



**HAL**  
open science

# Enjeux immunologiques liés à la grossesse, à propos de deux modèles : la transplantation utérine et l'infection à SARS-CoV-2

Marie Carbonnel

## ► To cite this version:

Marie Carbonnel. Enjeux immunologiques liés à la grossesse, à propos de deux modèles : la transplantation utérine et l'infection à SARS-CoV-2. Chirurgie. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS521 . tel-04850261

**HAL Id: tel-04850261**

**<https://theses.hal.science/tel-04850261v1>**

Submitted on 20 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.

# Sorbonne Université

Ecole doctorale ED394

*Laboratoire CIMI-Paris /*

*Equipe de recherche : Immunité, infection et cancer des cellules NK et T*

## **Enjeux immunologiques liés à la grossesse, à propos de deux modèles : La transplantation utérine et l'infection à SARS-CoV-2**

Par Marie CARBONNEL

**Thèse de doctorat d'immunologie**

Co-dirigée par le **Pr Jean-Marc AYOUBI** et le **Dr Vincent VIEILLARD**

Présentée et soutenue publiquement le 19/12/2023

Devant un jury composé de :

**Dr Sophie BROUARD**, DR, Rapporteur

**Dr Nabila JABRANE-FERRAT**, DR, Rapporteur

**Dr Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN**, DR, Présidente du jury

**Pr Alexandre HERTIG**, PUPH, Examineur

**Pr Olivier THAUNAT**, PUPH, Examineur

**Pr Jean Marc AYOUBI**, PUPH, Directeur

**Dr Vincent VIEILLARD**, DR, Directeur



<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>11</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>14</b>
<b>Le système immunitaire</b> .....	<b>15</b>
<b>1) L'immunité innée</b> .....	<b>16</b>
a) Barrière superficielle : la peau et les muqueuses .....	16
b) Les principales cellules de l'immunité innée.....	17
- Les macrophages.....	17
- Les cellules dendritiques .....	18
- Les polynucléaires neutrophiles.....	20
- Les cellules NK.....	21
<b>2) L'immunité adaptative</b> .....	<b>23</b>
a) Immunité humorale .....	23
b) Immunité cellulaire .....	24
<b>Enjeux immunologiques de la grossesse</b> .....	<b>26</b>
<b>1) L'Utérus</b> .....	<b>26</b>
a) Description anatomique .....	26
b) Endomètre et cycle menstruel.....	27
<b>2) Implantation et formation du placenta</b> .....	<b>29</b>
<b>3) L'interface materno-foetale</b> .....	<b>31</b>
a) Le placenta : anatomie et rôle .....	31
b) La tolérance foetale .....	33
c) Les cellules de la décidue .....	36
d) Rôle des cellules NK déciduales durant la grossesse. ....	39
<b>4) Les complications de la grossesse</b> .....	<b>40</b>
a) Fausses couches à répétition et défaut d'implantation.....	40
b) Prééclampsies et défaut de placentation .....	41
c) Complications infectieuses .....	43
<b>La transplantation</b> .....	<b>45</b>
<b>1) Généralités en greffes d'organes</b> .....	<b>45</b>
a) Bases immunologiques des différentes formes de rejet .....	45
b) Les traitements immunosupresseurs .....	51
c) Impact du microbiote sur la greffe d'organe .....	56
d) La grossesse chez les patientes greffées.....	56
e) Le cas particulier des greffes de tissus composites (hors greffes utérines).....	58
<b>2) La transplantation utérine</b> .....	<b>60</b>
a) Principes.....	60

b) La sélection .....	62
c) Etat des lieux .....	65
d) Le traitement immunosuppresseur .....	67
e) Les signes de rejet .....	68
f) La FIV et le déroulement des grossesses .....	71
g) Les risques des immunosuppresseurs et l'explantation .....	72
h) La première transplantation utérine Française .....	73
i) Enjeux immunologiques de la transplantation utérine.....	75
<b><i>L'infection à SARS-CoV-2.....</i></b>	<b>77</b>
1) Infection à SARS-CoV-2.....	77
2) NK et SARS-CoV-2.....	78
3) L'infection à SARS-CoV-2 chez la femme enceinte.....	80
a) Effets chez la mère.....	80
b) Effets chez le foetus .....	81
<b><i>Objectifs .....</i></b>	<b>83</b>
<b><i>Résultats.....</i></b>	<b>86</b>
<b><i>Article 1: Immunological biomarkers associated with rejection after uterus transplantation in the humans.....</i></b>	<b>87</b>
<b><i>Article 2: First in depth longitudinal immune analysis of a successful Uterus Transplantation in Human. ....</i></b>	<b>141</b>
<b><i>Article 3: Plasticity of natural killer cells in pregnant patients infected with SARS-CoV-2 and their neonates .....</i></b>	<b>168</b>
<b><i>Discussion.....</i></b>	<b>182</b>
<b><i>Particularités Immunitaires dans le rejet en transplantation utérine.....</i></b>	<b>183</b>
1) Les TLS en transplantation utérine .....	183
2) Macrophages dans le rejet et potentiels biomarqueurs .....	185
3) La transplantation utérine : Un VCA à part .....	189
<b><i>Rejet et infection .....</i></b>	<b>192</b>
1) Effets de l'infection sévère sur le rejet .....	192
2) Microbiote vaginal, infections et immunité innée.....	193
<b><i>L'interface materno-fœtale .....</i></b>	<b>195</b>
1) Immunomodulation des cellules immunitaires et de la production en cytokines dans le sang maternel et le sang de cordon : le rôle des oestrogènes.....	195
2) Comment expliquer les cas qui « échappent » : à propos de notre mort fœtale in utero dans l'étude MATERCOV et de notre prééclampsie chez la patiente greffée françaises .....	197
<b><i>Perspectives.....</i></b>	<b>199</b>
<b><i>Bibliographie .....</i></b>	<b>204</b>

<b>Annexes – .....</b>	<b>214</b>
<b>Annexe 1 : Article publié sur le cas de la première transplantation utérine française(109) .....</b>	<b>214</b>
<b>Annexe 2 : article “Impact de la COVID-19 sur les thromboses placentaires infracliniques et les facteurs maternels thrombotiques » (147) .....</b>	<b>222</b>
<b>Table des illustrations .....</b>	<b>235</b>
<b>Table des tableaux.....</b>	<b>237</b>

# Remerciements

## A mes directeurs de thèse,

Tout d'abord, je tiens à remercier mon chef de Service et co-directeur de thèse, le **Pr Jean-Marc Ayoubi** car sans vous, rien de tout cela n'aurait été possible ! A commencer par la transplantation utérine en France, dont vous êtes l'initiateur et l'investigateur principal. J'ai adoré faire partie de ce projet, de le voir grandir et se concrétiser, alors que rien n'était gagné au départ. Votre ténacité dans ce projet nous permet d'être aujourd'hui leaders en France. C'est très inspirant pour moi. Je vous remercie également pour votre soutien dans le difficile chemin de la carrière universitaire et plus largement votre soutien au quotidien dans le service depuis plus de 10 ans. Vous avez rendu enfin ma thèse possible, en appuyant ma demande au sein de la fondation Foch et de la chaire de transplantation pour les protocoles MARNI et MATERCOV, en croyant et en accompagnant ces projets. Votre bonne relation avec le Pr Brännström m'a permis également d'avoir accès à de précieux échantillons et d'étendre MARNI en Suède, ce qui est indispensable pour la suite. Pour votre confiance, votre soutien, vos conseils, votre enthousiasme, vos qualités de chef, MERCI !

Je remercie le **Dr Vincent Vieillard**, Co-directeur de ma thèse. Vous m'avez accueillie dans votre service avec beaucoup de bienveillance. Vous avez toujours su vous montrer disponible et à l'écoute pendant ces 4 années. Vous m'avez accompagnée et poussée à aller au bout de mes analyses. Vous m'avez appris entre autres la patience, la démarche scientifique, la rigueur mais aussi la créativité en sciences. Vous ne m'avez jamais fait peser mes lacunes en immunologie ni mon statut de médecin, ce qui fait que je me suis sentie acceptée dans votre laboratoire et que à mon tour, j'ai attrapé le virus : Celui de la recherche ! J'espère continuer au-delà de ma thèse à travailler en recherche translationnelle, au carrefour entre les chercheurs fondamentaux et la clinique. J'espère aussi continuer à travailler avec vous et avec votre équipe sur les sujets passionnants du rejet dans la transplantation utérine, de l'interface materno-fœtale et bien d'autres encore !

## Aux membres du jury,

Je remercie mes 2 rapporteurs **les docteurs Sophie BROUARD** et **Nabila JABRANE-FERRAT** d'avoir accepté cette tâche chronophage et de venir jusqu'à Paris pour ma soutenance. Votre expertise sur le rejet de greffe et l'interface materno-fœtale seront un réel apport pour ma réflexion et mes travaux.

Je remercie le **Pr Alexandre Hertig** d'avoir accepté d'être examinateur. Vous avez repris le flambeau du Pr Snanouj à Foch et je vous remercie pour votre accompagnement dans le suivi de notre deuxième patiente greffée et d'avance pour les suivantes. Votre intérêt pour la transplantation utérine mais également la mise en place d'un registre des grossesses chez les patientes greffées d'organes (le projet CRISTEL), et votre expertise sur la prééclampsie seront d'un grand apport pour mon travail. J'espère également pouvoir continuer à collaborer avec vous en clinique et en recherche à Foch.

Je remercie le **Pr Olivier Thauinat** d'avoir accepté d'être examinateur. Votre expertise en transplantation et en structures lymphoïdes tertiaires sera très intéressante pour discuter de mes résultats.

Je remercie le **Dr Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN**, d'avoir accepté d'être examinateur, alors que la date avait déjà été définie et que je devais modifier mon jury un peu en catastrophe ! Vous avez été d'une grande aide pour la mise en place de notre premier protocole Hyperion™. Vous nous avez également aidés à mieux comprendre les mécanismes des structures lymphoïdes tertiaires qui sont votre spécialité. Notre collaboration, soit directe soit par le biais de votre élève **Marylou Panouillot** a toujours été agréable et enrichissante. Votre expertise sera d'un grand apport dans ce travail.

#### **A l'équipe du CIMI,**

Merci à **Veronique Morin** et des doigts de fée en biologie moléculaire, tu m'as beaucoup aidée dans tout ce travail de thèse ! Merci à **Nadine Tarantino**, tu maîtrises la cytométrie en flux comme un horloger maîtrise le montage délicat des montres. Tu as dû avoir quelques sueurs froides, quand il a fallu démarrer les manip hyperion™ sur des échantillons très précieux. Mais



comme Véronique, tu as été toujours été très efficace ! Merci à vous deux pour votre aide capitale dans les projets, votre bonne humeur et votre gentillesse.

Merci à **Rima Zoorob**, ma belle-mère et brillante maitre de conférences en génétique du CIMI. C'est toi qui m'as poussée à aller travailler dans cette unité, sur le modèle humain et non plus animal. Tu avais mille fois raison à la fois sur le modèle et le lieu. Un grand Merci. Tes conseils en génétique m'ont été également très profitables.

Merci aux autres membres du CIMI que j'ai croisés sur ma route et qui m'ont apporté leur aide : **Assia Samri**, le **Pr Brigitte Autran**, le **Dr Amelie Guilhot**, mes collègues le **Dr Marine Baron**, le **Dr Baptiste Abbar**, **Lisa Dejancourt**. La tradition du Jeudi midi va me manquer ! Merci au **Dr Martin Larsen** et au **Dr Remy Villette**. Vous m'avez sensibilisée à l'impact du microbiote. Vous avez toujours été très accessibles, motivés et professionnels. Force est de constater que le microbiote vaginal est altéré dans la greffe utérine sur nos analyses préliminaires. Je suis pressée de continuer notre collaboration.

Merci à la plateforme de l'ICM en particulier **Yannick Marie**, son responsable et **Justine Gueguan** qui s'est occupée de l'analyse bioinformatique du RNAseq.

Merci à la plateforme CyPS, pour l'analyse Hyperion™, en particulier à **Maxime Petit** pour son analyse et ses doubles compétences en bioinformatique et immunologie qui ont été un réel atout, **Aurélien Corneau** pour la mise en place des panels, son enthousiasme et sa gentillesse, **Angélique Vinit** pour son aide dans l'obtention des résultats et les analyses, sa réactivité et sa bienveillance.

### **A l'équipe de Foch,**

C'est un peu ma deuxième maison et j'y suis heureuse depuis plus de 10 ans ! Malgré les difficultés qui ont pu emmailler parfois ces nombreuses années et notamment la crise COVID, je m'y suis toujours sentie en sécurité pour moi et mes patientes. J'y ai même accouché de 2 de mes enfants avec beaucoup de sérénité ! J'apprécie la qualité des soins prodigués à tous, sans dépassement d'honoraires, le travail pluri-professionnel, l'émulation, la dynamique de recherche, la gentillesse et le dévouement de la plupart des professionnels. Merci au directeur de l'établissement, **Jacques Léglise**, pour son soutien dans notre pratique au quotidien et son

appui pour des projets de recherche innovants comme celui de greffe utérine. Merci à la **fondation Foch** pour son soutien financier dans les différents projets de recherche.

Merci à l'équipe de la DRCI, pour son aide dans les projets MARNI, MATERCOV, et bien sûr greffe utérine. Merci au **Dr Elisabeth Hullier-Amar**, directrice de la DRCI, pour votre dynamisme et votre soutien indispensable dans l'initiation et la réalisation de ces projets de recherche. Merci à **Florence Couppey**, chef de projet, pour ton aide et ton investissement dans les différents projets, ta patience et ta pugnacité au grès des différents amendements et exigences (ANSM, CCP...) C'est toujours un plaisir de travailler avec toi. Merci à **Assia Ghaouti**, de nous avoir aidé dans l'initiation du projet greffe utérine. Merci à l'irremplaçable **Mathilde Le Marchand**, attachée de recherche, non seulement tu es liée à ces projets et en particulier à la greffe utérine, mais tu as su te rendre indispensable ! Ta rigueur, ta bonne humeur, ta présence au quotidien sont précieux ! Merci également aux autres personnes impliquées cœur et âme dans ce projet de greffe utérine, **Fabienne Juster**, qui forme un binôme efficace avec Mathilde, **Flavie Barret**, **Michelle Lejaille**, Merci à l'équipe du centre de recueil biologique : les techniciens, **Marine Largeau**, **Emanuel Roux**, merci de m'avoir aidée dans la mise en place et la réalisation de la bio-collection de MARNI et MATERCOV. Je remercie Le **Pr Renaud Snanoudj** Vous avez été là au début du projet de transplantation utérine à Foch, vous nous avez aidés à monter le protocole sur la partie des immunosuppresseurs, vous avez suivi notre première patiente greffée avec beaucoup d'attention. Vos conseils m'ont aidée à initier le protocole MARNI. Je vous remercie également pour la collaboration dans le projet FERGYTRANSPLANT, autour du désir de grossesse chez les patientes greffées d'organes. J'espère que notre collaboration continuera au sein de Paris Saclay.

Merci à **La chaire de transplantation** qui a financée mon travail de thèse sur la greffe utérine avec en particulier le **Pr Edouard Sage** et le **Pr Antoine Magnan**. Merci au **Pr Vasse** et au **Dr Farfour** pour leur collaboration dans MATERCOV. Merci à toutes les sages-femmes qui m'ont aidé dans la collection des échantillons de MATERCOV. Merci à l'équipe d'anatomopathologie, en particulier aux **Dr Camélia Radulescu** et au **Dr Morgan Tourne**. C'est une véritable collaboration qui s'est installée entre nos services, votre apport a été indispensable pour la transplantation utérine, MARNI et MATERCOV. Pour le temps passé, votre expertise, votre enthousiasme, votre gentillesse et votre professionnalisme, Merci !

Merci à tous les cliniciens qui se sont occupés des patientes greffées, Le **Pr Morgan Leguen**, en anesthésie, les infirmiers anesthésistes, les Infirmières de bloc opératoire dont **Norma Al Sassiya**, **Camille Hollier-Larousse**, **Cecile Friedman**, ma collègue le **Dr Aurélie Revaux**, le **Pr Marine Poulain**, le **Dr Pirtea** en AMP, Le **Dr François Mellot** pour l'imagerie, le **Dr Sarah Vanlieferinghen** pour le suivi anténatal, le **Dr Yves Coatantiec** pour le côté pédiatrique et **Léa Karpel** pour le suivi psychologique. La liste est trop longue pour que je puisse citer tout le monde, veuillez m'excuser pour les oublis ! Merci au **Pr Pierre-François Ceccaldi**, mon voisin de bureau, tu as toujours été à mon écoute et tu m'as motivée quand le moral était en berne. Merci enfin au **Pr Catherine Racowsky**, vous m'avez appris la rigueur, l'écriture scientifique, un peu l'anglais aussi, tout en étant généreuse et lumineuse ! Vous êtes un modèle pour moi, et vous m'avez aidée à franchir une marche. Grace à vous j'ai inventé un mot, la « Racowskyfication », et j'aimerais que tous mes articles le soient. Merci à ma deuxième « maman » en gynécologie, **Lydia Scemama**, ton dynamisme, tes connaissances et l'amour de ton métier m'inspirent au quotidien. Merci à mes collègues dont beaucoup sont devenus des amis solides au cours des années. Je ne peux tous les citer mais je tiens à remercier en particulier **Hind Abbou**, **Stephanie Fay**, **Flore Berruet** et **France Cimier**.

#### **A l'équipe Suédoise,**

Merci aux **Pr Mats Brännström**, au **Pr Pernilla Dahm-Kähler**, au **Dr Niclas Kvarnstrom**. Vous avez ouvert la voie dans la transplantation utérine avec une démarche scientifique de grande qualité. Vous nous avez aidés dans la mise en place de la transplantation utérine en France et nous continuons à collaborer ensemble avec bonheur et j'espère encore pour longtemps. Merci au **Dr Randa Akouri**, au **Dr Johan Mölne**, au **Dr Verena Bröcker**, pour la collaboration sur le rejet de greffe, votre participation à MARNI et les précieux échantillons de mon étude rétrospective. Nous n'avons pas fini de travailler ensemble !

#### **A l'UFR de Médecine de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines Paris SACLAY,**

Je suis fière d'être admise parmi vos enseignants en tant que maître de conférences. Je remercie particulièrement l'ex-doyen le **Pr Djillali Annane** d'avoir soutenu ma candidature. Je

remercie le **Pr François Vialard et le Dr Pascal Chavatte-Palmer** de m'accepter dans leur laboratoire et pour leur soutien ainsi que tous les membres de **BREED Rhuma** avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

### **A mes étudiants,**

C'est en partie parce que j'aime vous encadrer dans la réalisation de projets que j'ai choisi la voie universitaire. Vous m'apprenez autant que je vous apprend. J'espère surtout vous avoir transmis l'envie d'aller toujours un peu plus loin et de se dépasser.

A celles qui ont travaillé sur MATERCOV, le **Dr Camille Daclin** pour ta thèse de Médecine, **Olivia Groiseau** pour ton Master 2, **Camille Reiss** pour ton Master 1, **Marie Ducroux** pour ta licence, vous avez été toutes géniales et je suis fière de vous.

A celles qui ont travaillé auparavant sur le modèle animal dans la transplantation pour leur Master 2, le **Dr Angéline Favre-Inhofer**, Le **Dr Nathalie Cornet** et Le **Dr Claire Le gal**, Merci, ce fut un plaisir d'encadrer vos travaux ! Et je remercie également tous les autres qui ont travaillé sur d'autres thématiques et que je ne peux citer.

A mes futurs étudiants, en particulier à **Zakhia El Beaino**, mon futur thésard sur le rejet dans la greffe utérine. C'est ta candidature qui m'a donnée envie de continuer pour pousser les recherches et avancer sur MARNI. Pour cet avenir, que je souhaite stimulant, je te remercie.

### **Aux patientes,**

A **Déborah Berlioz**, la première patiente française ayant bénéficié d'une greffe utérine. Cette aventure, c'est aussi la vôtre. Avec Misha et Maxine, vous pouvez être fière du chemin accompli. Que d'impossibles franchis ! Aux patientes greffées suédoises et françaises qui ont permis ces analyses possibles, aux témoins, aux patientes de l'essai MATERCOV, Merci !

### **A ma famille et mes amis,**

Merci à la **Mafia Suresnoise** des jeudis et des autres jours, vous êtes toujours là pour partager sans juger et se soutenir. A **Emily Cormerais**, merci pour cette belle amitié qui résiste au temps

et à la distance. A **Mouna** et **Sofiane**, notre amitié m'est précieuse. A mes frères : **Thomas et François**. Ça a toujours été simple entre nous, je suis une grande sœur comblée. François, tu as ouvert la voie universitaire et tu continueras à l'ouvrir devant moi avec succès, j'en suis sûre. Thomas, ton bon sens est toujours un guide quand je perds le sens des priorités. A mes **beaux-parents**, **A mes parents**, Merci ! Je remercie **mon beau-père**, ta gentillesse et ton courage dans l'adversité sont un exemple à suivre. Je remercie **mon père**, tu as toujours été un modèle dans ta passion pour la médecine et la chirurgie. Je remercie **ma mère**, tu es mon Nord et mon Sud. Pragmatique et toujours de bon conseil, tu es là pour moi au quotidien, encore aujourd'hui ! A ma cousine, **Anne**, la distance ne coupera jamais notre lien indéfectible. A mon grand-père **Panou**, à ma grand-mère **Manou**, votre souvenir est toujours gravé en moi.

A **Alexandre**, Mon Mari, à qui je fais des excuses pour toutes les heures de travail qu'il a subi. Je sais que ton amour me pardonne et sois assuré du mien. Sans toi, je n'aurai jamais pu envisager une carrière universitaire, la cerise sur le gâteau. Le gâteau, nous l'avons construit ensemble, c'est cette belle famille qui est le moteur de nos vies.

Enfin à mes enfants, **Lélio**, **Gabriel** et **Paul**, vous êtes et resterez ma plus belle réussite.

## Liste des abréviations

Ac : anticorps

Ag : antigène

ACE2 : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine 2

ADCC : Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps

ARN : Acide ribonucléique

CD-X : Cluster de Différenciation-X

cDC : Cellules Dendritiques Classiques

CDC : Cytotoxicité par activation du Complément

CIVD : Coagulation intra vasculaire disséminée

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

COVID : Maladie à Coronavirus 2019

CTL : Lymphocytes T Cytotoxiques

DC : Cellules Dendritiques

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

dNK : NK déciduales

DSA : Anticorps anti HLA dirigés contre le Donneur

EBV : Epstein Barr Virus

EGF : Facteur de Croissance de l'Epiderme

EVT : Trophoblaste Extra Villeux

FCS : Fausses Couches Spontanées

FIV : Fécondation In Vitro

G : Gestité

GPA : Grossesse Pour Autrui

HB-EGF : Heparin Binding-Epithelial Growth Factor

HELLP : syndrome associant hémolyse, cytolyse et thrombopénie

HLA : Human Leucocyte Antigen

HSV : Herpes Simplex Virus

IDO : Indoleamine-2,3-Dioxygénase

IFN : Interféron

IGF-1 : Facteur de Croissance- 1 Insulin-like

IL : Interleukine

ILT2 : Ig-Like Transcript 2

IV : Intraveineux

J : Jour

KIR-L : Killer-cell Immunoglobulin-like Recepteurs

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

LT : Lymphocytes T

LTh : Lymphocytes T auxiliaires

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MHC : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

MMP : métalloprotéases matricielles

MRKH : le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser

NFAT: Facteur Nucléaire des LT Activés

NK : Natural Killer

NKG2-X : Natural Killer group 2 X

P : Parité

pDC : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes

PE : Prééclampsie

PRR : Récepteurs de Reconnaissance de formes

ROS : Reactive Oxygen Species

SA : Semaines d'aménorrhée

SARS-CoV-2 : Coronavirus 2 du Syndrome Respiratoire Aigu

SDRA : Syndrome sévère de Détresse Respiratoire Aigüe

SOT : Transplantation d'Organes Solides

TCR : Récepteurs des Cellules T

TLS : Structures Lymphoïdes Tertiaires

TNF : Facteur de Nécrose Tumoral

TORCH : Toxoplasmose, Others, Rubéole, Cytomégalovirus humain, Herpes virus

Treg : T régulateurs

TU : Transplantation Utérine

VCA : Vascularized Composite Allograft

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor



# Introduction

# Le système immunitaire

Le système immunitaire sert à nous défendre contre les agressions extérieures. Ce dernier comprend un ensemble de cellules, tissus, organes lymphoïdes, facteurs humoraux et cytokines qui agissent afin de défendre le corps contre les menaces potentielles, mais également pour réparer les tissus, maintenir l'homéostasie et cohabiter avec les micro-organismes bénéfiques du microbiote.

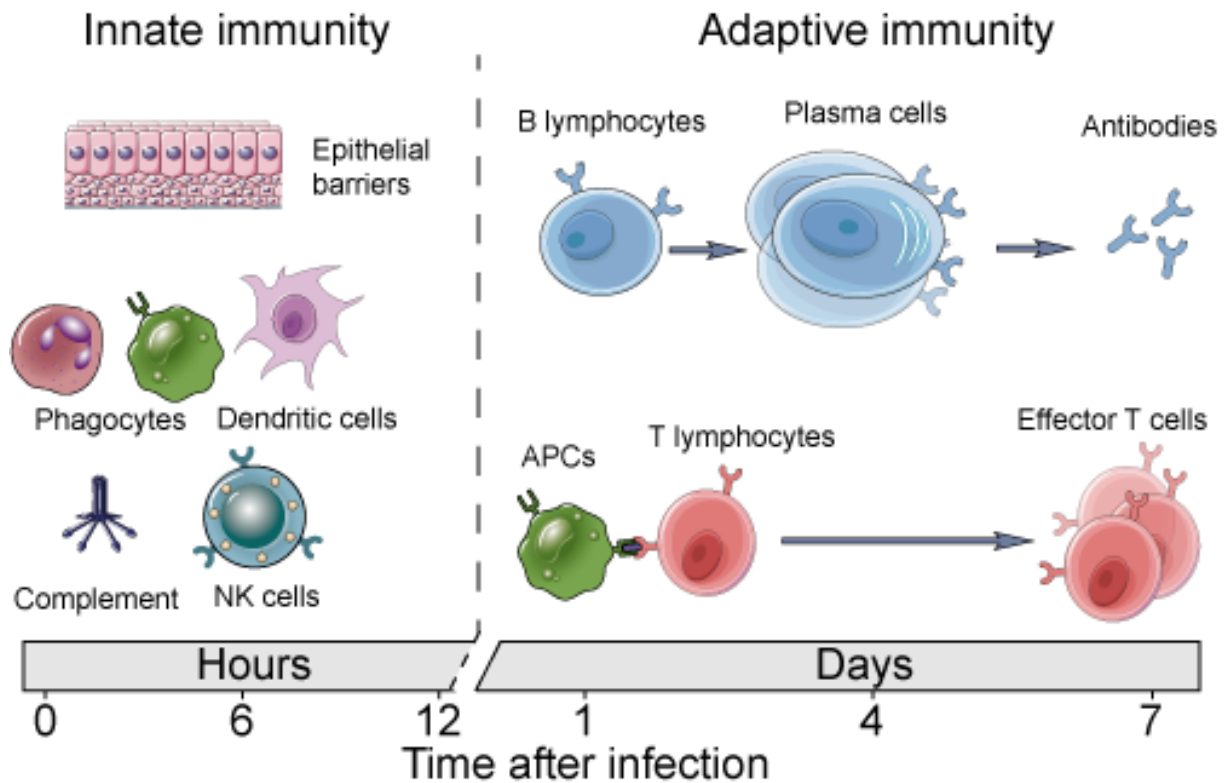
Schématiquement, l'homme a deux systèmes de défense inter-dépendants qui lui permettent de lutter contre le « non soi » ou le « soi modifié » :

**L'immunité innée.** C'est une succession de réponses simples et immédiates qui permettent d'éliminer rapidement des agresseurs extérieurs. Cette réponse "immédiate" repose sur la digestion (phagocytose) instantanée des "intrus" dans le cadre d'une intense réponse inflammatoire de défense. Elle implique des barrières physiques (épithélium...), des composés circulants de défense (interférons de type 1, molécules du complément, ...) et différentes cellules comme les cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, macrophages...), les cellules dendritiques, les cellules Natural Killer (NK) ... Cette immunité innée est déclenchée par divers différents types de stress incluant des infections microbiennes.

**L'immunité adaptative.** Elle est à médiation cellulaire, spécifique de l'agent pathogène. Elle se met en place progressivement et supplémente la réponse innée induite en premier lieu. Elle repose sur la capacité des lymphocytes T et B à répondre de façon adaptée à toute agression.

Aujourd'hui, la frontière entre immunité innée et adaptative tend à s'amenuiser car certaines cellules de l'immunité innée ont des fonctions adaptatives et inversement (1). La **figure 1** résume les 2 mécanismes.

Cette rapide revue n'a pas pour but d'être exhaustive mais d'apporter différents éléments qui ont été nécessaires dans les différentes études qui ont été réalisées.



**Figure 1 : Echelle de temps de l'immunité innée et adaptative.**

APC : cellule présentatrice d'antigène. Issu de <https://www.creative-diagnostics.com/innate-and-adaptive-immunity.htm>

## 1) L'immunité innée

### a) Barrière superficielle : la peau et les muqueuses

La première ligne de défense de l'organisme est constituée par la peau et les muqueuses ainsi que par les sécrétions que ces dernières produisent. Cette première ligne de défense est hautement efficace. Tant que l'épithélium kératinisé de l'épiderme est intact, il forme une barrière physique redoutable bloquant l'entrée à la plupart des microorganismes qui fourmillent sur la peau. La kératine résiste aussi à la plupart des acides et des bases faibles ainsi qu'aux enzymes bactériennes et aux toxines. Les muqueuses en bon état fournissent une protection semblable à l'intérieur du corps. Les muqueuses tapissent toutes les cavités corporelles qui s'ouvrent sur l'extérieur : le tube digestif, les voies respiratoires et urinaires ainsi que le système génital. Outre leur fonction de barrières physiques, ces épithéliums produisent diverses

substances chimiques protectrices. Par exemple, l'acidité des sécrétions cutanées et vaginales (pH de 3 à 5) inhibe la croissance bactérienne. Le mucus, une sécrétion collante, qui emprisonne un grand nombre de microorganismes. Par ailleurs, la peau et les muqueuses abritent une flore bactérienne commensale qui limite les bactéries étrangères de s'y installer ; la tâche de ces membranes est particulièrement complexe car, en plus d'avoir à distinguer entre ce qui est étranger à l'organisme et ce qui ne l'est pas, elles doivent aussi reconnaître et tolérer les microorganismes utiles.

## **b) Les principales cellules de l'immunité innée**

### **- Les macrophages**

On distingue les monocytes circulants des macrophages résidents dans les tissus, dont l'origine embryologique est différente (2). Les macrophages résidents sont à l'état d'homéostasie dans certains organes « fermés » comme l'épiderme (cellules de Langerhans), les poumons (cellules de Kupfer), les villosités choriales placentaires (cellules de Hofbauer). Ces cellules expriment le CD68 et le CD14 à leur surface. Elles éliminent les polynucléaires neutrophiles apoptotiques, les cellules mortes et les débris cellulaires par phagocytose, favorisant ainsi la résolution des processus inflammatoires. Les monocytes/macrophages sécrètent des quantités très importantes de cytokines (10 à 100 fois plus que les polynucléaires neutrophiles (PNN)). Au cours d'une réponse inflammatoire, les monocytes gagnent les tissus quelques heures après les PNN, dont ils partagent les mécanismes de migration par diapédèse. Les monocytes/macrophages reconnaissent les pathogènes via les PRRs (pathogen recognition receptors), les récepteurs pour les dérivés du complément et les récepteurs des fragments Fc des immunoglobulines. Les monocytes et les macrophages sont, comme les cellules dendritiques et les lymphocytes B des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), capables de charger un antigène sur le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I mais également de classe II et de stimuler les lymphocytes T CD4+ et CD8+(3).

En fonction de leur environnement, les macrophages peuvent schématiquement se polariser de 2 façons : vers une forme « inflammatoire » M1 (sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires de type Interferon gamma (IFN- $\gamma$ )) ou une forme « anti-inflammatoire » like M2 (sécrétion de cytokines anti-inflammatoires sous l'influence d'Interleukines (IL-4 et IL-

13)). Les M1 sécrètent des facteurs inflammatoires qui attaquent directement les tissus ou activent les cellules endothéliales et induisent une réponse T cytotoxique (4). On retrouve des taux élevés de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL3 produits par les M1 macrophages activés (5), qui expriment notamment HLA-DR et CD16(6).

S'il est bien établi que l'activation de l'immunité innée favorise la réponse adaptative, le concept émergent est celui d'un modèle inverse dans lequel le système immunitaire adaptatif détecte des antigènes spécifiques pour ensuite activer l'immunité innée afin d'augmenter encore les réponses allo-réactives. Les cellules T CD4+ sont essentielles pour que les macrophages naïfs acquièrent la capacité de s'activer. Elles reconnaissent les anticorps et participent ainsi à l'immunité acquise. Il a été rapporté que les macrophages pouvaient rejeter des cellules tumorales cibles via la voie perforine/granzyme B (7) qui est généralement reconnue comme la voie effectrice prédominante employée par les cellules NK et les cellules T CD8+ pour tuer les cellules cibles (8). Les macrophages impliqués dans la réponse adaptative pourraient être principalement des M2, car ils produisent 6 fois plus de granzyme-B que les M1 et ont une diminution du HLA-DR (9, 10).

Si les M2 sont connus pour être « anti-inflammatoires », ils contribuent également à la réparation des tissus en produisant des métallo protéinases matricielles qui permettent le renouvellement de la matrice extracellulaire. Leur production peut être dans certaines situations, excessive et entraîner une fibrose (11). C'est le cas dans les sepsis par exemple (9, 10). Il a été récemment démontré qu'une polarisation M2 peut être induite par des pathogènes bactériens et associée à l'évolution chronique de maladies infectieuses (11).

#### - Les cellules dendritiques

Il existe 4 types de cellules dendritiques (DC) : 3 types de DC dites myéloïdes, et un type dérivé des monocytes. Les DC font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (12).

- **DC myéloïdes (mDC)**

Elles comportent les DC conventionnelles ou classiques (cDC) de type 1 et de type 2, et les DC plasmacytoïdes (pDC). Les cDC, (CD45+/HLADR+/CD11c+ chez l'homme) sont considérées comme les CPA professionnelles : elles peuvent présenter les antigènes, sécréter

de grandes quantités d'IL-12, expriment des molécules de co-stimulation et disposent donc de toutes les caractéristiques nécessaires pour activer des Lymphocytes T (LT). Les cDC de type 1 (CD141+, CXCR1+, CLEC9A+) ont la capacité de capturer les cellules nécrotiques ou apoptotiques et de cross-présenter des antigènes aux LT CD8+ lors des réponses antivirales ou anticancéreuses (13). Les cDC de type 2 (CD1c+) présenteraient préférentiellement les antigènes aux LT CD4+. Les pDC, (CD11c-CD123high, chez l'homme) qui doivent leur nom à leur ressemblance morphologique avec des plasmocytes, ont la capacité de produire de grandes quantités d'IFN- $\alpha$  après activation et jouent donc un rôle clef dans la réponse antivirale.

- **DC dérivées des monocytes**

Les DC dérivées des monocytes ont un phénotype proche des cDC de type 2 (CD45+/HLADR+/CD11c+), elles ont un précurseur commun avec les macrophages, ainsi elles peuvent être CD14+ et/ou CD16+. Elles se différencient in situ à partir de monocytes recrutés sur le site de l'inflammation (12).

Les DC sont très nombreuses dans tous les tissus en contact avec le milieu extérieur, notamment au sein des épithéliums cutanéomuqueux. Leur recrutement est dépendant des chimiokines qui sont produites sur le site de l'inflammation par les cellules de l'immunité innée ou les cellules épithéliales. Les DC reconnaissent les microorganismes grâce à des PRR (dont les Toll Like Recepteurs). Après un contact avec l'agent infectieux ou stimulation par des cytokines inflammatoires, les DC immatures capturent les antigènes reconnus par différents mécanismes (endocytose, macropinocytose ou phagocytose). L'internalisation de l'antigène est un processus propre aux DC immatures qui diminue au cours de leur maturation. Pendant leur activation, les DC interagissent avec d'autres effecteurs de l'immunité présents sur le site (PNN, NK...). En fonction de ces interactions et de l'environnement cytokinique, les DC entrent dans un programme spécifique de maturation induisant au final différents types de réponses T. Les DC orchestrent donc les différents acteurs de l'immunité et font ainsi le relai entre la réponse innée et la réponse adaptative. Les DC matures expriment à leur surface de grandes quantités de molécules du CMH et des molécules de co-stimulation dédiées à la présentation de l'antigène. Grâce à leur propriété de migration au cours de la maturation, les DC font le lien entre la périphérie (site de l'inflammation) et les organes lymphoïdes secondaires. Après

activation, les DC quittent ainsi les tissus inflammatoires et entrent dans la circulation lymphatique vers les ganglions lymphatiques de drainage. Les DC matures délivrent alors aux LT les signaux d'activation, de prolifération et de différenciation qui leur sont nécessaires. L'interaction DC-LT implique la reconnaissance du peptide par le récepteur T (TCR) associé au complexe CD3, les molécules du CMH, les molécules de costimulation et les molécules d'adhésion. Les DC activent et régulent ainsi la réponse immunitaire en polarisant les LT vers la voie de différenciation la plus adaptée à l'agression. Une interaction avec des DC matures est nécessaire pour une survie à long terme des LT et leur différenciation en cellules mémoire.

#### - **Les polynucléaires neutrophiles**

Les PNN sont des cellules myéloïdes dont le noyau est polylobé et le cytoplasme riche en granulations (14). Chez l'homme, elles sont définies par la présence de CD66b et CD15 à leur surface et une granularité importante. Les PNN sont généralement négatifs pour CD11c (CD11c-) et positifs pour le CD11b (CD11b+). Le rôle des PNN est d'éliminer le plus rapidement tous les intrus exogènes à l'organisme, ce qui implique une réponse immédiate aux facteurs d'attraction (chimiokines sécrétées par les cellules endothéliales, mastocytes et macrophages) et une migration rapide dans les tissus infectés (diapédèse). La reconnaissance des cibles et l'activation se font grâce à des PRR. Parallèlement à son activation, le PNN engage automatiquement un processus de mort programmée, qui va être retardé par de nombreux facteurs présents au cours du processus inflammatoire (G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-4, TNF- $\alpha$  à faibles concentrations...)(14). Une fois activé, le PNN va induire la phagocytose : il émet des pseudopodes englobant la cellule cible avant de l'inclure dans des vacuoles cytoplasmiques où elle passe par diverses étapes de dégradation et de digestion. La destruction des agents pathogènes phagocytés à lieu grâce à des mécanismes enzymatiques indépendants de l'oxygène (impliquant notamment la perforine, des granzymes et la myéloperoxydase) ou bien la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species »). Au-delà de leur fonction de phagocytose, les PNN jouent également un rôle de régulation de la réponse immune et du remodelage tissulaire. Les ROS produits dans le milieu extracellulaire modulent la signalisation intracellulaire et les fonctions des cellules présentes au site de l'inflammation comme la production de cytokines, les réponses prolifératives lymphocytaires et l'apoptose. L'IL-8, principale cytokine produite par les PNN, est responsable d'une

augmentation de la migration des PNN au site inflammatoire. Certains PNN sont porteurs d'immuno-récepteurs de type TCR dont l'activation permet d'augmenter leur survie et de stimuler la production d'IL-8. Les PNN contribuent aussi, par l'intermédiaire de la production de chimiokines telles que CCL3, CCL4, CCL5/RANTES et CCL20/MIP-3 $\alpha$ , à recruter et activer les DC et LT, permettant ainsi la mise en place de la réponse adaptative. L'utilité de cette fonction du PNN vis-à-vis d'un antigène spécifique est sa rapidité de réponse, permettant d'attendre le relais par la réponse classique des LT aux antigènes. En effet, les PNN sont les premières cellules infiltrant le foyer inflammatoire, et leur production de cytokines peut être déterminante à ce stade précoce de la réponse immunitaire innée. Après élimination de l'agent pathogène, la réponse inflammatoire s'autolimit, avec une diminution du nombre des PNN, la suppression de leur activation, mais aussi de la production de protéines anti-inflammatoires, entraînant leur apoptose puis leur élimination par les macrophages.

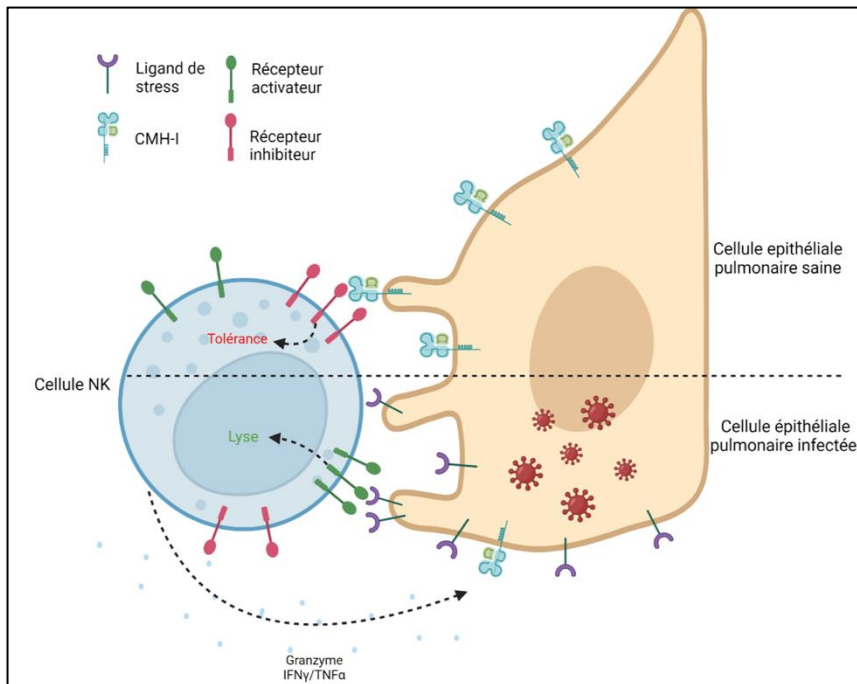
#### - Les cellules NK

Les cellules NK, CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>, sont de gros lymphocytes granuleux appartenant au système immunitaire inné. Elles représentent 5 à 15% des lymphocytes sanguins. Elles sont la première ligne de défense immunitaire antivirale et anti-tumorale (15). À l'inverse des lymphocytes T et B, elles agissent sans nécessité de primo-stimulation (16). En plus d'être des acteurs majeurs de la réponse innée antivirale, les cellules NK sont capables de réguler la réponse immunitaire adaptative, ce qui leur confère un rôle critique dans la modulation et le maintien de l'homéostasie du système immunitaire (17). Elles se divisent en deux sous-populations majoritaires, les cellules NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> qui représentent 90 % des cellules NK du sang périphérique et qui ont principalement une activité cytotoxique directe (sécrétion de perforine et granzymes) et d'ADCC (cytotoxicité médiée par des anticorps), puis les cellules NK CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> qui représentent 10 % des cellules NK périphériques, qui sont plus immatures, mais produisent des quantités plus importantes de cytokines (l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ ) (18). Il existe également d'autres populations que l'on retrouve dans les tissus et les organes lymphoïdes comme les NK décíduales (dNK).

Les principales fonctions des cellules NK reposent sur une balance entre récepteurs inhibiteurs et activateurs : Les récepteurs inhibiteurs (par exemple KIR-Ls, NKG2A et ILT-2) reconnaissent des molécules de CMH de classe I (CMH-I) exprimées à la surface des cellules.



Lors d'un stress cellulaire (cas d'une infection virale), la cellule infectée va généralement diminuer l'expression de ses molécules de CMH-I et augmenter l'expression de molécules de stress. Ces ligands de stress sont reconnus par les récepteurs activateurs (NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D, NKG2C) exprimés à la surface des cellules NK. Dans ce cas, la balance penche du côté de l'activation de la cellule NK ce qui amène à la libération des granules cytotoxiques. Ceux-ci comprennent de la perforine qui va créer des trous dans la cellule cible, et permettre ainsi à des granzymes d'entrer dans la cellule cible pour entraîner son apoptose. En parallèle, la cellule NK sécrète des cytokines inflammatoires telles que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  qui vont permettre le recrutement d'autres cellules de l'immunité. Le TNF- $\alpha$  joue aussi un rôle dans la cytotoxicité de la cellule NK (17) (**figure 2**). Parallèlement, les cellules NK sont activées par certaines cytokines comme les IFN de type 1, l'IL-12, l'IL-18 et l'IL-15 produites pas les cellules dendritiques et les macrophages, mais également sécrétées par certaines cellules infectées (19).



**Figure 2 :** Schéma représentant le fonctionnement d'une cellule NK et la balance entre les récepteurs activateurs et inhibiteurs.

Les récepteurs inhibiteurs permettent la tolérance de la cellule cible par leurs liaisons aux molécules de CMH-I présentes sur les cellules saines, en absence de reconnaissance de ligands de stress. Les récepteurs activateurs permettent la lyse de la cellule infectée via leurs liaisons à des ligands de stress qui se trouvent en proportions supérieures par rapport aux molécules de CMH-I. L'activation fonctionnelle de la cellule NK passe par la production de perforine et de granzyme qui vont permettre la lyse de la cellule infectée, ainsi que par la production des cytokines telle que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (mémoire de M2 d'Olivia Groiseau : « Projet Matercov, caractéristiques de cellules Natural Killer à l'interface materno-foetale pendant la COVID-19 »)

## 2) L'immunité adaptative

L'immunité adaptative est la ligne de défense de l'organisme hôte qui arrive dans un deuxième temps. Elle se distingue en deux catégories : l'immunité humorale et l'immunité cellulaire.

### a) Immunité humorale

L'immunité humorale comporte principalement les anticorps (Ac) produits par les plasmocytes. Chaque anticorps reconnaît une région spécifique d'un antigène (Ag). Une large diversité de molécules (protéines, carbohydrates, lipides) peuvent être ciblées et neutralisées par des Ac spécifiques. Les Ac sont présents dans les muqueuses où ils empêchent les pathogènes et diverses molécules microbiennes, comme des toxines, d'accéder à l'intérieur de

l'hôte. Ils sont aussi présents dans la circulation où ils peuvent neutraliser les Ag et déclencher une réponse cytotoxique (ADCC pour antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), ou l'activation des phagocytes via leurs récepteurs membranaires (FcR) qui reconnaissent les domaines Fc des Ac, conduisant à la phagocytose et la destruction des cibles.

## **b) Immunité cellulaire**

En parallèle à l'immunité humorale existe l'immunité cellulaire qui repose sur les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) et les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+). Les premiers sont des régulateurs de la réponse immunitaire et les seconds sont capables de détruire les cellules infectées ou tumorales de manière spécifique à l'antigène. Il est également important que plusieurs autres sous-types de lymphocytes T (LT) ont été mis en évidence, comme les TFSH, TH17, TH22... Les LT CD4+ et CD8+ s'activent via des récepteurs spécifiques (TCR) qui reconnaissent des Ag protéiques exposés sur les molécules MCH I/II des cellules dendritiques. Le récepteur TCR en interaction avec les molécules MCH I/II qui présentent des Ag, induisent des signaux de prolifération aux lymphocytes, qui se multiplient avant d'être libérés dans la circulation. Une fois dans la circulation, ils peuvent être recrutés sous l'effet des chimiokines dans les sites inflammatoires. Les LT CD4+ recrutées vont alors sécréter des cytokines pro-inflammatoires (ex.  $TNF\alpha$ , IL-2,  $IFN\gamma$ ) qui peuvent induire la réponse immunitaire (activation cellulaire) et donner aux LT CD8+ les signaux nécessaires pour devenir cytotoxiques et attaquer directement les cellules infectées ou tumorales (**figure 3**). Ce qui caractérise l'immunité adaptative est la mémoire. Après une infection et donc une première exposition antigénique des lymphocytes (réponse immunitaire primaire), l'activation de ces derniers donne naissance à des cellules à durée de vie longue (pool de cellules mémoires) qui sont spécifiques des Ag rencontrés. Dans le cas d'une deuxième rencontre avec ces mêmes Ag, ils déclenchent une réponse plus rapide et plus efficace (réponse immunitaire secondaire). Parmi les lymphocytes CD4+, on retrouve les LT régulateurs (Treg), qui se distinguent des autres LT par l'expression spécifique de CD25 et FoxP3. Les Treg ont comme fonction la suppression ou la résolution des réponses immunitaires, via l'expression et la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs (comme CTLA-4, CD39, CD73, IL-10,  $TGF\beta$ ). Leur rôle comme cellules régulatrices de la réponse immunitaire les rend essentielles pour éviter des réponses auto-immunes et, plus généralement, pour le maintien de l'homéostasie immunitaire.

TABLE 2-2 Lymphocyte Classes						
Class	Functions	Antigen Receptor and Specificity	Selected Phenotype Markers	Percentage of Total Lymphocytes*		
				Blood	Lymph Node	Spleen
<b><math>\alpha\beta</math> T Lymphocytes</b>						
CD4 <sup>+</sup> helper T lymphocytes	B cell differentiation (humoral immunity) Macrophage activation (cell-mediated immunity) Stimulation of inflammation	$\alpha\beta$ heterodimers Diverse specificities for peptide–class II MHC complexes	CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>-</sup>	35–60 <sup>†</sup>	50–60	50–60
CD8 <sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes	Killing of cells infected with viruses or intracellular bacteria	$\alpha\beta$ heterodimers Diverse specificities for peptide–class I MHC complexes	CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD8 <sup>+</sup>	15–40	15–20	10–15
Regulatory T cells	Suppress function of other T cells (regulation of immune responses, maintenance of self-tolerance)	$\alpha\beta$ heterodimers Specific for self and some foreign antigens (peptide–class II MHC complexes)	CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> (most common, but other phenotypes as well)	Rare	10	10
NKT cells	Suppress or activate innate and adaptive immune responses	$\alpha\beta$ heterodimers Limited specificity for glycolipid–CD1 complexes	CD56, CD16 (Fc receptor for IgG), CD3	5–30	Rare	10
$\gamma\delta$ T lymphocytes	Helper and cytotoxic functions (innate immunity)	$\gamma\delta$ heterodimers Limited specificities for peptide and nonpeptide antigens	CD3 <sup>+</sup> , CD4 and CD8 variable	Rare	Rare	Rare
<b>B Lymphocytes</b>						
Follicular B cells	Antibody production (humoral immunity)	Surface Ig Diverse specificities for many types of molecules	Fc receptors, class II MHC, CD19, CD23	5–20	20–25	40–45
Marginal zone B cells	Antibody production (humoral immunity)	Surface Ig Limited specificities for a restricted set of molecules	IgM, CD27	2–3	3–5	7–10
<p>This table summarizes the major properties of the lymphocytes of the adaptive immune system. Not included are NK cells and other innate lymphoid cells, which are discussed in Chapter 4.</p> <p>*The percentages are approximations, based on data from human peripheral blood and mouse lymphoid organs.</p> <p><sup>†</sup>In most cases, the ratio of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> to CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> is about 2:1.</p> <p><i>Ig</i>, immunoglobulin; <i>MHC</i>, major histocompatibility complex.</p>						

**Figure 3 : Les sous populations immunitaires de l'immunité adaptative (20)**

# Enjeux immunologiques de la grossesse

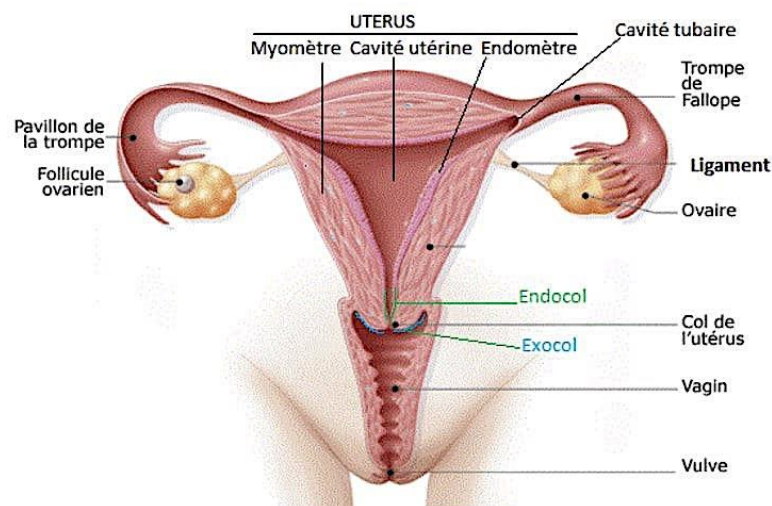
La grossesse est associée à de nombreux changements permettant le développement du fœtus. Parmi ceux-ci, on peut identifier les modifications utérines permettant la nidation puis l'implantation et la mise en place du placenta se situant à l'interface materno-fœtale. Des adaptations immunologiques accompagnent ces changements afin de tolérer le fœtus qui est semi-allogénique. Des anomalies immunologiques ou environnementales (infections, ...) au cours de la grossesse peuvent impacter le bon déroulement de celle-ci ainsi que le bien-être du fœtus.

## 1) L'Utérus

### a) Description anatomique

L'utérus fait partie du tractus génital féminin (**figure 4**). Il est sensible aux hormones sexuelles. Il va amplifier jusqu'à 10 fois son volume pour pouvoir accueillir l'embryon durant toute la grossesse. La paroi utérine est composée de l'endomètre, un épithélium glandulaire très vascularisé ; le myomètre et la séreuse. L'endomètre est composé de deux couches : la couche fonctionnelle et la couche basale en contact avec le myomètre. Le myomètre est composé de fibres musculaires lisses. Il sera responsable des contractions utérines. La séreuse est composée de tissus conjonctifs lâches et de nombreux vaisseaux lymphatiques. Point de communication entre l'utérus et le vagin, le col de l'utérus mesure environ 3 centimètres de long et comprend deux parties : une partie haute, appelée endocol ou canal endocervical, située du côté du corps de l'utérus ; une partie basse, appelée exocol. Situé du côté du vagin, l'exocol est visible à l'œil nu lors de l'examen gynécologique.

Grâce aux glandes de sa muqueuse, le col de l'utérus sécrète en permanence un mucus, appelé glaire cervicale. Celle-ci permet la lubrification du vagin et constitue une barrière de protection de l'utérus contre les infections. Le col de l'utérus joue aussi un rôle important lors de la grossesse et de l'accouchement. Pendant la grossesse, il est contracté pour maintenir le fœtus à l'intérieur de l'utérus. Le col de l'utérus est entièrement recouvert d'une muqueuse, composée d'un tissu de surface appelé épithélium et d'un tissu conjonctif en profondeur. La frontière entre les deux tissus est appelée membrane basale. Au niveau de l'endocol, l'épithélium contient des glandes qui produisent un mucus (épithélium glandulaire). Au niveau de l'exocol, l'épithélium est semblable à celui de l'épiderme de la peau (épithélium malpighien).

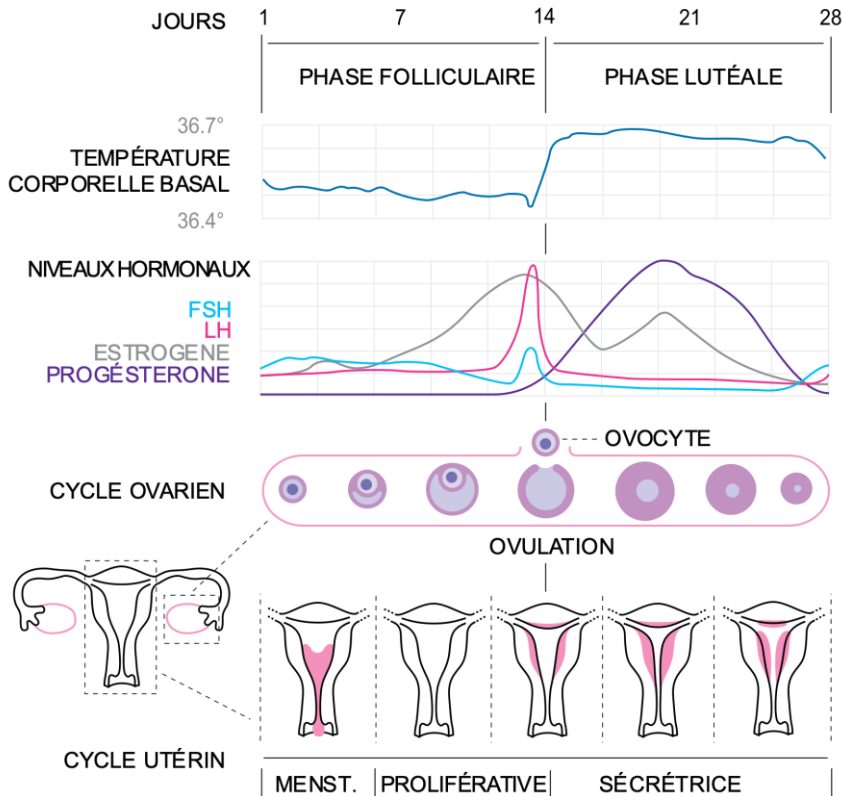


**Figure 4: coupe frontale de l'utérus et des annexes** issu de <https://microbiologiemedicale.fr/appareil-genital-feminin/>

### **b) Endomètre et cycle menstruel**

Chez la femme, le cycle menstruel dure 28 jours. Il est sous la dépendance des gonadotrophines hypophysaires FSH et LH et des hormones sexuelles œstrogène et progestérone produite par

les ovaires. Le cycle se découpe en deux phases : la phase folliculaire et la phase lutéale (**figure 5**). Durant la phase folliculaire, sous l'impulsion de la FSH, on observe une sélection et une croissance d'un follicule ovarien dominant. Celui-ci produit des œstrogènes qui vont permettre la croissance de l'endomètre. Ils stimulent la transcription de gènes codant pour différents facteurs de croissance tels que l'Epidermal Growth Factor (EGF) et l'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) ainsi que leurs récepteurs (21) qui participent à la prolifération cellulaire de l'endomètre. Arrivés à un certain taux, l'œstrogène déclenche un pic de LH entraînant l'ovulation qui se produit généralement au 14<sup>ème</sup> jour du cycle. Ensuite, le follicule devient un corps jaune qui va produire de la progestérone, alors que le taux d'œstrogène diminue, c'est la phase lutéale. La progestérone stimule les cellules épithéliales des glandes utérines. Par ailleurs, elle inhibe les récepteurs de l'œstrogène et la prolifération des cellules endométriales, qui s'engagent dans un processus de différenciation nommé décidualisation (22). La progestérone induit la sécrétion de différentes chimiokines nécessaires au recrutement immunitaire, indispensable à la tolérance maternelle (23). La progestérone induit la production de Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) qui permet le développement des cellules endothéliales des artères utérines. Les artères spiralées utérines se développent donc en parallèle. Durant la phase lutéale, la taille de l'endomètre est maximale pour accueillir le blastocyste. En l'absence de fécondation, le corps jaune dégénère et la sécrétion de progestérone chute brutalement, entraînant la phase menstruelle avec la dégénérescence de l'endomètre et une vasoconstriction des artères utérines (24).



**Figure 5: cycle menstruel féminin** issu de [https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle\\_menstruel#/media/Fichier:Cycle\\_menstruel.svg](https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle_menstruel#/media/Fichier:Cycle_menstruel.svg)

## 2) Implantation et formation du placenta

Sept jours après la fécondation, le blastocyste atteint l'utérus pour l'implantation (25). L'implantation nécessite l'adhésion du blastocyste au tissu endométrial. C'est au cours de cette étape que les cellules du blastocyste se polarisent en une couche externe qui deviendra le placenta et une couche interne qui donnera l'embryon. L'endomètre doit être réceptif, c'est ce que l'on appelle la « fenêtre d'implantation », estimée entre 8 et 10 jours après la fécondation (26). Cela nécessite une synchronisation entre les tissus maternels et embryonnaires (27). Elle implique des molécules d'adhésion, des cytokines et des facteurs de croissance. L'apposition est la première phase de l'implantation, le blastocyste rentre en contact avec les cellules



endométriales. Cela est favorisé par la présence de protrusions cytoplasmiques, les pinopodes, situés à l'apex des cellules épithéliales (28). Ces pinopodes apparaissent sous l'effet de la progestérone (29) et sont associées à la suppression de molécules anti-adhésion (30). La phase suivante de l'implantation est appelée l'adhésion. Elle dépend de la croissance et de la différenciation des cellules trophoblastiques qui entourent l'embryon. L'adhésion est initiée par la sécrétion de Leukemia Inhibitory Factor (LIF), d'Intereukine-1 (IL-1) et d'Heparin Binding-Epithelial Growth Factor (HB-EGF). La liaison de ces ligands à leurs récepteurs induit l'expression de molécules d'adhésion cellulaires, de protéines membranaires et de protéines de la matrice extracellulaire (31). La dernière phase de l'implantation est la phase d'invasion. Les cellules trophoblastiques différenciées envahissent le stroma endométrial et favorisent le remodelage utérin principalement par leur activité protéolytique. Plusieurs enzymes participent à ce processus invasif. Les métalloprotéases matricielles (MMP-2 et 9 principalement) jouent un rôle majeur dans la modification de la matrice extracellulaire (MEC) en dégradant le collagène de type IV. Le phénomène est amplifié par l'apoptose des cellules épithéliales, la rupture des jonctions serrées de l'épithélium utérin et la dissociation des cellules endométriales (32). L'embryon pénètre dans l'endomètre jusqu'à enfouissement complet. L'implantation dépend du dialogue entre les cellules déciduales, immunitaires, vasculaires et trophoblastiques (33). Les cellules NK déciduales, notamment jouent un rôle important dans le contrôle de l'invasion trophoblastique (34).

Durant le premier trimestre de grossesse, les artères déciduales maternelles subissent également un important remodelage, des cellules trophoblastiques extra-villeuses s'y accumulent et réalisent des « bouchons trophoblastiques » qui obstruent l'ouverture des vaisseaux et bloquent l'entrée du sang maternel dans l'espace intervilloux de l'ébauche de

placenta, créant un environnement hypoxique nécessaire au développement du fœtus et du placenta (35). A la fin du premier trimestre, les cellules trophoblastiques extra-villeuses colonisent les parois des vaisseaux utérins et les bouchons se désagrègent (36). Le placenta se met en place. Les vaisseaux formés présentent une faible résistance et un fort débit sanguin, ce qui permet de favoriser l'afflux sanguin au fœtus (37).

### **3) L'interface materno-fœtale**

La grossesse se caractérise par la mise en place de l'interface materno-fœtale. Elle comprend les villosités placentaires flottantes qui baignent dans l'espace intervilloux contenant le sang maternel et la décidue qui sert d'ancrage du placenta (38).

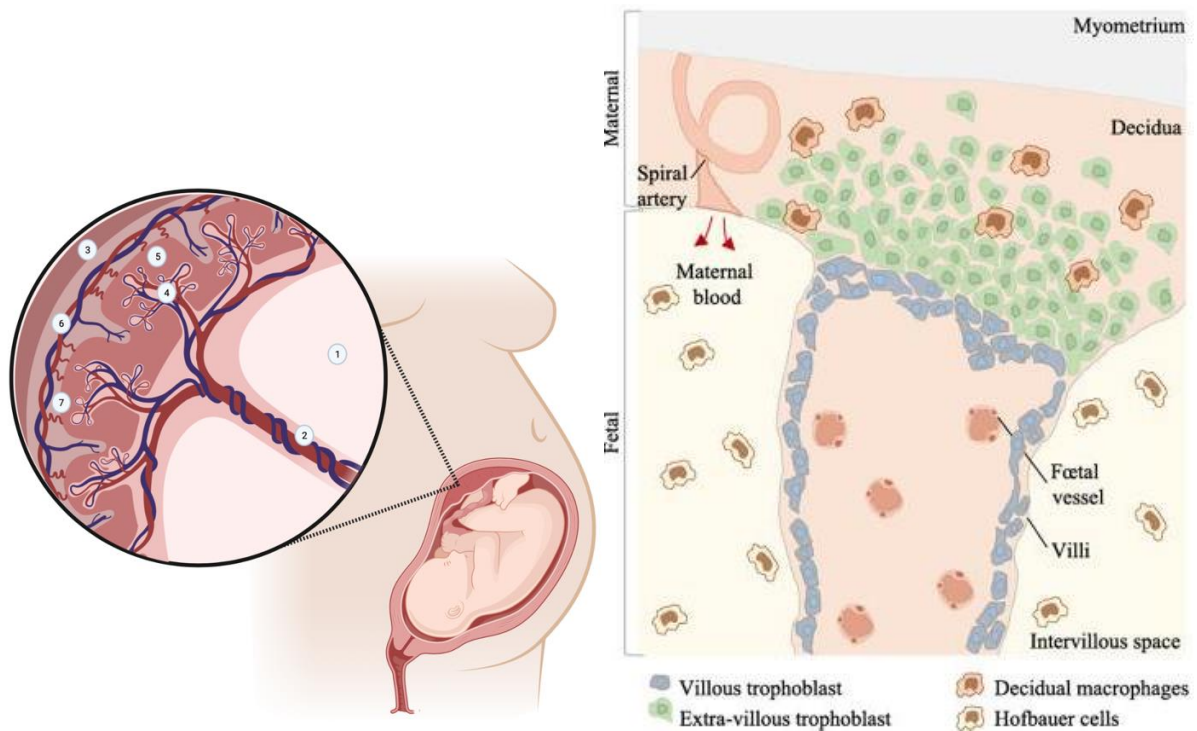
#### **a) Le placenta : anatomie et rôle**

Le placenta est un organe se trouvant à l'interface entre le fœtus et la mère. On peut distinguer deux zones dans le placenta (**figure 6**) :

- La face fœtale, aussi appelée chorion, qui permet l'apport en nutriments grâce à une importante vascularisation. Ces vaisseaux sanguins sont contenus dans des villosités choriales composées de deux couches cellulaires : cytotrophoblaste (couche interne avec des cellules cubiques) et le syncytiotrophoblaste (couche externe avec des cellules fusionnées). L'ensemble forme le trophoblaste dont les ramifications envahissent la décidue (trophoblaste extra villeux) et baignent dans la chambre intervillieuse afin de connecter la face fœtale et la face maternelle.
- La face maternelle (décidue ou muqueuse utérine) qui est formée par des cellules stromales et des cellules déciduales (cellules de l'endomètre modifiées suite à une stimulation hormonale oestro-progestative). Au sein de cette décidue, on trouve les vaisseaux maternels

(artères spiralées issues des artères utérines) qui se jettent également dans la chambre intervillieuse.

La fonction principale du placenta est l'échange de nutriments, de gaz et de substances nécessaires au soutien de l'embryon en développement. Les échanges gazeux et de nutriments sont permis grâce au contact indirect entre le sang fœtal et le sang maternel circulant dans la chambre intervillieuse (39). En effet, bien que des échanges aient lieu entre le sang maternel et le sang fœtal (sang de cordon ombilical) pour permettre le bon développement du fœtus, il est important de noter que les deux sangs n'entrent jamais en contact direct. Le placenta fait état de filtre qui laisse passer les petites molécules (< 500Da) telles que les cytokines ou les hormones, mais ne laisse pas passer les grosses molécules (> 1000Da) et les cellules (40). Il aide également à protéger le fœtus contre les infections et les maladies maternelles.



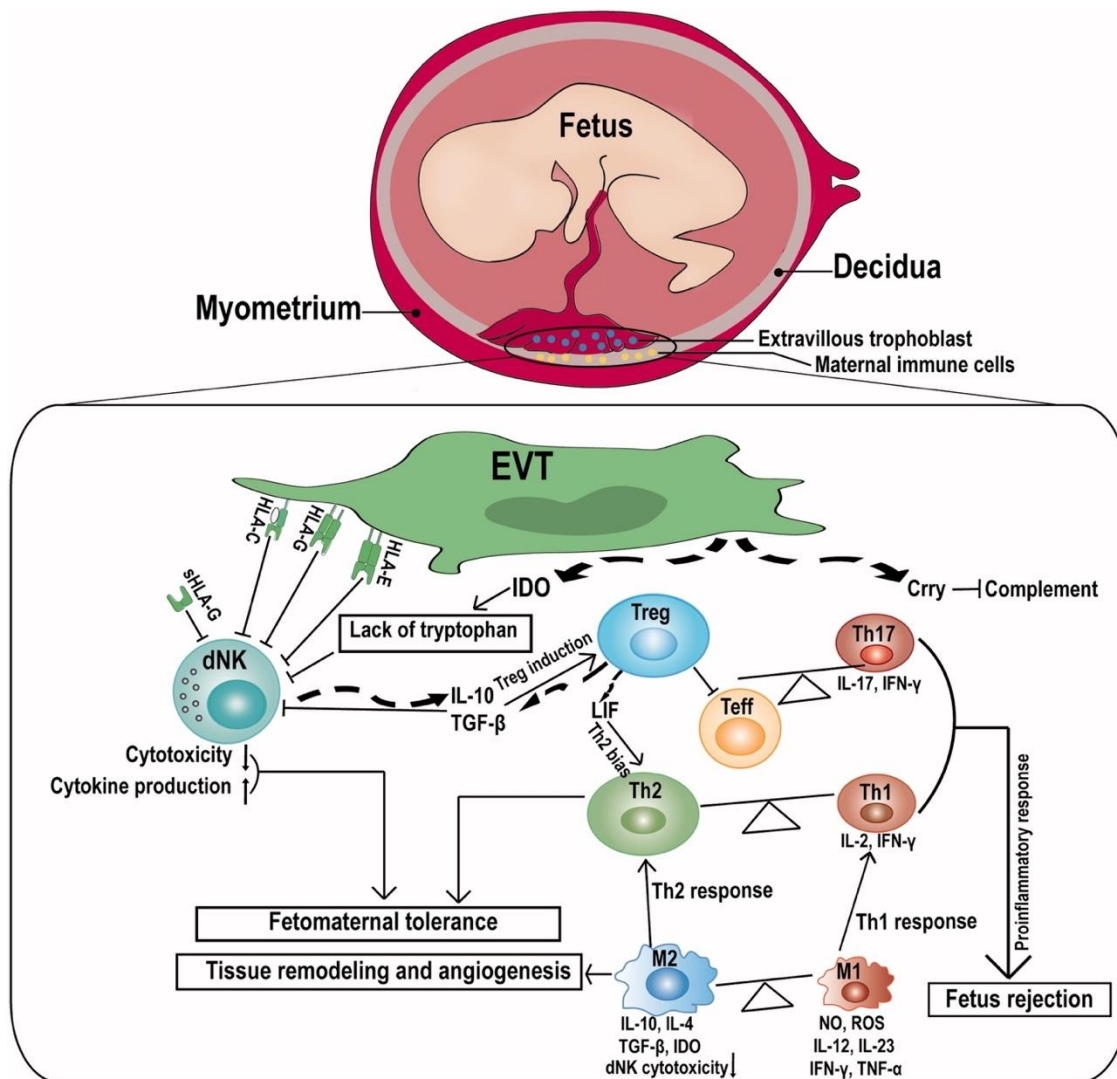
**Figure 6 : Schéma général du placenta : A droite vue macroscopique**

(1) liquide amniotique ; (2) cordon ombilical renfermant les artères fœtales ; (3) endomètre ; (4) veines fœtales renfermées dans les villosités choriales ; (5) chambre intervillieuse remplie de sang maternel ; (6) artères maternelles au sein de la décidue ; (7) veine spiralée maternelle au sein de la décidue qui récupère le sang de la chambre intervillieuse. (Figure issue du rapport de M1 de Camille Reiss « Evaluation des cellules NK placentaires dans le cas de la COVID-19 par la technologie hyperion »). **A gauche représentation microscopique de l'interface materno-fœtale** montrant la décidue, contenant les artères spiralées, envahie par le trophoblaste extra-villeux et les villosité trophoblastiques contenant les vaisseaux fœtaux, entre les deux se situe la chambre intervillieuse (41)

### **b) La tolérance foetale**

La grossesse est un processus immunologique particulier qui fait intervenir différents évènements modulant l'inflammation. Le bon déroulement de la grossesse requiert un état de tolérance immunologique vis-à-vis du fœtus semi-allogénique (42, 43). Cette tolérance materno-fœtale est possible grâce à différents mécanismes tels que l'expression d'une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1 propre au fœtus, appelée HLA-G, par les cellules trophoblastiques qui permet notamment d'inhiber l'activation des cellules

NK déciduales (dNK) en interagissant avec certains récepteurs inhibiteur : ILT-2 et KIR2DL4 (44) (**figure 7**). Cela diminue leur toxicité et induit une augmentation de cytokines agissant sur les lymphocytes T régulateurs (Treg) en orientant une réponse de type Th2. D'autres cellules sont impliquées dans la tolérance comme les macrophages M1/M2 et les cellules Th17. Les cellules NK périphériques diminuent en nombre et en fonctionnalité durant la grossesse avec un taux bas au troisième trimestre, ce qui semble également être une adaptation utile pour la survie fœtale (45). La tolérance fœtale est également régulée par la production des hormones suivantes (46) : La progestérone qui permet d'inhiber en partie la réponse immunitaire innée médiée par les macrophages et les cellules NK. L'œstradiol (famille des oestrogènes) qui à faible dose promeut la cytotoxicité des cellules NK. L'œstriol (famille des oestrogènes) produit spécifiquement lors de la grossesse qui permet de stimuler la production de cytokines anti-inflammatoires (telle que l'IL-5) et d'inhiber celle des cytokines pro-inflammatoires.



**Figure 7 : La réponse immunitaire pendant la grossesse dans la décidua. (47)**

L'expression de G dans l'interface materno-fœtale inhibent l'activation des cellules tueuses naturelles (dNK) de la décidua en interagissant avec certains récepteurs inhibiteurs. L'indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) sécrétée par les trophoblastes extravilloux (EVT) induit la dégradation du tryptophane pour inhiber l'activité des cellules dNK et induire la production de cytokines comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$  pour le maintien du fœtus et l'induction des Treg. Les Treg peuvent induire la réponse Th2 par le biais du LIF et supprimer l'activité des cellules T effectrices. Les cellules Th1 et Th17 produisent toujours des facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-2, l'IL-17 et l'IFN- $\gamma$ , qui contribuent au rejet du fœtus par l'hôte. L'équilibre des rapports Th2/Th1 et Treg/Th17 permet de créer un microenvironnement d'interface materno-fœtale approprié pour l'immunosuppression du fœtus. Les macrophages M1 et M2 affectent la réponse immunitaire et le remodelage de la structure des artères spiralées utérines en fonction de la production de cytokines. Les macrophages M2 induisent la réponse Th2 et les macrophages M1 induisent la réponse Th1 pour réguler la tolérance immunitaire.  $\perp$  : inhibition ;  $\rightarrow$  : induction ;  $\uparrow$  : sécrétion

### c) Les cellules de la décidue

La décidue est un tissu complexe, dynamique et hétérogène dont la fonction première est d'assurer l'ancrage du placenta. Elle contient la majorité des cellules immunitaires maternelles de l'interface avec le fœtus intervenant à la fois dans la tolérogénèse et dans la défense contre les pathogènes (**figure 8**). La composition évolue au fur et à mesure de la grossesse et des stimulations hormonales. On y retrouve notamment des macrophages (CD68+, CD14+). On différencie deux sous-populations de macrophages : les macrophages M1, « pro-inflammatoires » et les macrophages M2 dits « anti-inflammatoires » qui interviennent dans l'induction de tolérance ainsi que dans le remodelage tissulaire. Durant toute la grossesse, les macrophages représentent la deuxième population leucocytaire la plus importante (20 à 30% de tous les leucocytes lors du troisième trimestre) et la sous-population de macrophages M2 est la plus abondante dans la décidue, elle représente 70% des macrophages. Ces macrophages sont à différencier des macrophages résidents des villosités chorionales d'origine fœtales appelés cellules de Hofbauer (41). Celles-ci ont un profil plutôt M2-like.

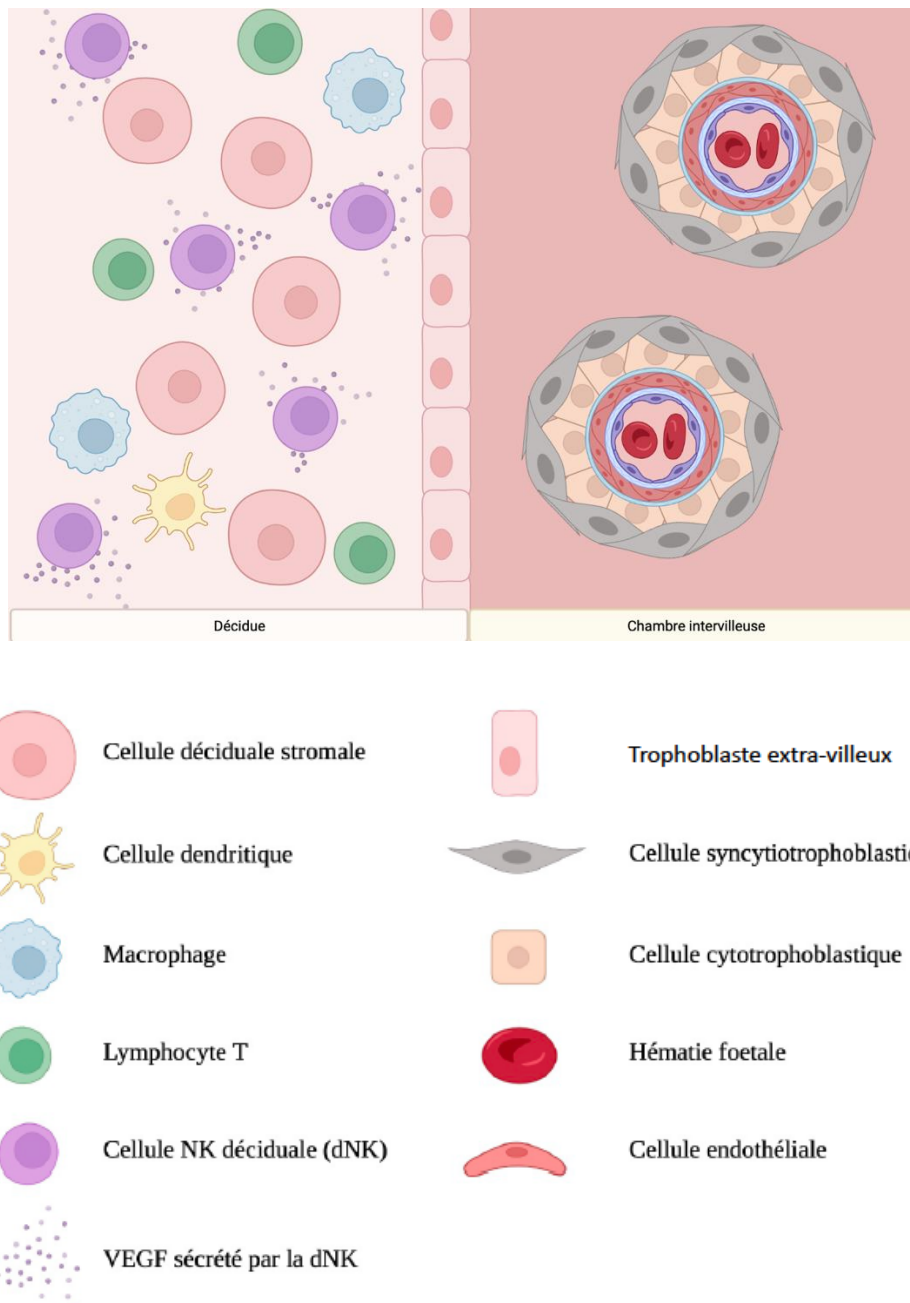
Des lymphocytes T sont également présents dans la décidue et représentent approximativement 20% des leucocytes. Certains lymphocytes T jouent un rôle dans l'invasion de l'endomètre par le trophoblaste ou encore dans la formation du placenta. Les lymphocytes T CD4+ (regroupant les Th1, Th2, Th17 et les Treg) représentent entre 30 et 45% de tous les lymphocytes T de la décidue. L'action des lymphocytes T effecteurs (Th1, Th2 et Th17) est fortement inhibée par les Treg afin d'éviter la reconnaissance et la lyse du trophoblaste fœtal qui envahit la décidue. Le mécanisme d'action des Treg reste pour le moment assez mal compris bien qu'il soit admis qu'une balance entre Th1/Th2/Th17 et Treg ainsi que la production de cytokines anti-inflammatoires (telles que l'IL-4 et l'IL-10) permette de maintenir la tolérance materno-fœtale.

Des lymphocytes cytotoxiques (CTL) sont également présents en grande quantité dans la décidue. Afin d'éviter toute lyse du trophoblaste qui pourrait avoir des conséquences graves pour la grossesse, les CTL de la décidue expriment plus fortement les récepteurs inhibiteurs Tim-3 et PD-1 que les CTL du sang périphérique. Le ligand de PD-1 (PDL-1) étant exprimé sur les cellules trophoblastiques cela permet la mise en place d'une tolérance spécifique de ce type cellulaire. Certaines études ont également démontré une expression réduite des protéines impliquées dans la cytotoxicité, comme la perforine et le granzyme B.

Les cellules dendritiques permettant de présenter l'antigène et sont peu décrites alors qu'elles doivent jouer un rôle important dans la régulation des lymphocytes T maternels activés. Les lymphocytes B sont absents du micro-environnement placentaire. Les fibroblastes représentent 10 à 30% des cellules de la décidue.

Enfin, les cellules NK représentent la majorité des lymphocytes retrouvés dans la décidue, au premier trimestre ils représentent 70% des leucocytes déciduaux, leur nombre diminue ensuite au deuxième et troisième trimestre (44).





**Figure 8 : Schéma du microenvironnement placentaire**

À gauche la décidue avec les cellules déciduales stromales et les différentes cellules immunitaires et à droite les villosités choriales baignant dans le sang maternel qui circule dans la chambre intervillieuse. (Figure issue du rapport de M1 de Camille Reiss « Evaluation des cellules NK placentaires dans le cas de la COVID-19 par la technologie hypérion).

#### **d) Rôle des cellules NK déciduales durant la grossesse.**

Les cellules NK sont présentes dans différents organes solides comme le thymus, le foie et l'utérus. Les NK déciduales (dNK) sont décrites dans de nombreuses études comme étant CD3-CD56+ CD16- (récepteur se liant à la partie constante d'un anticorps permettant d'activer la cytotoxicité médiée par les anticorps, ADCC) et représentent les cellules NK productrices de cytokines. En comparaison, 90% des cellules NK du sang périphérique possèdent le phénotype CD3-CD56+ CD16+. Ce shift phénotypique est dû à la stimulation par l'IL-5 des cellules progénitrices afin de produire des dNK.

Bien que la forte présence de cellules dNK puisse sembler surprenante, celle-ci a en réalité des effets positifs lors de la grossesse à tel point que les dNK jouent un rôle crucial dans son bon déroulement. Ceci a d'ailleurs été très bien décrit dans « *Killers become builders during pregnancy* » (48). En effet, les dNK sont une source de différentes molécules indispensables à la grossesse ; elles produisent par exemple les chimiokines IL-8 et IL-10 qui se fixent respectivement sur les récepteurs CXCR1 et CXCR3 exprimés par le trophoblaste afin de guider l'invasion de la décidue par celui-ci. Les dNK sécrètent également du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) en grande quantité, un facteur de croissance artériel indispensable lors du remodelage tissulaire de la décidue afin de permettre les échanges de nutriments entre la mère et le fœtus. D'autres facteurs de croissances tels que le G-CSF, GM-CSF et M-CSF sont également produits par les dNK qui participent au bon déroulement de la grossesse. Elles jouent également un rôle majeur dans la tolérance fœtale par les récepteurs aux HLA-G, qui diminuent sa cytotoxicité et augmentent la production de cytokines IL-10 et TGF- $\beta$  orientant les Treg vers une réponse Th2 (47).

Des cellules NK CD56+ CD16+ circulantes sont également présentes dans la décidue en faible quantité afin d'assurer toute réponse immunitaire rapide en cas d'infection par un pathogène (44).

#### **4) Les complications de la grossesse**

Des anomalies génétiques, immunitaires, métaboliques ou environnementales peuvent induire des défauts dans l'implantation pouvant amener à des anomalies pour l'embryon mais aussi le placenta (18,19).

##### **a) Fausses couches à répétition et défaut d'implantation**

Les fausses couches spontanées (FCS) surviennent dans 10% à 20% des grossesses et 80% surviennent au premier trimestre (49). Les fausses couches à répétition concernent la perte de 2 grossesses ou plus au premier trimestre, leur fréquence est plus rare (49). Il n'existe pas de définition standardisée pour les échecs d'implantation chez les patientes ayant des fécondations in vitro. On parle d'échec en l'absence de grossesse au bout de 2 à 3 FIV. De nombreux facteurs sont impliqués dans les causes des FCS et des échecs d'implantations en particulier des anomalies génétiques embryonnaires. Parmi les causes, on note également des facteurs immunologiques et des troubles d'origine auto-immune. Les fausses couches peuvent entre autres s'expliquer par un remodelage excessif des vaisseaux sanguins de la décidue en début de grossesse, associée à un stress oxydatif (50). L'entrée prématurée de sang maternel dans l'espace intervilloux perturbe l'interface materno-fœtale de manière irréversible. Une production dysfonctionnelle d'IFN- $\delta$  par les cellules NK pourrait être à l'origine de ce

remodelage excessif (51). 50% des causes de fausses couches à répétition restent encore inexpliquées (52).

### **b) Prééclampsies et défaut de placentation**

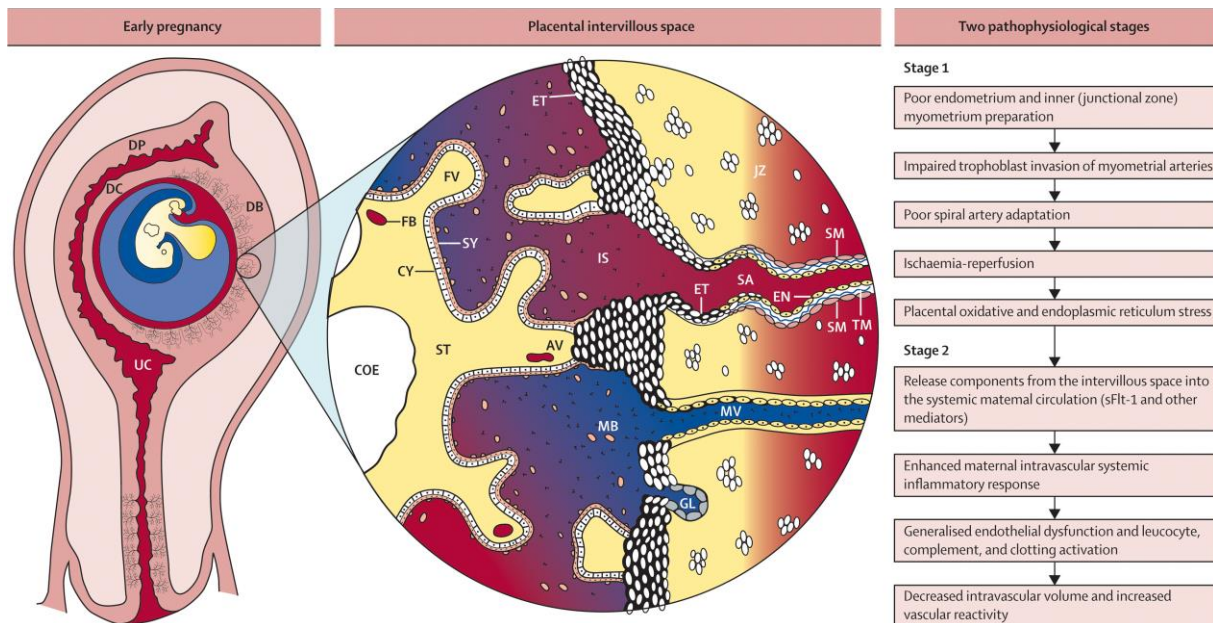
Les défauts de placentation peuvent entraîner des pathologies graves de grossesse. Une invasion excessive du trophoblaste peut entraîner une adhésion anormale du placenta dans le myomètre : c'est ce qu'on appelle le placenta accreta (53). Cette pathologie est associée à un risque majeur d'hémorragie à la naissance avec un taux de mortalité de 7%. Dans ce cas, une augmentation des facteurs pro-invasifs et pro-angiogéniques a été observée. La décidue perd sa capacité à limiter l'invasion trophoblastique, ce qui contribue à l'exacerbation de cette pathologie (54).

La prééclampsie (PE) est définie par la présence d'hypertension artérielle au cours de la grossesse associée à une protéinurie ( $>0,3\text{g/jour}$ ). Cette pathologie touche 2 à 8% des grossesses et est associée avec une importante morbidité (55). Elle peut se compliquer de lésions touchant différents organes : d'éclampsie (crise d'épilepsie), d'insuffisance rénale aiguë, d'œdème aigu du poumon, de retard de croissance intra-utérin, d'hématome retro placentaire, de complications hépatiques (HELLP syndrome associant hémolyse, cytolyse et thrombopénie ; hématome sous capsulaire du foie) et de troubles de la coagulation (de type CIVD : coagulation intra vasculaire disséminée). La physiopathologie de la prééclampsie est liée à une insuffisance de l'invasion de la décidue, en particulier la paroi des artères spiralées utérines, par le trophoblaste extra villositaire. Cela produit un défaut de remaniement de ces artères qui seront de plus faible calibre et avec une résistance plus importante (56) (**figure 9**). Ainsi, cela entraîne une ischémie placentaire et un stress oxydatif (57). Cette ischémie est responsable de retards de croissance intra-utérins, de morts fœtales in utero, alors que le stress oxydatif induit la

production de radicaux libres, cytokines et facteurs de croissance qui déclenchent une apoptose cellulaire placentaire. Des taux plus bas de HLA-G et HLA-E ont également été observés (58). Le dysfonctionnement placentaire entraîne le relargage de facteurs supplémentaires qui, libérés dans la circulation maternelle, entraîneront des lésions endothéliales. Parmi eux, On trouve des taux élevés d'un facteur anti-angiogénique : la tyrosine kinase 1 de type fms (sFlt-1), un récepteur soluble inhibiteur du VEGF et une diminution du PlGF (Placenta Growth Factor), un facteur angiogénique (59). L'augmentation du ratio sFlt-1/PlGF, témoigne d'une dysfonction endothéliale. Il est d'ailleurs utilisé comme biomarqueurs prédictif de la survenue de prééclampsie (60). L'apoptose trophoblastique entraîne une libération dans la circulation maternelle de débris apoptotiques qui activent l'inflammation de l'endothélium maternel.

Enfin, la prééclampsie serait liée à une modification dans la composition des cellules immunitaires à l'interface materno-fœtale avec une diminution des macrophages M2-like CD14<sup>+</sup> exprimant notamment de DC sign (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) ainsi qu'à une activation massive des macrophages M1-like et des dNK, qui produisent excessivement du TNF- $\alpha$  (61). D'ailleurs, on retrouve la primiparité (premier enfant du père) comme étant un facteur de risque. Ainsi, la prééclampsie peut être perçue comme une altération du système immunitaire maternel qui l'empêche de reconnaître et « tolérer » le fœtus.

L'ensemble de ces anomalies est responsable d'un dysfonctionnement endothélial associé à une hyperperméabilité vasculaire, une thrombophilie et une hypertension (57).



**Figure 9 : possibles processus physiopathologiques impliqués dans la prééclampsie (62)**

AV=anchoring villus. COE=coelomic cavity. CY=cytotrophoblast. DB=decidua basalis. DC=decidua capsularis. DP=decidua parietalis. EN=endothelium. ET=extravillous trophoblast. FB=fetal blood vessel. FV=floating villus. GL=gland. IS=intervillous space. JZ=junctional zone myometrium. MB=maternal blood, leaving the intervillous space with various components such as antiangiogenic factors. MV=maternal vein. SA=spiral artery. SM=smooth muscle. ST=stroma. SY=syncytiotrophoblast. TM=tunica media. UC=uterine cavity. sFlt-1=soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor

### c) Complications infectieuses

Les modifications immunitaires de la grossesse exposent la femme enceinte à une plus grande susceptibilité à certaines infections. On note une augmentation des infections urinaires et vaginales dans la très grande majorité des cas bénignes. Dans certaines situations cependant, un défaut de protection « cervicale » va être responsable d'une infection ascendante entraînant une infection de la poche des eaux appelée chorioamniotite. Cette infection entraîne quasi systématiquement un accouchement prématuré ou une fausse couche tardive en fonction du

terme malgré un traitement antibiotique bien conduit. Mal soignée elle peut entraîner une septicémie grave chez la mère. Elle peut être responsable également d'une infection fœtale et néonatale. Des ruptures prématurées de la poche des eaux, dont la physiopathologie n'a pas été clairement élucidée sont également des facteurs de risque de chorioamniotite. Une infection, à l'inverse, peut être responsable d'une rupture de la poche des eaux. Les études sont contradictoires sur l'évolution des macrophages placentaires en cas de choriomaniotites, certains les trouvent augmentés et d'autres diminués (41).

Quelques infections peuvent donner des infections congénitales lors de la transmission in-utéro d'un agent pathogène donné (virus, bactérie ou parasite) au fœtus (63). Cela peut compromettre le développement fœtal et entraîner des séquelles graves. L'acronyme TORCH (Toxoplasmose, Others, Rubéole, Cytomégalovirus humain, Herpes virus) fait référence à la principale famille d'agents pathogènes responsables d'infections congénitales associées à des maladies fœtales sévères (64).

Les femmes enceintes ont également un risque accru de complications liées à la grippe en raison de modifications du système immunitaire et de la fonction pulmonaire diminuée pendant la grossesse. La grippe peut entraîner des hospitalisations, des naissances prématurées et d'autres problèmes de santé chez la mère et le fœtus. La vaccination antigrippale est recommandée pour toutes les femmes enceintes.

Le cas particulier de l'infection par le SARS-CoV-2 qui a fait partie de mes travaux de recherche sera exposé ultérieurement.

# La transplantation

## 1) Généralités en greffes d'organes

### a) Bases immunologiques des différentes formes de rejet

Le rejet résulte d'une réaction inflammatoire qui endommage le tissu transplanté. Le système immunitaire adaptatif est le principal médiateur de ce mécanisme, et fait preuve de mémoire et de spécificité. Le rejet d'une greffe est principalement provoqué par une réponse immune cellulaire dirigée contre les allo-antigènes exprimés par les cellules du greffon. Ceux-ci sont représentés majoritairement par les complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC). Chez l'Homme, le MHC est nommé HLA (Human Leucocyte Antigen). Le rejet augmente de manière linéaire avec l'augmentation de l'âge du donneur et inversement avec la diminution de l'âge du receveur (65).

- **Le rejet hyperaigu :**

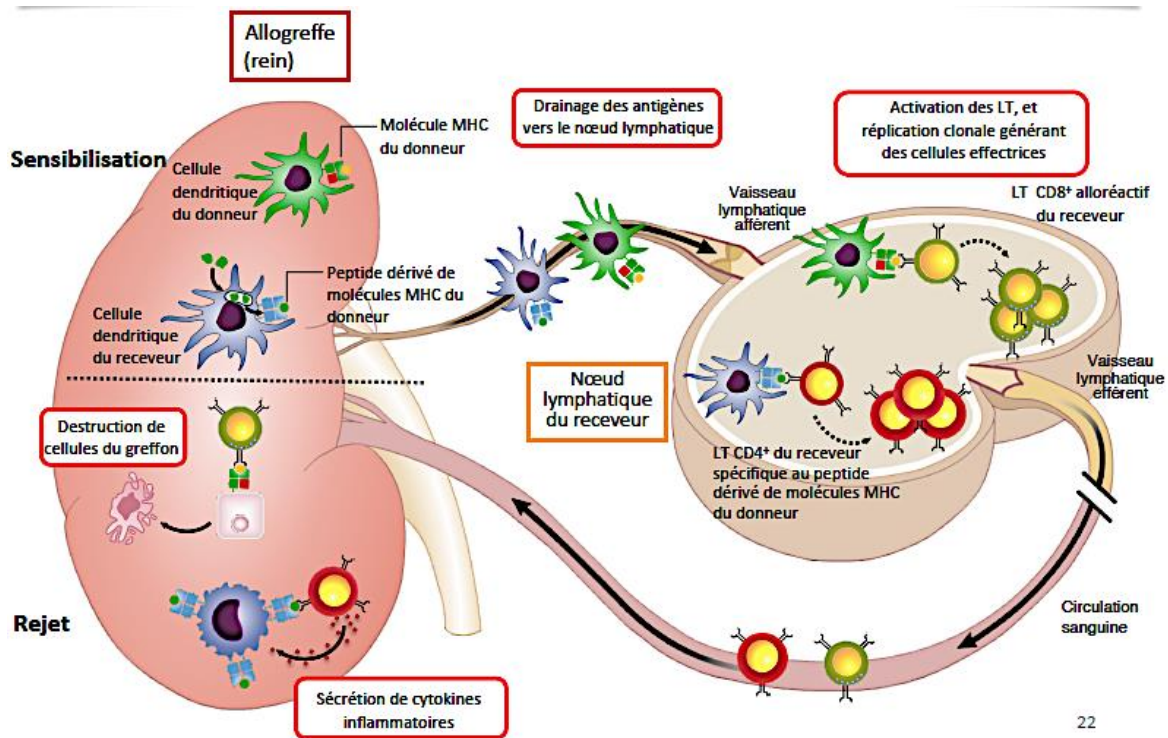
Il survient dans les heures qui suivent la transplantation. Ce type de rejet est essentiellement dû à des anticorps préexistants anti-ABO ou anti-HLA chez le receveur qui activent le complément et l'infiltration de neutrophiles qui induisent une réaction inflammatoire causant la destruction des parois endothéliales, la formation de thrombus et in fine, l'ischémie et la nécrose du greffon. Cette forme de rejet est devenue très rare grâce à une bonne sélection des receveurs et de leurs donneurs respectant la compatibilité ABO et la réalisation d'un test de compatibilité croisée négatif (lymphocytes du donneur et sérum du receveur).



- **Le rejet aigu :**

Il survient classiquement dans les 3 premiers mois de la transplantation. Le rejet aigu est le fait de deux mécanismes immunologiques qui peuvent agir seuls ou ensembles :

- **Le rejet à médiation cellulaire** qui est provoqué par la cytotoxicité de lymphocytes T (LT) CD8+ différenciés. Durant une phase de sensibilisation ; les cellules dendritiques (DC) du donneur (allo-reconnaissance directe) et du receveur (allo-reconnaissance indirecte) qui portent un peptide antigénique du greffon vont être reconnues par les LT CD8+ via leurs récepteurs de cellules T (TCR). Dans ce processus, les LT CD4+ seront également nécessaires pour apporter un signal de co-stimulation suffisant à l'activation des LT CD8+. Les contributions relatives des allo-reconnaissances directes et indirectes ne sont pas complètement comprises. La sensibilisation directe est probablement importante durant la phase aiguë et l'indirecte durant des phases plus tardives. Il est possible que la sensibilisation directe soit déclenchée par la nécrose des cellules du greffon, due à une phase ischémique initiale. La phase effectrice consiste en la destruction du greffon par les LT CD8+, et à la production de cytokines inflammatoires par les LT CD4+ qui entraîne une inflammation locale et l'activation des macrophages et neutrophiles entraînant des lésions tissulaires(66). L'alloreconnaissance directe et indirecte et la phase effectrice en cas de rejet est schématisée dans la **figure 10**.



**Figure 10** : Schéma montrant l'allorecognition directe et indirecte et la phase effectrice (inspiré d'Abbas, Basic immunology, 4eme édition)

- Le **rejet à médiation humorale** qui est occasionné par la présence d'anticorps anti-HLA dirigés contre le greffon. Dans ce type de rejet, c'est l'interaction entre le lymphocyte B et un LT CD4+ helper qui va activer la cellule B et sa différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Ces anticorps vont interagir avec le greffon en particulier au niveau des cellules endothéliales, pour former un complexe (antigène/anticorps) qui va entraîner une cytotoxicité par activation du complément (CDC) responsable d'une endothélite et à terme de rejet chronique. Il va également attirer les cellules phagocytaires de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles, cellules Natural killer, Eosinophiles). Alternativement, les anticorps peuvent se fixer via leur fragment Fc sur différents types cellulaires exprimant des récepteurs spécifiques

(CD16, CD32 ou CD64). C'est la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

Des organes lymphoïdes tertiaires peuvent se développer sur des sites non lymphoïdes dans les organes cibles des rejets d'allogreffes. Ils sont communément appelés structures lymphoïdes tertiaires (TLS)(67). Ces agrégats lymphoïdes vont d'amas de cellules B et T à des structures hautement organisées comprenant des centres germinaux fonctionnels. La présence de structures lymphoïdes ectopiques dans les tissus enflammés a été associée à des résultats à la fois protecteurs et délétères chez les patients. Des TLS ont été observés dans presque tous les types de greffons humains qui ont été prélevés en raison d'un rejet chronique, y compris les reins, les poumons, les cœurs et même les greffes de tissus composites (68, 69). Dans ces centres germinaux ectopiques, les cellules B naïves en contact avec les cellules T se différencient en plasmocytes producteurs d'anti-HLA et en cellules B mémoires, la libération continue d'allo antigènes du tissu lésé est piégée localement par un drainage lymphatique défectueux. Il en résulte une réponse immunitaire excessive à l'intérieur du TLS qui contribue au rejet de l'allogreffe (67).

Néanmoins, la corrélation entre TLS et rejet est controversée. La présence de TLS a également été associée à des transplantations d'organes solides (SOT) sans aucun signe de rejet : les premiers TLS apparaissaient 1 mois après la transplantation sur certaines biopsies et augmentaient pour atteindre près de 50 % des biopsies de greffes à un an (70, 71). Certains auteurs ont constaté que les structures les plus hautement organisées, comprenant par exemple des cellules dendritiques folliculaires, étaient associées à un dysfonctionnement rénal et à un rejet chronique, indépendamment de l'inflammation interstitielle (71).

## **- Réponse innée et rejet d'allogreffe**

A côté de la réponse adaptative, un rôle croissant des cellules de l'immunité innée notamment les cellules Natural Killer (NK) a été mis en évidence ces dernières années. C'est ce que l'on appelle l'allo-reconnaissance innée. Son activation est liée à deux mécanismes. Le premier, le plus connu est décrit au chapitre précédent, c'est celui des anticorps qui se fixent aux cellules innées par l'intermédiaire de leur fragment Fc et que l'on appelle l'ADCC et favorisent l'activation et/ou l'endommagement de la couche de cellules endothéliales. Cependant dans près de la moitié des cas, les lésions microvasculaires sont le résultat d'une activation directe des cellules NK du receveur par les cellules endothéliales du greffon. Les cellules endothéliales du greffon sont incapables de délivrer des signaux inhibiteurs aux cellules NK du receveur en raison de molécules HLA de classe I différentes. Cela imite le « soi manquant » pour les cellules NK qui attaquent l'endothélium (72). Des médiateurs pro-inflammatoires (chimiokines et cytokines) précoces ont également un rôle important dans le mécanisme de rejet par le priming des cellules innées. L'inflammation liée à l'ischémie au moment de la greffe ou lors d'infections active des récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) de type Toll-Like récepteurs, NOD-like récepteurs, RIG-like récepteurs et stimule des cellules de l'immunité T naïves, mais également neutrophiles macrophages et cellules NK qui vont infiltrer le greffon, entretenir et amplifier les rejets et entraîner une inflammation microvasculaire responsable d'un rejet



médiés par HLA I aux cellules NK circulantes du receveur déclenche leur activation, ce qui favorise à son tour les lésions endothéliales (72). De plus certains antigènes mineurs d'histocompatibilité non pris en compte pour la greffe peuvent provoquer le rejet comme l'antigène H-Y, présent uniquement chez les hommes et provoquant un rejet de greffe accéléré pour une receveuse femme dans la greffe de rein par exemple (73). En cas de rejet chronique on observe la prolifération de fibroblastes et des cellules musculaires lisses entraînant un rétrécissement du lumen des vaisseaux. Les lésions sont principalement vasculaires, associées à des lésions fibreuses du greffon et sont responsables d'une baisse progressive de la fonction du greffon. C'est aujourd'hui la menace principale dans les greffes d'organes.

#### **b) Les traitements immunosupresseurs**

- **Principes moléculaires des traitements anti-lymphocytes T**

Les lymphocytes T sont essentiels dans les mécanismes de rejet d'allo-greffe. Plusieurs stratégies peuvent être mises en évidence pour provoquer l'arrêt efficace des activités de lymphocytes T. Elles sont résumées dans la **figure 12**.

- ✓ **Inhibition de l'activation des lymphocytes T**

-**Corticostéroïdes** : dérivés des hormones glucocorticoides, ils inhibent l'activation des LT et la réactivité du système immunitaire par la modulation des récepteurs intracellulaires.

-**Antimétabolites (cyclophosphamide, azathioprine, mycophénolate)** : ils inhibent la synthèse d'ADN provoquant un effet antiprolifératif sur les cellules à division rapide comme les lymphocytes T mais provoquant également des effets secondaires sur les tissus à division cellulaire rapide (peau, moelle osseuse, système digestif). Le mycophénolate inhibe également la synthèse des anticorps et la prolifération des cellules musculaires lisses. Il est contre-indiqué

pendant la grossesse car il entraîne des risques malformatifs (74). Il doit être remplacé par un autre traitement 2 mois avant le début de la grossesse.

- **Cyclosporine A, Tacrolimus** : ils inhibent la calcineurine entraînant la réduction de facteurs nucléaires des LT activés (NFAT). Ils induisent une puissante immunosuppression. Ils bloquent de plus la réponse mémoire. Ils sont peu toxiques à faible dose. Un dosage de la tacrolémie permet d'ajuster la dose de tacrolimus donnée. La toxicité principale est rénale.

-**Betalcept** : Il s'agit d'une immunoglobuline CTLA4. C'est un nouvel immunosuppresseur, spécifique du co-signal. Il pourrait également prévenir la réponse humorale. Il présente peu d'effets secondaires. Il est onéreux et ne peut être utilisé que par voie intra veineuse.

#### ✓ **Inhibition de la signalisation des LT :**

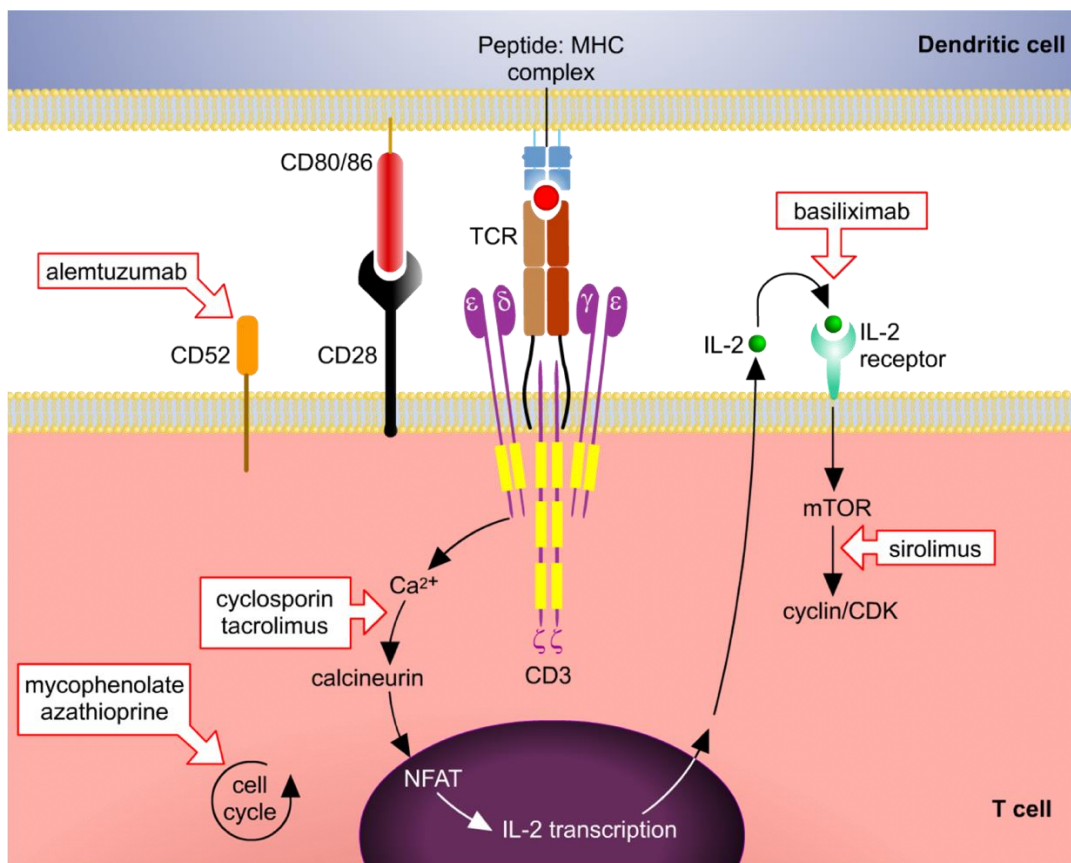
-**Rapamycine (= Sirolimus)** : Il inhibe l'activité de mTOR, qui est impliquée dans la régulation de la croissance et de la prolifération. Toutes les cellules sont atteintes, sans discrimination. Il permet le développement des cellules régulatrices et a un effet anti tumoral. Il pourrait être efficace sur le rejet chronique vasculaire médié par les cellules NK car il empêche le mécanisme du « soi manquant ». (75) Il a cependant un profil de tolérance médiocre.

#### ✓ **Anticorps dirigés contre les LT :**

-**Globulines anti-lymphocytaires (thymoglobulines)** : immunoglobulines polyclonales prélevées de lapins immunisés avec des lymphocytes humains, elles sont utilisées pour traiter les rejets aigus ou lors de traitements d'induction. Elles jouent également un rôle dans la modulation immunitaire, l'apoptose des cellules B, la déplétion des cellules dendritiques et des molécules d'adhésion.

- **Anti-CD52 (Alemtuzumab)** : il a une action déplétive contre les lymphocytes en ciblant le CD52, présent à la surface de la plupart des lymphocytes matures, et en induisant une destruction par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

- **Anti-IL-2-récepteur (Basiliximab)** : Il a une action non-déplétive contre les lymphocytes en inhibant la signalisation dépendante de l'interleukines de type 2 (IL-2).

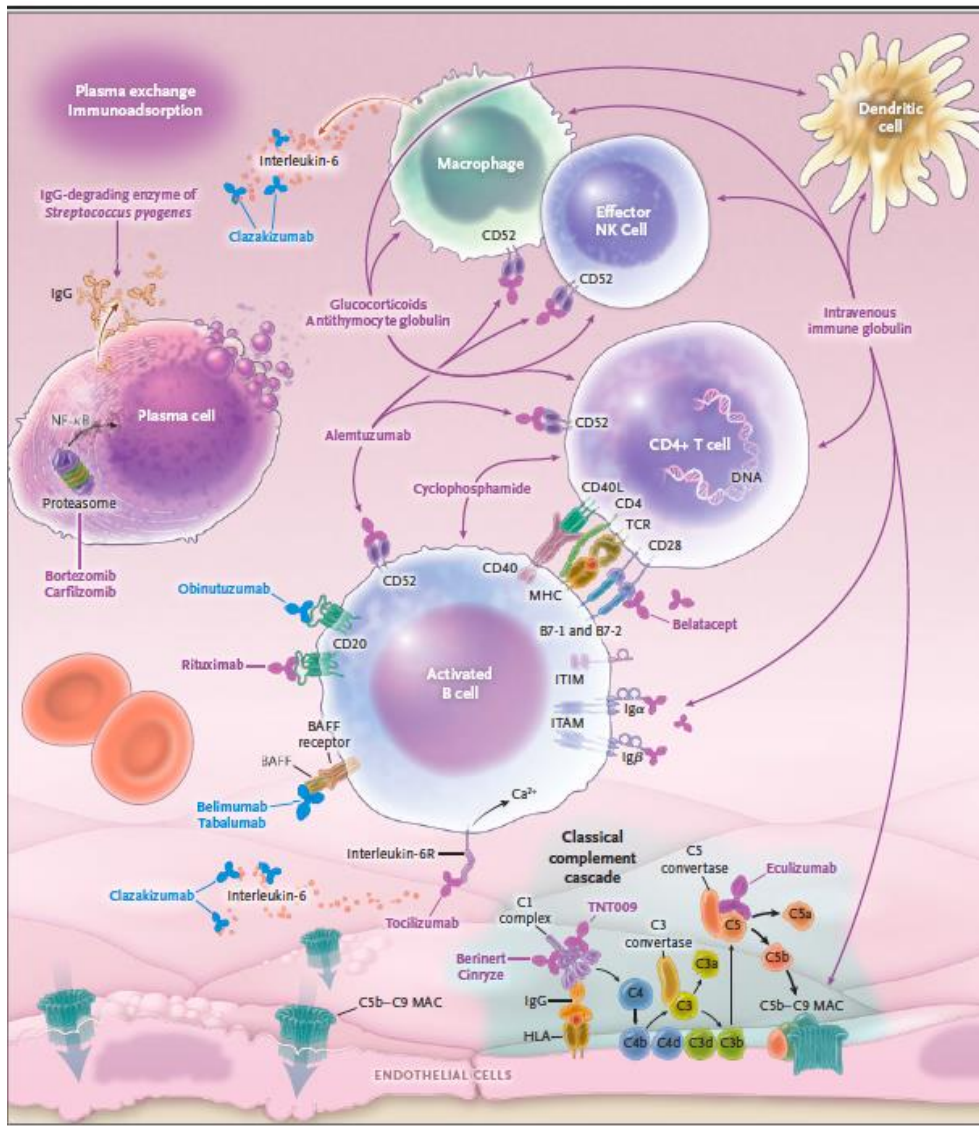


**Figure 12 : Mécanismes moléculaires des traitements immunosuppresseurs** (Abbas, Basic immunology, 4eme édition)

- **Principes moléculaires des traitements anti-rejets médiés par des anticorps**

Les traitements spécifiques comportent notamment des plasmaphérèses et des immunoglobulines intraveineuses. Les traitements et leurs cibles sont détaillés en **figure 13**.





**Figure 13 : Approches thérapeutiques pour le rejet médié par les anticorps (76)**

- **Principes cliniques**

Le traitement est instauré dès le début de la greffe avec des traitements d'induction puis des traitements de fond. Les traitements d'induction utilisés comportent principalement des bolus de corticoïdes et des antithymoglobulines ou du basilixumab. Le traitement d'entretien comporte une association de plusieurs molécules : un inhibiteur de la calcineurine (de préférence le tacrolimus) et du mycophénolate avec plus ou moins des corticoïdes. En cas

d'éviction des inhibiteurs de calcineurine, les mTor ou le betalcept peuvent être utilisés en deuxième intention(77). Pour les patients à faible risque de rejet, les corticoïdes ne sont pas recommandés au long court. Les traitements sont utilisés à plus faible dose au-delà de 3 mois, car les risques de rejet sont alors plus faibles. Actuellement, grâce aux traitements immunosuppresseurs, les épisodes de rejet aigus surviennent dans moins de 15% des transplantations dans les greffes d'organes solides (78). Une intensification du traitement immunosuppresseur permet dans la majorité des cas de traiter efficacement le rejet aigu cellulaire (corticoïdes le plus souvent et antithymoglobulines) (79). De la précocité de ce traitement va dépendre la réversibilité des lésions. Les lésions en lien avec le rejet humoral sont beaucoup moins sensibles au traitement institué que les lésions cytotoxiques. La plupart des rejets aigus sont asymptomatiques compte tenu de l'efficacité des traitements immunosuppresseurs actuels. Ils sont évoqués devant une altération de marqueurs biologiques. Par exemple, en transplantation rénale ils ne se manifestent que par une augmentation de la créatinine qui peut être infra clinique ; le rejet aigu ne peut alors être confirmé que par une biopsie de l'organe greffé. Dans le cas du rejet cellulaire, l'organe greffé est le siège d'une infiltration par des cellules immuno-compétentes (lymphocytes T). Dans le cadre du rejet humoral, les lésions concernent la micro-vascularisation avec la mise en évidence d'éléments du complément (C4d...) qui sont liées le plus souvent à des anticorps anti HLA dirigés contre le donneur (DSA) et peuvent donc être dosés régulièrement (80). C'est au rejet humoral que l'on attribue le rejet chronique entraînant une dysfonction d'organe.

Les effets secondaires des immunosuppresseurs sont une limite importante de leur utilisation. Ils sont liés à la dysfonction du système immunitaire qu'ils provoquent. Des infections opportunistes sont fréquentes, en rapport avec l'incapacité à gérer les infections par des pathogènes externes de manière efficace (CMV, pneumonies...). On observe également

l'apparition de maladies auto-immunes par dysfonction de la tolérance et enfin des cancers dus à l'incapacité à reconnaître et à détruire les cellules dysplasiques et à maîtriser la prolifération d'agents pathogènes pro-infectieux (HSV : Kaposi, HPV : cancer du col utérin...). De plus chaque traitement immunosuppresseur peut avoir des effets secondaires propres, comme par exemple la toxicité rénale bien connue du tacrolimus.

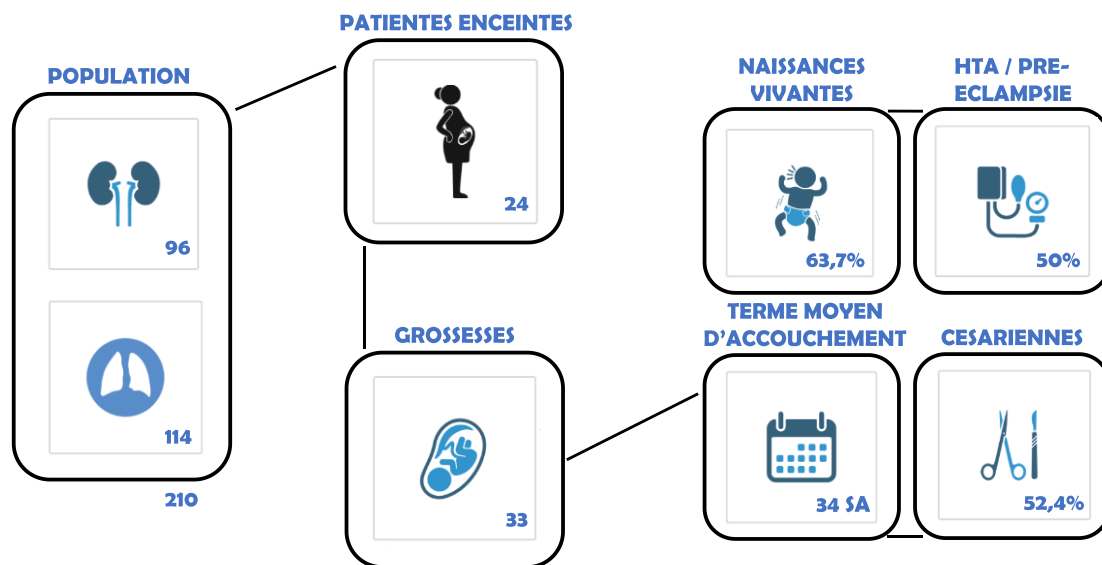
### **c) Impact du microbiote sur la greffe d'organe**

Le microbiote semble être impliqué dans les rejets des transplantations d'organes solides (81). Il a un effet direct et indirect sur de nombreuses cellules immunitaires innées ou acquises, il est appauvri dans de nombreux cas de greffes avec un impact négatif sur le devenir du greffon sans que l'on puisse établir à ce jour si c'est la cause ou la conséquence des effets de la greffe (82, 83).

### **d) La grossesse chez les patientes greffées**

Les greffes d'organes solides représentent environ 90 000 interventions chirurgicales par an dans le monde et plus de 4 400 procédures réalisées en France en 2020. L'amélioration continue des traitements a entraîné une amélioration de la qualité de vie et de l'espérance de vie des patients transplantés, comme en témoigne le taux moyen actuel de survie à cinq ans de plus de 75 % après une transplantation rénale (84). Ainsi, la possibilité d'être enceinte chez les jeunes patientes transplantées est un enjeu important. En ce qui concerne le moment optimal pour une grossesse après une greffe, une conférence de consensus organisée par l'American Society of Transplantation en 2003 a établi qu'une grossesse est généralement acceptable après la première année, à condition que la fonction du greffon soit stable et qu'il n'y ait pas eu d'épisode de rejet au cours de l'année précédant la conception (85). Concernant les traitements

immunosuppresseurs, la grossesse requiert un arrêt du MMF qui est foetotoxique avec un relais le plus souvent par azathioprine (74). Il existait un recul sur plus de 16000 grossesses en 2003. Ainsi nous avons un certain nombre d'informations sur le déroulement des grossesses au cours de greffes d'organes (85). Le taux de fausses couches précoce est estimé entre 11 et 24%. Les interruptions médicales de grossesses entre 1 et 33%. Ce taux élevé est lié entre-autre aux grossesses inopinées alors que la patiente est sous un immunosuppresseur foetotoxique ou bien que son état soit incompatible avec la grossesse. Le taux d'accouchements prématurés et de césariennes est de l'ordre de 50%. Le taux de morts fœtales in utéro et de décès néonataux sont entre 1 et 3% chacun. Les risques infectieux sont plus importants en particulier les choriomaniotites entraînant des pertes fœtales. Il existe des différences entre les organes, puisque le taux de naissances vivantes est au-dessus de 70% sauf pour les poumons où elle est inférieure à 60%. Le taux de rejet oscille entre 2 et 30%. La grossesse ne semble pas aggraver la perte de fonction de l'organe ou le rejet au long court. Les hypertensions gravidiques sont de l'ordre de 50% et peuvent monter jusqu'à 75% dans le rein. Le taux de pré éclampsies est compris entre 10 et 30%, lui aussi plus fréquent dans les greffes rénales. Il est également plus important en cas d'utilisation de tacrolimus. Ce dernier traitement est également pourvoyeur d'insuffisance rénale au cours de la grossesse (85). Les grossesses sont donc possibles chez les patientes greffées mais à haut risque de complications, bien qu'il soit difficile de savoir quel est la part de la greffe, du traitement immunosuppresseur et de l'état de santé global des patientes dans les différents risques rapportés. Nous avons trouvé des résultats similaires au sein d'une cohorte de grossesses de patientes greffées pulmonaires et rénales à l'hôpital Foch (**figure 14**)(86).

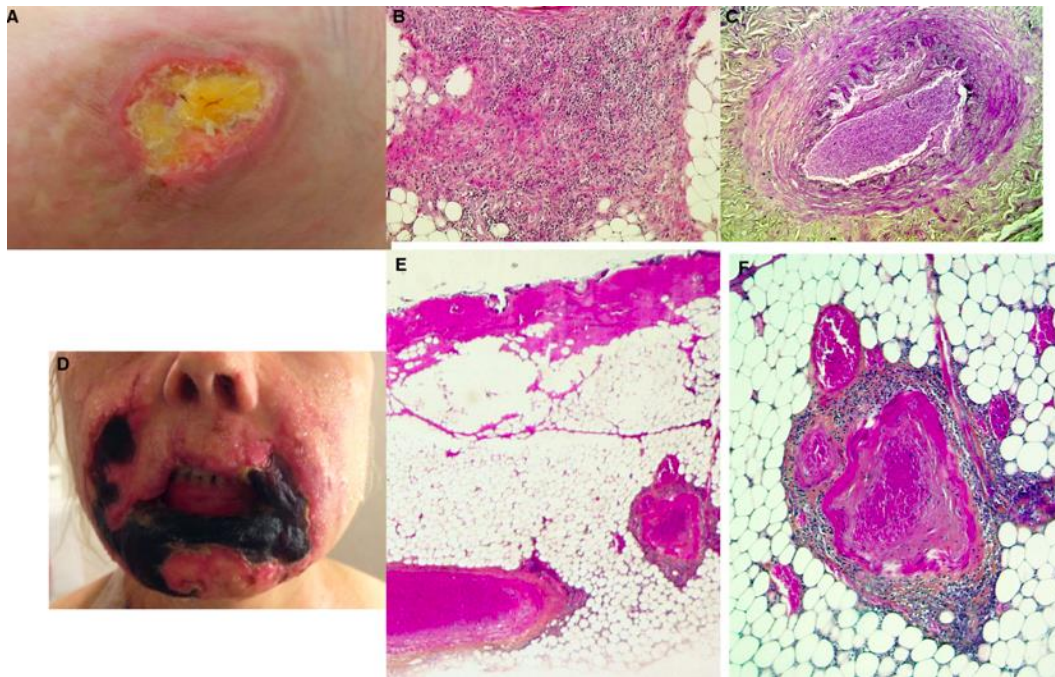


**Figure 14** : Cohorte de grossesses chez des patientes greffées pulmonaires et rénales à l'hôpital Foch (86)

**e) Le cas particulier des greffes de tissus composites (hors greffes utérines)**

Les greffes de tissus composites ou VCA (vascularized composite allograft) sont particulières à plus d'un titre. Il s'agit de greffes non vitales, permettant d'améliorer la qualité de vie des patients. Elles contiennent plusieurs tissus vascularisés (peau, muqueuse, muscle, os). Il s'agit principalement des greffes de membres et de face. Ce type de greffe reste encore confidentiel et le registre international comporte une 100<sup>ème</sup> de cas. Dans le rejet aigu, il existe quelques différences entre les VCA et les greffes d'organes solides. En premier lieu, le taux de rejet est beaucoup plus fréquent avec les VCA : 75 à 85% (87) versus 7,5% dans le rein (88). Il existe des signes cliniques associant érythème et œdème mais pas de marqueurs biologiques. La biopsie est peu invasive, elle est facilitée par un greffon de peau sentinelle destiné à la

réalisation de biopsies. Les rejets aigus sont le plus souvent médiés par des cellules T et sont faciles à contrôler par corticoïdes. Ce taux de rejet important s'explique par la peau qui est très immunogène et l'association de plusieurs tissus. Les traitements immunosuppresseurs comportent une forte induction pour éviter les rejets cutanés, puis un traitement associant inhibiteurs de la calcineurine (souvent le tacrolimus), du MMF et des corticoïdes à forte doses d'abord puis à plus faible dose. En cas d'insuffisance rénale, du bétalacept peut remplacer le tacrolimus, en cas de rejets répétés l'utilisation d'inhibiteurs de mTOR. Le problème majeur dans les VCA est le rejet chronique : un rejet humoral entraînant des vasculopathies et une nécrose à terme du tissu greffé (**figure 15**) (89) et/ou un rejet tissulaire entraînant une fibrose(90). Les complications infectieuses sont également très fréquentes. La greffe utérine est la greffe de tissu composite la plus récente mais est en passe de devenir celle la plus réalisée. Elle a des différences importantes cependant avec les autres types de VCA dans sa finalité (organe transitoire pour porter une ou deux grossesses) et le profil des rejets (elle ne comporte pas de tissu cutanés notamment).



**Figure 15: Rejet chronique de greffe de face.** Nécrose du greffon de peau sentinelle (novembre 2014) ; (B) Rejet de grade IV du greffon de peau sentinelle selon Banff (novembre 2014) : infiltration dermique diffuse et très dense de lymphocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles, sous un épiderme nécrosé ; (C) Histologie du vaisseau pédiculaire du greffon de peau sentinelle (novembre 2014) : épaissement fibreux de toute la paroi avec épaissement intimal focal et rétrécissement lumenale ; (D) Zones nécrotiques sur les lèvres, la zone périorale et le menton (mai 2015) ; FŒTALE Rejet de grade IV de Banff du greffon facial (mai 2015) : nécrose ischémique massive de l'épiderme et du derme. Une artère avec une thrombose extensive est visible dans l'hypoderme ; (F) grossissement plus important du panneau E, montrant une thrombose artérielle avec occlusion lumenale et un infiltrat périvasculaire dense de neutrophiles (89).

## 2) La transplantation utérine

### a) Principes

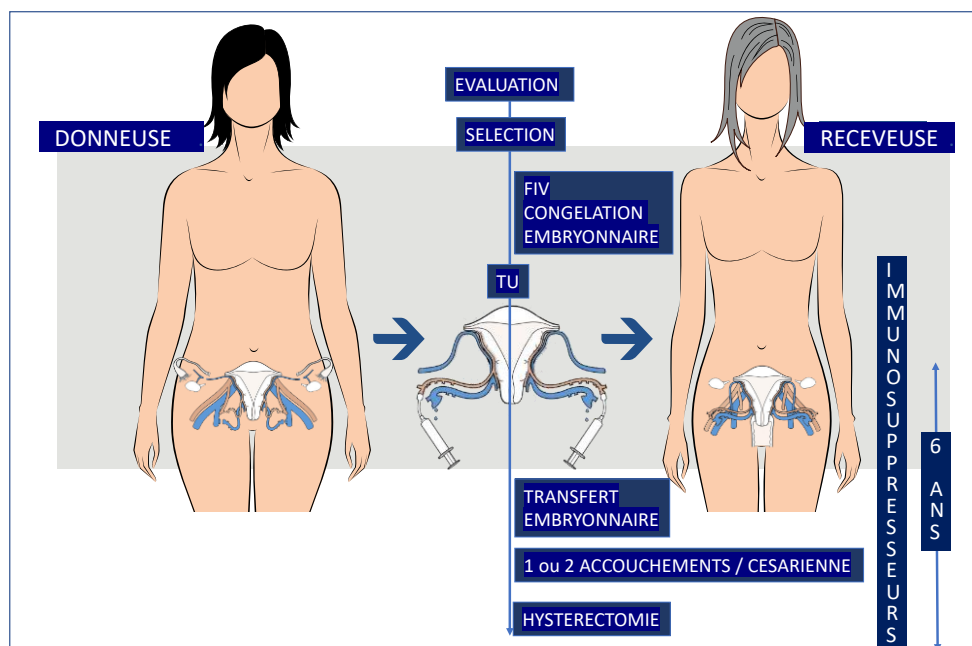
L'absence d'utérus est responsable d'infertilité appelée infertilité utérine et touche une femme sur 500 en âge de procréer (91). La forme congénitale est appelée le syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hausler (MRKH) et concerne 1 naissance sur 4500 filles (92). La forme acquise représente l'ensemble des hystérectomies. Jusqu'à récemment, les seules solutions pour avoir un enfant pour ces patientes étaient la Grossesse Pour Autrui (GPA), interdite en France

ou l'adoption dont les démarches administratives complexes et longues n'aboutissent pas toujours à l'obtention des agréments nécessaires.

La Transplantation Utérine (TU) constitue une alternative qui a motivé plusieurs équipes à travers le monde. La naissance du premier bébé suite à une greffe utérine venant d'une donneuse vivante, réalisée par l'équipe suédoise du Pr Brännström a eu lieu en septembre 2014, et a soulevé un immense espoir chez les patientes atteintes par ces affections (93).

La TU est réalisée à partir de donneuses vivantes ou en état de mort cérébrale. Cette transplantation est singulière car c'est une transplantation d'un organe non vital, dont le but est l'obtention de la naissance d'un ou de deux enfants en bonne santé. De plus, elle est transitoire ; sa durée est limitée au temps nécessaire pour la ou les grossesses. La Société internationale de greffe utérine estime à 6 ans, sa durée de vie maximale afin de diminuer les risques de immunosuppresseurs au long court (<https://tts.org/isutx-home>). La transplantation concerne l'utérus, la partie supérieure du vagin, les artères utérines et les veines utérines et/ou veines ovariennes (avec une longueur d'au moins 6cm pour chaque vaisseau) qui seront anastomosées en termino-lateral avec les vaisseaux iliaques externes de la receveuse ainsi que du péritoine et des ligaments pour fixer l'utérus dans le pelvis. La patiente receveuse bénéficie d'une ou de plusieurs Fécondation In Vitro (FIV) afin d'obtenir un nombre satisfaisant d'embryons avant de réaliser la transplantation utérine. En effet, la dévascularisation des trompes au cours de la greffe compromet les chances de grossesses spontanées. La receveuse bénéficie d'un traitement immunosuppresseur comparable aux autres greffes d'organes. Six mois à 1 an après la greffe, la patiente bénéficie d'un transfert d'embryon en l'absence de signes de rejet. La naissance a lieu par césarienne. Une deuxième grossesse est possible en l'absence de signes de rejet ou d'effets secondaires majeurs de l'immunosuppression. Le Schéma global de la greffe utérine est représenté en **figure 16**.





**Figure 16 :** Schéma global de la transplantation utérine (94).

### b) La sélection

Un screening poussé des receveuses et donneuses doit être réalisé afin d'optimiser les chances de succès de la greffe et de minimiser les risques de complications pour cette greffe qui est à la fois non-vitale et relativement récente. Les donneuses vivantes sont majoritairement apparentées aux receveuses, souvent les mères, et ainsi ont des liens émotionnels ou génétiques avec elles, comme sur le modèle de la transplantation rénale (95). D'un point de vue immunologique, la compatibilité ABO est respectée ainsi que la sélection des receveuses sans anticorps anti-HLA et crossmatch négatif avec la donneuse. La receveuse et la donneuse ne doivent pas être porteuses de virus HPV ni de dysplasies cervicales afin de diminuer le risque de dysplasies favorisées par l'immunosuppression et la receveuse est vaccinée contre l'HPV en pré-greffe (93). L'absence de vaginose, d'infections transmissibles, d'herpes, et dans certaines équipes de mismatch CMV et EBV est également vérifiée à plusieurs reprises chez la donneuse

et la receveuse afin de diminuer le risque infectieux. Des données limitées montrent un pronostic plus défavorable pour les utérus issus de patientes après la ménopause (95, 96), suggérant un effet négatif de l'âge sur la vascularisation utérine (risque d'artériosclérose). Bien qu'un âge de plus de 60 ans et/ou 5 ans après la ménopause sont actuellement considérés comme des critères d'exclusion raisonnables pour les donneuses, la donneuse la plus vieille ayant permis une naissance après greffe avait 62 ans (97). Les autres critères d'exclusion pour les donneuses vivantes sont la nulliparité, les antécédents de FCS (Fausses couches spontanées), l'obésité, une consommation prolongée de tabac et un antécédent de pathologie ou cicatrice utérine (98). Parmi les critères d'inclusion des receveuses, une longueur vaginale minimale de 6 cm est recommandée pour réaliser l'anastomose. Chez les patientes MRKH, la longueur vaginale est souvent réduite. Un vagin de longueur normale est obtenu par dilatation (méthode de Franck, technique actuellement privilégiée), ou des reconstructions chirurgicales. Parmi celles-ci l'utilisation d'un segment intestinal est souvent récusée dans les protocoles car il pourrait augmenter l'inflammation en perturbant le microbiote (99). Les critères d'inclusion du protocole français sont représentés dans le **tableau 1**. Pour les donneurs en état de mort cérébrale, les évaluations sont plus sommaires du fait du temps d'évaluation plus court et de l'absence de dossier médical complet.

**Tableau 1 Critères d'inclusion Français de la transplantation utérine (Hôpital Foch)**

	<b>Receveuses</b>	<b>Donneuses</b>
<b>Critères de Sélection : Etape 1</b>	<p>Agées 18-38 ans Se présentant avec donneuse apparentée IMC&lt;30 MRKH type 1 Ou MRKH type 2 avec un rein orthotopique unique Ou après hystérectomie pour un cancer du col de l'utérus de stage IA (FIGO 2018) en rémission depuis 5 ans et non traité par radiothérapie Pas d'enfants En couple stable Groupe sanguin compatible avec la donneuse Vagin résiduel de 6 cm ou plus Affiliée à la Sécurité Sociale Pas de comorbidités sévères Pas de malformations associées à l'exception du rein unique Pas d'oligo-asthénospermie ou azoospermie chez le partenaire Pas d'antécédent de cancer (excepté cancer du col de l'utérus) Pas d'antécédent de transfusion Pas d'antécédent de chirurgie abdominale ou pelvienne complexe Pas de reconstruction vaginale avec un segment intestinal Pas de maladies infectieuses transmissibles au sein du couple Non fumeuse, pas d'antécédents de toxicomanie ou d'alcoolisme active Couple parlant français</p>	<p>Agées 40-65 ans Apparentée à la receveuse IMC&lt;30 Avoir au moins un enfant en bonne santé (pas de fausse couche récurrente, pas d'accouchement prématuré, pas de pré éclampsie, pas de césarienne) Groupe sanguin compatible avec la receveuse Affiliée à la Sécurité Sociale Pas de comorbidités sévères Pas d'antécédents de cancer Pas de cicatrice utérine ou de chirurgie utérine majeure Pas d'antécédents de conisation Pas de maladie utérine Pas de maladies infectieuses transmissibles Pas d'antécédents de chirurgie abdominale ou pelvienne majeure Non fumeuse, pas d'antécédents de toxicomanie ou d'alcoolisme active Parlant Français.</p>
<b>Critères de Sélection : Etape 2</b>	<p>Evaluation psychologique favorable Receveuse et son partenaire ayant donné leur consentement éclairé pour participer à l'étude Accord du comité multidisciplinaire</p>	<p>Evaluation psychologique favorable Donneuse ayant donné son consentement éclairé pour participer à l'étude Accord du comité multidisciplinaire</p>
<b>Critères d'Inclusion : Etape 1</b>	<p>Test normal de thrombophilie Compatibilité HLA avec la donneuse Test négatif HPV oncogène Test PCR négatif au virus herpès simplex 1 et 2 Pas d'infection gynécologique Pas de maladies infectieuses transmissibles au sein du couple Bonne réserve ovarienne : AMH&gt;1.5, CFA&gt;10 Echographie pelvienne normale Pas de diabète Fonction rénale et hépatique normale Hémostase normale Spermogramme du partenaire normal</p>	<p>Frottis vaginal normal Compatibilité HLA avec la donneuse Test négatif HPV oncogène Test PCR négatif au virus herpès simplex 1 et 2 Pas d'infection gynécologique Pas de maladies infectieuses transmissibles Sérologies négatives EBV (si receveuse est négative) Sérologie négative HHV8 (si receveuse est négative) Echographie pelvienne normale Pas de diabète Fonction rénale et hépatique normal Hémostase normale Biopsie de l'endomètre normale</p>
<b>Critères d'Inclusion : Etape 2</b>	<p>ECG normal IRM abdominal et pelvien normal Radio Pulmonaire normale</p>	<p>Bonne qualité des vaisseaux utérins examinés par angio-IRM, angio-scanner et artériographie IRM abdomino-pelvienne normale ECG normal Echographie des vaisseaux du cou normale Mammographie normale Echographie abdominale normale Radio Pulmonaire normale</p>
<b>Inclusion Définitive</b>	<p>Au moins 10 embryons congelés par FIV Tests normaux 7 jours avant la chirurgie</p>	<p>Tests normaux 7 jours avant la chirurgie</p>

### **c) Etat des lieux**

La première TU humaine a été réalisée en Arabie Saoudite en 2000 et fut un échec (100). La deuxième réalisée en Turquie en 2011 a été un succès chirurgical, mais la patiente a eu de nombreuses fausses couches et échecs d'implantation avant l'obtention d'une naissance, 9 ans plus tard (101, 102). La première naissance d'un bébé en bonne santé après TU a été rapportée en Suède par le Pr Brännström et son équipe en 2014 (93) après plus de 10 ans d'expérimentation sur le modèle animal (103). En effet, un premier essai a été réalisé en Suède à partir de donneuses vivantes pour 9 receveuses : 7 greffons étaient fonctionnels (succès chirurgical avec menstruations dans les 3 mois qui suivent la chirurgie), 6 patientes ont donné naissance à des bébés en bonne santé dont 2 bébés pour 3 receveuses, et une a fait plusieurs fausses couches (104). C'est de cette série que sont issues nos analyses de biopsies et de marqueurs de rejet (cf résultats). Cette équipe a réalisé son deuxième essai de 8 TU avec une chirurgie par coelioscopie robot-assistée pour le prélèvement utérin à partir de donneuse vivante et a rapporté 6 greffons fonctionnels et plusieurs grossesses. À ce jour, plus de 100 cas de TU ont été réalisés dans le monde entier dont 79 ont été publiés, et une vingtaine d'équipes médicales travaillent sur ce sujet (105-108). Deux principaux registres sont disponibles : un international et un américain (105, 108). Les TU ont été pratiquées principalement à partir de donneuses vivantes (58 soit 74% des cas). Vingt et un cas ont été réalisés à partir de donneuses en état de mort cérébrale. Le succès chirurgical de la TU était de 77 % : 78 % pour les donneuses vivantes et 67 % pour les donneuses décédées. La plupart des cas de transplantectomies précoces ont été liées à des thromboses ou à une hypoperfusion du greffon (vaisseaux de petit calibre et artériosclérose). Quelques cas ont été liés à des infections : une candidose, une infection à un Virus Herpes Simplex (HSV), un abcès utérin et un lymphome à Epstein Barr

Virus (EBV) (105, 108). Plus de 40 enfants en bonne santé sont nés après une TU. Si la majorité des enfants sont nés grâce à une donneuse vivante, plusieurs naissances ont été signalées grâce à des donneuses décédées ce qui confirme la faisabilité de cette approche. Le taux de naissances vivantes par greffe utérine était de 62% (49/79), 80% en cas de succès chirurgical de la procédure (49/61)(105, 106, 108). La première TU française a été réalisée à l'hôpital Foch par notre équipe menée par le Pr Ayoubi en 2019, elle a permis la naissance de 2 petites filles en bonne santé en 2021 et 2023 (98, 109). Nous avons réalisé la deuxième greffe française avec succès en septembre 2022. Elles font partie d'un protocole expérimental comprenant 10 greffes utérines pour des patientes MRKH ou avec antécédent de cancer du col à partir de donneuses vivantes apparentée (N° NCT03689842). Actuellement expérimentale dans de nombreux pays, la TU est en passe de rentrer dans la pratique courante. C'est déjà le cas en Allemagne par exemple. Les projections tablent sur une réalisation exponentielle de cas les prochaines années avec un recours plus important aux donneuses en état de mort cérébrale (allocution du Pr JM Ayoubi, 3rd State of the art, Paris, octobre 2022). Les résultats sont présentés dans le **tableau 2**. Ils intègrent les publications et les cas non encore publiés mais colligés lors d'une enquête réalisée lors du dernier congrès international de greffe utérine en octobre 2022.

**Tableau 2 Etat des lieux de la transplantation utérine** (Allocution du Pr JM Ayoubi, 3rd State of the art, Paris, octobre 2022)

	Résultats publiés	Résultats non publiés (enquête)	Total
N de TU réalisées	79	11 nouveaux cas	90
Donneur vivant	58 (73,4%)	6 (54,5%)	64 (71,1%)
Donneur décédé	21 (26,6%)	5 (43,5%)	26 (28,9%)
N de succès chirurgicaux	61 (77,2%)	9 (81,8%)	70 (77,8%)
Donneur vivant	47 (78,3%)	4 (66,7%)	51 (77,3%)
Donneur décédé	14 (66,7%)	5 (100%)	19 (73,1%)
N de transplantectomies	17 (21,5%)	3 (22,2%)	19 (21,1%)
N de complications receveuses (>2DC)	14 (23%)	4 (44,4%)	18 (25,7%)
Sténose vaginale	14 (23%)	1 (11,1%)	15 (21,4%)
N de complications donneuses (2DC)	10 (16,7%)	0 (0%)	10 (11,1%)
N de naissances/ TU réalisées (Données publiées et non publiées)	49 (62%) (42+7)	Données non disponibles	Au moins 62%
N de naissances/ Succès	49(80,3%)	Données non disponibles	Au moins 80,3%

N : nombre ; >2DC : complications de Dindo Clavien supérieures au grade 2

#### d) Le traitement immunosuppresseur

Le traitement immunosuppresseur est comparable à celui utilisé pour la greffe de rein, il a été élaboré après de nombreuses études dans un modèle animal. Dans le premier essai Suédois, l'induction était assurée par des antithymoglobulines 2,5 mg/kg (J0 et J1) et de la méthylprednisolone 500 mg intraveineux (IV). Ensuite du MMF (mycophénolate Mofetil) était utilisé avec du tacrolimus et de la prednisone pendant 1 semaine ou en cas de rejet puis le MMF qui est foetotoxique était relayé par de l'azathioprine dans la plupart des cas au moins deux mois avant le transfert embryonnaire (95, 110). Pendant la grossesse, les corticoïdes étaient réintroduits. Ce protocole a ensuite été modifié dans le deuxième essai avec l'induction de basiliximab 20mg (J0 et J4) au lieu d'antithymoglobuline, et l'azathioprine était utilisée d'emblée au lieu du MMF en combinaison avec le tacrolimus. Dans le protocole français, le

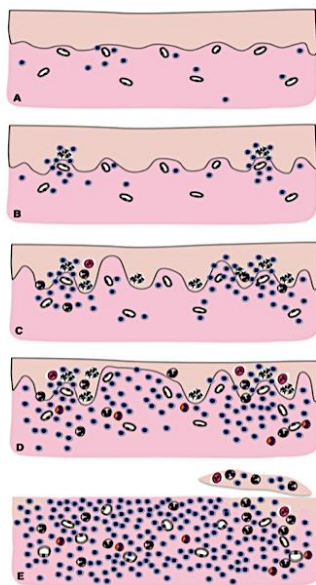
basiliximab était utilisé en induction avec du tacrolimus et MMF puis azathioprine. Les corticoïdes oraux étaient maintenus durant toute la greffe. Le délai avant de réaliser le transfert embryonnaire a d'abord été de 1an, puis a été raccourci à 6 mois dans la plupart des équipes en l'absence de rejet ou d'infection. Des équipes américaines réalisent le transfert embryonnaire 4 mois seulement après la chirurgie (111, 112).

#### e) Les signes de rejet

- **Le rejet aigu cellulaire**

A ce jour, les mécanismes du rejet aigu dans la greffe utérine ont été peu étudiés. Le rejet est principalement asymptomatique. En l'absence de marqueurs spécifiques de fonctionnement utérins, comme la CRP et l'atrophie du myomètre par imagerie qui sont des marqueurs tardifs et peu spécifiques, des biopsies de l'exocol sont réalisées systématiquement de manière hebdomadaire, mensuelle puis trimestrielle pour évaluer le rejet aigu (103). Basée sur la TU dans le modèle primate (113) et la classification Banff de rejet de peau et de muqueuse (114), une classification avec 3 grades de rejet a été établie par Mølne et al. Elle repose sur l'envahissement lymphocytaire T à l'interface entre le chorion et l'épithélium avec une inflammation stromale, un œdème intercellulaire et des corps apoptotiques épitheliaux (**figure 17**) (115). Des rejets ont été mis en évidence chez environ 60% des patientes greffées sur au moins un prélèvement, le plus souvent durant les 3 premiers mois (115, 116). Les épisodes de rejet sont plus fréquents (33%) les 5 premiers mois en comparaison avec les 5 mois suivants (21%) (105). L'équipe de Dallas a ajouté l'inflammation périvasculaire, l'interruption focale des capillaires et l'hémorragie interstitielle à cette classification (116). L'analyse des pièces d'hystérectomie de la première série suédoise a montré une corrélation entre les résultats de

l'exocol et du myomètre (117). Cependant, un cas d'hystérectomie pour infection à HSV a montré des signes de rejet exclusivement au niveau du myomètre en république Tchèque (118). En cas de rejet cellulaire, les bolus de corticoïdes sont le traitement de première intention, Ils permettent dans la très grande majorité des cas de résoudre l'épisode de rejet. En cas de rejet cortico-résistant, de la « thymoglobuline » peut être utilisée (119). 2/21 cas de rejet ont été rapportés au cours de la grossesse dans le registre américain (108) et 3/19 dans le registre de la société internationale de TU (105). Les cellules immunitaires impliquées sont principalement les lymphocytes T (CD4 et CD8) ainsi que les lymphocytes B. Quelques cellules NK ont également été visualisées en immunohistochimie. Le taux de macrophages n'était pas significativement augmenté avec le rejet (115). L'équipe Turque avait utilisé des biopsies vaginales et de patch de peau (sur le modèle des VCA).



Grade	Rejet	Histologie biopsie cervicale
0	Aucun	Morphologie normale
1	léger	Légère inflammation diffuse (principalement lymphocytes) Apoptose épithéliale distribution focale Surface épithéliale intacte Pas de nécrose
2	Modéré	Inflammation modérée, diffuse mixte (principalement lymphocytes) Augmentation de la quantité d' apoptose épithéliale Réduction d'épaisseur de l'épithélium de surface, érosion focale possible. Pas de nécrose.
3	Sévère	Infiltrat de cellules inflammatoires importante, généralisé et globale (principalement lymphocytes; neutrophiles et éosinophiles peuvent être présents) Apoptoses fréquentes Érosions épithéliales, focal à total. Nécrose focale

**Figure 17 : Différents grades de rejet cellulaire sur biopsies cervicales**

(A) tissu normal ; (B) borderline ; (C) grade 1 ; (D) grade 2 ; (E) grade 3 de rejet d'après Mølne et al. (113)



- **Le rejet aigu humoral**

Il est évoqué en présence d'anticorps anti-HLA (ou DSA) ou de complément (type C4d) sur les biopsies. Seulement peu de cas de rejet aigu humoral ont été rapportés (27, 31). Les anticorps anti-HLA sont mesurés régulièrement au cours de la greffe (à 1 mois, 6 mois puis tous les 6 mois post-greffe, 1 fois pendant la grossesse puis enfin 1 mois après l'accouchement dans le protocole Français). En cas de rejet humoral, des échanges plasmatiques et une perfusion d'immunoglobulines sont traditionnellement proposés. Un cas de rejet humoral et cellulaire sévère a été décrit aux États-Unis, il a pu être résolu après échanges plasmatiques, immunoglobulines et intensification du traitement immunosuppresseur, la patiente a ensuite pu être enceinte avec la naissance d'un enfant en bonne santé mais la grossesse a été marquée par la survenue d'un placenta accreta (placenta anormalement adhérent au myomètre) avec hémorragie de la délivrance et hystérectomie d'hémostase (120). Il s'agissait d'une greffe à partir d'une donneuse décédée.

- **Le rejet chronique**

Les signes de rejet chronique sont encore mal connus en TU. Une inflammation stromale périvasculaire dans le col associé à une inflammation cervicale subépithéliale linéaire avec de l'inflammation focale myométriale a été mise en évidence sur 2 pièces d'hystérectomies de la première série Suédoise, elle pourrait être le témoin d'un rejet chronique vasculaire sur le modèle des greffes de tissus vascularisés composites (114, 121). D'autres cas de rejet chronique vasculaire ont été également décrits (122).

#### **f) La FIV et le déroulement des grossesses**

Le taux de naissance en cas de succès de la greffe est très important, de l'ordre de 80% (cf **tableau 2**). Le taux de naissance par transfert embryonnaire est estimé à 36% (105, 108). Si la plupart des patientes ont eu une grossesse dès le premier transfert embryonnaire, certaines nécessitent de nombreux transferts d'embryons parfois sans succès. Nous n'avons pas encore la réponse à la cause provoquant ces échecs d'implantation. Les patientes MRKH peuvent avoir un épithélium vaginal altéré si elles ont bénéficié d'une chirurgie néovaginale soit avec de la peau (technique de Mc Indoe) soit avec de l'intestin, ce qui peut entraîner une colonisation bactérienne du vagin et être en partie responsable des échecs d'implantation et des fausses couches. Dans le registre international, 10% des patients avaient un néovagin créé avec de la peau (105). Le taux de fausses couches est estimé à 20% dans le registre américain, la plupart au premier trimestre (108). Deux patientes ont fait des fausses couches à répétition dans le registre international : l'une d'entre elles avait été opérée auparavant pour une reconstruction vaginale avec un segment de jéjunum(102). Des cas de fausses couches tardives ont été également rapportées dans un contexte de chorioamniotite (123).

42 naissances d'enfants en bonne santé ont été rapportées. Cependant, dans le registre international, 9 grossesses sur 19 étaient marquées par des complications en excluant les rejets (3 prééclampsies soit 16% dont une avec insuffisance rénale, 1 diabète gestationnel, une hypertension gravidique, une rupture prématurée des membranes, une cholestase, un hématome sous-chorial et une pyélonéphrite), le terme moyen d'accouchement était de 35 semaines d'aménorrhées (SA). Aucune mortalité néonatale ou fœtale, retard de croissance intra-utérin ou malformation congénitale notable n'a été décrite. Les suites néonatales étaient sans particularité (105) . Dans le registre Américain, sur 21 naissances étaient rapportés 5 cas

d'hypertension gravidique (24%), 3 cas de prééclampsie (12%), 3 cas de diabète gestationnel (12%), 2 cas d'insuffisance rénale, un placenta accreta, un hématome sous chorial, une rupture prématurée des membranes et un hydramnios, le terme moyen d'accouchement était de 36 SA et 6 jours (105). Plusieurs patientes ont eu deux enfants. Le recul sur le devenir des enfants n'est pas encore très développé du fait du caractère relativement récent de ce type de transplantation.

#### **g) Les risques des immunosuppresseurs et l'explantation**

Aucune donnée n'existe actuellement concernant les risques à long terme de l'immunosuppression dans la transplantation utérine. Cependant, il est recommandé de retirer l'utérus au bout de 6 ans afin de diminuer les risques de l'immunosuppression et de la néphrotoxicité au long court.

Concernant les risques infectieux et carcinologiques, 4 cas de transplantectomies ont été liés à des infections : une candidose, une infection à HSV, un abcès utérin et un lymphome à EBV (105, 108). Des cas d'infections à CMV, de dysplasies du col sur HPV, d'infections vaginales, de chorioamniotites, d'infections urinaires, et d'infections COVID-19 bénignes ont également été rapportées.

Douze patientes parmi 33 ayant bénéficié d'une transplantation utérine avec succès à 10 mois dans le registre international ont eu des complications liées aux immunosuppresseurs : des cytopénies (n=4), des insuffisances rénales (n=4), des hypertensions artérielles (n=1) des infections (n=1) et non spécifiées (n=2) (105). Sur les 9 hystérectomies réalisées après l'obtention d'une grossesse, 4 ont été réalisées en per-protocole, 4 en raison d'effets secondaires des immunosuppresseurs et 1 en raison de rejet. A noter que parmi les hystérectomies réalisées

avant l'obtention d'une grossesse, une a été réalisée suite à des fausses couches à répétition et une pour une altération importante de l'endomètre.

Dans le registre Américain, les taux de créatinine ont été impactés par la greffe : elle était en moyenne à 0,73 (0,54-0,89) mg/dL (pour convertir en micromoles par litre, multiplier par 88,4) avant la transplantation et 0,87 (0,49-1,04) mg/dL 6 mois après l'hystérectomie mais avec des taux en dehors de la grossesse de 1,08 (0,75-1,89) mg/dL et 1,17 (0,61-1,67) mg/dL, pendant la grossesse (108). L'impact des immunosuppresseurs n'est donc pas à minimiser. La durée maximale d'utérus en place est de 9 ans en Turquie.

Les transplantectomies per-protocoles sont réalisées pour moitié au cours de la césarienne et pour moitié quelques mois après la césarienne.

#### **h) La première transplantation utérine Française**

La première patiente française ayant bénéficié d'une greffe utérine à l'hôpital Foch, par notre équipe, était âgée de 34 ans au moment de l'inclusion dans le protocole de TU (N° NCT03689842). Elle souffrait de MRKH sans reconstruction vaginale et n'avait pas de comorbidité. Sa donneuse était sa mère âgée de 57 ans, elle était 3eme geste 3eme pare (G3P3) sans comorbidité sévère. Les sérologies pour HHV8 étaient négatives pour les deux, les sérologies EBV, CMV, HHV6, toxoplasme et VZV étaient positives pour les 2. Les groupes sanguins étaient O+, la receveuse n'avait pas d'anticorps anti-HLA contre la donneuse en préopératoire. La chirurgie a eu lieu le 31/03/2019. Le prélèvement a duré 13 heures et la greffe 6 h50. Le temps total d'ischémie a été de 3h. Le traitement immunosuppresseur a compris en induction du basilixumab et des corticoïdes IV, puis du tacrolimus, du MMF et des corticoïdes per os (10mg/ jour). Les premières menstruations sont survenues 14 jours après la greffe. Un

relais MMF par azathioprine a été réalisé 10 mois après la greffe. Le premier transfert embryonnaire réalisé 15 mois après la greffe (avec retard de 3 mois lié à la pandémie COVID-19) a été un succès. La grossesse s'est bien déroulée jusqu'à 30 semaines d'aménorrhées (SA) ou la patiente a été hospitalisée pour des contractions utérines et des anomalies du rythme ayant nécessité un traitement par atosiban. La patiente a développé une prééclampsie avec insuffisance rénale à 32 SA nécessitant une césarienne à 32 SA et 4 jours. A noter qu'une augmentation progressive des doses de tacrolimus avait été nécessaire pendant la grossesse pour maintenir une tacrolémie satisfaisante. Cette césarienne a permis la naissance d'une petite fille en bonne santé de 1850 grammes. La prééclampsie et l'insuffisance rénale sont rapidement rentrées dans l'ordre en post-partum. La patiente a été positive à SARS-CoV-2 en post-partum, mais n'a présenté aucun signe de gravité. Par la suite, elle a été enceinte de son deuxième enfant 17 mois après le premier, suite au deuxième transfert embryonnaire. La grossesse s'est bien déroulée jusqu'à 34 SA et 4 jours, ou la patiente a été hospitalisée pour contractions utérines. Une césarienne a été réalisée à 34SA et 6 jours, en raison de contractions persistantes, elle a permis la naissance d'une petite fille en bonne santé de 2550 g en février 2023. L'analyse histologique des 2 placentas a montré la présence de lésions en faveur de troubles de la vascularisation utéro-placentaire (avance de maturation villositaire, foyers d'hypoplasie villositaire distale, excès d'amas nucléaires péri-villositaires) pour le premier et une discrète avance de maturation pour le deuxième. La patiente a bénéficié d'une explantation de l'utérus 4 mois après la césarienne. A aucun moment, elle n'a présenté de signes de rejet sauf au moment de l'explantation ou un rejet humoral a été mis en évidence. Elle a ensuite développé des anticorps anti-HLA. Elle a présenté au cours de la durée de la greffe plusieurs infections urinaires et vaginales bénignes à divers germes comme l'Escherichia Coli. Le traitement immunosuppresseur a été interrompu le lendemain de l'explantation. De l'hydrocortisone a été

poursuivi 3 mois. La description en détail de ce cas jusqu'à son post-partum de la première grossesse été publiée et est accessible en **annexe 1** (109) et ont fait l'objet de travaux (cf partie Résultats).

### **i) Enjeux immunologiques de la transplantation utérine**

La transplantation utérine est un modèle unique associant plusieurs défis immunologiques : non seulement elle associe une greffe d'organe à la grossesse mais l'organe greffé est celui qui porte la grossesse. Les lymphocytes utérins permettent un dialogue unique entre les cellules et les tissus provenant de la patiente greffée et ceux du fœtus semi-iallogénique. Les réponses allo-immunes (rejet, ischémie reperfusion) et l'immunosuppression peuvent interférer avec la complexité de l'interface materno-fœtale, affectant la placentation, la grossesse et l'accouchement prématuré. Inversement, la décidue constitue un environnement immunosuppresseur qui interfère avec les réponses allo-immunes. La TU peut enfin avoir également un impact sur le microchimérisme fœtal et maternel (124).

Ces enjeux sont importants à appréhender car le but de la greffe est l'obtention d'un enfant en bonne santé et c'est une greffe non vitale dont les risques doivent être minimisés. Le traitement immunosuppresseur doit prendre en compte la phase de la TU et être dynamique depuis la période postopératoire, en passant par le transfert d'embryon et la grossesse, jusqu'à l'accouchement et l'hystérectomie afin d'entraîner un minimum de risques de complications pour la mère et le fœtus tout en étant efficace sur les rejets.

Le rejet pourrait constituer un défi tant au niveau du diagnostic que du traitement.

Le traitement immunosuppresseur doit être axé sur le type de rejet et la classification histologique et, si le rejet se produit pendant la grossesse, sur l'utilisation de traitements n'ayant pas d'effets tératogènes. Le diagnostic du rejet de greffe d'utérus doit être amélioré par l'introduction de marqueurs précoces. L'histologie seule peut conduire à une interprétation erronée. Elle doit être étayée par des résultats cliniques, des résultats d'analyses de laboratoire et même une seconde biopsie, si nécessaire.

Les recherches futures devraient se concentrer sur les effets des immunosuppresseurs sur le bien-être du fœtus et du nouveau-né et sur le développement de protocoles efficaces utilisant des médicaments déjà approuvés ou de nouveaux médicaments pour atteindre la tolérance, ce qui permettrait à chaque receveuse de poursuivre sa grossesse même si le greffon a déjà été exposé à un rejet.

Une meilleure compréhension des complications liées à la grossesse tels les échecs d'implantation, les fausses couches à répétition, les pré éclampsies, les accouchements prématurés est également nécessaire pour assurer le succès de ces grossesses très particulières.

# **L'infection à SARS-CoV-2**

## **1) Infection à SARS-CoV-2**

La pandémie de COVID-19 (Maladie à Coronavirus 2019) est une maladie infectieuse due au Coronavirus 2 du Syndrome Respiratoire Aigu (SARS-CoV-2). Depuis son apparition en décembre 2019 à Wuhan en Chine, l'épidémie s'est rapidement répandue sur tous les continents, devenant un problème majeur de santé publique. Le SARS-CoV-2 est un virus enveloppé à Acide ribonucléique (ARN) simple brin positif du genre beta coronavirus qui se transmet par les gouttelettes salivaires ou les sécrétions nasales, via les voies aériennes supérieures (125). Lorsqu'il arrive au niveau des poumons, il infecte les cellules épithéliales alvéolaires en se fixant à l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine 2 (ACE2), via sa protéine de surface Spike (126).

Les patients infectés peuvent présenter divers symptômes tels que de la fièvre, des maux de tête de la toux, de la fatigue, des courbatures, une agueusie, une anosmie ou encore des difficultés respiratoires d'intensité variable entre les individus (127).

Dans la majorité des cas, les formes sont asymptomatiques, légères ou modérées menant à un rétablissement sans nécessité d'hospitalisation. Les personnes âgées de 60 ans ou plus et celles possédant des comorbidités telles que l'obésité, des maladies cardiovasculaires, des maladies auto-immunes, ou encore des maladies respiratoires chroniques sont plus exposées aux formes graves de la maladie (128). L'infection augmente également le risque de thrombose(129). Il est à noter que les hommes sont également plus sujets aux formes sévères que les femmes (130). Ces formes sévères nécessitent une hospitalisation pour mise sous oxygène et dans les cas les plus avancés, une admission en soins intensifs avec possibilité de décès du patient (128). Les



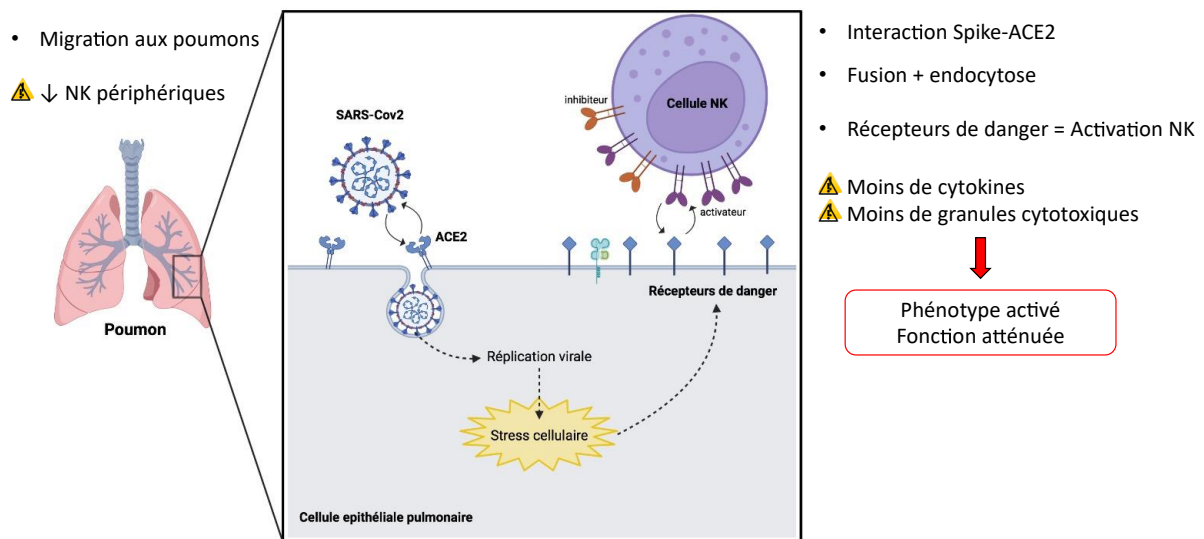
formes les plus sévères semblent être associées à un dysfonctionnement immunitaire induit par le virus (131).

Lors de l'infection, la réponse immunitaire se met en place afin de lutter contre l'invasion et la réplication virale. L'infection par le SARS-CoV-2 est caractérisée par une lymphopénie avec diminution de plus de 60 % des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ pour une forme sévère de la maladie (132). Dans le plasma des patients COVID-19+, on retrouve un taux élevé de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1b, l'IL-7, l'IL-8, L'Interféron gamma (IFN  $\gamma$ ) ou le Facteur de Nécrose Tumorale alpha (TNF $\alpha$ ), mais aussi de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (133). Un certain sous type de cellules NK activées est particulièrement associé aux formes sévères (134). Dans les cas les plus avancés, on observe des Syndromes sévères de Détresse Respiratoire Aigüe (SDRA) qui sont notamment liés à une production anormalement élevée de cytokines pro-inflammatoires (notamment de l'IL-6), entraînant une inflammation massive et des lésions tissulaires importantes pouvant mener au décès du patient ; on parle de tempête cytokinique (135, 136).

## **2) NK et SARS-CoV-2**

Lorsque le SARS-CoV-2 infecte les cellules épithéliales pulmonaires, l'activation des cellules innées résidentes permet le recrutement des cellules NK périphériques au niveau du site infecté (poumon) par la présence de facteurs chimio-attractants. Cette redistribution au site de l'infection entraîne une diminution des cellules NK en périphérie chez les patients COVID-19+ (137, 138). Malgré cette diminution, les cellules NK périphériques des patients COVID-19+ sont phénotypiquement activées (expression de CD69 et HLA-DR) (138). En parallèle, certaines études montrent que les cellules NK paraissent fonctionnellement épuisées chez les patients infectés par le SARS-CoV-2 avec l'augmentation du récepteur NKG2A qui est un

marqueur d'inhibition des cellules NK. En effet, Bortolotti et ses collègues rapportent que des peptides de la spike présentés sur le HLA-E à la surface des cellules épithéliales pulmonaires pourraient se lier au récepteur inhibiteur NKG2A des cellules NK et ainsi limiter la libération de cytokines et de granules cytotoxiques. Ce mécanisme met en évidence un échappement viral et le rôle certainement important des NK dans cette infection (139). Cependant, les données existantes aujourd'hui sont insuffisantes pour affirmer que cette voie est la seule expliquant l'épuisement fonctionnel des cellules NK chez patients COVID-19+. En effet, d'autres études posent l'hypothèse que le défaut fonctionnel des cellules NK serait lié à une production insuffisante d'IFN- $\alpha$  lors de la COVID-19 (140). Les mécanismes immunologiques entre cellules NK et SARS-CoV-2 sont représentés en **figure 18**.



**Figure 18** : Mécanismes immunologiques entre cellules pulmonaires infectées par le SARS-CoV-2 et les cellules NK

(mémoire de M2 d'Olivia Groiseau : « Projet Matercov, caractéristiques de cellules Natural Killer à l'interface materno-foetale pendant la COVID-19 »)

### **3) L'infection à SARS-CoV-2 chez la femme enceinte**

#### **a) Effets chez la mère**

Les femmes enceintes présentent un remodelage de leur système immunitaire avec entre autres, une diminution du nombre et de la fonction des cellules NK périphériques (45) et une baisse du statut pro-inflammatoire (réponse Th1) au profit du statut anti-inflammatoire (réponse Th2). Cette baisse de la réponse Th1 et du taux de cellules NK pendant la grossesse entraîne une plus grande susceptibilité aux infections virales (141, 142).

Malgré cela, on retrouve un effet positif de la diminution de la réponse Th1 sur la COVID-19. En effet, chez les malades sévères, la réponse Th1 excessive entraîne une tempête cytokinique. L'adaptation du système immunitaire pendant la grossesse vers un statut anti-inflammatoire TH2 confère aux femmes enceintes une protection contre cette tempête cytokinique. D'autres études ont montré que les hormones de grossesse (estradiol et progestérone) joueraient un rôle protecteur dans les infections par le SARS-CoV-2 et l'influenza virus en diminuant la réponse Th1 au profit de la réponse Th2 (130, 143). De ce fait, bien que les femmes enceintes soient plus susceptibles à la COVID-19 et à l'admission en réanimation, en particulier au troisième trimestre, de par leur « relative » immunosuppression naturelle et leurs capacités respiratoires limitées (144), leur mortalité est identique à celle de la population générale (126, 141). Ainsi, le risque de formes sévères pendant la grossesse reste faible, souvent associé à des co-morbidités comme l'obésité et les maladies respiratoires (145). Nous avons trouvé des résultats concordants au sein de l'hôpital Foch ou parmi 85 cas de COVID-19 survenus au cours de la grossesse durant la première année de la pandémie, le taux d'hospitalisation était de 5,8% et 1,2% en réanimation pour détresse respiratoire (146).

L'infection augmente néanmoins le risque de complications propres à la grossesse. De nombreuses études ont montré l'augmentation des fausses couches précoces, des pré-éclampsie (OR 1,7), des retards de croissance intra-utérin (OR 9), des accouchements prématurés (OR 1,48) et des morts fœtales in utero (OR 2,36) (145, 147).

Le récepteur d'entrée ACE2 au virus SARS-CoV2 est exprimé au niveau des cellules trophoblastiques permettant ainsi l'infection au niveau du placenta. Certaines études ont d'ailleurs prouvé la présence du virus au sein du placenta par RT-qPCR ou par microscopie électronique à transmission (148) Il entraîne dans certains cas des infections placentaires et des choriomaniotites.

#### **b) Effets chez le fœtus**

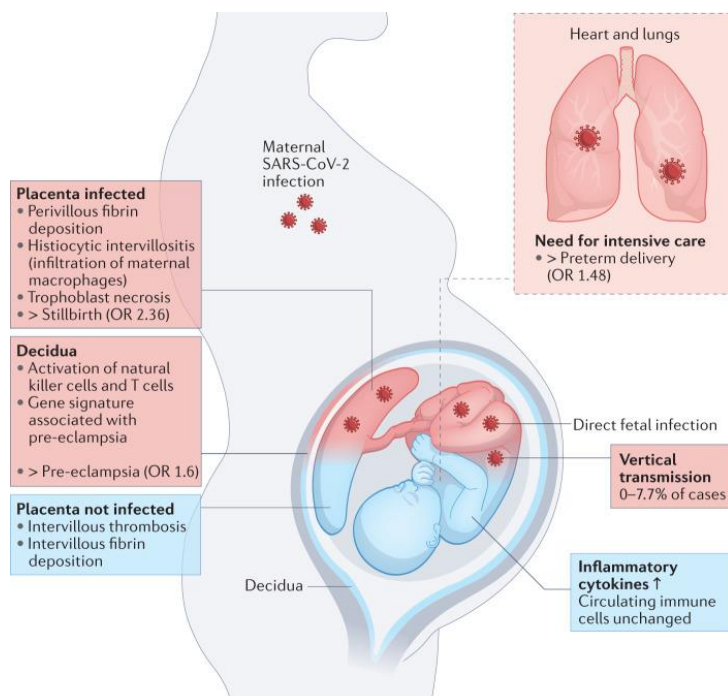
De nombreuses études ont montré que la transmission verticale du SARS-CoV-2 est très limitée (3,5 %) (145). Cependant, Le taux de morts fœtales in utéro (1,9%) et de décès néonataux (3%) sont plus importants que dans la population non infectée. Ceci peut être attribué aux formes sévères de COVID-19 pendant la grossesse, mais également aux pathologies propres de la grossesse comme la prééclampsie (149). L'infection par le SARS-CoV2 peut entraîner une mort fœtale *in-utero* par différents mécanismes : l'endommagement des vaisseaux sanguins entraînant une insuffisance placentaire (défaut d'apport en oxygène et en nutriments), une réponse inflammatoire excessive, l'apparition de thrombose ou encore une altération de la tolérance materno-fœtale (150). Des études sont contradictoires sur l'effet du SARS-CoV-2 sur le placenta ont été rapportées ; Alors que certaines trouvent des signes d'hypoperfusion et d'inflammation (151) d'autres ne trouvent pas plus de lésions vasculaires ou inflammatoires (152). Dans notre étude MATERCOV réalisée sur une cohorte de patientes de l'hôpital Foch atteintes de la COVID-19 au moment de l'accouchement et de patientes ayant eu la COVID-19

au cours de la grossesse mais guéries, nous n'avons pas trouvé plus de pathologies placentaires dans ces deux groupes vis à vis des témoins (annexe 2)(147).

Dans le sang de cordon, le nombre de cellules NK est supérieur à celui retrouvé chez l'adulte (30 % vs 10 %) mais les cellules sont phénotypiquement et fonctionnellement immatures (153).

Des données montrent une augmentation des cellules NK néonatales en cas d'infection maternelle récente à SARS-CoV-2 suggérant qu'une empreinte immunitaire observée chez le nouveau-né pourrait provenir d'une transmission de l'immunité maternelle à son fœtus (154).

Les données à l'interface materno-fœtale pendant la COVID-19 sont très limitées. Bien que Gee et ses collègues aient réalisé une étude chez les nouveau-nés de mères infectées, beaucoup d'informations restent à découvrir, notamment sur le rôle des cellules NK péri-utérines à l'interface materno-fœtale ainsi que sur la transmission de l'immunité maternelle au fœtus (154). Un résumé des effets maternels et fœtaux de l'infection à SARS-CoV-2 est montré en **figure 19** (155).



**Figure 19 :** Effets directs (rouge) et indirects (bleu) de l'infection à SARS-CoV-2 sur la mère et le fœtus(155).

# Objectifs

Durant la grossesse, l'interface materno-fœtale permet des échanges entre la mère et le fœtus. Des anomalies au niveau de cette interface peuvent retentir sur la mère en entraînant des pathologies propres à la grossesse comme la prééclampsie et des anomalies de placentation. Elles peuvent aussi retentir sur le fœtus en entraînant des fausses couches, des retards de croissance et des morts fœtales in-utéro ou avoir des effets à plus long terme sur des pathologies en lien avec l'immunité (156). La transplantation utérine est la première greffe réalisée dans le but de porter une grossesse et la naissance d'un enfant en bonne santé. Le bon déroulement de celle-ci est donc fondamental. Or, la transplantation expose à des risques de rejets et est soumise à des traitements immunosuppresseurs qui peuvent perturber cette interface. Il est donc fondamental de bien maîtriser ces deux paramètres dans cette nouvelle greffe. Les mécanismes de rejet dans la greffe utérine ont été peu étudiés. Aucune étude n'a été effectuée concernant l'identification des mécanismes physiopathologiques sous tendant les différents sous-types de dysfonctions cellulaires ou humorales, aiguës ou chroniques, par des approches transcriptomiques et phénotypiques. Seules les études observationnelles sur des biopsies du col et la recherche d'anticorps anti-HLA ont été réalisées à ce jour pour la détection de rejet.

**-L'objectif principal** de mon projet était de mieux comprendre les mécanismes de rejet de greffe utérine. Pour cela, j'ai utilisé des échantillons de biopsies cervicales (en comparant avant et durant le premier épisode de rejet) provenant d'une cohorte rétrospective de 5 patientes greffées en Suède. J'ai réalisé d'abord une approche sans à priori avec l'analyse par transcriptomique (RNAseq). J'ai ensuite sélectionné certains marqueurs d'intérêt afin de les

valider par qPCR puis de les localiser par spectrométrie de masse sur lame au sein des tissus (Hypérion ; Fluidigm®).

-En parallèle, j'ai mis en place un protocole prospectif Franco-Suédois, le protocole MARNI, dont le but est à terme d'évaluer certains marqueurs de rejets qui pourraient être retrouvés de manière non invasive (sang, frottis cervico-vaginal). En effet, l'absence de marqueurs biologiques de bon fonctionnement utérin et le fait que le rejet soit asymptomatique dans la greffe utérine limitent le dépistage du rejet aux biopsies cervicales systématiques et à la recherche d'anticorps anti-HLA. Dans ce protocole, j'ai également inclus l'étude du microbiote vaginal par séquençage ribosomal du gène 16S qui pourrait avoir un impact sur le rejet et la grossesse. J'ai fait l'analyse des échantillons de la première patiente transplantée utérine française.

**-L'objectif secondaire** était de mieux comprendre les mécanismes en jeu au sein de l'interface materno-fœtale en particulier lorsque celle-ci est perturbée. Ainsi, J'ai analysé les cellules immunitaires du sang maternel et fœtal (cordon ombilical) par cytométrie en flux au moment des deux accouchements de la première patiente greffée Française ainsi que les placentas par spectrométrie de masse (Hypérion) en me focalisant particulièrement sur les cellules NK qui jouent un rôle majeur dans la tolérance materno-foetale. J'ai réalisé les mêmes analyses sur une cohorte de patientes ayant une infection à SARS-CoV-2 lors de la grossesse ou lors de l'accouchement (étude MATERCOV).



# Résultats

# **Article 1: Immunological biomarkers associated with rejection after uterus transplantation in the humans**

ARTICLE SOUMIS

# **Title: Immunological biomarkers associated with rejection after uterus transplantation in human**

**Authors :** Marie Carbonnel<sup>1,2,3\*</sup>, Maxime Petit<sup>4</sup>, Nadine Tarantino<sup>3</sup>, Veronique Morin<sup>3</sup>, Aurélien Corneau<sup>4</sup>, Morgan Tourne<sup>5</sup>, Justine Gueguan<sup>6</sup>, Johann Mölne<sup>7</sup>, Randa Akouri<sup>8</sup>, Verena Broecker<sup>7</sup>, Angélique Vinit<sup>4</sup>, Catherine Racowsky<sup>1</sup>, Mats Brännström<sup>8,9</sup>, Jean-Marc Ayoubi<sup>1,2</sup>, Vincent Vieillard<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Foch Hospital; Suresnes, 92150, France.

<sup>2</sup> University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines ; Montigny-Le-Bretonneux,78180, France.

<sup>3</sup> Sorbonne Université, Inserm U1135, CNRS EMR 8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris) ; Paris, 75013, France.

<sup>4</sup> Pitié-Salpêtrière Cytometry Platform (CyPS), UMS037-PASS, Sorbonne Université-Faculté de Médecine ; Paris, 75013, France.

<sup>5</sup> Department of Pathology, Foch Hospital; Suresnes, 92150, France.

<sup>6</sup> Institut du Cerveau (ICM), Bioinformatics/Biostatistics iCONICS Facility, Sorbonne Université, INSERM ; Paris, 75013, France.

<sup>7</sup> Institute of Biomedicine, Department of Laboratory Medicine, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg; Göteborg, 40530, Sweden.

<sup>8</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg; Göteborg, 40530, Sweden.

<sup>9</sup> Stockholm IVF-EUGIN; Stockholm, 103 16, Sweden

[\\*m.carbonnel@hopital-foch.com](mailto:m.carbonnel@hopital-foch.com)

**One Sentence Summary:** Uterus transplantation rejection is associated with immune modulations, particularly involving B-cell structures linked to tertiary lymphoid structures, and the accumulation of macrophages producing granzyme B.

**Abstract:**

Uterus transplantation (UTx) is an emerging therapy for women with uterine factor infertility to achieve pregnancy and childbirth. However, critical concerns remain with this procedure including the mechanisms involved in graft rejection, the current lack of biomarkers to identify early signs of rejection, and the consequences of rejection at the maternofetal interface. In this study, we analyzed the immune profile of ectocervical biopsies from five patients following UTx to identify markers associated with rejection. Using RNA sequencing, we identified 530 up-regulated genes and 207 down-regulated genes associated with graft rejection. Enrichment databases revealed abnormalities of skin-associated genes and the immune system, in particular activation and differentiation of T and B lymphocytes, and macrophages. Imaging mass cytometry confirmed these observations; in cervical biopsies of three women, rejection was associated with the presence of B-cell structures independent of the grade of rejection, and those from two women with severe rejection episodes and poor prognosis of graft function (repeated miscarriage and implantation failures) rejection was associated with an accumulation of HLA-DR<sup>+</sup> macrophages, producing granzyme B at the surface of the epithelium. Collectively, our findings show that rejection of a UTx graft is associated with major alterations of immune markers including the involvement of B-cell structures linked to tertiary lymphoid structures, and an increase in HLA-DR<sup>+</sup> macrophages expressing granzyme B. These findings provide the

foundation for further study in a larger cohort which, if confirmed, should lead to development of improved strategies for the prevention and/or treatment of uterus graft rejection.

## **INTRODUCTION**

The absence of a uterus results in absolute uterine infertility and affects around one in 500 women of childbearing age (1). The first baby born following uterus transplantation (UTx) occurred in 2014 after more than a decade of animal research undertaken by the Swedish team of Prof. Brännström (2). Since then, one hundred UTx procedures have been performed around the world with the birth of more than 40 healthy children (3, 4).

UTx is the first transitory transplantation of a non-vital organ and is performed to obtain the birth of at least one healthy child. The life of the graft is limited to the time necessary for the pregnancy(ies) so as to reduce the risks associated with the long-term use of immunosuppression. Immunosuppressive treatments after UTx are similar to those used with other organ transplants (5). However, contrary to functional markers for other organs (such as creatinine for the kidney), no early biological or radiological marker of uterine function or rejection currently exists. Evaluation of a UTx graft is performed using Doppler ultrasound monitoring of the blood flow and resistance of uterine arteries, size of the uterus and growth of the endometrium, and by assessment of menstrual period regularity. Signs of rejection occur most commonly during the first 6 months after UTx (6, 7). Rejections after UTx are almost invariably asymptomatic and not detectable on ordinary gynaecological examination or by ultrasound (6). Thus, close and frequent monitoring is currently required by regular assessment of ecto-cervical biopsies, which are invasive and may lead to side effects, such as bleeding and infection.

Using the UTx primate model (8) and the skin graft Banff classification (9), three grades of rejection have been established by Mölne et al. that emphasize T-cell invasion of the interface between the stroma and epithelium associated with a linear stromal inflammation, intercellular oedema and epithelial apoptotic bodies (Fig. S1) (6). The Dallas UTx team added perivascular inflammation, focal capillary disruption and interstitial hemorrhage to this classification (10). The overall risk of T-cell mediated rejection following UTx is about 60%, although no rejection has currently resulted in graft removal, and the majority have resolved with additional corticoid therapy (6, 10).

Signs of chronic rejection remain poorly understood in UTx. Only a few cases of humoral rejection (presence of donor specific antibody and C4d positivity in the tissue) have been reported (10, 11). Perivascular inflammation of stroma vessels in the cervix and intimal inflammation in larger vessels, associated with linear subepithelial cervical inflammation and small inflammatory foci in the myometrium have been demonstrated in two hysterectomy specimens from the first Swedish series. Such inflammatory responses may be indicative of chronic (vascular) rejection as in the composite vascularized tissue graft model (9).

With the increase in the number of UTx procedures now being performed (3), improved understanding of the immune mechanisms involved and the signs of early rejection is becoming ever more pressing. Thus, in the present study we analyzed gene expression profiles and localization of selected proteins in ectocervical biopsies before and after rejection episodes to enhance our understanding of the mechanisms underlying UTx rejection.

## **RESULTS**

### **Clinical data**

The demographic and clinical characteristics of the five patients included in this study are shown in Table 1, and their immunosuppressive treatments and clinical courses post-UTx are shown schematically in Fig. S2. All five were from the first Swedish trial (6); four had Mayer Rokitansky Küster Hauser (MRKH) syndrome, and one (Patient-1) had a history of cervical cancer, as previously described (6, 12, 13). Patient-2 had a vaginal reconstruction using the McIndoe technique (skin) and Patient-3 had a single kidney. Four of the patients used living donors who were related to the patient (three mothers and one aunt), and one used a living donor who was a friend (Patient-3).

The HLA mismatches (HLA-A, -B, and -DRB1) among the five patients varied between 1/0 and 3/2. UTx was surgically successful for all patients (i.e., a functional graft with regular menstruations for the initial 12 months after the surgery), and all but one (Patient-2) gave birth to one healthy child, and two patients (Patient-1 and -4) each delivered two (13). The pregnancy of Patient-3 was complicated by preeclampsia and that of Patient-5 by cholestasis.

Immunosuppressive therapy during the first several months following UTx involved use of tacrolimus combined with mycophenolate mofetil (MMF) in four patients, while one patient only received tacrolimus. In preparation for pregnancy, MMF was replaced by azathioprine (AZA) due to MMF fetal toxicity (14).

All five patients had at least one UTx rejection, which occurred from 2 weeks to 3 years after UTx and which, by initial evaluation, ranged in grade from 1 (mild) to 3 (severe) according to Mølne's classification (6), and that was subsequently confirmed by the pathologist at Foch Hospital (Suresnes, France). In the current study, pre- and post-biopsy specimens relating to each patient's first rejection episode were analyzed. In addition, a second pair of biopsy specimens was analyzed for Patient-2. This strategy allowed a paired analysis within patient. T-cell mediated rejection was reported for all patients, although no case of donor specific

antibodies (DSA) or C4d positivity in capillaries was identified either before or at the time of a rejection. One case of DSA was observed several months after hysterectomy in Patient-3.

The number and occurrence of rejection episodes of the graft varied among the five patients (6, 13). Patient-1 had in total one episode, which occurred before her first pregnancy. The two episodes of rejection of Patient-2 analyzed in this series were associated with miscarriage of her first pregnancy at 15 weeks of gestation (WG) due to chorioamnionitis and occurred contemporaneous with vaginal E-coli infection. This patient had four more consecutive episodes of rejection during a three-month period with failure of oral corticosteroid treatment, which required solumedrol and anti-thymocyte globulin (ATG) to reverse the rejection episodes and was administered with increased maintenance IS (tacrolimus and AZA). She underwent 16 embryo transfers and 6 miscarriages but, unfortunately, had no birth (13). Patient-3 had only one rejection episode, which occurred during her pregnancy (18 WG). Patient-4 and Patient-5 experienced three episodes of rejection with a good response to corticosteroids. In the hysterectomy specimens, signs of chronic vascular rejection were seen in in Patients -3 and -5, two years after the transplantation (12).

### **Gene expression during UTx rejection**

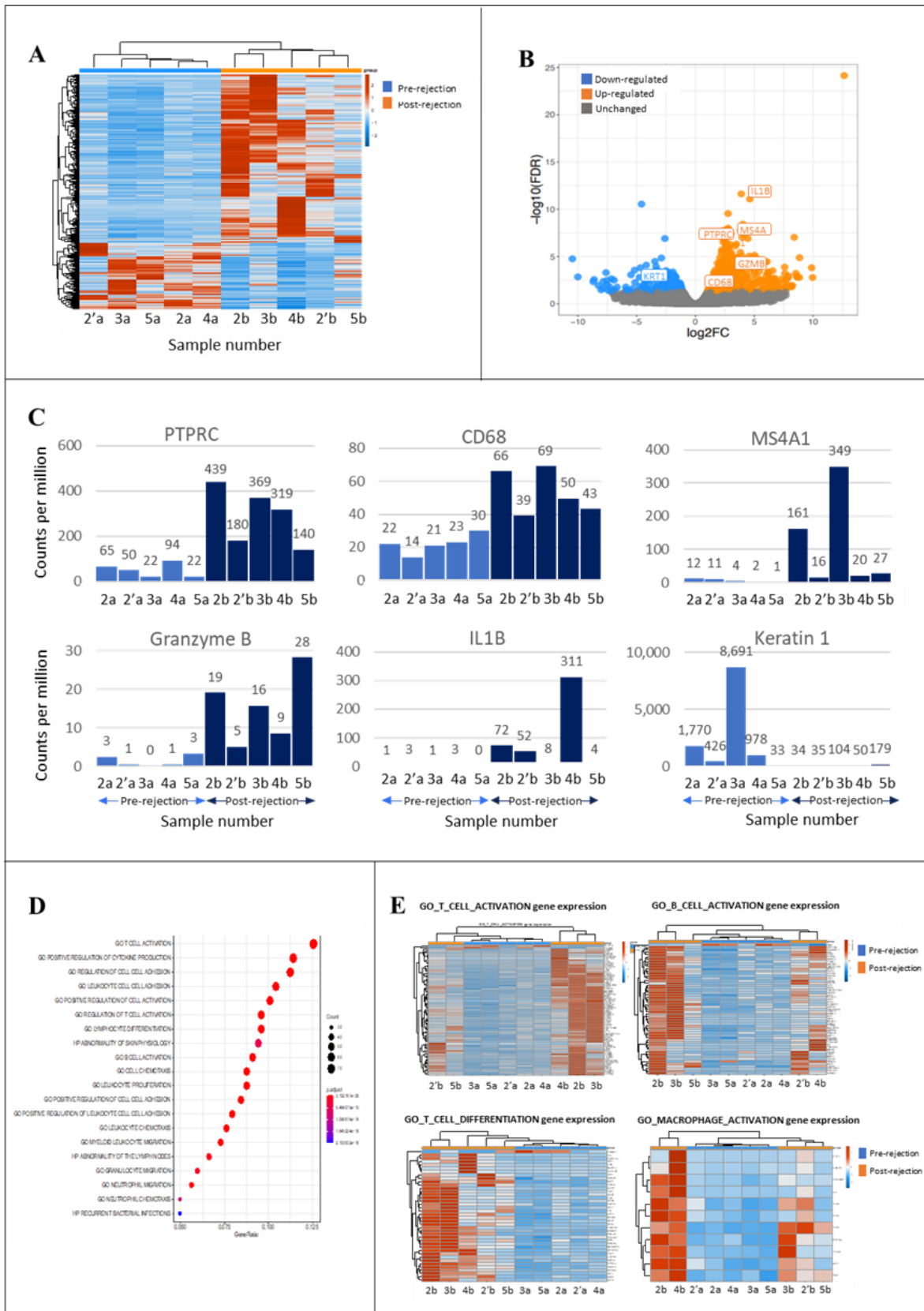
RNA-seq analysis was performed on formalin fixed paraffin embedded biopsies. Quality criteria were met for our samples except for the orientation of the library (strand of the reads) which must be known in more than 90% of cases. It was 70% on average (Fig. S2). Only reads with a certain orientation were used for the analyses. Two particularly problematic samples were removed from the analyses: sample #1a: 40% incorrect strand assignment of the reads, and sample #1b: 60% incorrect strand of the reads, both provided from Patient-1. After exclusion of the samples from Patient-1 due to a high rate of strand direction failure, principal



component analysis showed significant differences in gene expression between pre- and post-rejection biopsy samples (Fig. 1A); 530 genes were up-regulated and 270 down-regulated in the post-rejection versus pre-rejection samples with a difference of at least 2-fold. Among all the genes modulated in post-rejection samples, expression was markedly different for the following six: *PTPRC* (CD45), *CD68*, *MS4A1* (CD20), *granzyme B*, *Interleukin-1b* (*IL-1b*) and *Keratin 1* (Fig. 1B). Five of these genes (*PTPRC*, *CD68*, *MS4A1*, *granzyme B* and *IL1B*) were over-expressed in all five post- versus pre-rejection samples (Fig. 1C). However, the range of over-expression varied among the sample pairs (Table S1) and was most marked for *MS4A1* and *IL1B*. *IL-1b* was markedly over-expressed in the post-rejection sample for Patient-2 and Patient-4, while *MS4A1* was over-expressed in the first rejection episode sample of Patient-2, and in the sample of Patient-3. In contrast, *Keratin 1* was down-regulated in all post-rejection samples except for Patient 5 in which there was a five-fold increase in expression (Table S1). Seventy-three over- or under-expressed genes were selected for qPCR. The following samples were successfully analyzed by qPCR: in pre-rejection Patient-2 before her second episode of rejection, Patients 3, 4 and 5 and in post-rejection Patient-1, Patient-2 second episode of rejection and Patient-5. Among the 73 genes, only three were discordant by qPCR (*CXCL10*, *CDSN*, and *DEF103B*) (Table S2).

Analysis of identified genes by “Go gene sets enrichment” revealed that the most-expressed pathways were associated with T and B cell-activation, cytokine regulation, macrophages, and adhesion molecule expression as well as skin abnormalities (Fig. 1D). Details of the genes involved in the twenty top pathways are shown in Table S3. “Kegg pathway” analysis results revealed that the differentially expressed genes were associated with antigen processing, including those involved in the MHC class II pathway (Fig. S3A) and cell adhesion pathways (Fig. S3B).

The gene expression profiles differed markedly between pre- and post-rejection samples for each of the five pairs of biopsy samples from the four patients (Patients 2, 3, 4 and 5) included in this analysis. The profiles of all pre-rejection samples segregated together, whereas those of post-rejection clustered differently (Fig. 1D).



**Fig. 1. RNAsequencing analysis from cervix biopsies.** (A) Heatmap of hierarchical clustering based on EdgeR analysis of RNAseq samples from biopsies in pre-rejection (blue lines) and post-rejection (orange lines) (expression in log<sub>2</sub> fold-change). Each value is colored according to its level of expression and listed in order: blue color indicates inferior to median, and red color indicates superior to median. Paired samples for patient #2 (first episode): 2a and 2b in pre- and post-rejection, respectively; Paired samples for patient #2 (second episode): 2'a and 2'b in pre- and post-rejection, respectively; Paired samples for patient #3: 3a and 3b in pre- and post-rejection, respectively; Paired samples for patient #4: 4a and 4b in pre- and post-rejection, respectively; Paired samples for patient #5: 5a and 5b in pre- and post-rejection, respectively. (B) Volcano-plot of up-regulated (red dots) and down-regulated (blue dots) with log<sub>2</sub> fold-change. Not-modified genes are in grey. (C) Gene expression of *IL 1 $\beta$* , *KRT1*, *PTPRC*, *MS4A1*, *GZMB*, *CD68* from samples in pre-rejection (light blue bars) and post-rejection (dark blue bars). (D) Enrichment analysis of differentially expressed genes after rejection. Data were analyzed using the MsigDB Molecular Signatures Database. Ranking of the 20 top pathways. Dots are colored according to the p-value (available on Sup Table 3); their size is proportional to that of the set of genes. (E) Heatmap of gene-pathways dedicated to the T cell activation, B cell activation, T cell differentiation, and Macrophage activation. Data were obtained for samples from biopsies in pre-rejection (blue lines) and post-rejection (orange lines).

### **Characterization of specific immune profiles associated with UTx rejection by imaging mass cytometry**

To undertake an in-depth imaging mass cytometry (IMC) analysis of the modulation of the immune composition and spatial organization of UTx after rejection, we optimized a multiplex antibody panel (Table S4) based on RNA sequencing data. Patient-4 was excluded because of

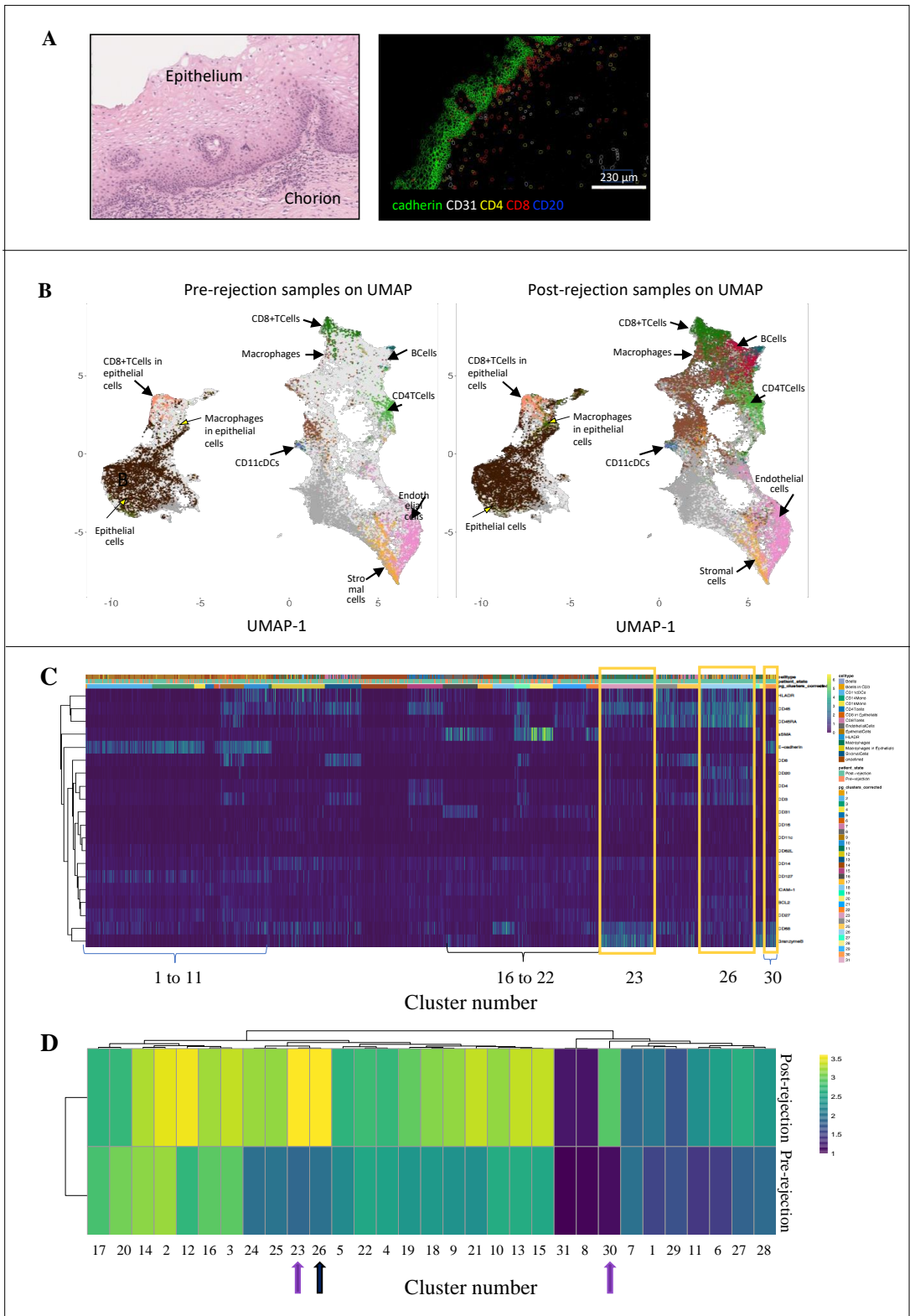
tissue deficiency. Images acquired from IMC (on the right) were consistent with those obtained by hematoxylin eosin staining (on the left) (Fig. 2A). After pooling the samples from all four patients, a supervised lineage assignment approach was used to classify bulk expression of endothelial cells, epithelial cells, and immune cell populations including macrophages, B cells, CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 2B). As expected, in biopsies before rejection, major cell populations included endothelial, epithelial, and stromal cells and a few T lymphocytes, whereas macrophages and B lymphocytes were relatively infrequent. In contrast, in those biopsies after rejection, the number of immune cells increased markedly, particularly for macrophages and B cells. Macrophages and CD8<sup>+</sup> T cells were the only immune cells identified within the epithelium that also increased in post-rejection samples. A cell type/sample-combination approach showed that macrophages next to epithelial cells, and B cells next to T cells, were strikingly evident in post-rejection, as compared to pre-rejection samples.

An unsupervised analysis was performed to better define the different cell populations involved in graft rejection. As shown in Fig 2C, this analysis revealed thirty different cell-clusters of interest including twelve (#1 through #11 and #30) associated with the epithelium (e-cadherin expression); six (#16 through #22) associated with stroma cells or endothelium (alpha smooth muscle actin: aSMA and CD31 expression); one (#26) characterized by the presence of B cells, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells; four (#9, #13, #17 and #19) associated with CD8<sup>+</sup> T cells; one (#14) associated with CD4<sup>+</sup> T cells; and seven clusters (#10, #12, #18, #21, #23, #24 and #30) associated with macrophages. Among the seven associated with macrophages, two (#23 and #30) were dominated by HLA-DR<sup>-</sup>granzyme B<sup>+</sup> macrophages. Importantly, the most differentially expressed cell populations in rejection were represented by clusters #23 and #30, which included HLA-DR<sup>-</sup>granzyme B<sup>+</sup> macrophages, and cluster #26, which was characterized by the presence of B and T lymphocytes (Fig. 2D).

We next characterized the most represented cell populations and their interactions in samples post-rejection. Rejection was associated with a strong increase in immune cells, highlighted by the presence of macrophages and B cells close to T lymphocytes (Fig. 3A). A re-analysis of the T lymphocytes in post-rejection samples showed that the majority of CD4<sup>+</sup> T cells were differentiated (CD45Ra<sup>-</sup>) and non-activated (HLA-DR<sup>-</sup>), whereas CD8<sup>+</sup> T cells were naïve (CD45Ra<sup>+</sup>) and activated (HLA-DR<sup>+</sup>) (Fig. 3B and 6C). A population of HLA-DR<sup>-</sup> macrophages expressing granzyme B increased in post-rejection samples (Fig. 3D and 6E). Granzyme B was most prominently produced by macrophages rather than by CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> T cells in post-rejection (Fig. 3E). We also observed a decrease in keratin 1 expression in epithelial cells associated with rejection (Fig. 3G).

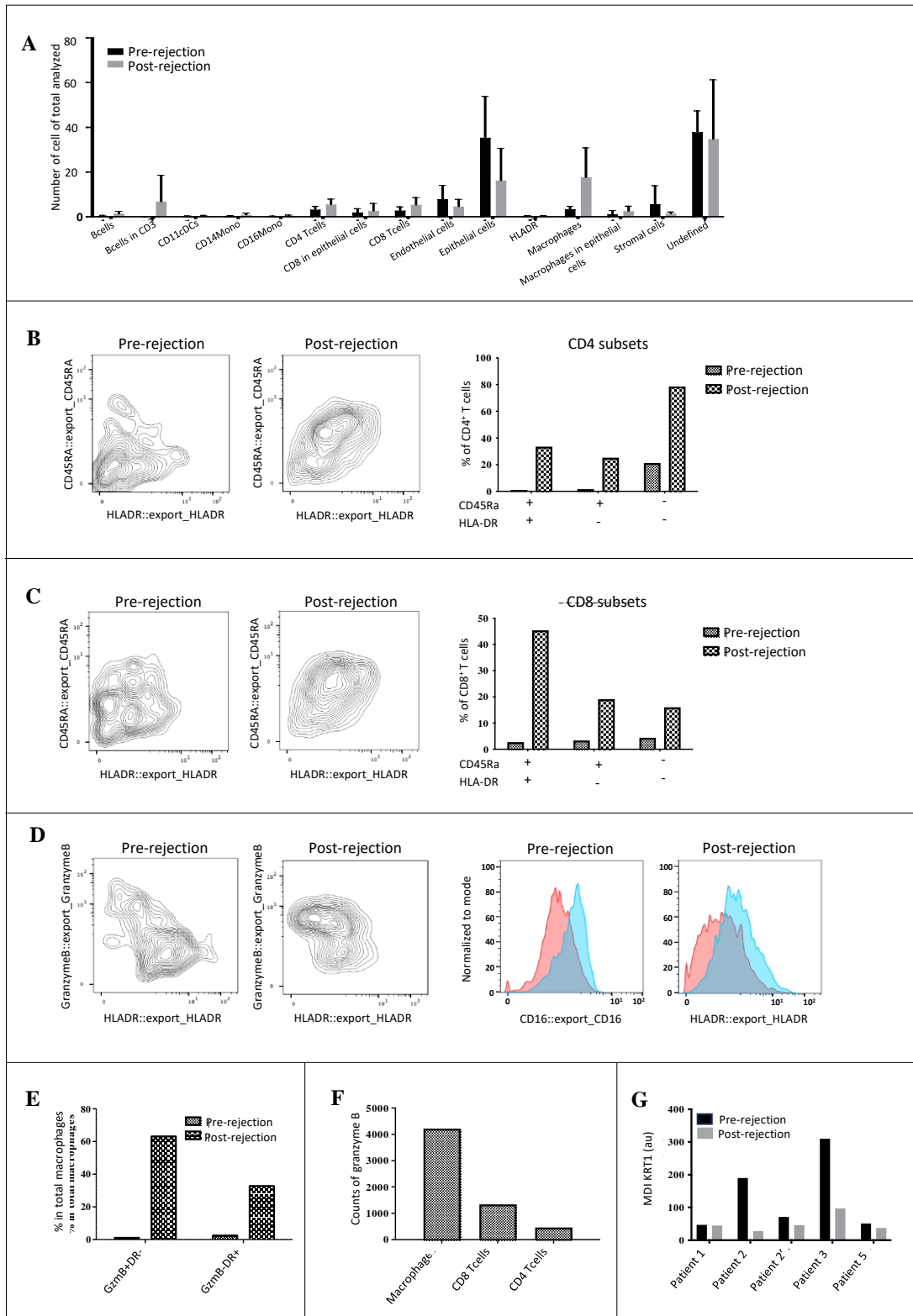
To further dissect the mechanisms associated with UTx rejection, we next performed an individual analysis of the pairs of biopsies from each of the four patients by IMC. Post-rejection biopsies from each patient revealed T cell infiltration into the cervical extravascular space at the interface between the stroma and epithelium (Fig. 4 to 8). Most of these CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were differentiated (CD45Ra<sup>-</sup>) and non-activated (HLA-DR<sup>-</sup>) in pre- and post-rejection samples (Fig. 4). More interestingly, we observed specific B-cell structures in samples after rejection in Patient-2 (her first episode of rejection), and in Patient-3 and Patient-5. In Patient-3, a high proportion of B-cells was identified close to dendritic cells and surrounded by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the stroma. Most of these T cells were naïve (CD45Ra<sup>+</sup>) and activated (HLA-DR<sup>+</sup>) (Fig. 5). To a lesser degree, Patient-2 showed a similar profile during her first episode of rejection (Fig. 6), as also did Patient-5 (Fig. 7). In biopsies from these patients (Patient-2 first episode of rejection, Patients -3 and -5), we also observed strong interactions between B cells and CD11c<sup>+</sup> dendritic cells (Fig. 5D, 6D, 7D), which were not observed in samples obtained before rejection or in the other two episodes of rejection (Patient 2 second

episode of rejection and Patient-1) (Fig. 4D, 8D). Furthermore, in the samples of both rejection episodes of Patient-2 we also observed an accumulation of HLA-DR<sup>+</sup> macrophages producing granzyme B, consistent with the increase of granzyme B, measured by RNA sequencing (Fig. 1C). These specific macrophages were mainly located in the stroma and the epithelium up to the surface of cervix (Fig. 6 and 8).

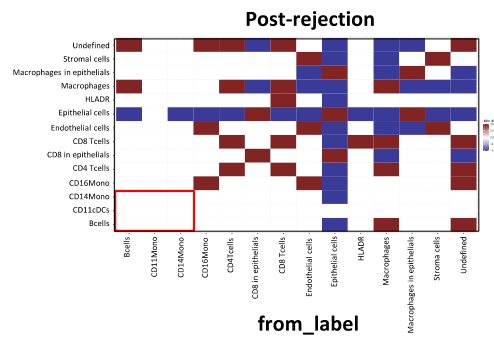
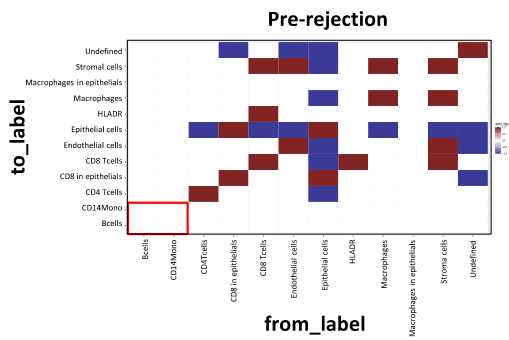
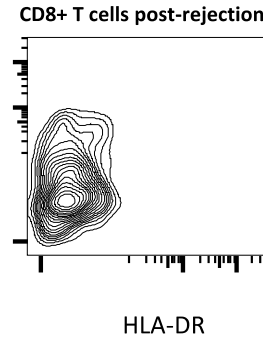
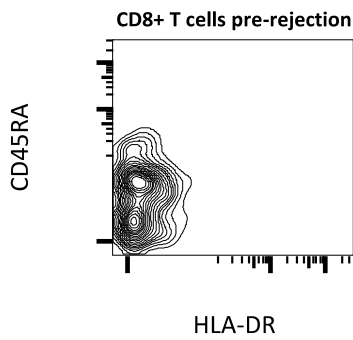
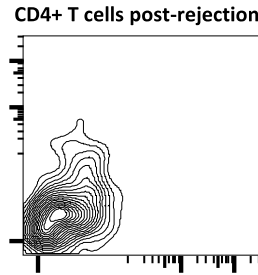
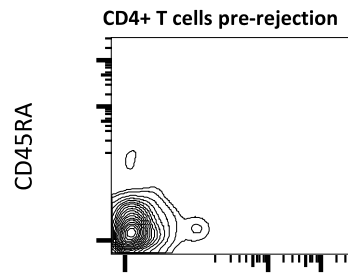
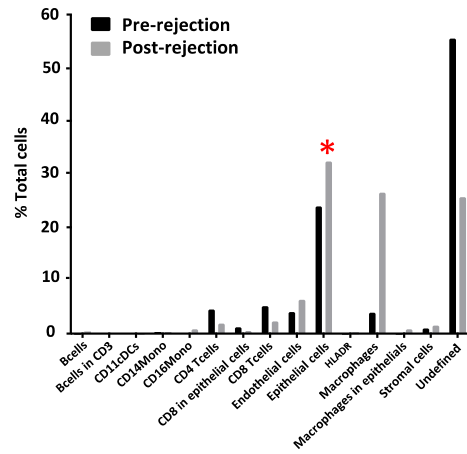
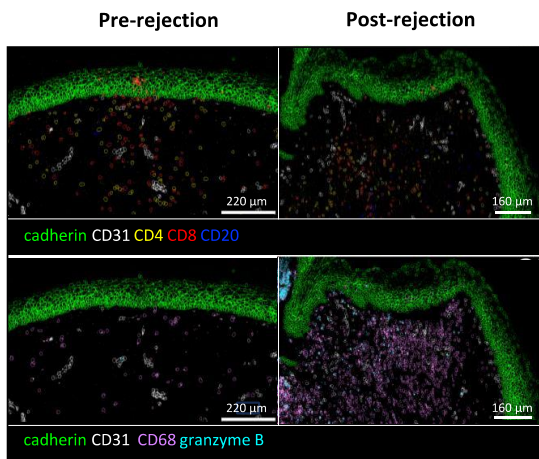




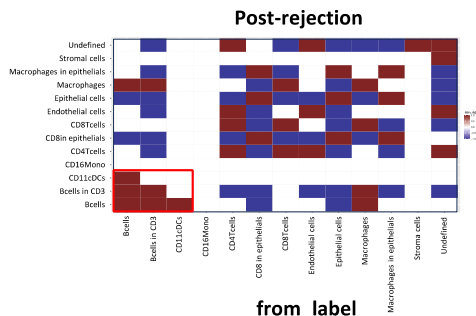
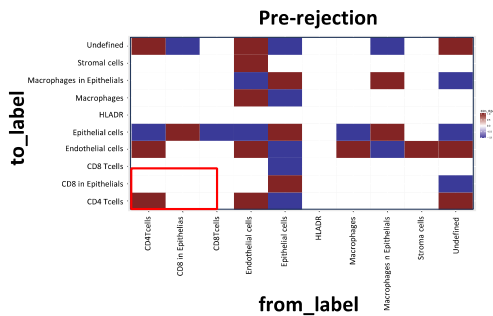
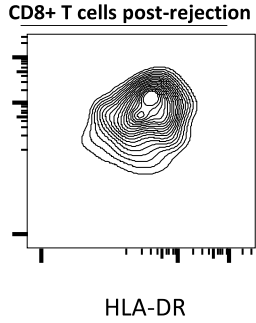
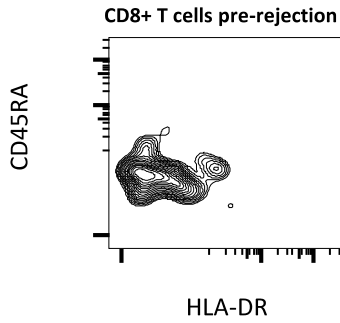
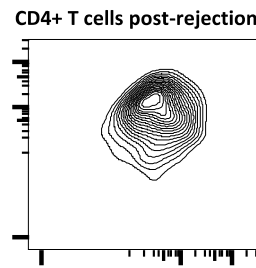
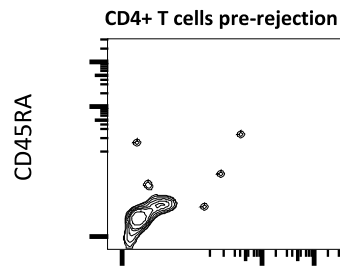
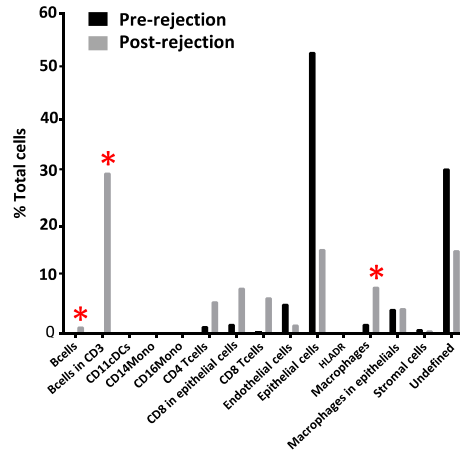
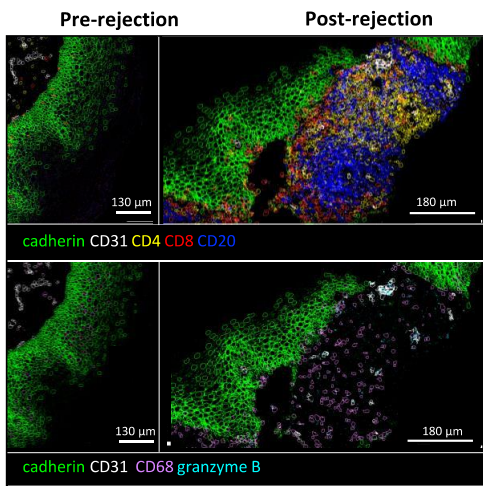
**Fig. 2. Repartition of the cell-subsets in pre- and post-rejection.** (A) Staining comparison of HES (left panel) and IMC pseudo-colored image (right panel) for a prototypic sample of post-rejection (Patient#5), showing a CD8<sup>+</sup> T cells infiltration between epithelium and stroma (Grade 1 rejection). (B) Expression of IMC cell-subset clusters on UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) in pre-rejection (left panel) and post-rejection (right panel) samples (Patient-1, Patient-2 first and second episode of rejection, Patient-3 and Patient-5). Major cell-subset components are indicated. (C) Heatmap of unsupervised analysis of IMC cell-subset clusters in pre-rejection and post-rejection samples (Patient-1, Patient-2 first and second episode of rejection, Patient-3 and Patient-5). Major clusters for the epithelial cells (#1 to 11 and 30), a mix of epithelial and stromal cells (#16 to 22), macrophages granzyme B<sup>+</sup> (#23), and lymphocytic cells (#26). (D) Heatmap of IMC differential expression in clusters according to the rejection status. Arrows show most expressed clusters in rejection: clusters 23 and 30 are associated with granzyme B positives, and cluster 26 is associated with B cells in interaction with CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells.



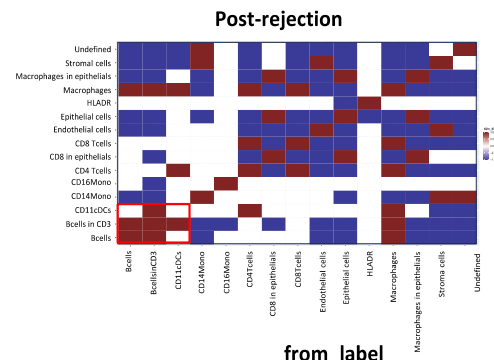
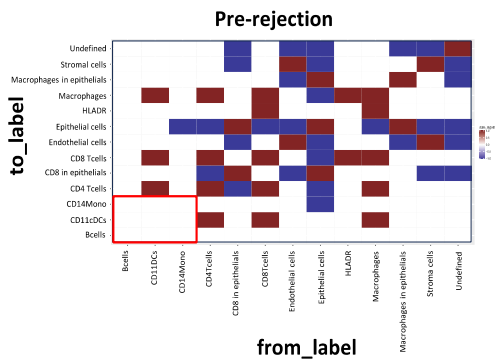
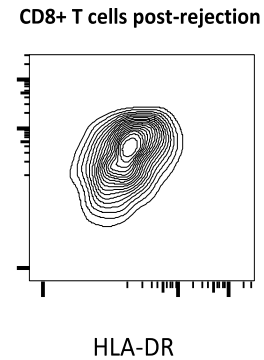
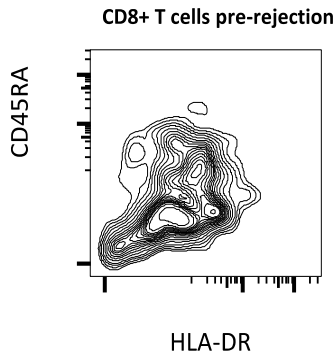
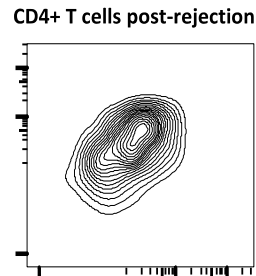
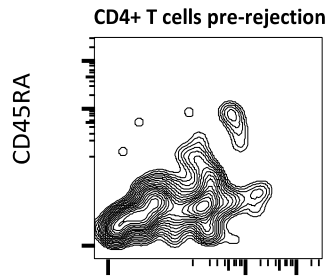
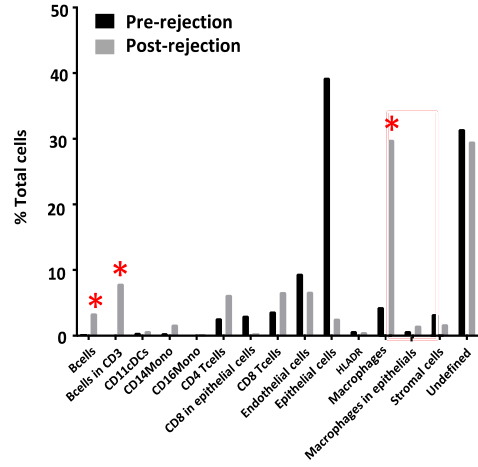
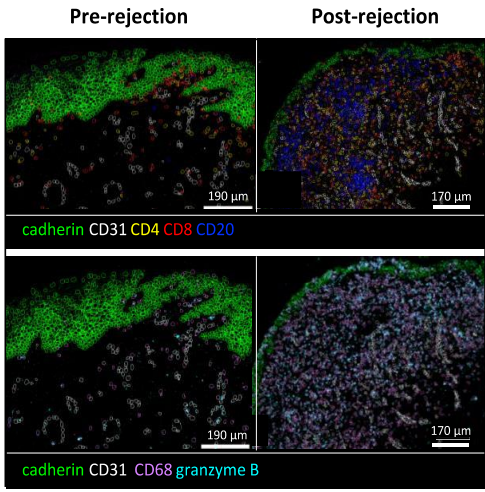
**Fig. 3. Characterization of immune cell-subsets in post-rejection.** (A) Bulk analysis of the cell-subset repartition of samples from biopsies in pre-rejection (black bars) and post-rejection (grey bars). (Patient-1, Patient-2 first and second episode of rejection, Patient-3 and Patient-5). Data are expressed in % of cells of all cells analyzed per sample. (B) Flow cytometry contour plots and quantitative analysis of CD4<sup>+</sup> T cells subsets according to the CD45RA and HLA-DR expression in pre- and post-rejection. (C) Flow cytometry contour plots and quantitative analysis of CD8<sup>+</sup> T cells subsets according to CD45RA and HLA-DR expression in pre- and post-rejection. (D) Flow cytometry contour plots of CD68<sup>+</sup> Macrophages according granzyme B and HLADR before (left panels) in pre- and post-rejection, and histogram overlay analysis of CD68<sup>+</sup> Macrophages expressing CD16 or HLA-DR in pre-rejection (red line) and post-rejection (blue line) (right panels). (E) Quantitative analysis of CD68<sup>+</sup> macrophages expressing granzyme B and/or HLA-DR status in pre- and post-rejection. (F) Quantitative analysis of cell-subsets expressing granzyme B in post-rejection. (G) quantitative expression of Keratine 1 level in epithelial cells in pre- and post- rejection samples of each patient. MFI: Mean Fluorescent Intensity level of expression.



**Fig. 4. Individual analysis of biopsy samples from Patient-1.** (A) IMC pseudocolored images in pre-rejection (left panel) and post-rejection (right panel). (B) quantitative analysis of the cell-subsets in pre-rejection (black bars) and post-rejection (grey bars); the asterix indicates at least a five-fold difference in immune cells for pre-rejection versus post-rejection samples. (C) Flow cytometry contour plots of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells according to the CD45RA and HLA-DR expression in pre- and post-rejection. (D) proximal distribution of relationships among cell types in pre-rejection and post-rejection samples as determined by neighborhood analyses. Blue= distant; red=close; and white=no relationship.

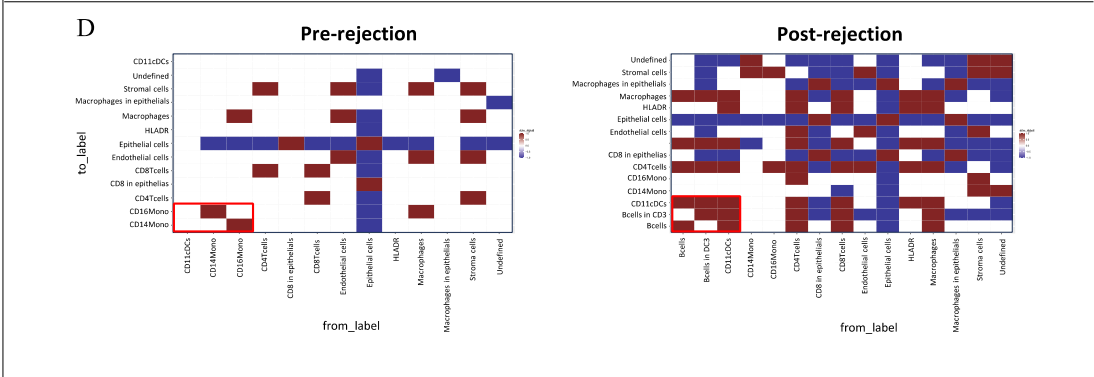
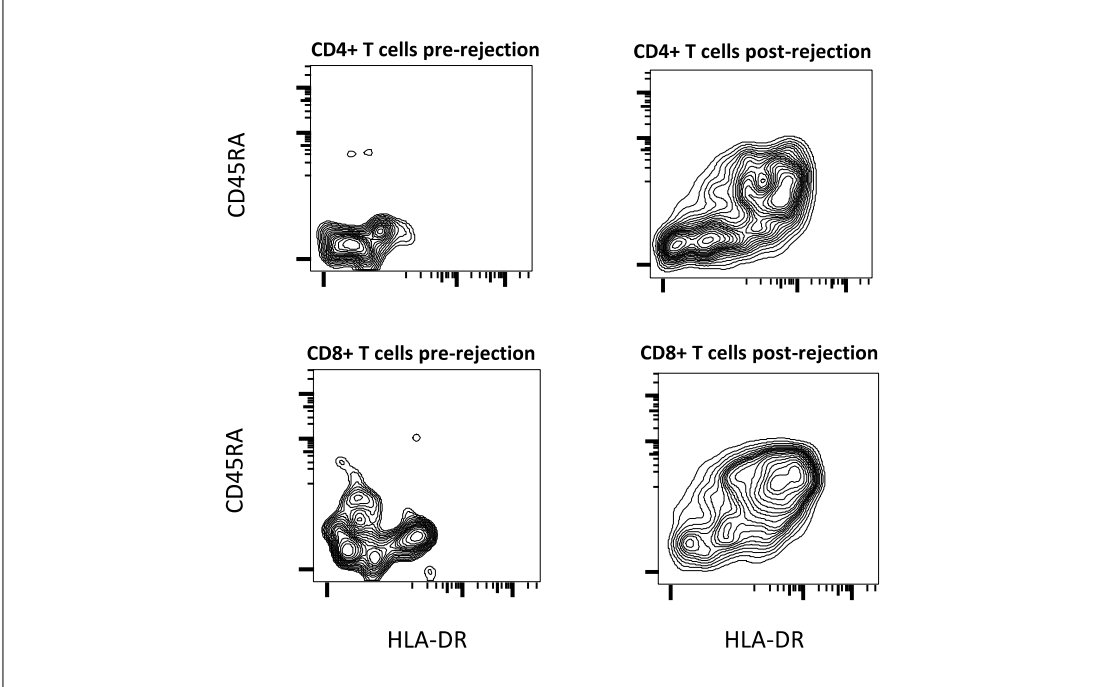
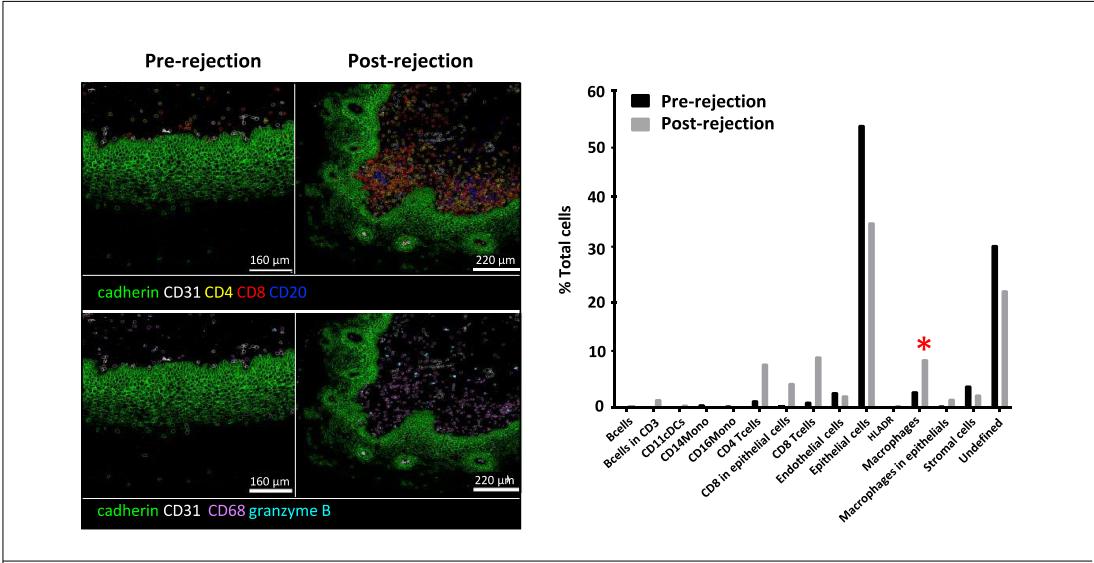


**Fig. 5. Individual analysis of biopsy samples from Patient-3.** (A) IMC pseudocolored images in pre-rejection (left panel) and post-rejection (right panel). (B) quantitative analysis of the cell-subsets in pre-rejection (black bars) and post-rejection (grey bars); the asterix indicates at least a five-fold difference in immune cells for pre-rejection versus post-rejection samples. (C) Flow cytometry contour plots of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells according to the CD45RA and HLA-DR expression in pre- and post-rejection. (D) proximal distribution of relationships among cell types in pre-rejection and post-rejection samples as determined by neighborhood analyses. Blue= distant; red=close; and white=no relationship.

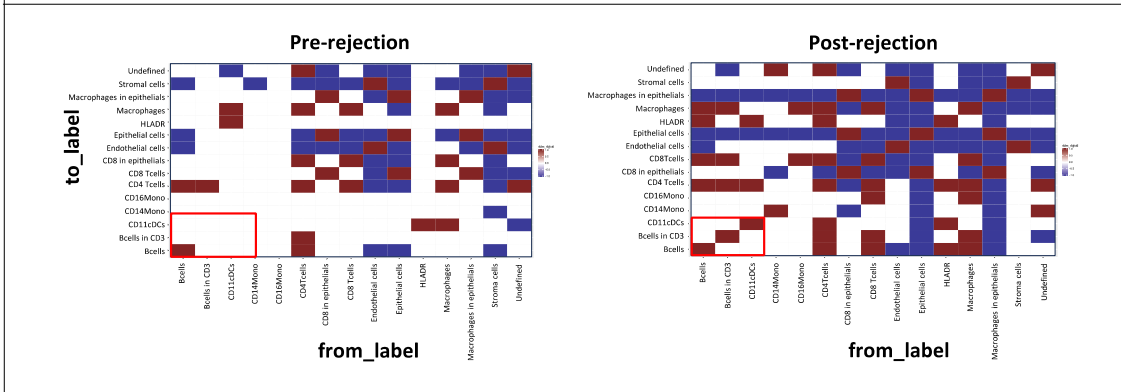
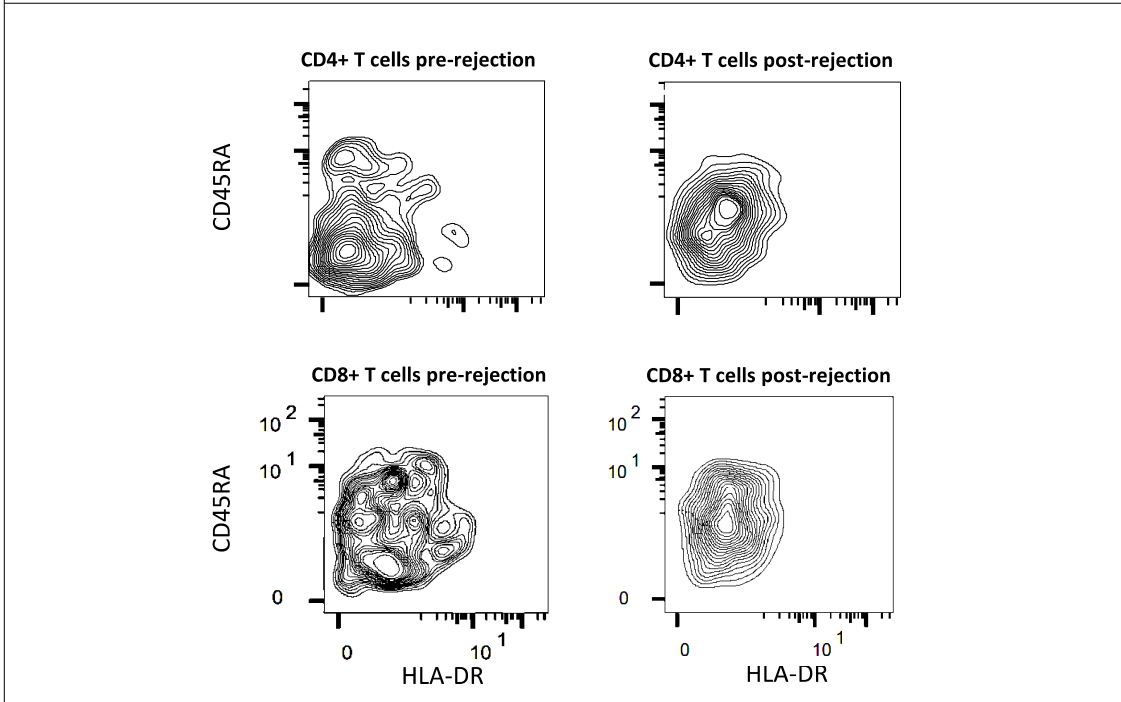
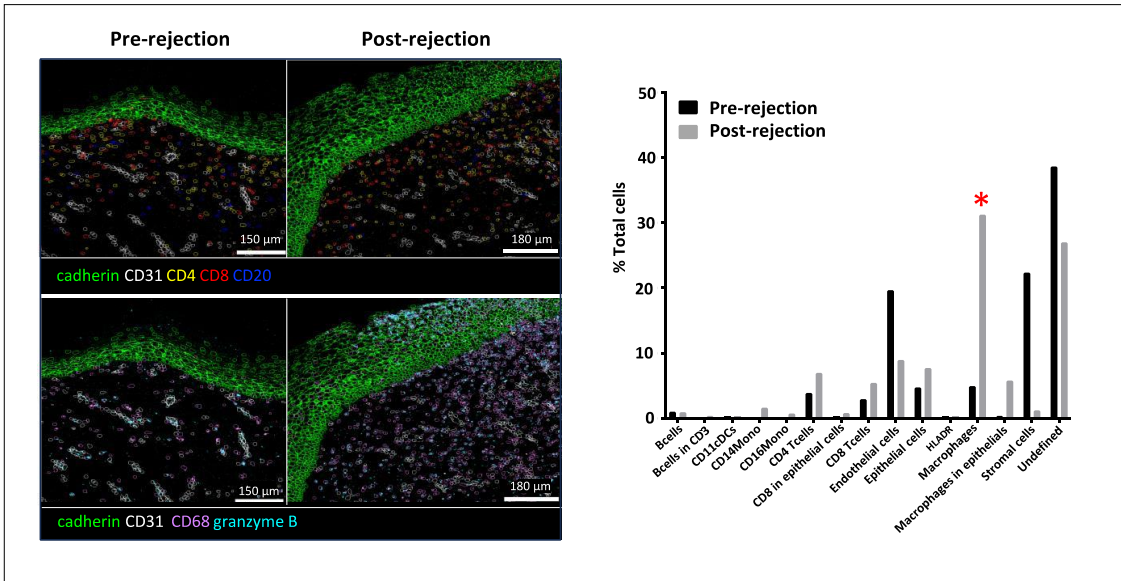




**Fig. 6. Individual analysis of biopsy samples from Patient-2 (first episode of rejection).** (A) IMC pseudocolored images in pre-rejection (left panel) and post-rejection (right panel). (B) quantitative analysis of the cell-subsets in pre-rejection (black bars) and post-rejection (grey bars); the asterix indicates at least a five-fold difference in immune cells for pre-rejection versus post-rejection samples (C) Flow cytometry contour plots of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells according to the CD45RA and HLA-DR expression in pre- and post-rejection. (D) proximal distribution of relationships among cell types in pre-rejection and post-rejection samples as determined by neighborhood analyses. Blue= distant; red=close; and white=no relationship.



**Fig. 7. Individual analysis of biopsy samples from Patient-5.** (A) IMC pseudocolored images in pre-rejection (left panel) and post-rejection (right panel). (B) quantitative analysis of the cell-subsets in pre-rejection (black bars) and post-rejection (grey bars). (C) Flow cytometry contour plots of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells according to the CD45RA and HLA-DR expression in pre- and post-rejection. (D) proximal distribution of relationships among cell types in pre-rejection and post-rejection samples as determined by neighborhood analyses. Blue= distant; red=close; and white=no relationship.



**Fig. 8. Individual analysis of biopsy samples from Patient-2 (second episode of rejection).**

IMC pseudocolored images in pre-rejection (left panel) and post-rejection (right panel). (B) quantitative analysis of the cell-subsets in pre-rejection (black bars) and post-rejection (grey bars); the asterisk indicates at least a five-fold difference in immune cells for pre-rejection versus post-rejection samples. (C) Flow cytometry contour plots of CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T cells according to the CD45RA and HLA-DR expression in pre- and post-rejection. (D) proximal distribution of relationships among cell types in pre-rejection and post-rejection samples as determined by neighborhood analyses. Blue=distant; red=close; and white=no relationship.

## DISCUSSION

Uterus transplantation (UTx) was a breakthrough in the field of reproductive medicine, which is expected to become more widely adopted in the future. However, among the major side effects after transplantation, graft rejection is a common occurrence (6, 10). To our knowledge, this is the first study that analyzes in-depth immune modulations in cervical biopsies after UTx rejection. Our findings show that UTx rejection is associated with different immune pathways. As demonstrated by RNAseq and then confirmed by imaging mass cytometry (IMC), UTx rejection was associated with two unexpected immune-cell pathways, highlighted by the presence of B-cell structures, related to tertiary lymphoid structures (TLS), and expansion of CD68<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> macrophages expressing granzyme B.

TLS can develop in non-lymphoid sites within the target organs of chronic inflammatory, autoimmune diseases, solid tumors and allograft rejection (15). TLS aggregates as tight clusters of B and T cells to compose highly organized structures that comprise a functional germinal center. The presence of these ectopic lymphoid-like structures has been linked to both protective and deleterious outcomes in patients (16, 17). They are observed in almost all types of removed

grafts due to chronic rejection after kidney, lung, heart and VCA transplantations (18, 19). Nonetheless, a correlation between TLS and rejection is controversial in solid organ transplantations. In the absence of rejection, TLS are visible in renal and cardiac allografts one month after transplantation, and increase to reach nearly 50% of grafts at one year, possibly promoting tolerance and graft function (20, 21). However, it has also been reported that the most organized TLS with germinal centers may be associated with renal dysfunction and chronic rejection events (22-25).

In the present study, the presence of specific B-cell structures, like TLS, was observed in three of five of the samples tested after UTx rejection, but never before rejection. These TLS formations were however patchy, raising the possibility that their prevalence may be underestimated from biopsies collected in a defined location. The state of rejection, however, was not correlated with the presence or evolution of the TLS in most patients. Nevertheless, in Patient-3, who had a highly organized TLS during pregnancy complicated with preeclampsia, signs of chronic rejection were observed in the post-partum transplantectomy specimen and DSA were positive few months after. Together, these observations raise the possibility of a putative correlation between highly organized TLS and chronic rejection mediated by humoral mechanisms.

Due to the limited number of cases in our study, additional analyzes will be necessary to confirm the presence of TLS after UTx, using more specific markers, such as CD21 (specific to follicular dendritic cells), DC-Lamp, or PNA<sub>d</sub> (26) to better define cell-populations, and to focus more particularly on humoral rejection. Furthermore, it will be important to estimate the link between TLS formations and preeclampsia due to insufficient invasion of the decidua, in particular the wall of the uterine spiral arteries by the extravillous trophoblast (27). Of note, the

rate of preeclampsia is estimated to be between 10% and 30% in solid organ transplants (28), and 12-16% in UTx (7, 29).

On the other hand, we found a high proportion of macrophages in the post-rejection samples in all five patients, as previously described in acute and chronic graft rejection (30). Macrophages can differentiate into two polarized states according to their function and phenotype: inflammatory (M1 type) macrophages and activated (M2 type) macrophages (31). We observed CD68<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> macrophages expressing granzyme B in both samples of the two rejection episodes of Patient- 2 that were classified as grade 3. Therefore, these macrophages expressing granzyme B may reflect the severity of rejection and a poor prognosis that compromises uterine functionality and the ability to carry a pregnancy to birth.

Granzyme B has previously been identified as a non-invasive biomarker of rejection in peripheral blood lymphocytes and urine after solid organ transplantations (32). In future studies, it will be particularly interesting to test whether this cytolytic marker is also detectable in non-invasive samples like blood or vaginal smear. These macrophages which exhibit down regulation of HLA-DR and produce granzyme B, are differentiated into the M2 phenotype (33, 34) and are known for their “anti-inflammatory” properties (35). Nevertheless, they can also produce matrix metalloproteinases, like MMP3 and MMP9, that contribute to extracellular matrix turnover and fibrosis (36). Matrix metalloproteinases have been associated with worse outcomes in sepsis, cancer (33, 34) and also in transplantation with fibrosis during chronic rejection (37). Serum MMP3 has been also identified as a potential biomarker of severe rejection in VCA (38).

Of note, we observed an increased level of MMP9 in the post-rejection samples from Patient-2, the only UTx patient analyzed with no childbirth. Her case was very particular because she had 16 embryo transfers and 6 miscarriages, and unfortunately no birth (13). Her

first episode of rejection occurred in the context of chorioamnionitis, due to vaginal E-coli infection. Recently, it was suggested that M2 polarization may be induced by pathogenic bacteria in accordance with the chronic evolution of infectious diseases (39), as we observed in Patient-2, which emphasizes a possible role of infection as a promotor of rejection.

The prevention and treatment of vaginal infections, particularly during pregnancy, should thus be a major focus in UTx patients. Such infection could influence rejection and organ functionality in addition to compromise pregnancies, more particularly in MRKH patients under immunosuppressive therapy. In the ISUTx registry report, 10% of patients had a vagina created from a split-skin graft leading to colonization of bacteria that are present in the vaginal flora (7). Our patient-2 also had a skin graft neovagina. Interestingly, repeated pregnancy losses and implantation failures were reported in another MRKH patient with neovaginal reconstruction using an intestinal flap (40). Therefore, the influence of the vaginal microbiome should be also explored in future prospective UTx studies (41). Our Patient-2 also experienced several rejection episodes, which were only resolved after antithymocytes globulin treatment (42), whereas increased doses of corticoids were ineffective. Interestingly, glucocorticoids polarize macrophages towards an M2 phenotype and may thus participate in the rejection process and treatment failure against E. Coli infection (65). In the future, the identification of M2 macrophage in association with infections may help selection of the most suitable immunosuppressive therapy which, in turn, may decrease repeated implantation failures and miscarriages.

The main limitation of our study was the small number of biopsies that we were able to include as well as insufficient material for RNAseq and IMC leading to exclusion of some samples. Despite the increasing number of UTx procedures being performed worldwide, the number is still small relative to that of other organ transplantations. Thus, the current



availability of research material in this unique population is limited. Analyses on a larger cohort, including episodes of acute and chronic rejection, targeting the cell-structures highlighted in this study, and more particularly on TLS and M2 macrophages, will be necessary to confirm these data. Nevertheless, these results suggest that acute UTx rejection is likely associated with different immune pathways, and also that *granzyme B*, *IL1 $\beta$* , *Keratin 1*, and/or *MMP9* are potential emerging biomarkers to predict or diagnose graft rejection, as previously determined in other transplantations (32). International collaborations with larger cohorts and with a larger number of cervical biopsies available for analysis are needed to confirm our findings.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Ethics Approval**

The study was approved by the Regional Human Ethics Committee and was registered at ClinicalTrials.gov (NCT01844362). Approval was given by all patients for use of their samples in this study.

### **Study Design**

Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) samples were prepared from ecto-cervical biopsies of five patients in the first Swedish trial that were collected just before and during their first episode of UTx rejection (6). For Patient-2, a second set of samples was also collected at her second episode of rejection. The clinical characteristics relating to patient UTx history are shown in Table 1 (6, 12, 13). RNAseq was performed on the samples, as well as qPCR on some selected genes and Imaging mass cytometry (IMC) with a panel of antibodies selected according to the RNAseq results.

## **Preparation of samples for analyses**

Four scrolls of 10 µm Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) ectocervical biopsies were used to perform RNA sequencing. In addition, 1 slice of 4-µm-thick (silane coated slide, -3°C) was necessary to perform IMC (Hyperion™ Fluidigm) and 1 slice of 4-µm-thick I was stained with hematoxylin and eosin and examined microscopically to redo a blind evaluation of rejection.

## **RNA Sequencing**

### Total RNA Extraction, Library Preparation and RNA Sequencing

Total RNA was extracted from paraffin-embedded biopsies according to the manufacturer's instructions (Qiagen Rneasy FFPE Kit). After extraction, RNA quality and purity was measured by the Agilent Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA). Sequencing was performed on the ICM (brain and spinal cord institute) platform at La Pitié-Salpêtrière hospital (Paris). Preparation of 3' RNA libraries was done according to the manufacturer's recommendations (QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina from Takara). Final pooled library prep samples were sequenced on NovaSeq6000 ILLUMINA with cartridges of S1-100 cycles (1x1600 million 100 base reads), corresponding to 1x88 million reads per sample after demultiplexing. Single end sequencing (1 x 100 bp) was performed using a Nextseq 500 machine and High Output Kit (300 cycles). The data analysis consisted of the following steps: (i) assessment of quality of raw reads with FastQC(43); (ii) trimming, including adaptor cutting and exclusion of reads below 40, with Trimmomatic (44); and (iii) alignment of processed reads on the human reference genome hg38 and gene quantification with Dragen v3.6.3.

Bioinformatics analysis of the data was performed by the ICM bioinformatics department using R software. EdgeR\* v 3.16.5 was used to normalize the samples. A threshold of 1 count per million (cpm) in a minimum of 3 samples was chosen for gene expression analysis. A paired analysis before and during rejection within each patient was performed with the edgeR framework (45). An adjusted p-value of  $< 0.05$  ( $p \text{ adj. } < 0.05$ ) and a  $\log_2$  fold change threshold of 1 was used to shortlist those genes with a significant change in expression (up or down) between pre-rejection versus post-rejection samples.

#### RNAseq data accession number

Raw sequence reads were uploaded to the Gene Expression Omnibus (GEO) Database (GEO Series Accession Number: GSE122248).

#### Analysis of DEGs. MDS plots

Multidimensional plots (MDS) were prepared using the MDS function within edgeR (<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>), which is a widely accepted RNAseq analytical package. This function plots the data on a two-dimensional scatterplot so that distances between the plots approximate the expression differences ( $\log_{FC}$ ) between the samples. Heatmaps, volcano plots and histograms were also used for data analyses.

#### Ingenuity pathway analysis (IPA).

A gene over-representation (enrichment) analysis was performed to look for involvement of specific biological functions or processes in UTx rejection. A list of differentially expressed genes (DEGs) with identifiers, and corresponding p values and  $\log_2$  FC were subjected to the IPA core analysis (Ingenuity Systems®). After uploading the DEGs and using default settings,

corresponding values of changes in fold expression and false Discovery rate (FDR) were obtained.

### Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

GSEA was performed for the complete transcriptome using the Rfgsea package (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/060012v3>). Gene lists representing the GO gene set Pathway were extracted from MsigDB (the Molecular Signatures Database) (46). We also used Kegg pathway analyses to identify molecular mechanisms involved (47).

### **qPCR**

A total of 73 over- or under-expressed genes between pre- rejection and post-rejection samples from our RNA seq results were selected for confirmation using qPCR (Table S2). We chose 10 genes (*G0S2*, *KLHDC7B*, *LCE3D*, *LCE3E*, *INO80B-WBP1*, *CDSN*, *RPTN*, *NFE2*, *TFF1*, *KRT1*) not involved in immune responses but with a differential expression of more than 16 (Log<sub>2</sub>:4) (with a minimum of 1 cpm in at least 3 of the 5 paired patient samples), and 63 genes involved in immune responses with a differential expression of more than 2 (log<sub>2</sub>:1) (with a minimum of 1 cpm in at least 3 of the 5 paired patient samples). We added 17 genes usually found in organ rejection (*CCR5*, *CCR9*, *CD4*, *CD8a*, *CD56*, *CXCR3*, *IFN $\gamma$* , *ITGAE* coding for CD103, *FasL*, *FOXP3*, *HAVCR2* coding for TIM3, *HLA-G*, *IGKV4*, *IGLL1*, *PDCD1* coding for PD1, *TNFRSF4* coding for protein OX40 and *STAT1*) (32), and four that are specific to cervix (*CEACAM7*, *SPPR3*, *S100A7* et *KRT6A*) (48) but not found in our RNA seq analyses. We deleted genes redundant for function. We used the Biomark™ system, real-time PCR equipment with PCR reactions in dedicated 96X96 arrays. We used *RPS14* as housekeeping gene based on its basic and 121yndrome121s cellular functions. After normalization on *RPS14*,

the fold differences in expression between rejection *versus* non-rejection samples were calculated. The Mann and Whitney test was used to evaluate the significance of the results.

### **Imaging Mass Cytometry**

The imaging mass cytometry (Hyperion™, fluidigm) is available on the CysPS platform of Sorbonne University (La Pitié-Salpêtrière Hospital). It is an imaging module which, associated with the Helios (a 3<sup>rd</sup> generation CyTOF), allows the analysis of cells in suspension and tissue by mass cytometry. It allows a localization analysis of up to 35 markers simultaneously on the same histological section due to the use of heavy metals (49). By comparing our RNA seq results and publications of antibody panels run in Hyperion™ (50, 51), we established a panel of 29 antibodies for our study. Iridium was routinely used to label nuclei and we used four structural markers (αSMA and CD31 for vessels, type 1 collagen for the extracellular matrix, cadherin for the cytoplasm of the epithelium), and eight phenotypic markers and sixteen functional markers. All the antigens, heavy metals, dilutions and conditions of slide marking used are summarized in Table S3.

We performed the development on lymph node sections before performing the final analyses on our samples. We used hematoxylin/eosin stained (HES) slides to help us localize the areas of interest (1mm<sup>2</sup> on each sample). The analysis steps of the Hyperion™ data included successively: segmentation, transformation of the segmentation masks, data preprocessing, and data analysis with quality control, data normalization including correction of any potential batch effect existing among slides and finally statistical and spatial analyses of cell diversity. The segmentation steps were carried out with the Visiopharm® software using deep learning algorithms implemented with the U-Net method, specific for biomedical image analysis. The learning was based on the iridium (191Ir and 193Ir) DNA labeling for nuclear segmentation.

The segmentation masks exported from Visiopharm were transformed under CellProfiler (Python) to allow the identification of each object individually in the following steps of the analysis. Images generated in Hyperion™ (.mcd) were transformed using Steinbock (Python) to respect the architecture and data formats required for analyses in imcRtools and cytomapper

I. Groups of cells were selected on the basis of:

- B cells: CD45<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>
- B cells close to T cells: CD45<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD3<sup>lo/+</sup>
- CD4<sup>+</sup> T cells : CD45<sup>+</sup> CD20<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>
- CD8<sup>+</sup> T cells : CD45<sup>+</sup> CD20<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>
- Macrophages: CD45<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup>
- Monocytes: CD45<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>
- Dendritic cells: CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> CD68<sup>-</sup>
- Epithelial cells: E-cadherin<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>
- Endothelial cells: CD31<sup>+</sup> aSMA<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>

We visualized the data by observing the expression levels in terms of pixels or classified objects/cells (cell types and marker expression levels). We performed spatial analyses with interaction, community and neighborhood analyses.

## References and Notes

1. K. Sieunarine, F. B. Zakaria, D. C. Boyle, D. J. Corless, D. E. Noakes, I. Lindsay, A. Lawson, L. Ungar, G. Del Priores, J. R. Smith, Possibilities for fertility restoration: a new surgical technique. *Int Surg* **90**, 249-256 (2005).

2. M. Brannstrom, L. Johannesson, H. Bokstrom, N. Kvarnstrom, J. Molne, P. Dahm-Kahler, A. Enskog, M. Milenkovic, J. Ekberg, C. Diaz-Garcia, M. Gabel, A. Hanafy, H. Hagberg, M. Olausson, L. Nilsson, Livebirth after uterus transplantation. *Lancet* **385**, 607-616 (2015).
3. J. M. Ayoubi, M. Carbonnel, C. Racowsky, D. de Ziegler, A. Gargiulo, N. Kvarnstrom, P. Dahm-Kahler, M. Brannstrom, Evolving clinical challenges in uterus transplantation. *Reprod Biomed Online* **45**, 947-960 (2022).
4. M. Brannstrom, C. Racowsky, M. Carbonnel, J. Wu, A. Gargiulo, E. Y. Adashi, J. M. Ayoubi, Uterus transplantation: from research, through human trials and into the future. *Hum Reprod Update*, (2023).
5. G. D'Amico, L. Del Prete, B. Egtesad, K. Hashimoto, C. Miller, A. Tzakis, C. Quintini, T. Falcone, Immunosuppression in uterus transplantation: from transplant to delivery. *Expert Opin Pharmacother* **24**, 29-35 (2023).
6. J. Molne, V. Broecker, J. Ekberg, O. Nilsson, P. Dahm-Kahler, M. Brannstrom, Monitoring of Human Uterus Transplantation With Cervical Biopsies: A Provisional Scoring System for Rejection. *Am J Transplant* **17**, 1628-1636 (2017).
7. M. Brannstrom, S. G. Tullius, S. Brucker, P. Dahm-Kahler, R. Flyckt, I. Kisu, W. Andraus, L. Wei, F. Carmona, J. M. Ayoubi, P. Scollo, S. Weyers, J. Fronek, Registry of the International Society of Uterus Transplantation: First Report. *Transplantation* **107**, 10-17 (2023).
8. L. Johannesson, A. Enskog, J. Molne, C. Diaz-Garcia, A. Hanafy, P. Dahm-Kahler, A. Tekin, P. Tryphonopoulos, P. Morales, K. Rivas, P. Ruiz, A. Tzakis, M. Olausson, M. Brannstrom, Preclinical report on allogeneic uterus transplantation in non-human primates. *Hum Reprod* **28**, 189-198 (2013).

9. L. C. Cendales, J. Kanitakis, S. Schneeberger, C. Burns, P. Ruiz, L. Landin, M. Rimmelink, C. W. Hewitt, T. Landgren, B. Lyons, C. B. Drachenberg, K. Solez, A. D. Kirk, D. E. Kleiner, L. Racusen, The Banff 2007 working classification of skin-containing composite tissue allograft pathology. *Am J Transplant* **8**, 1396-1400 (2008).
10. A. Agarwal, L. Johannesson, S. K. Findeis, M. Punar, M. Askar, T. W. Ma, K. Pinto, A. J. Demetris, G. Testa, Clinicopathological Analysis of Uterine Allografts Including Proposed Scoring of Ischemia Reperfusion Injury and T-cell-mediated Rejection-Dallas UtErus Transplant Study: A Pilot Study. *Transplantation* **106**, 167-177 (2022).
11. R. Flyckt, T. Falcone, C. Quintini, U. Perni, B. Eghtesad, E. G. Richards, R. M. Farrell, K. Hashimoto, C. Miller, S. Ricci, C. A. Ferrando, G. D'Amico, S. Maikhor, D. Priebe, A. Chiesa-Vottero, A. Heerema-McKenney, S. Mawhorter, M. K. Feldman, A. Tzakis, First birth from a deceased donor uterus in the United States: from severe graft rejection to successful cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol* **223**, 143-151 (2020).
12. C. C. Karlsson, P. Dahm-Kahler, N. Kvarnstrom, J. Molne, V. Broecker, M. Brannstrom, Hysterectomy after uterus transplantation and detailed analyses of graft failures. *Acta Obstet Gynecol Scand* **101**, 355-363 (2022).
13. M. Brannstrom, P. Dahm-Kahler, N. Kvarnstrom, A. Enskog, J. I. Olofsson, M. Olausson, J. Molne, R. Akouri, S. Jarvholm, L. Nilsson, L. Stigson, H. Hagberg, H. Bokstrom, Reproductive, obstetric, and long-term health outcome after uterus transplantation: results of the first clinical trial. *Fertil Steril* **118**, 576-585 (2022).
14. M. Hoeltzenbein, E. Elefant, T. Vial, V. Finkel-Pekarsky, S. Stephens, M. Clementi, A. Allignol, C. Weber-Schoendorfer, C. Schaefer, Teratogenicity of mycophenolate confirmed in a prospective study of the European Network of Teratology Information Services. *Am J Med Genet A* **158A**, 588-596 (2012).



15. C. Pitzalis, G. W. Jones, M. Bombardieri, S. A. Jones, Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **14**, 447-462 (2014).
16. E. Nova-Lamperti, P. Chana, P. Mobillo, M. Runglall, Y. Kamra, R. McGregor, G. M. Lord, R. I. Lechler, G. Lombardi, M. P. Hernandez-Fuentes, G. Study, Increased CD40 Ligation and Reduced BCR Signalling Leads to Higher IL-10 Production in B Cells From Tolerant Kidney Transplant Patients. *Transplantation* **101**, 541-547 (2017).
17. Y. Lu, B. Li, Q. Shen, R. Wang, Z. Chen, H. Jiang, J. Chen, Effects of CD20+ B-cell infiltration into allografts on kidney transplantation outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 37935-37941 (2017).
18. O. Thauinat, Pathophysiologic significance of B-cell clusters in chronically rejected grafts. *Transplantation* **92**, 121-126 (2011).
19. T. Hautz, B. G. Zelger, I. W. Nasr, G. S. Munding, R. N. Barth, E. D. Rodriguez, G. Brandacher, A. Weissenbacher, B. Zelger, P. Cavadas, R. Margreiter, W. P. Lee, J. Pratschke, F. G. Lakkis, S. Schneeberger, Lymphoid neogenesis in skin of human hand, nonhuman primate, and rat vascularized composite allografts. *Transpl Int* **27**, 966-976 (2014).
20. K. Brown, S. H. Sacks, W. Wong, Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur J Immunol* **41**, 89-96 (2011).
21. L. Le Texier, P. Thebault, A. Lavault, C. Usal, E. Merieau, T. Quillard, B. Charreau, J. P. Souillou, M. C. Cuturi, S. Brouard, E. Chiffolleau, Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant* **11**, 429-438 (2011).

22. T. Hasegawa, A. Iacono, S. A. Yousem, The significance of bronchus-associated lymphoid tissue in human lung transplantation: is there an association with acute and chronic rejection? *Transplantation* **67**, 381-385 (1999).
23. Y. H. Lee, Y. Sato, M. Saito, S. Fukuma, M. Saito, S. Yamamoto, A. Komatsuda, N. Fujiyama, S. Satoh, S. H. Lee, P. Boor, T. Habuchi, J. Floege, M. Yanagita, Advanced Tertiary Lymphoid Tissues in Protocol Biopsies are Associated with Progressive Graft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol* **33**, 186-200 (2022).
24. O. Thaunat, N. Patey, G. Caligiuri, C. Gautreau, M. Mamani-Matsuda, Y. Mekki, M. C. Dieu-Nosjean, G. Eberl, R. Ecochard, J. B. Michel, S. Graff-Dubois, A. Nicoletti, Chronic rejection triggers the development of an aggressive intra-graft immune response through recapitulation of lymphoid organogenesis. *J Immunol* **185**, 717-728 (2010).
25. O. Thaunat, N. Patey, C. Gautreau, S. Lechaton, V. Fremeaux-Bacchi, M. C. Dieu-Nosjean, E. Cassuto-Viguiet, C. Legendre, M. Delahousse, P. Lang, J. B. Michel, A. Nicoletti, B cell survival in intra-graft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation* **85**, 1648-1653 (2008).
26. S. Garaud, M. C. Dieu-Nosjean, K. Willard-Gallo, T follicular helper and B cell crosstalk in tertiary lymphoid structures and cancer immunotherapy. *Nat Commun* **13**, 2259 (2022).
27. J. Uzan, M. Carbonnel, O. Piconne, R. Asmar, J. M. Ayoubi, Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag* **7**, 467-474 (2011).
28. D. B. McKay, M. A. Josephson, Pregnancy in recipients of solid organs—effects on mother and child. *N Engl J Med* **354**, 1281-1293 (2006).

29. L. Johannesson, E. Richards, V. Reddy, J. Walter, K. Olthoff, C. Quintini, A. Tzakis, N. Latif, P. Porrett, K. O'Neill, G. Testa, The First 5 Years of Uterus Transplant in the US: A Report From the United States Uterus Transplant Consortium. *JAMA Surg* **157**, 790-797 (2022).
30. J. Li, C. Li, Q. Zhuang, B. Peng, Y. Zhu, Q. Ye, Y. Ming, The Evolving Roles of Macrophages in Organ Transplantation. *J Immunol Res* **2019**, 5763430 (2019).
31. R. Ostuni, F. Kratochvill, P. J. Murray, G. Natoli, Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol* **36**, 229-239 (2015).
32. D. J. Lo, B. Kaplan, A. D. Kirk, Biomarkers for kidney transplant rejection. *Nat Rev Nephrol* **10**, 215-225 (2014).
33. M. A. Zaki, N. Wada, J. Ikeda, H. Shibayama, K. Hashimoto, T. Yamagami, Y. Tatsumi, M. Tsukaguchi, H. Take, M. Tsudo, E. Morii, K. Aozasa, Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch* **459**, 361-366 (2011).
34. G. Monneret, M. E. Finck, F. Venet, A. L. Debard, J. Bohe, J. Bienvenu, A. Lepape, The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* **95**, 193-198 (2004).
35. D. M. Mosser, J. P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958-969 (2008).
36. P. J. Murray, T. A. Wynn, Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**, 723-737 (2011).
37. T. P. van den Bosch, K. Caliskan, M. D. Kraaij, A. A. Constantinescu, O. C. Manintveld, P. J. Leenen, J. H. von der Thusen, M. C. Claahsen-van Groningen, C. C. Baan, A. T.

- Rowshani, CD16+ Monocytes and Skewed Macrophage Polarization toward M2 Type Hallmark Heart Transplant Acute Cellular Rejection. *Front Immunol* **8**, 346 (2017).
38. B. Kollar, A. Uffing, T. J. Borges, A. V. Shubin, B. T. Aoyama, C. Dagot, V. Haug, M. Kauke, A. F. Safi, S. G. Talbot, E. Morelon, S. Dakpe, B. Pomahac, L. V. Riella, MMP3 Is a Non-invasive Biomarker of Rejection in Skin-Bearing Vascularized Composite Allotransplantation: A Multicenter Validation Study. *Front Immunol* **10**, 2771 (2019).
39. A. Vazquez-Torres, Y. Xu, J. Jones-Carson, D. W. Holden, S. M. Lucia, M. C. Dinauer, P. Mastroeni, F. C. Fang, Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **287**, 1655-1658 (2000).
40. O. Ozkan, O. Ozkan, N. U. Dogan, M. Bahceci, I. Mendilcioglu, K. Boynukalin, H. Ongun, A. M. Kantarci, M. Yaprak, M. Cengiz, N. Hadimioglu, Y. T. Kafadar, K. Celik, Birth of a Healthy Baby 9 Years After a Surgically Successful Deceased Donor Uterus Transplant. *Ann Surg* **275**, 825-832 (2022).
41. B. P. Jones, S. Saso, A. L'Heveder, T. Bracewell-Milnes, M. Y. Thum, C. Diaz-Garcia, D. A. MacIntyre, I. Quiroga, S. Ghaem-Maghani, G. Testa, L. Johannesson, P. R. Bennett, J. Yazbek, J. R. Smith, The vaginal microbiome in uterine transplantation. *BJOG* **127**, 230-238 (2020).
42. M. Bosch, M. Dhadda, M. Hoegh-Petersen, Y. Liu, L. M. Hagel, P. Podgorny, A. Ugarte-Torres, F. M. Khan, J. Luider, I. Auer-Grzesiak, A. Mansoor, J. A. Russell, A. Daly, D. A. Stewart, D. Maloney, M. Boeckh, J. Storek, Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy* **14**, 1258-1275 (2012).
43. in *Babraham Bioinformatics Web site* vol. 2015.

44. A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel, Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **30**, 2114-2120 (2014).
45. M. D. Robinson, D. J. McCarthy, G. K. Smyth, edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-140 (2010).
46. A. Liberzon, A description of the Molecular Signatures Database (MsigDB) Web site. *Methods Mol Biol* **1150**, 153-160 (2014).
47. M. Kanehisa, Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, M. Tanabe, KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* **44**, D457-462 (2016).
48. A. Shadeo, R. Chari, G. Vatcher, J. Campbell, K. M. Lonergan, J. Maticic, D. van Niekerk, T. Ehlen, D. Miller, M. Follen, W. L. Lam, C. MacAulay, Comprehensive serial analysis of gene expression of the cervical transcriptome. *BMC Genomics* **8**, 142 (2007).
49. M. E. Ijsselsteijn, R. van der Breggen, A. Farina Sarasqueta, F. Koning, N. de Miranda, A 40-Marker Panel for High Dimensional Characterization of Cancer Immune Microenvironments by Imaging Mass Cytometry. *Front Immunol* **10**, 2534 (2019).
50. Y. J. Wang, D. Traum, J. Schug, L. Gao, C. Liu, H. Consortium, M. A. Atkinson, A. C. Powers, M. D. Feldman, A. Naji, K. M. Chang, K. H. Kaestner, Multiplexed In Situ Imaging Mass Cytometry Analysis of the Human Endocrine Pancreas and Immune System in Type 1 Diabetes. *Cell Metab* **29**, 769-783 e764 (2019).
51. R. Elaldi, P. Hemon, L. Petti, E. Cosson, B. Desrues, A. Sudaka, G. Poissonnet, E. Van Obberghen-Schilling, J. O. Pers, V. M. Braud, F. Anjuere, A. Meghraoui-Kheddar, High Dimensional Imaging Mass Cytometry Panel to Visualize the Tumor Immune Microenvironment Contexture. *Front Immunol* **12**, 666233 (2021).

## **Acknowledgments:**

We thank the University of Versailles Saint Quentin en Yvelines Transplantation Chair and the Foch foundation for their financial support. From the Foch Hospital (Suresnes, France): We thank the Department of clinic research, especially F. Coupepy for administrative supervision and Foch anatomopathologist team for rereading of the sample's rejection grade. We thank R. Zoorob for her help in the initiation of the project. We thank Marylou Panouillot and Marie-Caroline Dieu-Nosjean for their help in Imaging Mass Cytometry and their expertise about Tertiary Lymph Nodes structures. We thank the Swedish team of uterine transplantation and their patients for the samples collection.

## **List of Supplementary Materials**

Fig S1: Proposed grading system for uterus transplantation rejection on histology according Mölne's classification (6)

Fig S2: Clinical course of study patients from the time of uterus transplantation to hysterectomy.

Fig. S3. Enrichment analysis of differential expressed genes after rejection.

Table S1. Fold difference in gene expression between post- and pre-rejection cervical biopsies.

Table S2. Comparison of results with RNAseq and qPCR

Table S3. Enrichment analysis in differentially expressed genes in cervical biopsy samples pre- and post-rejection.

Table S4. Imaging mass cytometry panel.

**Funding:**

This work was supported by the university of Versailles Saint Quentin en Yvelines transplantation chair and the Foch foundation.

**Author contributions:**

Conceptualization: MC, JMA, VV

Methodology: MC, MP, NT, VM, AC, JG

Investigation: MC, MT, JM, MP, NT, VM, AC

Visualization: MC, MT, JG, JMA, JG

Funding acquisition: MC, JMA

Project administration: MC

Supervision: CR, JMA, VV, MP

Writing – original draft: MC

Writing – review & editing: MC, MP, NT, VM, AC, MT, JG, JM, VB, RA, NK,

PDK, CR, MB, JMA, VV

**Competing interests:**

Authors declare that they have no competing interests.

**Data and materials availability:**

All data are available in the main text or the supplementary materials.

Patient number	Reason for uterine infertility	Donor	ABO compatibility recipient/donor	HLA mismatch HLA-A, -B, or -DRB1	Year of UTx	Assigned biopsy number	Rejection status (G=grade)	Duration between UTx and biopsy	Obstetrical status at time of biopsy	Previous rejection before biopsy	Age at UTx (years) R/D	IS therapy	HLA antibodies at time of biopsy	DSA at time of biopsy	C4d at time of biopsy	Vaginal status at time of biopsy	Any infection identified at vaginal swab?
P1 (P1)*	cervical K	Mother	0+/0+	2/0	2012	1	Pre-rejection	0D	Not pregnant	No	32/52	Tac+MMF+ corticosteroids	0	0	0	Normal	No
						7	Post-rejection G2	2W	Not pregnant		32/52	Tac+MMF	0	0	0		No
P2 (P3)	MRKH	Aunt	0+/0+	3/1	2012	2	Pre-rejection	2Y	Post-miscarriage at 6W	No	28/54	Tac+AZA +, corticosteroids	0	0	0	McIndoe	E.Coli
						8	Post-rejection G3	2Y 4M	Not pregnant		28/54	Tac+AZA + corticosteroids	0	0	0		E. coli
						3	Pre-rejection	2Y 5M	Not pregnant	Yes	28/54	Tac+AZA + corticosteroids	0	0	0		E. coli
						9	Post-rejection G3	2Y 5M 1W	Not pregnant		28/54	Tac+AZA + corticosteroids	0	0	0		E. coli
P3 (P5)	MRKH	Friend	0+/0+	3/2	2013	4	Pre-rejection	10M	Not pregnant	No	34/61	Tac+AZA+ corticosteroids	0	0	0	Dilated	No
						10	Post-rejection G2	1Y 3M	18W pregnant		34/61	Tac+AZA+ corticosteroids	0	0	0		No
P4 (P6)	MRKH	Mother	A+/A+	1/1	2016	5	Pre-rejection	3Y 2M	Not pregnant	No	27/54	Tac+AZA	0	0	0	Vechietti	No
						11	Post-rejection G1	3Y 6M	Not pregnant		27/54	Tac+AZA	0	0	0		No
P5 (P8)	MRKH	Mother	A+/A-	1/1	2013	6	Pre-rejection	2W	Not pregnant	No	27/50	Tac+MMF	0	0	0	Dilated	No
						12	Post-rejection G1	3W	Not pregnant		27/50	Tac+MMF	0	0	0		No

**Table 1: Clinical data.**

\* The patient numbers in parentheses are the patient numbers assigned in the Swedish trial(6).

P: patient; UI: uterine infertility; UTx: uterus transplantation; Age at the biopsy; K: cancer;

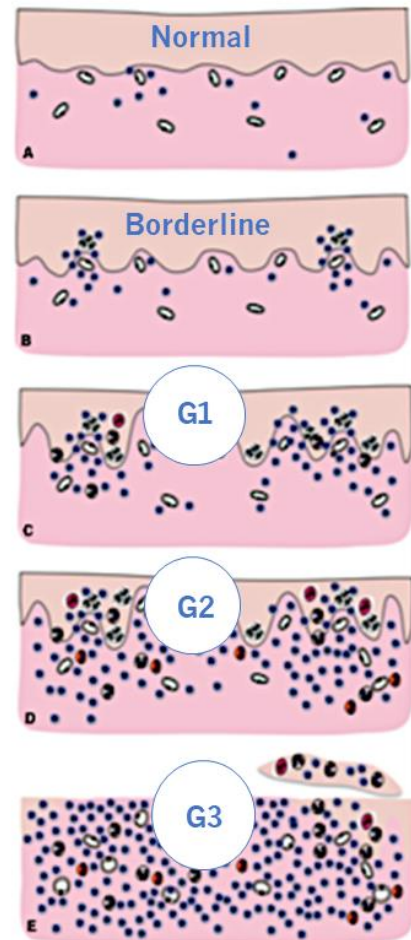
MRKH: Mayer Küster Hauser Rokitansky 133yndrome; G: grade; Tac: Tacrolimus; MMF:

mycophenolate mofetil; Y: year; M: month; D: day; chorioA: chorioamnionitis; E coli vag:

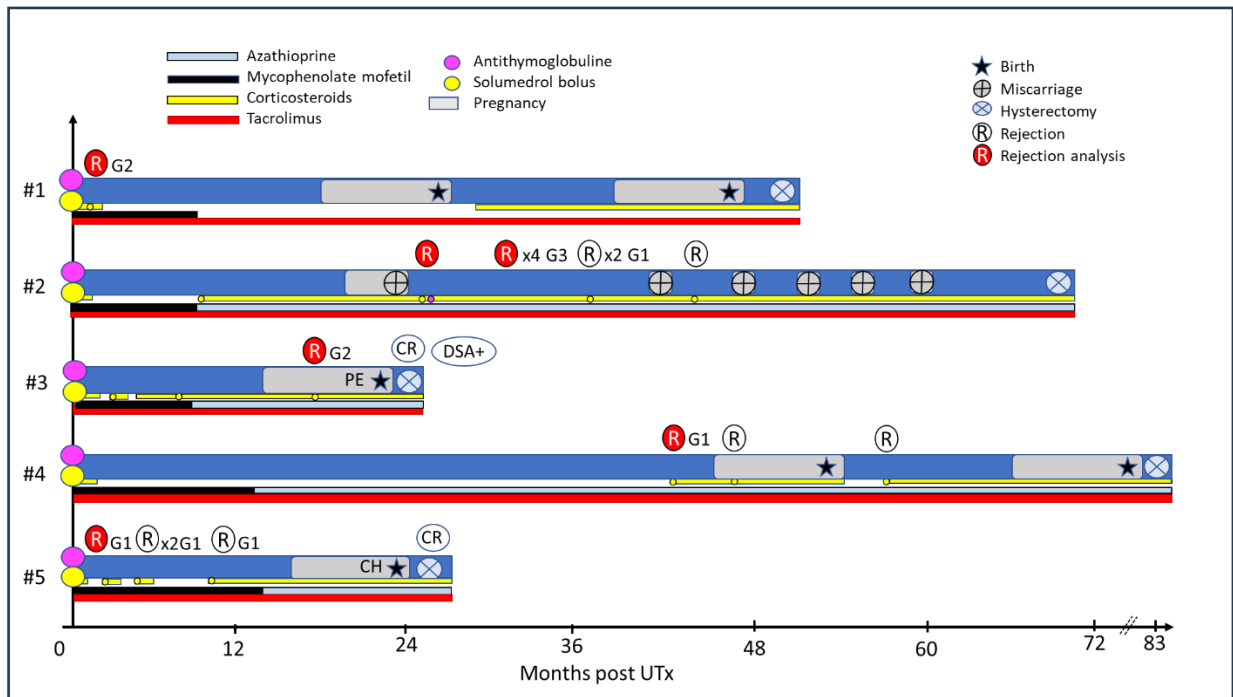
vaginal infection with Escherichia coli



Grade	Morphology
<b>Borderline changes</b>	At least two, small, nested foci of interphase inflammation in the basal cell layers dominated by lymphocytes; focal intercellular edema; minimal stromal inflammation, particularly in the papillary stroma.
<b>Grade 1 rejection</b>	Mild mixed inflammatory cell infiltrate in the basal epidermal layer, dominated by lymphocytes; single epithelial apoptotic bodies; low-grade stromal inflammation and edema.
<b>Grade 2 rejection</b>	Moderate inflammatory cell infiltrate with intraepidermal influx (exocytosis), dominated by lymphocytes and with some neutrophils; may show reduced surface epithelial thickness, some epithelial apoptotic bodies, marked, mixed stromal inflammation and edema.
<b>Grade 3 rejection</b>	Significant diffuse, mixed inflammatory cell infiltrate dominated by lymphocytes with a presence of neutrophils and eosinophils; apoptotic bodies, epithelial erosions/ulcerations and focal necrosis is evident; the stromal infiltrate (mixed) is intense and continuous.



**Fig. S1. Proposed grading system for uterus transplantation rejection on histology according to Mólne et al. Modified from Fig 2 in Molne et al (6).**



**Fig. S2. Clinical course of study patients from the time of uterus transplantation to hysterectomy.** Patient numbers are shown on the y-axis. G=grade of rejection; PE=pre-eclampsia; CH=cholestasis; CR=chronic rejection; DSA+=donor specific antibodies



green in cases of rejection. (A) Kegg pathway antigen processing and presentation. (B) cell adhesion molecules.

**Table S1. Fold difference in gene expression between post- and pre-rejection cervical biopsies.**

Biopsy pair	Fold difference in gene expression between post- and pre-rejection biopsies					
	PTPRC	CD68	MS4A1	Gran B	IL1B	Keratin
2	6.8	3.0	13.4	6.3	72.0	-5.2
2'	3.6	2.8	1.5	5.0	17.3	-12.2
3	16.8	3.3	87.3	16.0	8.0	-83.6
4	3.4	2.2	10.0	9.0	103.7	-19.6
5	6.4	1.4	27.0	9.3	4.0	5.4
<b>Mean fold difference</b>	<b>7.4</b>	<b>2.5</b>	<b>27.8</b>	<b>9.1</b>	<b>41.0</b>	<b>-23.0</b>
<b>STD</b>	<b>4.9</b>	<b>0.7</b>	<b>30.8</b>	<b>3.8</b>	<b>39.8</b>	<b>35.1</b>
<b>Range</b>	<b>3.4 to 16.8</b>	<b>1.4 to 3.3</b>	<b>1.5 to 87.3</b>	<b>5.0 to 16.0</b>	<b>4.0 to 103.7</b>	<b>-83.6 to 5.4</b>

*STD=standard deviation*

**Table S2. Comparison of results obtained with RNA seq versus qPCR.**

RNAseq				qPCR			RNAseq				qPCR		
FeatureID	logFC	FDR	Status	LogFC	p	Status	FeatureID	logFC	FDR	Status	LogFC	p	Status
BANK1	2.61	0.02	Up	2.67	NS	Up	IRF1	2.35	0.0003	Up	1.01	NS	Up
BATF	5.02	9.87E-06	Up	1.82	NS	Up	ISG20	3.79	5.68E-06	Up	1.41	NS	Up
BCL2A1	4.42	8.65E-09	Up	4.17	NS	Up	ITGAE (CD103)*	-0.16	NS	Not modified	2.64	NS	Up
C3	3.45	4.92E-07	Up	2.46	NS	Up	KLHDC7B	4.01	0.003	Up	4.64	0.05	Up
CCL3	2.77	0.0004	Up	3.36	NS	Up	KLRK1	0.96	0.07	Not modified			Failure
CCL4	2.32	0.01	Up	2.07	NS	Up	KRT1	-4.35	0.007	Down	-0.55	NS	Not modified
CCRS*	1.62	NS	Up	1.5	NS	Up	KRT6A*	1.68	NS	Up	2.97	NS	Up
CCR9*			Failure	1.9	NS	Up	LCE3D	-4.11	1.00E-05	Down	-3.85	NS	Down
CCR7	3.03	0.001	Up	3.23	NS	Up	LCE3E	-4.71	6.39E-07	Down	-2.48	NS	Down
CD19	4.98	0.0004	Up			Failure	LCP2	2.62	8.89E-07	Up	2.29	NS	Up
CD22	2.74	0.0001	Up	2.92	NS	Up	LEF1	2.13	0.004	Up	0.3	NS	Not modified
CD37	2.59	5.96E-07	Up	2.9	0.05	Up	LILRB1	4.43	1.31E-07	Up			Failure
CD3E	2.31	0.01	Up	1.95	NS	Up	LILRB3	3.56	0.01	Up			Failure
CD4*	1.52	NS	Up	1.28	NS	Up	LOR	-4.69	0.02	Down			Failure
CD48	2.24	0.003	Up	2.3	NS	Up	LTB	3.06	4.00E-05	Up			Failure
CD56 (NCAM1)*	0.09	NS	Not modified	2.35	NS	Up	MMP9	3.03	0.01	Up	4.46	NS	Up
CD8A*	1.21	NS	Up	1.75	NS	Up	MNDA	2.73	0.003	Up	3.1	NS	Up
CDH1	-5.19	0.004	Down	-3.12	NS	Down	M5A1 (CD20)	3.95	9.95E-08	Up	2.12	NS	Up
CD5N	-4.81	0.001	Down	0.85	NS	Up	MZB1	2.98	7.54E-06	Up	2.68	NS	Up
CEACAM7*	-1.36	NS	Down	-2.28	NS	Down	NCF1	3.34	1.31E-06	Up	1.39	NS	Up
CFB	2.79095193466914	1.42E-06	Up	2.73	NS	Up	NFE2	6.53	0.0002	Up	5.39	NS	Up
CFP	2.99	1.00E-04	Up	4.22	NS	Up	NGK7	2.02	0.01	Up	2.45	NS	Up
CXCL1	3.62	0.001	Up	2.75	NS	Up	PD1 (PD 1)*	0.9	NS	Not modified			Failure
CXCL10	2.25	0.005	Up	-0.94	NS	Down	PHYHIP	-4.2	5.02E-05	Down	-2.49	NS	Down
CXCL9	2.07	0.049	Up	0.12	NS	Not modified	PRF1	2.99	0.004	Up	1.29	NS	Up
CXCR1	4.73	0.04	Up	5.98	NS	Up	PTPRC	2.58	2.96E-07	Up	3.46	NS	Up
CXCR3*	1.9	NS	Up			Failure	PVRIG	4.44	0.02	Up			Failure
DEFB103A	-5.21	0.0003	Down	-2.54	NS	Down	RPTN	-4.61	5.01E-15	Down	-6.74	NS	Down
DEFB103B	-3.45	0.0003	Down	3.67	NS	Up	RUNX3	2.4	2.00E-05	Up	1.85	NS	Up
FasL*	6.04	NS	Up	0.74	NS	Not modified	S100A7*	-1.08	NS	Down	-0.76	NS	Not modified
FCGR3A	4.3	0.001	Up	3.28	NS	Up	SELL	4.55	2.99E-08	Up	4.86	0.05	Up
FGXP3*	-0.03	NS	Not modified	1.6	NS	Up	SERPINA3	4.29	0.001	Up	1.45	NS	Up
G0S2	4.01	2.68E-09	Up	3.78	NS	Up	SLAMF1	4.57	0.0001	Up	2.43	NS	Up
GZMB	3.78	0.0003	Up	0.01	NS	Not modified	SPIB	4.09	0.002	Up	5	NS	Up
HAVCR2 (TIM3)*	0.58	NS	Not modified	1.04	NS	Up	SPRR3*	-1.79	NS	Down	-2.78	NS	Down
HLA-G*			Failure	2.98	NS	Up	STAT1*	0.89	NS	Not modified	0.09	NS	Not modified
ICAM1	2.49	0.001	Up	2.24	NS	Up	TFF1	4.33	0.0005	Up			Failure
IFNA1*			Failure	0.43	NS	Not modified	THEMIS2	2.71	3.18E-06	Up	0.88	NS	Up
IGHG2	2.98	0.0007	Up	4.75	NS	Up	TNF	2.67	0.02	Up	3.03	NS	Up
IGKV4-1 (B3)*			Failure	4.47	NS	Up	TNFAIP3	2.12	0.00102886436989091	Up	1.76	NS	Up
IGLL1*			Failure	1.46	NS	Up	TNFAIP6	4.12	4.50E-08	Up	4.25	NS	Up
IL1B	4.6	9.09E-12	Up	6.3	0.05	Up	TNFRSF1B	2.19	5.53E-06	Up	1.12	NS	Up
IL2RA	2.58	0.04	Up	3.32	0.05	Up	TNFRSF4 (OX40)*	3.33	NS	Up	1.7	NS	Up
IL2RG	2.66	9.00E-05	Up	2.27	NS	Up	TP53AIP1	-2.53	0.0002	Down	-2.84	NS	Down
IL32	2.02	1.00E-04	Up	1.6	NS	Up	TRBC2	2.23	0.01	Up	0.74	NS	Not modified
IL41	2.88	0.02	Up	2.8	NS	Up	VCAM1	2.3	0.03	Up	0.29	NS	Not modified
IL7R	2.7	3.00E-05	Up	2.1	NS	Up	WBP1	-4.03	0.006	Down			Failure
INO80B-WBP1	12.64	4.95E-25	Up	3.54	NS	Up							

The following RNAseq differentially expressed genes were selected for qPCR: immunologic genes with  $\text{Log}_2\text{FC} > 2$ ; non immunologic genes with  $\text{Log}_2\text{FC} > 4$ ; and  $\text{FDR} > 0.05$ \* additional immunologic and cervical genes were selected according to the literature; Feature ID=identity of the gene;  $\text{Log}_2\text{FC}$ =log2-fold change;  $\text{FDR}$ =adjusted p-value; NS=not significant; Up=up-regulated gene; Down=down-regulated gene; The three genes highlighted in grey had discordant results for RNAseq versus qPCR.

**Table S3. Enrichment analysis of differentially expressed genes in cervical biopsy samples pre- and post-rejection, results with C5:20 top pathways and Go gene sets**

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	geneID
M2810	GO_T_CELL_ACTIVATION	76/605	483/19325	4.84e-32	3.19e-28	2.56e-28	IL1B,IL1RB1,PTPRC,RAC2,TNFRSF1B,BATF,SIRPB1,RUNX3,IL7R,CORO1A,GPR183,DOCK2,DOCK8,IL1RB2,ICP1,ADAM8,TNFSF14,WAS,SASH3,IRF1,CCR7,HPD2,AP3B1,JAML,RIPOR2,TCF7,LAX1,VAWI,CCR7,ICAM1,NCKAP1,PTPN6,PAG1,LYN,CD3D,RHOH,GRAP2,LEF1,CDC88B,SPN,SCGB1A1,IRF4,CD27,CCL5,AIF1,IGALS9,ITGAL,IL6,IAK3,PREX1,CD3E,NLRP3,HHLA2,TNFSF13B,PRKCC,RELB,PIK3CD,CLEC4E,RUNX1,FGI2,VCAM1,HLA-DMB,IL27RA,TIGIT,SIT1,TNFRSF13C,IL2RA,RARA,RAB29,FCER1G,CD274,CD2,ZAP70,ITK,SFTPD,FOXN1
M14645	GO_LEUKOCYTE_CELL_CELL_ADHESION	63/605	364/19325	4.96e-29	1.63e-25	1.31e-25	AV1,CCR7,ICAM1,NCKAP1,PTPN6,NR4A3,PAG1,LYN,RHOH,GRAP2,LEF1,CDC88B,SPN,SCGB1A1,CD27,CCL5,AIF1,IGALS9,ITGAL,IL6,IAK3,ITGA4,CD3E,NLRP3,HHLA2,TNFSF13B,PRKCC,RUNX1,FGI2,TNF,VCAM1,HLA-DMB,IL27RA,TIGIT,PECAMI1,FERMT3,TNFRSF13C,IL2RA,RARA,CD274,ZAP70,PTAFR,SFTPD
M6401	GO_REGULATION_OF_CELL_CELL_ADHESION	68/605	439/19325	2.76e-28	6.07e-25	4.87e-25	IL1B,IL1RB1,PTPRC,SIRPB1,RUNX3,IL7R,CORO1A,DOCK8,IL1RB2,ITGB2,ADAM8,TNFSF14,SASH3,IRF1,ETI1,RIPOR2,BLK,PLAUR,LAX1,VAWI,CCR7,ICAM1,NCKAP1,PTPN6,NR4A3,PAG1,LYN,RHOH,GRAP2,LEF1,CDC88B,SPN,SCGB1A1,CD27,CCL5,AIF1,IGALS9,IL6,IAK3,ITGA4,CD3E,NLRP3,HHLA2,TNFSF13B,CXCL13,PRKCC,RUNX1,FGI2,TNF,AKNA,VCAM1,HLA-DMB,IL27RA,TIGIT,FERMT3,TNFRSF13C,IL2RA,RARA,CD274,ZAP70,ADAM19,PTAFR,TGFB3,CELSR2,SFTPD,CD9,CDSN,ALOX12
M11373	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CYTOKINE_PRODUCTION	69/605	462/19325	1.03e-27	1.70e-24	1.36e-24	P,CYBA,NR4A3,IRF8,PDE4B,POU2AF1,MNDA,CCL3,CDC88B,OSM,TLR1,SPN,IRF4,AIF1,TLR4,SULF1,IGALS9,IL6,CD14,CD3E,NLRP3,HHLA2,TLR2,FCN1,AIM2,PRKCC,CLEC4E,RUNX1,TNF,IL27RA,IRF7,PTGS2,TIGIT,IL17RA,PLCG2,SCIMP,CSAR1,RARA,CARDB1,FCER1G,CSAR1,CD274,CD2,PTAFR,TGFB1,NLRX1,SERPINB7,RAB7B
M16253	GO_REGULATION_OF_T_CELL_ACTIVATION	58/605	332/19325	5.32e-27	7.01e-24	5.62e-24	IL1B,IL1RB1,PTPRC,RAC2,TNFRSF1B,SIRPB1,RUNX3,IL7R,CORO1A,DOCK8,IL1RB2,ADAM8,TNFSF14,SASH3,IRF1,CR1,RIPOR2,TCF7,LAX1,VAWI,CCR7,NCKAP1,PTPN6,PAG1,LYN,RHOH,GRAP2,LEF1,CDC88B,SPN,SCGB1A1,IRF4,CD27,CCL5,AIF1,IGALS9,IL6,IAK3,ITGA4,CD3E,NLRP3,HHLA2,TNFSF13B,PRKCC,RUNX1,FGI2,VCAM1,HLA-DMB,IL27RA,TIGIT,SIT1,TNFRSF13C,IL2RA,RARA,CD274,CD2,ZAP70,SFTPD,FOXN1
M25133	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_LEUKOCYTE_CELL_CELL_ADHESION	48/605	235/19325	1.32e-25	1.45e-22	1.16e-22	IL1B,IL1RB1,PTPRC,SIRPB1,RUNX3,IL7R,CORO1A,DOCK8,IL1RB2,ITGB2,ADAM8,TNFSF14,SASH3,ETI1,VAWI,CCR7,ICAM1,NCKAP1,PTPN6,NR4A3,LYN,RHOH,GRAP2,LEF1,CDC88B,CD27,CCL5,AIF1,IGALS9,IL6,IAK3,ITGA4,CD3E,NLRP3,HHLA2,TNFSF13B,PRKCC,RUNX1,TNF,VCAM1,HLA-DMB,IL27RA,TNFRSF13C,IL2RA,RARA,CD274,ZAP70,PTAFR
M10657	GO_B_CELL_ACTIVATION	55/605	321/19325	3.25e-25	3.06e-22	2.45e-22	POU2F2,MS4A1,PTPRC,MZB1,BATF,CD79A,IL7R,GPR183,SAMS1,CD22,IKZF3,SASH3,PRKCB,CD19,IGH2,BLK,LAX1,TNFAIP3,NCKAP1,LYROB,P,PTPN6,INPP5D,IGHM,LYN,CD137,CD137R,POU2AF1,MNDA,LEF1,TBC1D10C,CD27,TLR4,GAPT,TRBC2,IL6,IAK3,ITGA4,MFNG,SLAMF8,TNFSF13B,INHA,PIK3CD,BANK1,VCAM1,IL27RA,IGH2,LAZ1,ATZ,PLCG2,TNFRSF13C,SIRPB1,ZAP70,CD38,CD130,TGFB1,LYN
M14725	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_CELL_ADHESION	51/605	279/19325	8.68e-25	7.153e-22	5.73e-22	IL1B,IL1RB1,PTPRC,SIRPB1,RUNX3,IL7R,CORO1A,DOCK8,IL1RB2,ITGB2,ADAM8,TNFSF14,SASH3,ETI1,PLAUR,VAWI,CCR7,ICAM1,NCKAP1,PTPN6,NR4A3,LYN,RHOH,GRAP2,LEF1,CDC88B,CD27,CCL5,AIF1,IGALS9,IL6,IAK3,ITGA4,CD3E,NLRP3,HHLA2,TNFSF13B,CXCL13,PRKCC,RUNX1,TNF,VCAM1,HLA-DMB,IL27RA,TNFRSF13C,IL2RA,RARA,CD274,ZAP70,ADAM19,PTAFR
M18190	GO_LYMPHOCTE_DIFFERENTIATION	58/605	368/19325	1.28e-24	9.41e-22	7.5e-22	IL1B,POU2F2,MS4A1,PTPRC,BATF,CD79A,RUNX3,IL7R,GPR183,DOCK2,IL1RB2,IKZF1,SPI1,IKZF3,ADAM8,SASH3,IRF1,CD19,CR1,TCF7,VAWI,CCR7,NCKAP1,PTPN6,INPP5D,CMTM7,CD3D,POU2AF1,RHOH,LEF1,SPN,IRF4,CD27,IGALS9,IL6,IAK3,ITGA4,PREX1,CD3E,MFNG,NLRP3,SLAMF8,RELB,INHA,PIK3CD,CLEC4E,RUNX1,FGI2,VCAM1,PLCG2,IL2RA,RARA,FCER1G,CD2,ZAP70,CD79B,ITK,FOXN1
M10536	GO_CELL_CHEMOTAXIS	53/605	310/19325	2.77e-24	1.78e-21	1.43e-21	IL1B,RACE2,CSF3R,CCL18,ITGB2,ADAM8,CXCL8,JAML,RIPOR2,VAWI,CXCL6,CCR7,NCKAP1,CXCL1,POE4B,RHOH,CCL3,CXCL10,CCL5,CXCL5,CXCL2,CCL4,PREX1,CSAR2,SLAMF8,CXCL13,PIK3CD,IL17RA,C3AR1,FCER1G,CSAR1,CXCR1,CXCL9,SFTPD,SULT2
M13385	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_ACTIVATION	61/605	414/19325	2.97e-24	1.78e-21	1.43e-21	NCKAP1,LYROB,PTPN6,INPP5D,IGHM,NR4A3,LYN,RHOH,GRAP2,LEF1,CCL3,CDC88B,CD27,CCL5,AIF1,TLR4,IGALS9,TRBC2,IL6,IAK3,CD3E,NLRP3,HHLA2,TNFSF13B,PRKCC,RUNX1,VCAM1,HLA-DMB,IL27RA,IGH2,TNFRSF13C,IL2RA,RARA,FCER1G,CD274,CD2,SH3BP1,ZAP70,PTAFR,TGFB1,PLA2G3
M11916	GO_LEUKOCYTE_CHEMOTAXIS	46/605	231/19325	4.33e-24	2.252e-21	1.81e-21	IL1B,RACE2,CSF3R,CCL18,ITGB2,ADAM8,CXCL8,JAML,RIPOR2,VAWI,CXCL6,CCR7,NCKAP1,CXCL1,POE4B,RHOH,CCL3,CXCL10,CCL5,CXCL5,CXCL2,CCL4,PREX1,CSAR2,SLAMF8,CXCL13,PIK3CD,IL17RA,C3AR1,FCER1G,CSAR1,CXCR1,CXCL9,SFTPD,SULT2
M12516	GO_LEUKOCYTE_PROLIFERATION	53/605	313/19325	4.44e-24	2.252e-21	1.81e-21	IL1B,MS4A1,IL1RB1,PTPRC,RAC2,TNFRSF1B,MZB1,CD79A,IL7R,CORO1A,GPR183,DOCK2,DOCK8,IL1RB2,CD22,IKZF3,TNFSF14,SASH3,IRF1,CD19,BLK,TNFAIP3,NCKAP1,LYROB,PTPN6,INPP5D,IGHM,LYN,CD137,CD137R,POU2AF1,MNDA,LEF1,TBC1D10C,CD27,TLR4,GAPT,TRBC2,IL6,IAK3,ITGA4,MFNG,SLAMF8,TNFSF13B,INHA,PIK3CD,CLEC4E,RUNX1,FGI2,VCAM1,PLCG2,IL2RA,RARA,FCER1G,CD2,ZAP70,CD79B,ITK,FOXN1
M25402	GO_NEUTROPHIL_MIGRATION	34/605	121/19325	2.91e-23	1.37e-20	1.10e-20	IL1B,RACE2,CSF3R,CCL18,ITGB2,ADAM8,CXCL8,JAML,RIPOR2,VAWI,CXCL6,CCR7,NCKAP1,CXCL1,POE4B,RHOH,CCL3,CXCL10,CCL5,CXCL5,CXCL2,CCL4,PREX1,CSAR2,SLAMF8,CXCL13,PIK3CD,PECAMI1,C3AR1,FCER1G,CSAR1,CXCR1,CXCL9,SULT2
M10503	GO_MYELOID_LEUKOCYTE_MIGRATION	44/605	221/19325	4.38e-23	1.92e-20	1.54e-20	CCL5,AIF1,CXCL5,CCR1,IL6,CXCL2,CCL4,PREX1,CSAR2,SLAMF8,CXCL13,PIK3CD,PECAMI1,IL17RA,C3AR1,FCER1G,CSAR1,CXCR1,CXCL9,SFTPD,SULT2,PDGFD,CD9
M35990	HP_ABNORMALITY_OF_THE_LYMPH_NODES	40/605	188/19325	3.26e-22	1.34e-19	1.08e-19	M5A4,PTPRC,NCF1,TNFRSF1B,NFKB2,NCF2,IL7R,NCF4,IL2RG,BIRC3,CXCR4,NLRP12,CD19,SNX10,CYBB,CYBA,IRF8,PRF1,TRAC,CD27,TLR4,CCR1,IL6,IAK3,NLRP3,APOE,SF110,INHA,PIK3CD,RUNX1,FERMT3,TNFRSF13C,IL2RA,CYBC1,RARA,PSTPIP1,ZAP70,ITK,H19,LYN
M13368	GO GRANULOCYTE_MIGRATION	36/605	149/19325	4.23e-22	1.64e-19	1.31e-19	IL1B,RACE2,CSF3R,ADGRE2,CCL18,ITGB2,ADAM8,CXCL8,JAML,RIPOR2,VAWI,CXCL6,CCR7,NCKAP1,CXCL1,POE4B,RHOH,CCL3,CXCL10,CCL5,CXCL5,CXCL2,CCL4,PREX1,CSAR2,SLAMF8,CXCL13,PIK3CD,PECAMI1,IL17RA,C3AR1,FCER1G,CSAR1,CXCR1,CXCL9,SULT2
M37777	HP_ABNORMALITY_OF_SKIN_PHYSIOLOGY	57/605	408/19325	1.47e-21	5.38e-19	4.32e-19	PTPRC,NCF1,TNFRSF1B,CD79A,NFKB2,NCF2,IL7R,DOCK8,NCF4,LYZ,IL2RG,WAS,NLRP12,CYBB,TNFAIP3,CYBA,IGHM,ADA2,CD3D,POU2AF1,SPIB,MIC8,TLR4,CCR1,FCGR2A,IL6,IAK3,CD3E,NLRP3,SP110,RUNX1,IL10RA,WIPF1,IL17RA,FERMT3,SAMHD1,IL2RA,FU1,CYBC1,PSTPIP1,TM6CC,CFI,ZAP70,CD79B,TGFB1,TP63,SCNN1G,FLG,GLI1,CYPAF22,FOXN1,KRT1,GPC1,KRT10,CD5N,DSG1,ALOX12B
M34121	GO_NEUTROPHIL_CHEMOTAXIS	30/605	102/19325	2.62e-21	9.08e-19	7.28e-19	IL1B,RACE2,CSF3R,CCL18,ITGB2,CXCL8,JAML,RIPOR2,VAWI,CXCL6,CCR7,NCKAP1,CXCL1,POE4B,CCL3,CXCL10,CCL5,CXCL5,CXCL2,CCL4,PREX1,CSAR2,CXCL13,PIK3CD,C3AR1,FCER1G,CSAR1,CXCR1,CXCL9,SULT2

*GeneRatio*=number of differentially expressed genes in genset over the total number of differentially expressed genes present in the database; *BgRatio*=Pathway size/size of the db (total number of genes); *p.adjust*=FDR.

**Table S4. Imaging Mass Cytometry Panel**

Gene	Metal Tag	Source	Reference	Dilution	Temperature	Main target cells
alpha-SMA	<sup>141</sup> Pr	Standard biotools	3141017D	1:400	4°C	Stromal and Endothelial
CD14	<sup>144</sup> Nd	Standard biotools	3144025D	1:200	4°C	Monocytes Macrophages
BCL2	<sup>146</sup> Nd	Standard biotools	3146019D	1:100	4°C	Apoptosis
PDL1 - cd227)	<sup>150</sup> Nd	Standard biotools	3150031D	1:15	4°C	T lymphocyte exhaustion
CD31 - PECAM1)	<sup>151</sup> Eu	Standard biotools	3151025D	1:200	4°C	Endothelial
CD45 - PTPRC)	<sup>152</sup> Sm	Standard biotools	3152018D	1:200	4°C	Immune
CD4	<sup>156</sup> Gd	Standard biotools	3156033D	1:100	4°	T4 lymphocytes
E-cadherin	<sup>158</sup> Gd	Standard biotools	3158029D	1:100	4°C	Epithelial
CD68	<sup>159</sup> Tb	Standard biotools	3159035D	1:800	4°C	Macrophages
CD20 - MS4A1)	<sup>161</sup> Dy	Standard biotools	3161029D	1:400	4°C	B lymphocytes
CD8a	<sup>162</sup> Dy	Standard biotools	3162034D	1:200	4°C	T8 lymphocytes
pNFKB - NFKB)	<sup>166</sup> Er	Standard biotools	3166026D	1:50	4°C	Immune
GZMB	<sup>167</sup> Er	Standard biotools	3167021D	1:200	4°C	Protease
CD127 - IL7R)	<sup>168</sup> Er	Standard biotools	3168026D	1:100	4°C	Mature TL, Immature BL
CD45RA - PTPRC)	<sup>169</sup> tm	Standard biotools	3169008B	1:200	4°C	Maturity of TL
CD3	<sup>170</sup> Er	Standard biotools	3170019D	1:100	4°C	T lymphocytes
CD27	<sup>171</sup> Yb	Standard biotools	3171024D	1:50	IH30 Room temperature	Maturity of TL
HLADR	<sup>174</sup> Yb	Standard biotools	3174025D	1:1600	4°C	MHC2 receptor
CD25 - IL2RA)	<sup>175</sup> Lu	Standard biotools	3175036D	1:50	4°C	T lymphocyte activation
CD16 - FCGR3A) *	<sup>172</sup> Yb	Abcam	ab215977	1:200	4°C	Monocytes Macrophages
KRT1 *	<sup>163</sup> Dy	Abcam	ab250844	1:50	4°C	Epithelium
IL1B *	<sup>165</sup> Ho	Abcam	ab283822	1:25	4°C	Cytokine
Collagen Type I *	<sup>143</sup> Nd	Merck	AB758	1:100	4°C	Extra cellular matrix
TIGIT *	<sup>153</sup> Eu	Abcam	ab243903	1:15	4°C	T lymphocyte exhaustion
NKp46 - NCR1) *	<sup>145</sup> Nd	BioTechne	MAB1850-100	1:15	4°C	NK lymphocytes
CD11c - ITGAX) *	<sup>154</sup> Sm	Abcam	ab216655	1:800	4°C	dendritic cells
C4d *	<sup>155</sup> Gd	Clinisciences	24022022-3A	1:100	4°C	Fraction of Complement F
CD62L - SELL) *	<sup>164</sup> Dy	Novus biologicals	DREG56	1:50	4°C	Adhesion Immune cells
Iridium	<sup>191</sup> Ir	Standard biotools	201192A	1:400	4°C	DNA

\*=coupling with the heavy metal achieved

**Article 2: First in depth longitudinal immune analysis of a successful Uterus Transplantation in Human.**

NON SOUMIS



**Title: First extended longitudinal immune analysis of a successful Uterus Transplantation in Human.**

Marie Carbonnel<sup>1,2,3\*#</sup>, Remy Villette<sup>3</sup>, Maxime Petit<sup>4</sup>, Nadine Tarantino<sup>3</sup>, Veronique Morin<sup>3</sup>, Angélique Vinit<sup>4</sup>, Emmanuel Roux<sup>6</sup>, Morgan Tourne<sup>5</sup>, Camélia Radulescu<sup>5</sup>, Mathilde Le Marchand<sup>6</sup>, Renaud Snanoudj<sup>7</sup>, Catherine Racowsky<sup>1</sup>, Martin Larsen<sup>3</sup>, Mats Brännström<sup>8,9</sup>, Jean-Marc Ayoubi<sup>1,2</sup>, Vincent Vieillard<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Foch Hospital; Suresnes, 92150, France.

<sup>2</sup> University of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines Paris Saclay ; Montigny-Le-Bretonneux,78180, France.

<sup>3</sup> Sorbonne Université, Inserm U1135, CNRS EMR 8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris) ; Paris, 75013, France.

<sup>4</sup> Pitié-Salpêtrière Cytometry Platform (CyPS), UMS037-PASS, Sorbonne Université-Faculté de Médecine ; Paris, 75013, France.

<sup>5</sup> Department of Pathology, Foch Hospital; Suresnes, 92150, France.

<sup>6</sup> Department of Clinic Research, Foch Hospital; Suresnes, 92150, France.

<sup>7</sup> Department of Kidney Transplantation, Kremlin Bicêtre Hospital, Paris, France.

<sup>8</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg; Göteborg, 40530, Sweden.

<sup>9</sup> Stockholm IVF-EUGIN; Stockholm, 103 16, Sweden

\*Corresponding Author: Marie Carbonnel, [m.carbonnel@hopital-foch.com](mailto:m.carbonnel@hopital-foch.com)

Running title: longitudinal immune analysis of Uterus Transplantation

Keywords: Uterus, Transplantation, Immune, microbiota, rejection, pregnancy

## Abstract

Uterus transplantation is a new treatment for patients with absolute uterine infertility who wish to experience pregnancy and childbirth. Concerns remain with this emerging procedure including a better understanding of rejection and immune mechanisms at play during the process as well as impact on the materno-foetal interface and neonates. We report the first extended longitudinal immune analysis of a successful uterus transplantation with two child births included in the prospective multicenter MARNI trial. Altogether, this study reports effects of an immunosuppressive therapy and first signs of humoral rejection after an UTx. We observed an alteration of vaginal microbiome. We discovered variations of frequency and phenotypes of the immune cells on blood, particularly on NK cells growing overtime and specific modulations during pregnancy. Finally, during UTx explantation, a humoral rejection was discovered thanks to C4d staining. It was correlated with the increase of plasmablastes and positivity of DSA few weeks later. Our findings support the hypothesis of a natural history between infection, alteration of the innate immune system and humoral rejection. Two biomarkers seemed to be correlated with rejection in blood: granzyme B and IL1 $\beta$ . Our promising results, if confirmed on a larger cohort, will help to improve follow up, prevention and treatment of rejection in uterus transplantation recipients.

## Introduction

Women suffering from Absolute uterine factor infertility (1/500) had no hope of childbearing until clinical feasibility of Uterus transplantation (UTx) was documented in 2014 with the birth of a healthy baby reported by the Swedish team led by Pr Brännström (1). To date, a hundred UTx procedures have been performed worldwide with more than 30 live births (2, 3). This emerging technology is moving away from clinical trial status to becoming accepted clinical practice. However, several aspects of this complex technology require further advancement, not the least of which is the need for an improved understanding of the immune mechanisms involved in episodes of UTx graft rejection. UTx presents a unique model with numerous immunological challenges. Classified as a vascularized composite allograft (VCA), it combines the transplanted organ itself carrying the pregnancy and the foetus, a semi-allogenic allograft.

Rejection can impact materno-foetal interface and crucial aspects of pregnancy, including placentation, pregnancy progression and delivery. Conversely, the decidua provides an immunosuppressive environment that can modulate alloimmune responses. Given the absence of specific biological markers for uterine function and the fact that rejection is typically asymptomatic, ectocervical biopsies are routinely performed on a weekly, monthly, and later quarterly basis to evaluate acute cellular rejection (4). Mölne et al. established a three-grade rejection classification system, based on T lymphocyte infiltration at the interface between the chorion and epithelium (5). Cellular Rejection is observed in 60% of UTx patients, most commonly within the first three months (5, 6). Humoral rejection is suspected when Donor Specific Antibodies (DSA) are detected in the blood or complement (C4d type) antibodies are found in biopsies. Acute humoral rejection is relatively rare, with only a few reported cases (7). The signs of chronic rejection in UTx remain poorly understood, with a few cases showing perivascular stromal inflammation in the cervix, accompanied by linear cervical subepithelial inflammation and focal myometrial inflammation (8).

We report the first prospective longitudinally analysis of various biological parameters performed in the first French uterus transplantation that allowed the birth of 2 healthy children.

## **Materials and Methods**

### *Data collection of the UTx patient*

In the MARNI protocol, various samples are collected during the entire UTx process (each time a cervical biopsy is performed), as well as at key moments such as childbirth and uterus explantation:

- Blood samples are obtained, including the use of Cell Preparation Tubes (CPT) containing sodium heparin (BD Vacutainer®) (9, 10). These samples are processed to collect Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) for subsequent flow cytometric analysis, which assesses immune cell subpopulations and their phenotypes. Additionally, EDTA tubes (K2EDTA BD Vacutainer®) (11) are used for cytokine analysis, and total blood for qPCR.

- Cervical smears are taken for qPCR analysis.

- Vaginal swabs are collected to analyze the vaginal microbiota.

- Ecto-cervical biopsies are performed to do histological assessments, qPCR analysis, immunohistochemical staining, and imaging mass cytometry.

During Caesarean section, additional samples are obtained, including placenta, umbilical cord blood and meconial microbiota. At the time of uterus explantation, multiple stepped uterine biopsies are included for analysis.

#### Control groups

We established two control groups:

The first group consisted of six women from whom samples were collected during a benign surgical procedure conducted under general anesthesia. These samples were identical to those obtained from the recipients of uterine transplants.

The second group included 12 pregnant patients from whom we collected samples of blood, umbilical cord blood, and placental tissue for comparison purposes.

In addition, we included meconium microbiotas from healthy neonates processed in a preceding work to compare the meconium composition of the meconium from the patient newborn (12).

#### Study approval and registration

The MARNI study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, as well as French statutory and regulatory law, and received approval from the Institutional Review Board of Sud-Ouest et Outre-Mer in august 2020 IRB number ID-RCB n°: 2020-A00737-32, and declared as clinical trial (N° NCT04615221). Patients received information about research to be performed on their biological samples and provided written informed consent to participate.

#### Vaginal microbiota and meconium microbiota processing

##### *Vaginal swab processing*

Vaginal swabs were collected and frozen at -80°C immediately. Vaginal swab were strongly homogenized in 1X Phosphate Buffer Saline for 5 minutes to retrieve bacteria from the swab. Tubes were then centrifuged at 2000 rpm to pellet eukaryotic cells originated from desquamating cells; supernatant was then centrifuged at 13 000 rpm for 20 minutes to pellet bacteria. Bacterial pellet was finally homogenized in 1X PBS 10% glycerol and freezed immediately until usage.

##### *DNA extraction and 16S rRNA gene sequencing*

200 mg of raw stool for the meconium microbiota and 100 mL of suspended vaginal microbiota were used to extract DNA using Miniprep Zymobiotic extraction kit according to manufacturer guidelines. Of note, meconium microbiota and vaginal microbiota were processed on different days. Bead-beating step was performed on a Precellys 24 (Bertin) at maximum speed (7800rpm) for 60 seconds and repeated three times with one minute on ice, for a total of 3 minutes of cell lysing. DNA was retrieved in 50  $\mu$ L of pure DNase and RNase free water and immediately stored at -20°C until amplification. The V3–V4 region of the 16S rRNA gene was amplified using a semi-nested PCR protocol. The semi-nested PCR was performed as previously described with minor adjustment (13). Briefly, 16S rRNA genes were amplified using a short pre-amplification of 10 cycles with primer couple S-D-Bact-0341-b-S-17 (+ 343; 5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3') and S-D-Bact-1061-a-A-17 (+ 1061; 5' CRRCACGAGCTGACGAC 3') (annealing temperature: 55 °C) followed by a second amplification with 35 cycles of standard PCR with the primer couple S-D-Bact-0341-b-S-17 (+ 343, 5'-TCG-TCG-GCA-GCG- TCA-GAT-GTG-TAT-AAG-AGA-CAG-CCT-ACG-GGN-GGC-WGC-AG-3') and S-D-Bact-0785-a-A-21 (+ 784; 5'-GTC-TCG-TGG-GCT-CGG-AGA-TGT-GTA-TAA-GAG-ACA-GGA-CTA-CHV-GGG-TAT-CTA-ATC-C-3') for the ICM sequencing platform with specific primers with MiSeq adapter sequences. Amplification reactions were performed with OneTaq HotStart (NEB). PCR amplicon libraries were sequenced on a MiSeq Illumina platform (ICM, Paris, France) producing 2  $\times$  300 bp paired-end reads. The quality of the sequence run was checked internally using PhiX, and then each paired-end sequence was assigned to its sample with the help of the previously integrated index.

*Bioinformatics for 16S rRNA gene analysis.*

Further processing of demultiplexed sequence reads followed the DADA2 workflow for Big Data (<https://benjjneb.github.io/dada2/bigdata.html>) and employed R software (version 4.0.439) and the DADA2 package (v. 1.5.2). To ensure that amplicon sequence variant (ASV) could be detected longitudinally between paired samples we performed a DADA2 pipeline with all the different runs together, including a subset of infant meconium samples. Filtering parameters were set to 260bp and 250bp length and 3 and 4 for the expected errors, for the forward and reverse sequences respectively. Thirty-five bases were removed from the start of the sequences to ensure primers removal and subsequent taxonomic assignment. Dereplication step was performed with all samples from all runs to ensure ASV overlap between samples,

then chimeras were removed using the DADA2 algorithm. Finally, ASV were assigned to genus and species level using SILVA database version 138. We validated that running all runs together didn't introduce significant differences by running a subset of 20 samples paired in the different runs, all together or by runs and compared using alpha diversity, beta diversity and ASV overlap. Microbiome composition was studied with the Phyloseq R package (version 1.44). Alpha diversity was assessed as the Shannon diversity index and beta-diversity as the Bray-Curtis distance. The distance matrix was subjected to a NMDS (Non Multi-Dimensional Scaling), PERMANOVA test was conducted in the vegan R package (2.6.4) with the adonis2 function based on the Bray-Curtis distance and with a 1000 permutations. Heatmaps were generated with the ComplexHeatmap R package (2.16.0). Plots were generated using ggplot2 (3.4.3) and ade4 (1.7.22). Figures were assembled using Inkscape software.

#### Flow cytometry analyses

CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells, T and B lymphocytes were analyzed in mothers and umbilical cord on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Cells were stained with an appropriate cocktail of monoclonal antibodies (mAbs), described in **Supplementary Table 1**. According to flow cytometry guidelines (14), live lymphocyte cells were acquired (DXFlex, Beckman-Coulter; Brea, CA, USA) and then analyzed with FlowJo software version 10 (TreeStar; Ashland, OR, USA).

For polyfunctional NK cell assay degranulation and the intracellular production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were assessed, as previously described (15). NK cells were pretreated overnight in the presence of interleukin (IL)-12 (10 ng/ml) and IL-18 (100 ng/ml) to measure the intracellular production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by NK cells or incubated with standard HLA class-1-negative K562 target cells (ATCC CCL243) at an effector: target (E:T) cell ratio of 1:1 to measure degranulation in the presence of anti-CD107a mAb (#H4A3; Becton Dickinson) (**Supplementary Table 1**). Cells were incubated for 5 h in the presence of Golgi Stop and Golgi Plug solutions (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA) and then stained with NK cell surface markers. NK cells were thereafter fixed, permeabilized with a cytofix/cytoperm kit (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA), and then intracellularly stained with anti-IFN- $\gamma$  and anti-TNF- $\alpha$  mAbs (**Supplementary Table 1**), as described previously (15). At minimum 100 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells were acquired on a DXFlex flow cytometer and then analyzed with FlowJo version 10.

### Histology

Fourteen longitudinal ecto-cervical biopsies were longitudinally analyzed with HES and C4d immunochemistry for the UTx patient, and compared to controls, including 6 ecto-cervical biopsies and staged biopsies of uterus (cervical X3, isthmus and uterine fundus) during the explantation of the uterus. All the collected samples underwent histopathological examination conducted by the Anatomical Pathology Department at Foch Hospital. The histological assessments involved 4- $\mu$ m-thick tissue slices. Cervical biopsies were evaluated using Mólne's rejection classification (5). To prepare for Imaging Mass Cytometry (IMC), the HES slides were also microscopically examined to identify an appropriate 1mm<sup>2</sup> region of interest. Placental tissues were subjected to microscopic analysis, and lesions were graded according to the 2016 Amsterdam Consensus Conference guidelines.

### Imaging Mass Cytometry

Six control ecto-cervical biopsies (control group), two ecto-cervical biopsies 8 and 30 months after UTx in the recipient (graft), and all explanations biopsies (explantation) were used for analyze. The imaging mass cytometry (Hyperion<sup>TM</sup>, fluidigm) was performed on the CyPS platform of Sorbonne University (Paris, France). It is an imaging module which, associated with the Helios (a 3rd generation CyTOF) allows the analysis of cells in suspension and tissue by mass cytometry. It enabled localization analysis up to 35 markers simultaneously on the same histological section thanks to the use of heavy metals (16).

We established a panel of 27 antibodies for our study. Iridium is routinely used to label nuclei. For this analysis, we used 3 structural markers (aSMA for vessels, type 1 collagen for the extracellular matrix, cadherin for epithelial cells and trophoblast), 15 phenotypic markers and 7 functional markers. All the antigens, heavy metals, dilutions and conditions of slide marking that were used are summarized in Table S2. We checked this antibody panel on lymph node sections before performing the final manipulation. The analysis of the hyperion<sup>TM</sup> was performed as previously described (Carbonnel et al, Submitted). Groups of cells were selected on the basis of:

- B cells: CD45<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>
- CD4<sup>+</sup> T cells: CD45<sup>+</sup> CD20<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells
- CD8<sup>+</sup> T cells: CD45<sup>+</sup> CD20<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>

- Macrophages: CD45<sup>+</sup> CD68<sup>+</sup>
- Monocytes: CD45<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup> CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>
- Epithelial cells: E-cadherin<sup>+</sup>
- Endothelial cells: aSMA<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup>

The data were analyzed by the expression levels, in terms of pixels or classified objects/cells (cell types and marker expression levels). We performed spatial analyses with interaction, community and neighborhood analyses.

### qPCR

Four scrolls of 10 µm Formalin fixed paraffin embedded (FFPE) ectocervical biopsies were used to perform qPCR on biopsies. The cervical smear was taken in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), then washed 1X in RPMI and 2X in PBS before being frozen in dry pellet. Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions (Qiagen RNeasy FFPE Kit). After extraction, RNA quality and purity were measured by the Agilent Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA). We used the Biomark™ system, real-time PCR equipment with PCR reactions in dedicated 96X96 arrays. We added 2 housekeeping genes (GAPDH and RPS14). We explored 4 genes according to our previous data on rejection (Carbannel et al. submitted): *Granzyme B*, *IL1β*, *MMP9*, *keratin 1* and one according our blood findings: *Blimp 1*, in different steps of the UTx: biopsies and cervical smear were tested at 1 week post-UTx, and blood samples at month 21 after UTx.

## **Results**

### Clinical data

The first French patient to undergo a uterine transplantation at Hôpital Foch, performed by our team, was 34 years old at the time of inclusion in the TU protocol (Clinical Trial Registration Number: NCT03689842). She had been diagnosed with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (MRKH) without vaginal reconstruction and had no comorbidities. Her donor was her 57-year-old mother, who was gravida 3, para 3 (G3P3) without severe comorbidities. Serological tests for HHV8 were negative for both individuals, while EBV, CMV, HHV6, toxoplasma, and VZV were positive for both. Both had blood group O+, and the recipient did not have any preoperative anti-HLA antibodies against the donor.

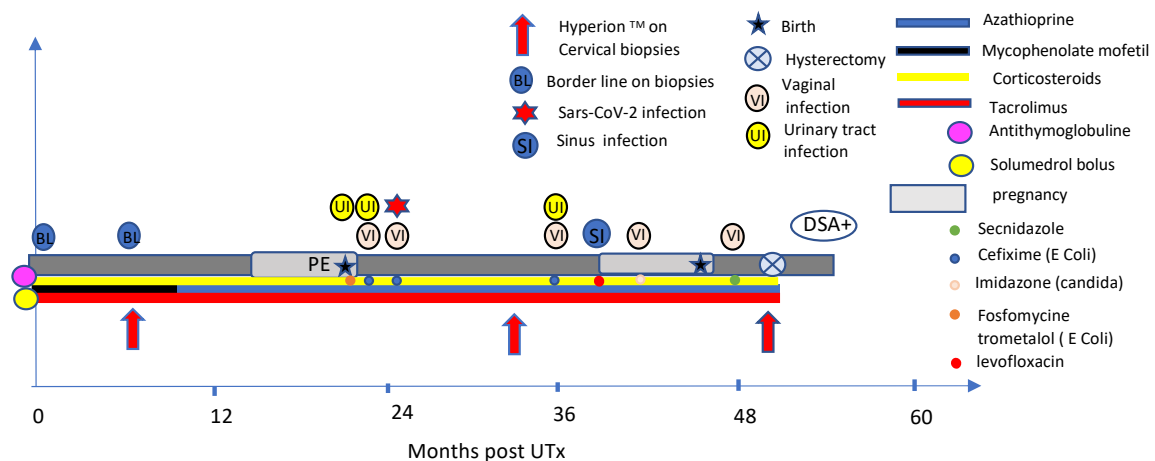


The surgery was performed on March 31, 2019. The harvesting process took 13 hours, and the transplantation itself lasted 6 hours and 50 minutes. The total ischemia time was 3 hours. The immunosuppressive treatment included basilixumab and intravenous corticosteroids for induction, followed by tacrolimus, mycophenolate mofetil (MMF), and oral corticosteroids (10 mg/day). The first menstrual cycle occurred 14 days after transplantation. MMF was replaced by azathioprine 10 months after transplantation. The first embryo transfer was carried out 15 months post-transplant, with a 3-month delay due to the COVID-19 pandemic, and it was successful. The pregnancy progressed well until 30 weeks of gestation (WG) when the patient was hospitalized due to uterine contractions and rhythm abnormalities, requiring treatment with atosiban. At 32 WG, the patient developed preeclampsia with kidney failure, necessitating a cesarean section at 32 weeks and 4 days. there had been a progressive increase in tacrolimus doses during pregnancy to maintain satisfactory tacrolimus levels. The cesarean section resulted in the birth of a healthy baby girl weighing 1850 grams. Three weeks Postpartum, the patient tested positive for SARS-CoV-2 but showed no signs of severity (17). She subsequently became pregnant with her second child 17 months after the first pregnancy, following a second embryo transfer. The second pregnancy progressed smoothly until 34 weeks and 4 days of gestation when the patient was hospitalized due to uterine contractions. Similarly, to the first pregnancy, progressive increase in tacrolimus doses was done to maintain satisfactory tacrolimus levels. A caesarean section was performed at 34 weeks and 6 days due to persistent contractions, resulting in the birth of a healthy baby girl weighing 2550 grams in February 2023. The patient underwent uterine explantation four months after the caesarean section.

Three months after uterine explantation, she developed donor-specific antibodies (DSA). During the course of the transplant, she experienced several mild urinary and vaginal infections caused by various pathogens, such as *Escherichia coli*. She experienced also an acute sphenoidal sinus infection, 38 months after UTx with successful antibiotherapy treatment and sphenoidotomy at 39 months for chronic sinusitis and suspicion of aspergillosis on histology. The Immunosuppressive therapy was discontinued the day after explantation, and hydrocortisone was continued for three months. The clinical data of the patient are summarized in **Figure 1**.

The mean non-pregnant control group age of 6 patients was 30.2 years (26-35). They didn't have any co-morbidity, infection nor inflammation diseases. They were nulliparous and

nulligravid. They underwent surgery for uterus polyps (n=4) or benign ovarian cyst (n=2) during the sampling. The pregnant control group of 12 patients were 32.5 years (26-44). They didn't have any comorbidity, infection nor inflammation disease and no pregnancy-related complications. The Median Delivery occurred at 39.5 (37-41). The neonate controls used for meconium microbiota were healthy and born at term by vaginal delivery.

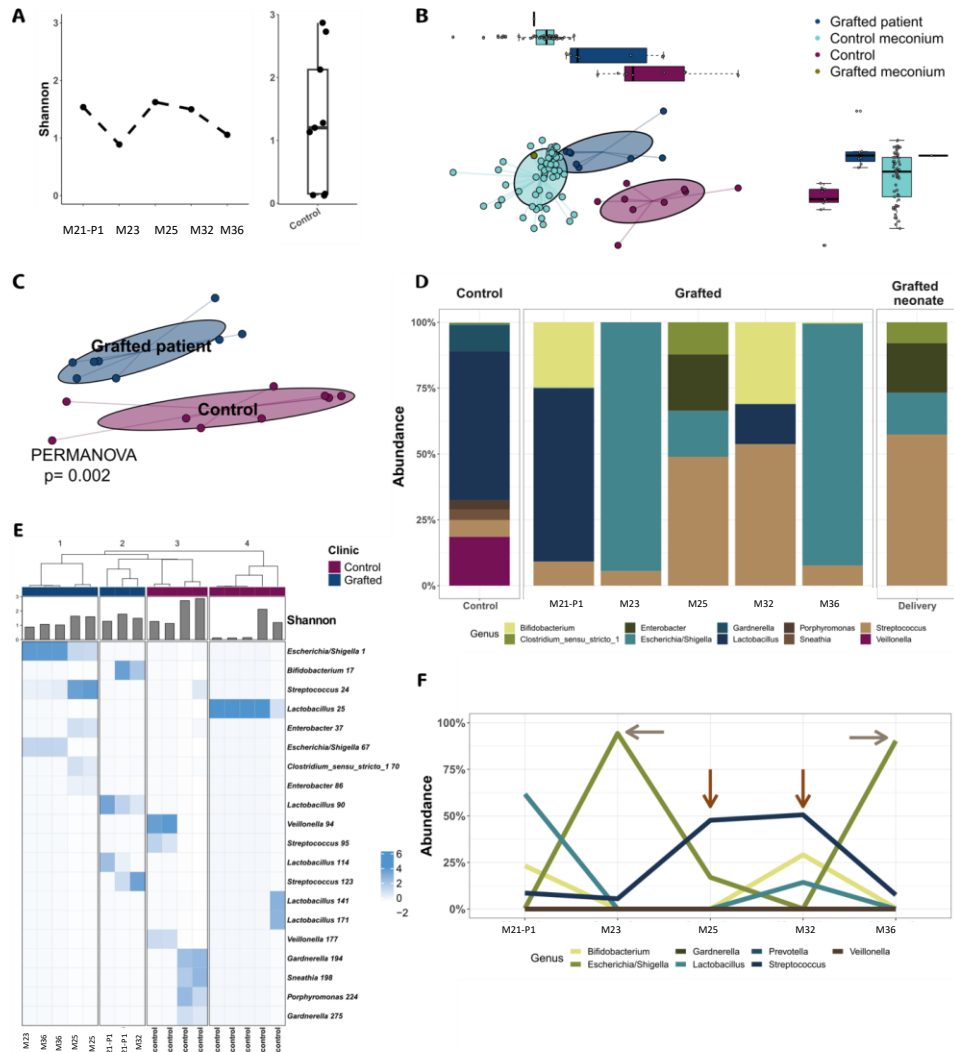


**Figure 1. Clinical course of the patient from the time of uterus transplantation to hysterectomy.** On x-axis are shown months after uterus transplantation until hysterectomy. PE=Preeclampsia and kidney failure; DSA+=Donor specific antibodies.

### Microbiota

Samples were collected longitudinally in the grafted mother and compared to healthy non pregnant mothers. Shannon diversity index is fluctuating temporally between 0.87 and 1.78 but remains in the range of control vaginal microbiome that did not undergo uterus graft (**Figure 2A**). Contrary to gut microbiome, alpha diversity increase is not associated with an eubiotic vaginal microbiota, indeed, a healthy vaginal microbiome should be dominated by *Lactobacillus*. We subjected the vaginal microbiome to a beta-diversity approach using Bray-Curtis distance coupled with a NMDS algorithm to compare vaginal microbiome to meconium microbiome. Surprisingly, the vaginal microbiome from the grafted mother was closer to the meconium microbiome than to control women's microbiome (**Figure 2B**). Interestingly, the meconium microbiome from the infant that was born from the uterus graft was resembling that of a classical born infant's meconium (**Figure 2B**). Vaginal microbiome of the grafted patient

remained distant from control vaginal microbiomes at any point in time when comparing only vaginal microbiomes (**Figure 2C**). Vaginal microbiome is usually dominated by acidifying bacteria such as *Lactobacillus* genus which species *crispatus*, *iners*, *jhonsonii* and *jensenii* usually described as largely dominating. Vaginal microbiome from the grafted mother is dominated by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* during pregnancy but is largely dysbiotic at any other point in time sampled (**Figure 2D**). *Streptococcus* and *Escherichia-Shigella* genus were almost absent from control vaginal microbiomes but increased strongly in the grafted patient (**Figure 2D**). When using the top 20 ASV from the whole vaginal microbiome dataset, we could see that grafted patient microbiomes clustered separately from the control microbiomes (**Figure E**). We detected 4 clusters, a first one composed only by samples from the grafted patient, clearly dominated by *Escherichia-Shigella* and *Streptococcus*. A second one composed by samples from the grafted patient vaginal microbiome being dominated by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* (**Figure 2 E**). The two remaining clusters were composed of control vaginal microbiomes and with two very different bacteria dominating, the third was dominated by *Veillonella* and *Gardnerella* while the fourth was dominated only by *Lactobacillus* (**Figure 2E**). Of note, the third cluster was classically presented as dysbiotic and a result of bacterial vaginosis. Finally, we looked at the most abundant taxa found in either the grafted patient or control microbiomes to highlight the rapid overgrowth of *Escherichia-Shigella* and *Streptococcus* genus. As presented in **Figure 2F**, *Escherichia-Shigella* and *Streptococcus* were clearly overgrowing at month (M)23, M25, M32 and M36 after the transplantation, showing clear infectious episodes. This was correlated with clinic signs of vaginal and urinary tract infections (**Figure1**).



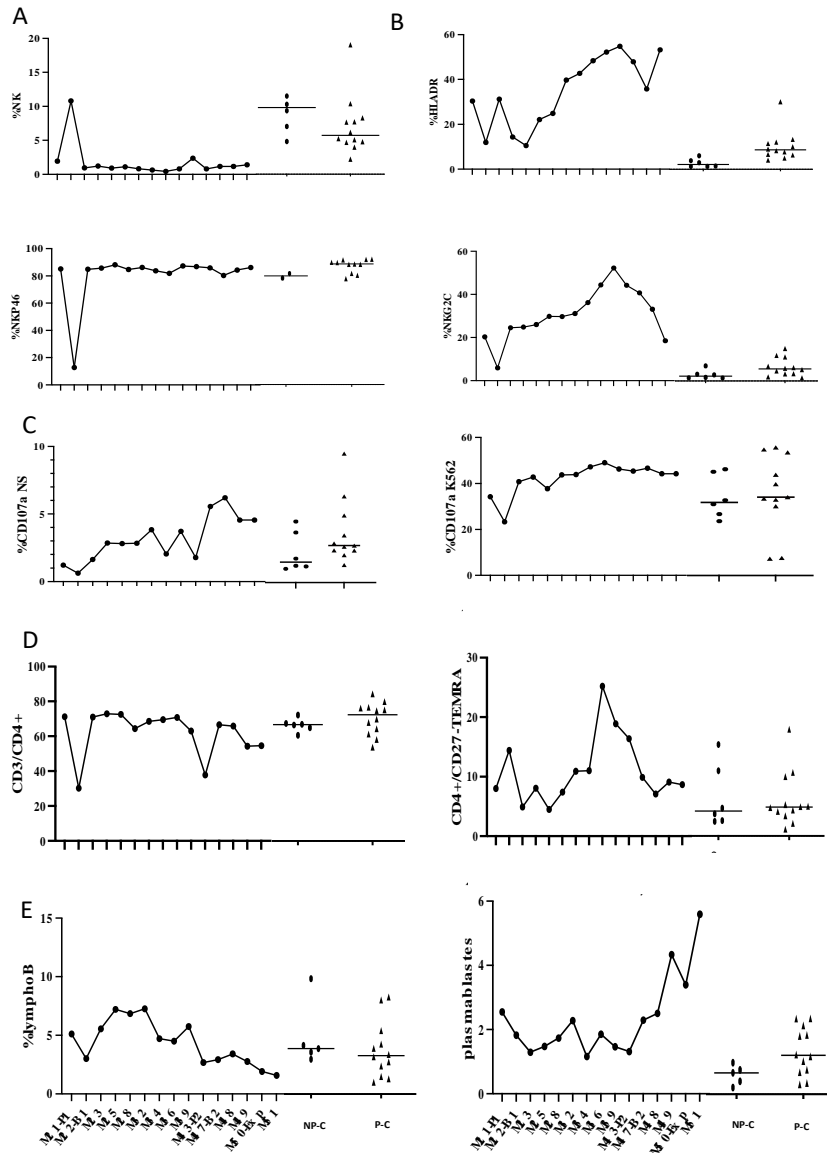
**Figure 2. microbiota results.** Longitudinal vaginal microbiome of the Utx recipient (=grafted) during the first pregnancy, 21 months after transplantation and in post-partum (M23 to M36) and meconial microbiota of the neonate( =grafted neonate) are compared to control groups. M=months; P=pregnancy (A) Longitudinal Shannon index for UTx recipient and a group of healthy non-pregnant women. (B) Non-Multidimensional Scaling (NMS) analysis based on a Bray-Curtis dissimilarity matrix of UTx longitudinal vaginal samples (Grafted patient), vaginal microbiota healthy non-pregnant women (Control), meconium sample of the neonate from the UTx patient and meconium from healthy neonates from the EXHES cohort. (C) NMS analysis of vaginal samples from the UTx recipient and healthy non-pregnant women, PERMANOVA with 1000 permutations. (D) Stacked barplot of the top 10 genus represented in the dataset with non-pregnant healthy women being pooled while longitudinal UTx recipient samples are not pooled. On the right panel the microbiome of the neonate meconium is represented. (E) Heatmap of top 20 relative abundance at the ASV level for vaginal microbiota samples from the UTx patient and healthy non-pregnant women. Shannon index is depicted as barplot on the top panel of the heatmap. (F) Line plot of 9 selected genes.

### Phenotypic and functional activities in the periphery

We observed that the frequency of blood NK cells in the UTx patient was very low in comparison to the control group, excepted during pregnancy where it increases, particularly

during the first one, to reach standard values (**Figure 3A**). In contrast, a decrease in NK cell frequency was observed in the pregnant control group (**Figure 3A**). Concerning the phenotype of NK cells, we observed that most markers are unchanged (data not shown). However, the cell activation (HLA-DR<sup>+</sup>) and the expression of NKG2C, a marker associated with various infections, were higher in the UTx patient and increased progressively until the 48 months post UTx (**Figure 3B**). In contrast, the expression of NKp46, an activating NK-cell marker decreased drastically during the first pregnancy in the UTx patient (**Figure 3B**). Together, these data suggested that NK cells could present markers of adaptive NK cells consistently with the infectious events described in this patient (Figure 1).

Concerning the polyfunctional capacities of NK cells, we observed a comparable level of degranulation of NK cells in the absence of stimuli or after addition of the standard K562 target cells in UTx patient and control groups (**Figure 3C**). In contrast, the intracellular production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by NK cell in the UTx patient, without stimulation or after pre-treatment with IL12+IL18, was low as compared to the control groups (**supplemental Figure**). The CD4<sup>+</sup> T cell frequency was maintained at a normal level in the UTx patient except during pregnancy, where it was very low (**Figure 3E**). The CD4<sup>+</sup> TEMRA T cells were evolving at normal rate besides 39 months after UTx, where they were higher (**Figure 3E**). CD8<sup>+</sup> T cells frequency was maintained at a normal level for our UTx patient (**supplemental Figure**). The frequency of lymphocyte B was maintained at standard values with a tendency to decrease overtime (**Figure 3E**). On the contrary, we observed an increase in plasmablastes starting from 49 months after UTx, with higher level than controls (**Figure 3E**).

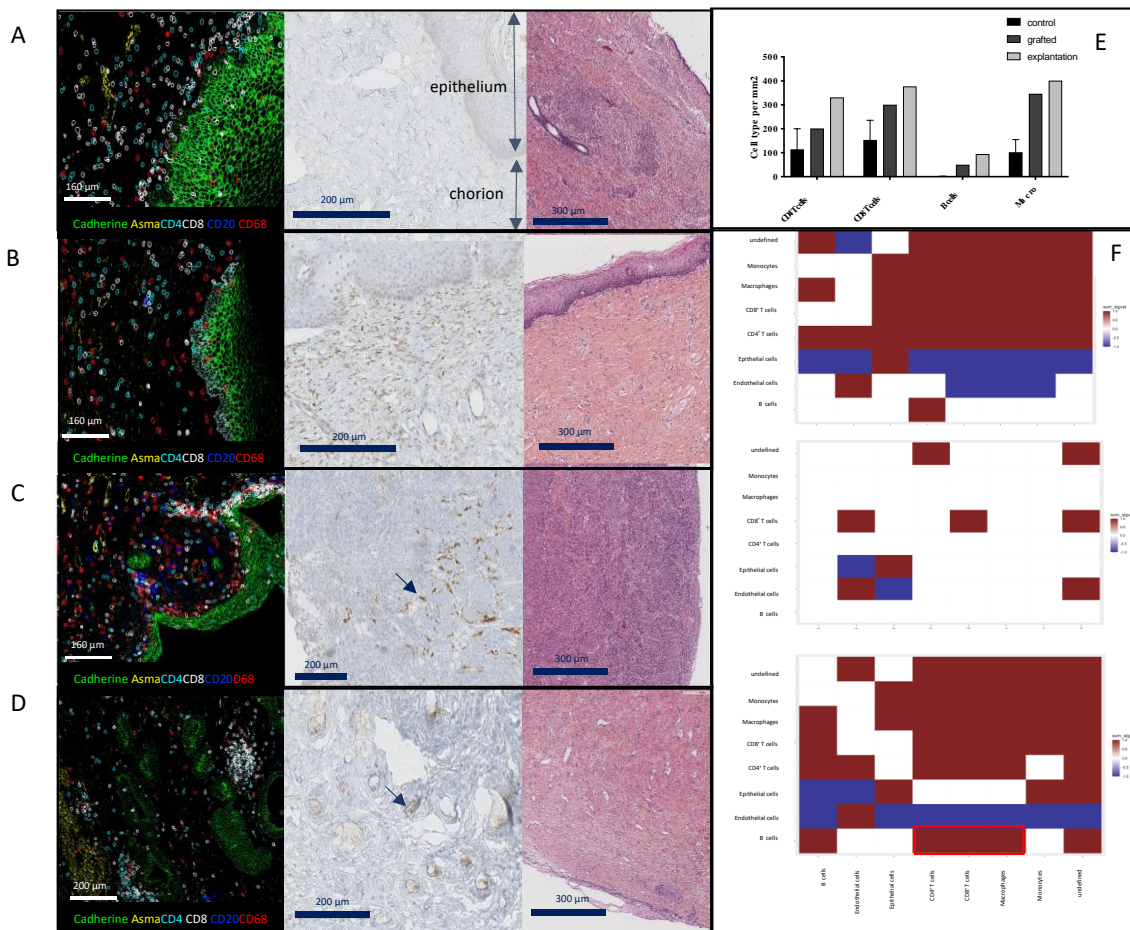


**Figure 3. Characteristics of immune cells by flow cytometry: timeline of the Utx recipient and comparison to 2 control groups.** *x-axe= time; y-axe=frequency expressed in percentage. Black lines represent the median. NP=non pregnant; P=Pregnant; M=months; P1=first pregnancy; P2=second pregnancy; B1=first birth, B2=second birth.; Exp=explantation of the uterus (A) Frequency of CD3-CD56<sup>+</sup> NK cells. (B) phenotype of NK cells: HLA-DR<sup>+</sup>, NKp46 and NKG2C. (C) Degranulation of NK cells measured by cell-surface expression of CD107a in CD3-CD56<sup>+</sup> NK cells tested in the absence (NS) of target cells and in presence of standard K562 target cells (ratio 1:1). (D) Frequency of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>/CD27<sup>-</sup>/TEMRA (effector memory cells re-expressing CD45RA). (E) Frequency of B lymphocytes and plasmablastes.*

Expression, localization, and neighborhood analyses of immunological markers in the biopsies

All biopsies performed for the UTX patient didn't reveal any signs of cellular or chronic rejection. Nevertheless, C4d was positive on endothelium vessels during explantation on cervical and uterus samples (**Figure 4 A to D**). Imaging mass cytometry revealed a growing

immune cell density in grafted uterus and explantation exocervical biopsies of the UTx patient, as compared to controls (**Figure 4E**). Interestingly, neighborhood revealed interaction between B lymphocytes, CD4+ and CD8+ T lymphocytes and macrophages in the explantation group, not observed both in the graft group or control group. Of note, these specific neighborhood between immune cells is sharply visible on cervix and fundus uterus (**Figure 4C and 4D**), but not showed in the isthmus (**Supplemental Figure 2**).



**Figure 4. Analysis of biopsies.** On the right pseudocolored IMC images; in the middle *c4d* stain with Immunohistochemistry; on the left HES coloration. (A) Control #1 exocervical biopsy. (B) Exocervical biopsy of the UTx patient 30 months after UTx. (C) Exocervical biopsy of the UTx during explantation; arrow shows *c4d* staining in vessels. (D) Uterine fundus biopsy of the UTx during explantation; arrow shows *c4d* staining in vessels. (E) Evolution of immune cells between the control, the grafted and explantation exocervical biopsies; x-axis= immune cells; y-axis= number of cells per mm<sup>2</sup> (F) proximal distribution of relationships among cell types in samples as determined by neighborhood analyses. Blue= distant; red=close; and white=no relationship. On top the control group, in the middle the two samples of exocervical biopsies performed during the graft life, in the bottom the stages biopsies performed during explantation.

Histological analysis showed the presence of lesions consistent with disorders of uteroplacental vascularization (advanced villous maturation, foci of distal villous hypoplasia, excess of perivillous nuclear clusters) in the first, and discrete advanced maturation in the second biopsy of placenta.

By qPCR from UTx cervical biopsies we analyzed all different points transcriptional expression of *granzyme B* and *IL1β* (Figure 5). We observed an increase of granzyme B and IL1β at the end of the longitudinal UTx follow up. Granzyme B also increased during the first birth (Figure 5C). On the biopsies, we observed the same tendency. We also had an increase at day 7 and 9 to 10 months after UTx. Cervical smears results were different from the biopsies, except for granzyme B which was also increased at day 7. In contrast the data were not conclusive for *Keratine 1*, *MMP9* and *Blimp 1*.

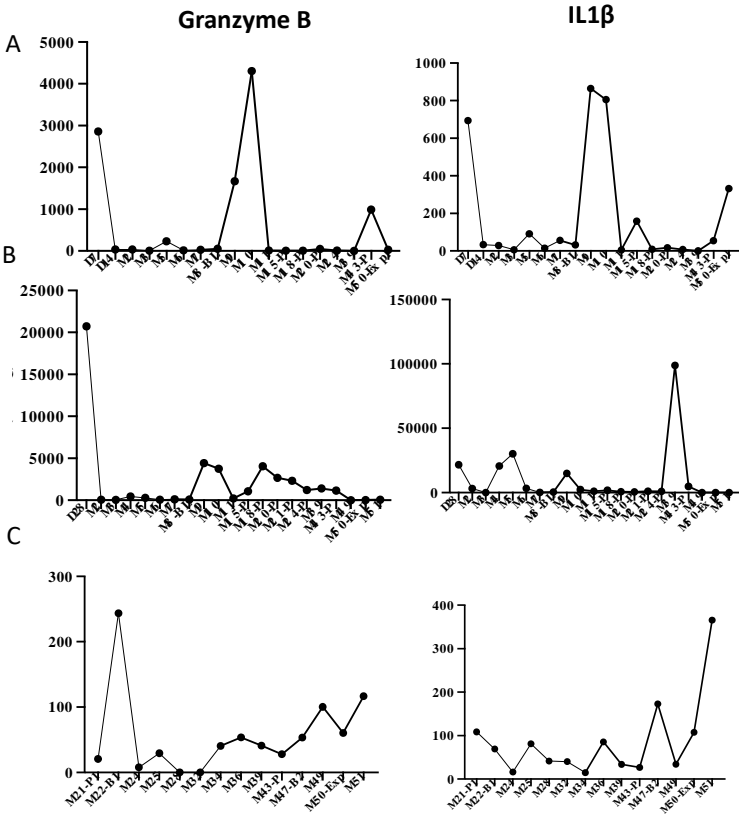


Figure 5. Timeline of granzyme B and IL1β measured with PCR. x-axis= time; y-axis=relative expression; M=months; P1=first pregnancy; P2=second pregnancy; B1=first birth, B2=second birth.; Exp=explantation of the uterus. (A) FFPE cervical biopsies. (B) vaginal smear (C) blood.

Discussion



In this study we have observed an alteration of vaginal microbiome during the UTx process, possibly responsible for vaginal and urinary recurrent infections. We discovered an alteration of frequency of the immune cells on blood, and specific modulations during pregnancy. The association between modification of NK phenotypes overtime and infections should not be excluded. Finally, during UTx explantation, a humoral rejection was discovered thanks to C4d staining. It was correlated with the increase of plasmablastes and positivity of DSA few weeks later. Two biomarkers seemed to be correlated with rejection in blood: granzyme B and IL1 $\beta$ . Altogether, this study reports effects of an immunosuppressive therapy and first signs of humoral rejection after an UTx.

Vaginal microbiota from the UTx patient was particularly unstable over time. Indeed, we saw clear signs of bacterial vaginal infection led by *Escherichia-Shigella* and *Streptococcus* genus at multiple points in time, and reduction of lactobacillus (18). The alteration of the vaginal microbiota is probably linked to the immunosuppressive drugs, as the patient had a normal vagina (19). The role of the vagina microbiota in UTx could be substantial, given that the uterus is in direct contact with the external environment through the vagina and so is particularly vulnerable during pregnancy, even if we found that the microbiota was relatively preserved during the pregnancy in our UTx patient, probably thanks to hormonal immunomodulation (20). It is for example well known, that alteration of the vaginal microbiota can lead to premature birth (21). Furthermore, at least 10% of patients with congenitally uterine absolute infertility (MRKH syndrome), the main candidates for UTx, have a new vagina that comes from graft skin or intestinal flap, leading to the colonization of bacteria not observed in the normal vaginal flora (22, 23), which could be compromise pregnancy (24). Some cases of repeated miscarriages and implantation failures have already been described in these situations (23). In a precedent study, we have described a MRKH patient case with skin graft vagina who experienced repeated miscarriages and unfortunately no childbirth; It was observed acute severe rejections episodes following chorioamnionitis. We have highlighted in this case a modulation of the innate immunity with an abnormal polarization of M2 macrophages, probably due to severe infections (Carbonnel et al, submitted). The microbiota is emerging as a factor involved in transplant rejection, while exercising both direct and indirect effects on innate and adaptive immune cell subsets. A link between alteration in NK cells, including over-expression of the cell-activation HLDR marker and NKG2C on NK cells from the UTx patient (increase of

NKG2C NK marker, specific of infections and HLADR<sup>+</sup> NK) could be associated with vaginal infections observed in this UTx patient, and potentially with humoral rejection. Additionally, the vaginal microbiota may have an impact on the neonate. As observed, the neonatal microbiota was closed to that of the mother and different from control cases. It is known that Caesarean section can be responsible for an impoverishment of the newborn's microbiota (25). Scarcity of data about the neonatal microbiota of children from transplant patients as well as their evolution at medium- and long-term outcome suggest that new studies should be performed, especially that alterations in the neonatal microbiota have been incriminated in the development of allergic conditions in children, as well as a number of chronic pathologies (26, 27).

We also observed that NK cells and T and B lymphocytes increased in the grafted exocervical biopsies and during the explantation, in comparison to the control group. The role of dNK on trophoblastic invasion and fetal tolerance has been clearly demonstrated (28). However, the pregnancy of the UTx patient was responsible of immune modulations that differed from the pregnant healthy control group. If pregnancy normalized the level of peripheral NK cells, while this level decreased in healthy controls, the frequency of CD4<sup>+</sup> T cells decreased drastically, certainly linked to immunosuppressive treatments, and more particularly to corticosteroids (29) and inhibitors of calcineurin (30). However, the impact of immunosuppressive treatment on the transplant itself during pregnancy is not well established.

As reported, this UTx patient experienced only preeclampsia and kidney failure during her first pregnancy. With UTx, the rate of preeclampsia was described between 12-16% in which, single kidney and calcineurin inhibitors have been advanced as main risk factors, as no comorbidities have been described (22). In other solid organ transplantation is associated with preeclampsia in 10-30% of the pregnancies, with calcineurin inhibitor and associated comorbidities reported as risk factors (29). Preeclampsia is due to abnormal invasion of trophoblast (30). It can be seen as an alteration of the maternal immune system, preventing it from recognizing and "tolerating" the fetus. In our case, we don't have the explanation why the UTx patient have only Preeclampsia during her first pregnancy, but during this period we observed many specific immune modulations including a drastic decrease of the NKp46 expression that could suggest abnormal functional activity of NK cells, possibly responsible of the preeclampsia, as previously reported (31). In the future, more data and understanding on the

materno-foetal interface in UTx is mandatory, to better prevent complications of pregnancies (32).

At the end of the graft life, we observed a beginning of humoral rejection with concordant findings including increase of antibody-secreting plasma cells (plasmablasts), positivity of C4d on explanted uterus, and few weeks later positivity of DSA. We observed also a major cluster of immune cells, composed of CD8<sup>+</sup> T Cells, CD4<sup>+</sup> T Cells, Macrophages and B cells; suggesting the formation of Tertiary lymphoid structures (TLS). These TLS can develop in non-lymphoid sites within the target organs of chronic inflammatory, autoimmune diseases, solid tumors and allograft rejection (33). TLS aggregates as tight clusters of B and T cells to compose highly organized structures that comprise a functional germinal center. It has also been reported that the most organized TLS with germinal centers may be associated with renal dysfunction and chronic rejection events (34-37). Accordingly, we have already reported the possibility of a correlation between putative highly organized TLS and chronic rejection mediated by humoral mechanisms in UTx (Carbonnel et al, submitted). Additional analyzes will be necessary to confirm our results, using more specific markers, such as CD21 (specific to follicular dendritic cells), DC-Lamp, or PNA<sup>+</sup> (38) to better define cell-populations, and to focus more particularly on humoral rejection. This is all the more important as humoral and chronic rejection are more difficult to treat than cellular rejection (39).

A growing understanding of the mechanisms of rejection in different organs has led to the identification of several potential biomarkers of rejection, which may have a prognostic or predictive role in limiting organ failure. Currently, several non-invasive candidate markers of rejection have been identified, notably in blood and/or urine for kidney transplants, such as the expression of certain genes associated with the immune system, lymphocyte phenotypic markers, cytokines and/or chemokines (40, 41). In UTx, whose rejection is asymptomatic and biologic signs of dysfunction are not available, non-invasive biomarkers of rejection could be interesting. It could avoid regular cervical biopsies, which increase the risk of hemorrhage, allow a good follow-up even if vaginal stricture is present and makes impossible cervical biopsies. Altogether, it could optimize immunosuppression therapy to reduce the risks, while staying efficient to avoid rejection. In this case report, granzyme B and IL1 $\beta$  increased in blood at the end of the graft life in the same way as the humoral rejection appearance. (42). IL1 $\beta$  is a cytokine produced by M1 macrophages, implicated in several organ rejection (42), including

after UTX (Carbonnel et al, submitted). Granzyme B, a protease generally recognized as the predominant effector pathway used by NK cells and CD8<sup>+</sup> T cells to kill target cells has already been identified as a non-invasive biomarker of rejection in SOT, peripheral blood lymphocytes and urine (43-46), as well recently after UTx in chorion and until the surface of epithelium (Carbonnel et al, submitted). Of note, cervical smears were not representative of cervix biopsies nor humoral rejection in the present study.

Diagnosis of uterine graft rejection should be improved by the introduction of early markers. Histology alone can lead to misinterpretation. Future research should focus on the effects of immunosuppressive drugs on the well-being of the fetus and the newborn, and on the development of effective protocols using already approved drugs or new drugs to achieve tolerance, enabling every recipient to continue her pregnancy even if the graft has already been exposed to rejection. A better understanding of the materno-foetal immune interface and pregnancy-related complications such as implantation failure, recurrent miscarriage, pre-eclampsia and premature delivery is also needed to ensure the success of these very special pregnancies. A multicentric international study on a larger cohort is mandatory to confirm and refine our preliminary conclusions.

1. Brannstrom M, Johannesson L, Bokstrom H, Kvarnstrom N, Molne J, Dahm-Kahler P, et al. Livebirth after uterus transplantation. *Lancet*. 2015;385(9968):607-16.
2. Ayoubi JM, Carbonnel M, Racowsky C, de Ziegler D, Gargiulo A, Kvarnstrom N, et al. Evolving clinical challenges in uterus transplantation. *Reprod Biomed Online*. 2022;45(5):947-60.
3. Brannstrom M, Racowsky C, Carbonnel M, Wu J, Gargiulo A, Adashi EY, et al. Uterus transplantation: from research, through human trials and into the future. *Hum Reprod Update*. 2023;29(5):521-44.
4. Johannesson L, Kvarnstrom N, Molne J, Dahm-Kahler P, Enskog A, Diaz-Garcia C, et al. Uterus transplantation trial: 1-year outcome. *Fertil Steril*. 2015;103(1):199-204.
5. Molne J, Broecker V, Ekberg J, Nilsson O, Dahm-Kahler P, Brannstrom M. Monitoring of Human Uterus Transplantation With Cervical Biopsies: A Provisional Scoring System for Rejection. *Am J Transplant*. 2017;17(6):1628-36.
6. Agarwal A, Johannesson L, Findeis SK, Punar M, Askar M, Ma TW, et al. Clinicopathological Analysis of Uterine Allografts Including Proposed Scoring of Ischemia Reperfusion Injury and T-cell-mediated Rejection-Dallas UtErus Transplant Study: A Pilot Study. *Transplantation*. 2022;106(1):167-77.
7. Flyckt R, Falcone T, Quintini C, Perni U, Eghtesad B, Richards EG, et al. First birth from a deceased donor uterus in the United States: from severe graft rejection to successful cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(2):143-51.
8. Brucker SY, Kramer B, Abele H, Henes M, Hoopmann M, Scholler D, et al. Uterine allograft removal by total laparoscopic hysterectomy after successful cesarean delivery in a living-donor uterus recipient with uterovaginal agenesis (MRKHS). *Arch Gynecol Obstet*. 2023;307(3):827-40.

9. Nazarpour R, Zabihi E, Alijanpour E, Abedian Z, Mehdizadeh H, Rahimi F. Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. *Int J Mol Cell Med.* 2012;1(2):88-93.
10. Corkum CP, Ings DP, Burgess C, Karwowska S, Kroll W, Michalak TI. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT) and standard density gradient. *BMC Immunol.* 2015;16:48.
11. Ammerlaan W, Trezzi JP, Lescuyer P, Mathay C, Hiller K, Betsou F. Method validation for preparing serum and plasma samples from human blood for downstream proteomic, metabolomic, and circulating nucleic acid-based applications. *Biopreserv Biobank.* 2014;12(4):269-80.
12. Villette R, Traore D, Dhilly E, Foucault P, Parisel E, Sauce D, et al. Gut microbiota and maternal immune transfer at birth influence pre-allergic clinical outcome. *bioRxiv.* 2023.
13. Villette R, Autaa G, Hind S, Holm JB, Moreno-Sabater A, Larsen M. Refinement of 16S rRNA gene analysis for low biomass biospecimens. *Sci Rep.* 2021;11(1):10741.
14. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andra I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol.* 2017;47(10):1584-797.
15. Bennabi M, Tarantino N, Gaman A, Scheid I, Krishnamoorthy R, Debre P, et al. Persistence of dysfunctional natural killer cells in adults with high-functioning autism spectrum disorders: stigma/consequence of unresolved early infectious events? *Mol Autism.* 2019;10:22.
16. Ijsselsteijn ME, van der Breggen R, Farina Sarasqueta A, Koning F, de Miranda N. A 40-Marker Panel for High Dimensional Characterization of Cancer Immune Microenvironments by Imaging Mass Cytometry. *Front Immunol.* 2019;10:2534.
17. Ayoubi JM, Carbonnel M, Kvarnstrom N, Revaux A, Poulain M, Vanlieferinghen S, et al. Case Report: Post-Partum SARS-CoV-2 Infection After the First French Uterus Transplantation. *Front Surg.* 2022;9:854225.
18. Chen X, Lu Y, Chen T, Li R. The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:631972.
19. Mouraux S, Bernasconi E, Pattaroni C, Koutsokera A, Aubert JD, Claustre J, et al. Airway microbiota signals anabolic and catabolic remodeling in the transplanted lung. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(2):718-29 e7.
20. Fuhler GM. The immune system and microbiome in pregnancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2020;44-45:101671.
21. Elovitz MA, Gajer P, Riis V, Brown AG, Humphrys MS, Holm JB, et al. Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. *Nat Commun.* 2019;10(1):1305.
22. Brannstrom M, Tullius SG, Brucker S, Dahm-Kahler P, Flyckt R, Kisu I, et al. Registry of the International Society of Uterus Transplantation: First Report. *Transplantation.* 2023;107(1):10-7.
23. Ozkan O, Ozkan O, Dogan NU, Bahceci M, Mendilcioglu I, Boynukalin K, et al. Birth of a Healthy Baby 9 Years After a Surgically Successful Deceased Donor Uterus Transplant. *Ann Surg.* 2022;275(5):825-32.
24. Jones BP, Saso S, L'Heveder A, Bracewell-Milnes T, Thum MY, Diaz-Garcia C, et al. The vaginal microbiome in uterine transplantation. *BJOG.* 2020;127(2):230-8.
25. Song SJ, Wang J, Martino C, Jiang L, Thompson WK, Shenhav L, et al. Naturalization of the microbiota developmental trajectory of Cesarean-born neonates after vaginal seeding. *Med.* 2021;2(8):951-64 e5.
26. Brandao HV, Vieira GO, de Oliveira Vieira T, Camargos PA, de Souza Teles CA, Guimaraes AC, et al. Increased risk of allergic rhinitis among children delivered by cesarean section: a cross-sectional study nested in a birth cohort. *BMC Pediatr.* 2016;16:57.
27. Kristensen K, Henriksen L. Cesarean section and disease associated with immune function. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(2):587-90.

28. Le Bouteiller P, Tabiasco J. Killers become builders during pregnancy. *Nat Med.* 2006;12(9):991-2.
29. McKay DB, Josephson MA. Pregnancy in recipients of solid organs--effects on mother and child. *N Engl J Med.* 2006;354(12):1281-93.
30. James JL, Saghian R, Perwick R, Clark AR. Trophoblast plugs: impact on utero-placental haemodynamics and spiral artery remodelling. *Hum Reprod.* 2018;33(8):1430-41.
31. Fukui A, Yokota M, Funamizu A, Nakamura R, Fukuhara R, Yamada K, et al. Changes of NK cells in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2012;67(4):278-86.
32. Iske J, Elkhali A, Tullius SG. The Fetal-Maternal Immune Interface in Uterus Transplantation. *Trends Immunol.* 2020;41(3):213-24.
33. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(7):447-62.
34. Hasegawa T, Iacono A, Yousem SA. The significance of bronchus-associated lymphoid tissue in human lung transplantation: is there an association with acute and chronic rejection? *Transplantation.* 1999;67(3):381-5.
35. Lee YH, Sato Y, Saito M, Fukuma S, Saito M, Yamamoto S, et al. Advanced Tertiary Lymphoid Tissues in Protocol Biopsies are Associated with Progressive Graft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2022;33(1):186-200.
36. Thauinat O, Patey N, Caligiuri G, Gautreau C, Mamani-Matsuda M, Mekki Y, et al. Chronic rejection triggers the development of an aggressive intra-graft immune response through recapitulation of lymphoid organogenesis. *J Immunol.* 2010;185(1):717-28.
37. Thauinat O, Patey N, Gautreau C, Lechaton S, Fremeaux-Bacchi V, Dieu-Nosjean MC, et al. B cell survival in intra-graft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation.* 2008;85(11):1648-53.
38. Garaud S, Dieu-Nosjean MC, Willard-Gallo K. T follicular helper and B cell crosstalk in tertiary lymphoid structures and cancer immunotherapy. *Nat Commun.* 2022;13(1):2259.
39. Pescovitz MD, Book BK, Henson S, Leapman SB, Milgrom ML, Kimball J, et al. The addition of sirolimus to cyclosporine and steroids inhibits the anti-equine antibody response in renal transplant recipients treated with antithymocyte globulin. *Am J Transplant.* 2003;3(4):497-500.
40. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(6):401-9.
41. Augustine JJ, Hricik DE. T-cell immune monitoring by the ELISPOT assay for interferon gamma. *Clin Chim Acta.* 2012;413(17-18):1359-63.
42. Hoffmann MW, Wonigeit K, Steinhoff G, Herzbeck H, Flad HD, Pichlmayr R. Production of cytokines (TNF-alpha, IL-1-beta) and endothelial cell activation in human liver allograft rejection. *Transplantation.* 1993;55(2):329-35.
43. Lo DJ, Kaplan B, Kirk AD. Biomarkers for kidney transplant rejection. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(4):215-25.
44. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation.* 1998;66(5):562-6.
45. Heng B, Li Y, Shi L, Du X, Lai C, Cheng L, et al. A Meta-analysis of the Significance of Granzyme B and Perforin in Noninvasive Diagnosis of Acute Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation.* 2015;99(7):1477-86.
46. Kollar B, Uffing A, Borges TJ, Shubin AV, Aoyama BT, Dagot C, et al. MMP3 Is a Non-invasive Biomarker of Rejection in Skin-Bearing Vascularized Composite Allotransplantation: A Multicenter Validation Study. *Front Immunol.* 2019;10:2771.

## Supplementary tables

**Table S1. List of flow cytometry markers used in the study**

Marker	Clone	Fluorochrom	Company
<b>NK Cells</b>			
CD3	UCHT1	eFluor780	eBioscience
CD16	REA423	PerCP-Vio 700	Miltenyi Biotec
CD56	REA196	PEVio770	Miltenyi Biotec
CD161	DX12	FITC	BD Pharmingen
CD69	TP1.55.3	ECD	Coulter
HLA-DR	I243	AlexaFluor 700	BioLegend
CD57	NC1	Pacific Blue	Coulter
NKG2A	Z199	Phycoerythrin	Coulter
NKG2C	#134591	Allophycocyanin	R&D System
NKG2D	1D11	Brilliant Violet 786	BD Optibuild
NKp30	P30-15	Brilliant Violet 421	BD Pharmingen
NKp46	REA808	PEVio615	Miltenyi Biotec
KIR2DL1	HP-3E4	FITC	BD Pharmingen
KIR2DL2/DL3	GL183	Phycoerythrin	Coulter
KIR3DL1	DX9	AlexaFluor-700	Biolegend
ILT2	GHI/75	Allophycocyanin	Miltenyi Biotec
DNAM-1	DX11	Brilliant Violet 650	BD Optibuild
CD107a	H4A3	FITC	BD Pharmingen
IFN-g	B27	AlexaFluor-700	BD Pharmingen
TNF-a	Mab11	eFluor450	eBioscience
Viability		eFluor506	eBioscience
<b>T Cells</b>			
CD45-RA	5H9	FITC	BD Pharmingen
CD38	HB7	PE	BD Pharmingen
CD8	B9.11	ECD	Beckman
CD27	L128	PerCP-Cy 5.5	BD Pharmingen
CCR7 (CD197)	3D12	PE-Cy 7	BD Pharmingen
CD45-RA	RPA-T4	APC	BD Pharmingen
HLA-DR	I243	AF700	BioLegend
CD3	UCHT1	eFluor780	eBioscience
CD57	NC1	Pacific Blue	Beckman
Viability		eF506	eBioscience
<b>B Cells</b>			
IgD	IA6-2	FITC	BD Pharmingen
CD11c	3.9	PE	BD Pharmingen
CD3	UCHT1	PE-CF594	BD Pharmingen
CD14	MoP9	PE-CF594	BD Pharmingen
CD38	HIT2	PerCP-Cy 5.5	BD Pharmingen
CD27	M-T271	PE-Cy 7	BD Pharmingen
CD21	B-ly4	APC	BD Pharmingen
CD19	HIB19	AR700	BD Pharmingen
IgM	G20-127	BV510	BD Pharmingen
CD24	ML5	BV650	BD Pharmingen
Viability		eF780	eBioscience

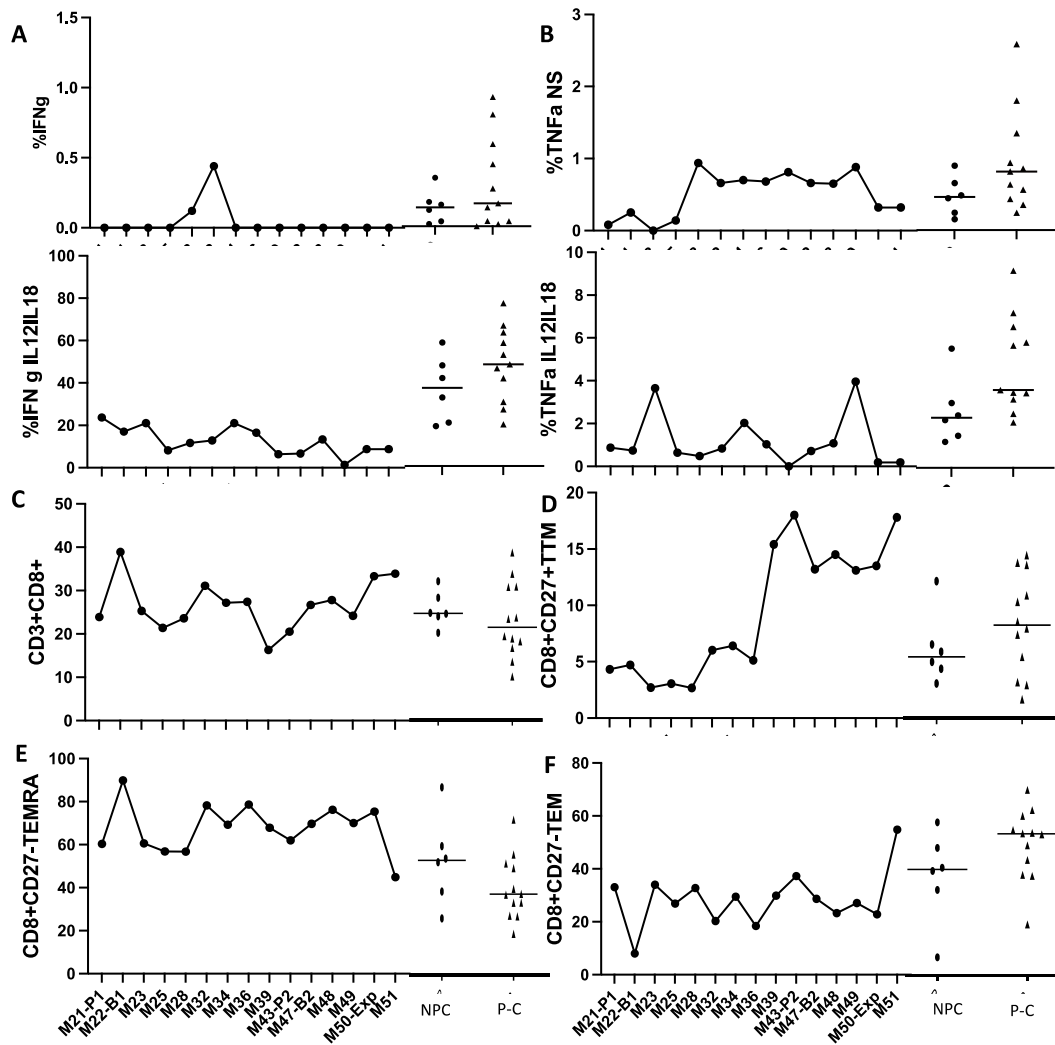
**Table S2. Imaging Mass cytometry Panel**

Short name (gene)	Clone	source	Isotope	Dilution	Conditions	Main target cells
alpha-SMA	IA4	STBT	141Nd	1/400	4°	endothelial
Collagen Type I *	ABT123	Merck	143Nd	1/100	4°	extra cellular matrix
CD14	EPR3653	STBT	144Nd	1/100	4°	monocytes
pankeratin	C11	STBT	148Nd	1/100	4°	syncytotrophoblast/ epithelium
CD15	W6D3	STBT	149Sm	1/50	4°	neutrophils
CD107A	H4A3	STBT	151Eu	1/50	4°	degranulation
CD45(PTPRC)	D9M81	STBT	152Sm	1/200	4°	leucocytes
CD11c (ITGAX) *	EP134Y	Abcam	154Sm	1/200	4°	dendritic cells
CD4	EPR6855	STBT	156Gd	1/100	4°	T4 lymphocytes
E-Cadherin	24-E10	STBT	158Gd	1/200	4°	trophoblast/epithelium
CD68	KP1	STBT	159Tb	1/800	4°	macrophages
CD20 (MS4A1)	H1	STBT	161Dy	1/400	4°	B lymphocytes
CD8a	C8/144B	STBT	162Dy	1/200	4°	T8 lymphocytes
VEGF	G 153-694	STBT	163Dy	1/100	4°	decidual NK cells
Granzyme B	EPR20129-21	STBT	167Er	1/200	4°	protease
CD45RA(PTPRC)	HI100	STBT	169Er	1/200	4°	maturity of lymphocytes T
CD3	Polyclonal	STBT	170Er	1/100	4°	T lymphocytes
CD16 (FCGR3A) *	EPR16784	Abcam	172Yb	1/200	4°	Igg Fc Receptor monocytes/NK/Mac/neutrophils
HLADR	LN3	STBT	174Yb	1/1600	4°	MHC2 Receptor
CD56 *	E7X9M rabbit	Ozyme	155Gd	1/100	4°	NK lymphocytes
HLA G *	MEM-G/2	Invitrogen	145Nd	1/100	4°	non classical MHC1
DC SIGN *	NBP1-77284	BioTechne	166Er	1/100	4°	dendritic cells /macrophages
CD69 *	EPR21814	Abcam	165Ho	1/50	4°	lymphocytes activation
Integrin β 7 *	FIB504	Invitrogen	176Yb	1/100	4°	decidual NK cells
ACE2 *	A200691	Biolegend	175Yb	janv-50	4°	R SARS COV 2
Iridium	201192A	STBT	191Ir	1/400	4°	DNA
CD27	EPR8569	STBT	171Yb	1/50	1h30 RT	Maturity of T lymphocytes, NK

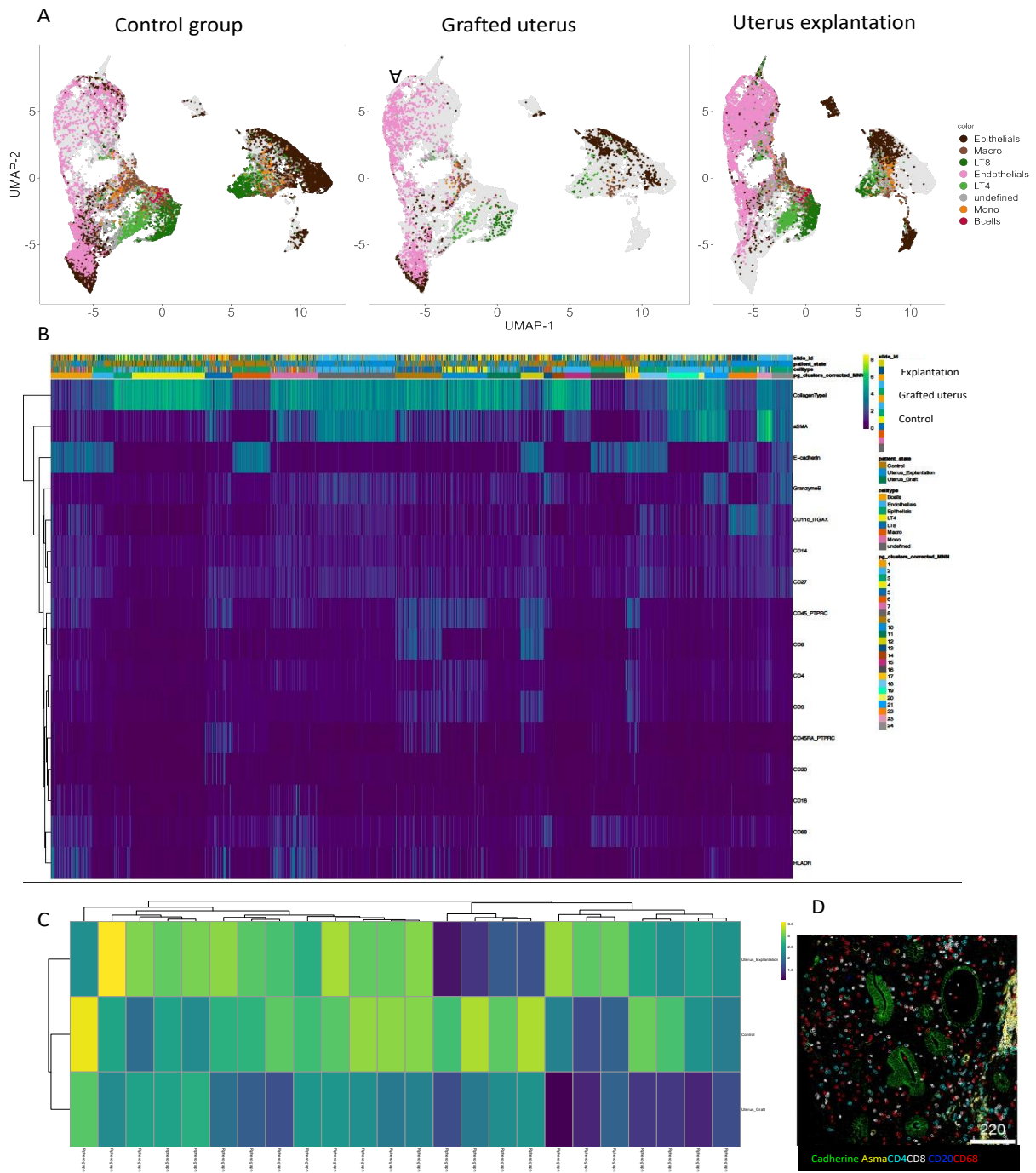
\*= coupling with the heavy metal achieved in the lab; in grey: structure markers; in red= functional markers



## Supplementary figures



**Figure S1. Characteristics of immune cells by flow cytometry: timeline of the Utx recipient and comparison to 2 control groups.** x-axis= time; y-axis=frequency expressed in percentage. Black lines represent the median. NP=non pregnant; P=Pregnant; M=months; P1=first pregnancy; P2=second pregnancy; B1=first birth, B2=second birth.; Exp=explantation of the uterus (A) Percentage of IFN- $\gamma$  produced by NK cells without stimulation on the top and in the presence of IL-12 and IL-18 on the bottom. (B) Percentage of TNF- $\alpha$  produced by NK cells without stimulation on the top and in the presence of IL-12 and IL-18 on the bottom. (C) frequency of CD3 $^+$  CD8 $^+$ . (D) Frequency of CD8 $^+$ CD27 $^+$  TTM (transitional memory) cells. (E) Frequency of CD8 $^+$ CD27 $^-$  effector memory cells re-expressing CD45RA (TEMRA). (F) frequency of CD8 $^+$ CD27 $^-$  effector memory (TEM).



**Fig S2. Repartition of the cell-subsets in control group, grafted uterus group and uterus explantation group.** (A) Expression of IMC cell-subset clusters on UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) in control group (left panel), grafted uterus group (middle) and explantation group (right). (B) Heatmap of unsupervised analysis of IMC cell-subset clusters in the 3 groups. (C) Heatmap of IMC differential expression in clusters according to the 3 groups. (D) IMC pseudo-colored image for isthmus of uterus during explantation.

**Article 3: Plasticity of natural killer cells in pregnant patients infected with SARS-CoV-2 and their neonates**



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Philippe Krebs,  
University of Bern, Switzerland

REVIEWED BY  
Andrea Ponzetta,  
Karolinska Institutet (KI), Sweden  
Vishal Khaimar,  
Dana-Farber Cancer Institute,  
United States

\*CORRESPONDENCE  
Vincent Vieillard  
vincent.vieillard@sorbonne-  
universite.fr

SPECIALTY SECTION  
This article was submitted to  
Viral Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

RECEIVED 10 March 2022  
ACCEPTED 28 June 2022  
PUBLISHED 15 July 2022

CITATION  
Carbonnel M, Daclin C, Tarantino N,  
Groiseau O, Morin V, Rousseau A,  
Vasse M, Hertig A, Kennel T,  
Ayoubi JM and Vieillard V (2022)  
Plasticity of natural killer cells in  
pregnant patients infected with  
SARS-CoV-2 and their neonates  
during childbirth.  
*Front. Immunol.* 13:893450.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.893450

COPYRIGHT  
© 2022 Carbonnel, Daclin, Tarantino,  
Groiseau, Morin, Rousseau, Vasse,  
Hertig, Kennel, Ayoubi and Vieillard. This  
is an open-access article distributed  
under the terms of the [Creative  
Commons Attribution License \(CC BY\)](#).  
The use, distribution or reproduction  
in other forums is permitted, provided  
the original author(s) and the  
copyright owner(s) are credited and  
that the original publication in this  
journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is  
permitted which does not comply with  
these terms.

# Plasticity of natural killer cells in pregnant patients infected with SARS-CoV-2 and their neonates during childbirth

Marie Carbonnel<sup>1,2</sup>, Camille Daclin<sup>1,2</sup>, Nadine Tarantino<sup>3</sup>,  
Olivia Groiseau<sup>3</sup>, Véronique Morin<sup>3</sup>, Alice Rousseau<sup>3</sup>,  
Marc Vasse<sup>4,5</sup>, Alexandre Hertig<sup>6,7</sup>, Titouan Kennel<sup>7</sup>,  
Jean Marc Ayoubi<sup>1,2</sup> and Vincent Vieillard<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Hôpital Foch, Suresnes, France, <sup>2</sup>University of Versailles, Versailles, France, <sup>3</sup>Sorbonne Université, Inserm U1135, CNRS ERL 8255, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (CIMI-Paris), Paris, France, <sup>4</sup>Department of Clinical Biology, Hôpital Foch, Suresnes, France, <sup>5</sup>INSERM UMR5-1176, University Paris-Sud, Orsay, France, <sup>6</sup>Nephrology and Renal Transplantation Department, Hôpital Foch, Suresnes, France, <sup>7</sup>Department of Clinic Research, Hôpital Foch, Suresnes, France

The COVID-19 pandemic has occurred due to infection caused by the SARS-CoV-2 coronavirus, which impacts gestation and pregnancy. In SARS-CoV-2 infection, only very rare cases of vertical transmission have been reported, suggesting that fetal immune imprinting due to a maternal infection is probably a result of changes in maternal immunity. Natural killer (NK) cells are the leading maternal immune cells that act as a natural defense system to fight infections. They also play a pivotal role in the establishment and maintenance of pregnancy. While peripheral NK cells display specific features in patients infected with SARS-CoV-2 in the general population, information remains elusive in pregnant mothers and neonates. In the present study, we analyzed the characteristics of NK cells isolated from both neonatal umbilical cord blood and maternal peripheral blood close to the time of delivery. Phenotype and functions were compared in 18 healthy pregnant women and 34 COVID-19 patients during pregnancy within an ongoing infection (PCR<sup>+</sup>; N = 15) or after recovery (IgG<sup>+</sup>PCR<sup>-</sup>; N = 19). The frequency of NK cells from infected women and their neonates was correlated with the production of inflammatory cytokines in the serum. The expression of NKG2A and NKp30, as well as degranulation of NK cells in pregnant women with ongoing infection, were both negatively correlated to estradiol level. Furthermore, NK cells from the neonates born to infected women were significantly decreased and also correlated to estradiol level. This study highlights the relationship between NK cells, inflammation, and estradiol in patients with ongoing infection, providing new insights into the impact of maternal SARS-CoV-2 infection on the neonate.

## KEYWORDS

natural killer cells, pregnancy, neonates, SARS-CoV-2, COVID-19

## Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), is a major public health challenge that rapidly spread around the world. Multi-system injuries and death observed in patients are thought to be associated with immune dysfunction induced by the virus (1). Pregnant women are generally more susceptible to viral infection, and their respiratory capacity decreases as the pregnancy progresses (2). Initial reports raised a concern of an excess risk of developing severe COVID-19 for pregnant women infected with SARS-CoV-2, particularly in the third trimester; however, more recent, larger cohorts suggest that only a small fraction of them were severely affected (3). However, COVID-19 induces more maternal and fetal complications during pregnancy, including preeclampsia, intrauterine growth retardation, and preterm birth (3, 4).

During pregnancy, major adaptations occur to protect the mother and her future baby. There is some evidence to support that the maternal immune system weakens during pregnancy, so that it can tolerate the fetus, increasing the risks for certain infections (2). The importance of natural killer (NK) cells in pregnancy is paramount: decidual NK cells play an important role in placentation, remodeling of the spiral arteries, and control of trophoblast invasion (5); peripheral NK cells decrease in number and functionality during pregnancy with a lower rate in the third trimester, which seems to be a useful adaptation to help ensure fetal survival (6). In umbilical cord blood, the number of NK cells is greater than in adults, and these cells are phenotypically and functionally immature (7). NK cells are critical effectors of the innate immune response and represent the first line of defense against invading viruses, highlighted by studies on patients with NK cell deficiencies, a condition that leads to the development of fulminant viral infections (8). NK cell activity is shaped by a vast array of receptors, including not only inhibitory receptors, like KIR-L and NKG2A, used to maintain a self-tolerance, but also activating receptors, such as the natural cytotoxicity receptors (NKp30, NKp46), NKG2D, and NKG2C. When these latter signals are activated, NK cells produce an array of proinflammatory cytokines, like IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , in parallel with the initiation of their cytotoxic functions to specifically eliminate harmful infected host cells (9–11).

A previous clinical study reported that NK cells were markedly decreased in patients with SARS-CoV-2 infection, especially in individuals with severe disease, but restoration was observed after recovery (12, 13). Specifically, NK cells were activated in the peripheral blood of COVID-19 patients and showed high expression of perforin and NKG2C (13). In parallel, it was shown that NK cells were depleted and appeared exhausted, expressing high levels of LAG3 (14). Mechanistically, SARS-CoV-2 can induce NK cell exhaustion *via* Spike 1 protein binding to the HLA-E of lung epithelial cells, thereby triggering the HLA-E/NKG2A pathway (15), suggesting the important role of NK cells in pathological COVID-19 processes. Nevertheless, a

better understanding of the role of NK cells in pregnant women infected with SARS-CoV-2 and the consequences on their neonates is urgently needed. To date, it has been shown that vertical transmission is low, i.e. around 5% (3), and preliminary data reveal an increase in NK cells in neonates born after a recent or ongoing COVID-19 infection during pregnancy (16).

The aim of this study was to extensively characterize the phenotypic and functional features of NK cells isolated from pregnant women in cases of ongoing SARS-CoV-2 infection or after recovery, and their neonates, during a period close to the time of delivery.

## Materials and methods

### Participants and data collection

We designed the prospective MaterCov cohort study including pregnant women who were infected with COVID-19 and delivered in the Obstetric Department of Foch Hospital (Suresnes, France) (Table 1). Between January and July 2021, 37 pregnant women with healthcare insurance infected by SARS-CoV-2 were enrolled in this study (Figure 1A). Exclusion criteria were infection with human immunodeficiency virus, toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, or syphilis during pregnancy, infection with influenza virus within 10 days prior to delivery, patients under 18 years, and patients under guardianship. The MaterCov study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, as well as French statutory and regulatory law, received approval from the Institutional Review Board of Ouest V Rennes in December 2020 (IRB number 2020-A03115-34), and was declared as a clinical trial (No. NCT04726111). Patients received information about the research to be performed on their biological samples and provided written informed consent to participate. Partners also provided consent for the cord blood assays.

Patients were categorized according to those with an ongoing infection ( $N = 16$ ; RT-PCR SARS-CoV-2 positive at delivery) and those who had recovered ( $N = 21$ ; RT-PCR SARS-CoV-2 negative at delivery, and anti-SARS-CoV-2 IgG serology positive at delivery). The control group was constituted retrospectively, based on the clinical data of infected patients, from 18 non-infected pregnant women without comorbidities such as diabetes, preeclampsia, and high blood pressure (Table 1). Importantly, none of the individuals tested (patients and healthy controls) had been vaccinated against SARS-CoV-2. From all individuals, maternal blood and cord blood samples were collected within the 24 h before delivery and at birth, respectively. Hormonology and analysis of lymphocyte subpopulations (CytoDiff<sup>TM</sup>) were performed on all samples by the biology department of Foch Hospital. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by standard density centrifugation and then frozen at  $-150^{\circ}\text{C}$ , and plasma at  $-80^{\circ}\text{C}$ , by the Foch Hospital biological repository resource center.

TABLE 1 Maternal and neonatal clinical characteristics.

	Ongoing Infection	Recovered	Control	p value
<b>Maternal characteristics (n)</b>	<b>16</b>	<b>21</b>	<b>18</b>	
Median age, years (min - max)	34.0 (21 - 40)	31.0 (24 - 43)	32.5 (26 - 44)	0.52
Median BMI (min - max)	28.4 (21 - 36)	25.5 (19 - 31)	27.0 (22 - 34)	0.09
Asthma, number (%)	0	2 (9.5%)	2 (11%)	0.54
Previous HBP <sup>a</sup> , number (%)	0	0	0	NA
Previous Diabetes, number (%)	0	0	0	NA
Gestation (weeks) median (min-max) <sup>b</sup>	38 (30 - 41)	27 (8 - 37)	NA	<0.001
Days between SARS-CoV-2 <sup>+</sup> status and birth, median (min - max) <sup>c</sup>	7 (0 - 56)	84 (21 - 225)	NA	<0.001
COVID-19 symptoms, number (%)	13 (81%)	18 (86%)	NA	1
Hospitalisation, number (%)	3 (19%)	1 (4.8%)	3 (17%)	0.59
Total number of complications (%)	6 (37%)	2 (9.5%)	1 (5.66%)	<b>0.04</b>
Stillbirth, number (%)	1 (6.2%)	0	0	0.29
Gestational Diabetes, number (%)	1 (6.2%)	0	0	0.29
HBP, number (%)	0	1 (4.8%)	0	1
Preeclampsia, number (%)	1 (6.2%)	0	0	0.29
Threat of premature delivery, number (%)	1 (6.2%)	0	1 (5.6%)	0.52
IUGR, number (%)	3 (19%)	1 (4.8%)	0	0.10
Term at birth median (min - max)	39 (29 - 41)	40 (37 - 41)	39.5 (37 - 41)	0.68
Pyrexia during labor, number (%)	1 (6.2%)	0	0	0.29
Cesarean section, number (%)	3 (19%)	4 (19%)	1 (5.6%)	0.45
<b>Neonatal characteristics (n)</b>	<b>14</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	
Female sex, number (%)	7 (50%)	9 (47%)	7 (39%)	0.95
Weight, median (min - max)	3100 (1484 - 4140)	3320 (2760 - 4270)	3515 (2660 - 4198)	0.13
pH, median (min - max)	7.25 (7.20 - 7.35)	7.24 (7.08 - 7.43)	7.23 (7.09 - 7.45)	0.26
Transfer in ICU, number (%)	2 (14.2%)	0	0	0.07
Respiratory distress, number (%)	1 (7.1%)	1 (5.3%)	0	0.75

<sup>a</sup>High blood pressure; <sup>b</sup>Gestation (weeks) at time of positive SARS-CoV-2<sup>+</sup> status; <sup>c</sup>Days between SARS-CoV-2<sup>+</sup> status (nasopharyngeal swab) and birth. Bold values, significant values.

## Flow cytometry analysis

CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells were analyzed in women and neonates for whom peripheral blood mononuclear cells had been frozen. Cells were stained with an appropriate cocktail of monoclonal antibodies (mAbs), described in [Supplementary Table 1](#). According to flow cytometry guidelines (17), live cells were acquired (DXFlex, Beckman-Coulter; Brea, CA, USA) and then analyzed with FlowJo software version 10 (TreeStar; Ashland, OR, USA) ([Supplementary Figure 1](#)). A minimum of 100 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells were acquired on a DXFlex flow cytometer and then analyzed with FlowJo version 10.

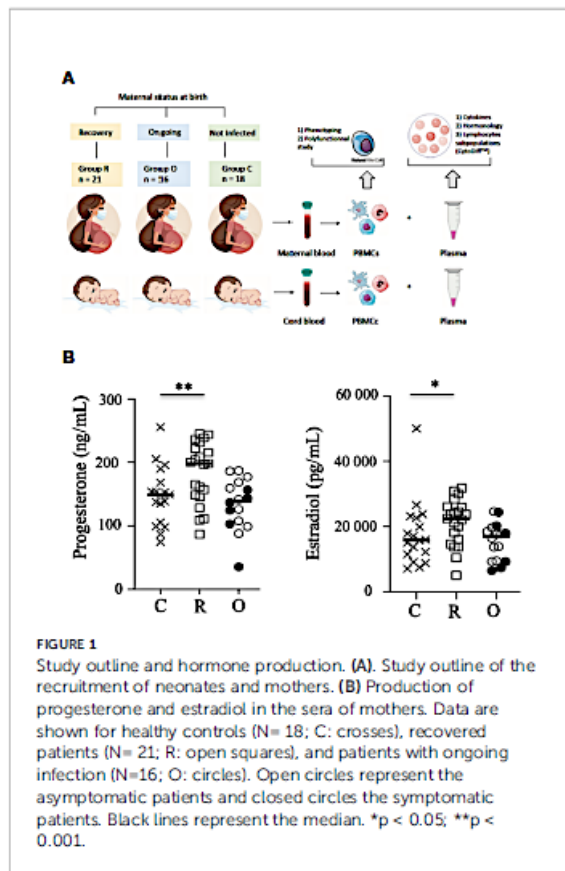
## NK cell degranulation assays and cellular production of cytokines

Polyfunctional NK cells were studied with degranulation assays and the cellular production of cytokines was assessed, as previously described (18). NK cells were pretreated overnight in the presence of interleukin (IL)-12 (10 ng/mL) and IL-18 (100 ng/mL) to

measure the intracellular production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by NK cells or incubated with standard HLA class I-negative K562 target cells (ATCC CCL243) at an effector:target (E:T) cell ratio of 1:1 to measure degranulation in the presence of anti-CD107a mAb (#H4A3; Becton Dickinson) ([Supplementary Table 1](#)). Cells were incubated for 5 h in the presence of Golgi Stop and Golgi Plug solutions (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, USA) and then stained with NK cell surface markers. NK cells were thereafter fixed, permeabilized with a Cytotfix/Cytoperm kit (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA), and then intracellularly stained with anti-IFN- $\gamma$  and anti-TNF- $\alpha$  mAbs ([Supplementary Table 1](#)), as described previously (18). Only samples containing at least 100 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells were acquired on a DXFlex flow cytometer and then analyzed with FlowJo version 10; consequently, the number of samples may vary depending on the experiments.

## Cytokine profiling

A CorPlex Human Cytokine 10-Plex Panel 1 Array (116-7BF-1-AB; Quanterix, USA) was used to simultaneously profile 10



cytokines (IL-12p70, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-22, TNF- $\alpha$ , and IL-10) in maternal and neonatal plasma from individuals, as described in Table 1. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. The luminescence was read using an SP-X Imaging System (Quanterix). Sensitivity and selectivity are described on the manufacturer's website ([https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017197\\_HumanCytokineMagnetic10PlexPanel\\_TDS.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017197_HumanCytokineMagnetic10PlexPanel_TDS.pdf)).

## Statistical analysis

For clinical and biological data, Microsoft Excel software was used for data recording and analyses were performed using SAS v9.4. For experimental data, statistical analyses were performed with Prism 8.0 software (GraphPad, CA, USA). The quantitative data are described as median values and categorical variables as percentages. The non-parametric Kruskal–Wallis test was used for comparisons between groups. When statistical differences were observed between patients with ongoing infection and controls, a Mann–Whitney test was performed to compare data of symptomatic and asymptomatic ongoing patients. Correlations between variables were calculated using the non-

parametric Spearman rank order test.  $P$  values  $> 0.05$  were considered insignificant.

## Results

### Demographic and clinical features of COVID-19

The demographic and clinical features of COVID-19<sup>+</sup> patients are summarized in Table 1. From a total of 37 pregnant women infected by the SARS-CoV-2, 16 tested positive by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR; nasopharyngeal swab); ten were asymptomatic and six patients were diagnosed as having mild or severe (requiring oxygen supplementation) COVID-19. One of the women with severe disease (p34 patient) was hospitalized at 29 weeks of gestation (WG) for oxygen therapy; she had COVID-19 symptoms for 15 days and no associated comorbidities. Blood tests found an increase in CRP (22 mg/L). On the second day of hospitalization, a stillbirth was diagnosed. She delivered a eutrophic fetus (1480 g) on the same day. Placental analysis found placental abruption. The mother had a complete recovery without sequelae of COVID-19.

Term at birth was similar in all groups, i.e. at 39 WG in patients with ongoing infection, 40 WG in recovered patients, and 39.5 WG in controls. No case of preterm delivery was observed except for the stillbirth. Neonates were not RT-PCR tested for SARS-CoV-2; thus, infection status throughout the manuscript refers solely to the mother.

At 1 month after birth, 60% of mothers answered the phone survey. No mothers had sequelae of COVID-19 infection or other complications; two neonates were hospitalized for 3 to 8 days for pulmonary infection not related to COVID-19 (not shown). No cases of infection or additional complications were reported for the neonates.

Progesterone and estradiol were measured at birth in all groups of mothers and were both significantly increased in recovered patients, as compared to patients with ongoing infection and healthy women (Figure 1B).

### Phenotypic characteristics of peripheral NK cells from pregnant women and their neonates in COVID-19

The absolute values of neutrophils, CD14<sup>+</sup> monocytes, CD45<sup>+</sup> lymphocytes, B lymphocytes, T lymphocytes, and NK subsets were measured using CytoDiff in cord blood and NK from pregnant women infected with SARS-CoV-2 and compared to healthy controls. The absolute values of B and T lymphocytes were similar in healthy and SARS-CoV-2-infected maternal blood samples (Supplementary Figure 2). In contrast,

the levels of neutrophils and monocytes were significantly decreased in infected women with ongoing infection, as compared to healthy controls ( $p = 0.0402$ ), and this more significantly in symptomatic patients (black circles) than asymptomatic patients ( $p = 0.0176$ ) (Supplementary Figure 3A). Of note, in cord blood samples the level of the different cell subsets was similar in infected and control samples, as previously described (16, 19).

With regard to the NK cell compartment, although some symptomatic patients with ongoing infection had elevated levels of NK cells (closed circles), Figure 2A shows that the absolute value of NK cells was similar in patients with ongoing infection, as compared to recovered patients and healthy pregnant women. In contrast, the number of NK cells was significantly decreased in neonates from women with ongoing infection, as compared to other neonates ( $p = 0.0042$ ) (Figure 2A). Of note, a very significant increase in NK cell numbers was observed between healthy women and recovered patients and their neonates ( $p < 0.0001$ ), but not in patients with ongoing infection (Figure 2B). These data are in accordance with those concerning the frequency of NK cells in pregnant women and their neonates (Figure 2C), measured by a DXFlex flow cytometer. Importantly, the frequency of NK cells from neonates of mothers with ongoing infection was specifically correlated with the production of estradiol ( $r = 0.5919$ ;  $p = 0.0461$ ) (Figure 2D), and more specifically if only cord blood samples from symptomatic mothers (closed circles) were tested (Supplementary Figure 3B).

Human NK cells can be divided into CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> subpopulations, based on the cell surface density of CD56 molecules; these subgroups present distinct phenotypic and functional capacities. Thus, the CD56<sup>dim</sup> NK cell subset is thought to mediate higher cytotoxic responses, including antibody-dependent cellular cytotoxicity, whereas the CD56<sup>bright</sup> subset is more involved in immunomodulation, with a higher capacity to produce cytokines like IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (20). In this study, the frequency of CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> cells was similar in the different groups of samples (Figure 2E and Supplementary Figure 4). In addition, the rate of activated NK cells expressing HLA-DR, reported as a sign of intense chronic activation, was not significantly modulated by SARS-CoV-2 infection in pregnant women and their neonates at birth (Figure 2F), contrary to what has been reported for infected patients in the general population (13).

We next focused our study by analyzing the expression of a large panel of activating and inhibitory receptors on peripheral NK cells from the mothers and their neonates, and showed that the frequency of most of the tested markers was similar in the different groups of mothers and their neonates (Figure 3A and Supplementary Figure 4). However, production of estradiol was inversely correlated with NKG2A and NKp30, but directly correlated with NKG2C (Figure 3B), a marker overexpressed in several infections, including SARS-CoV-2 in patients with severe forms (13). Of note, no other phenotypic NK cell markers in mothers with ongoing infection and their neonates were

correlated with estradiol production (Supplementary Figure 5). Furthermore, a significant decrease of NKp46 was observed in symptomatic patients ( $p = 0.0221$ ), as compared to other patients with ongoing infection (Supplementary Figure 3A). Additionally, in neonates from mothers infected with SARS-CoV-2, expression of DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1) was significantly increased, as compared to healthy pregnant women (Figure 3C). DNAM-1 is an activating receptor. Its ligands, belonging to the nectin family, are receptors for several viruses that mediate both the viral particle attack and entry, allowing the infection of cells of different origins (21).

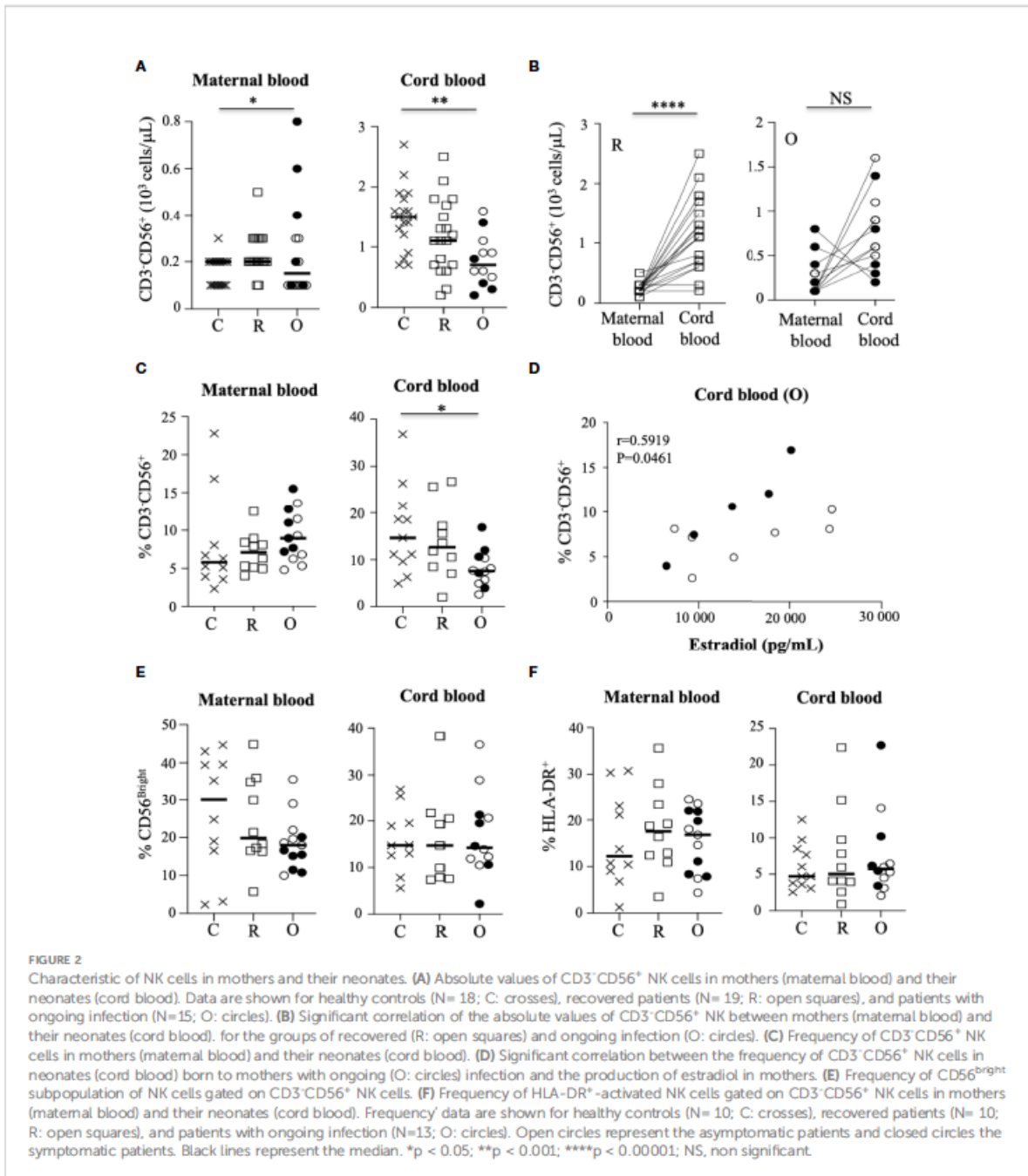
Although the phenotypic profile of NK cells was only slightly impacted in mothers with ongoing infection and their neonates, these data reveal an important correlation between several key NK cell markers and estradiol.

## Impact of COVID-19 on the NK cell response in pregnant women and their neonates

We next assessed the overall functional ability of NK cells. One of the main functions of these cells is their capacity to degranulate, measured by the cell surface expression of CD107a. Before stimulation, a low level of CD107a expression was detected in NK cells from SARS-CoV-2-infected patients (mothers and their neonates), similar to that observed in samples from healthy individuals (Supplementary Figure 6). In the presence of HLA class I-negative K562-sensitive target cells, the level of degranulation increased similarly in mothers and their neonates, unrelated to viral status (Figure 4A). However, in women with ongoing infection, the level of CD107a expression was very significantly correlated with estradiol ( $r = -0.8671$ ;  $p = 0.0005$ ) (Figure 4B).

We also investigated the ability of NK cells to synthesize and release IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . In the absence of stimulation, production of both cytokines was close to baseline in NK cells of all groups of mothers and their neonates (Supplementary Figure 6). Following overnight stimulation with IL-12 plus IL-18, IFN- $\gamma$  production by maternal NK cells was strongly increased in healthy donors and recovered patients, but much less in mothers with ongoing infection, and more especially in symptomatic patients (Figure 4C and Supplementary Figure 3A). In contrast, in neonates the production of IFN- $\gamma$  by NK cells was similar in all groups (Figure 4C). Of note, a pattern similar to that of IFN- $\gamma$  was observed for the production of TNF- $\alpha$  by NK cells of mothers and their neonates (Figure 4C). Together, these data suggest a specific impairment of cytokine production by NK cells in symptomatic infected patients. However, none of these functional markers in mothers with ongoing infection and their neonates were correlated with estradiol production (Supplementary Figure 5). Unexpectedly, in the maternal NK cells of the symptomatic infected woman with fetal demise (p34 patient), we observed

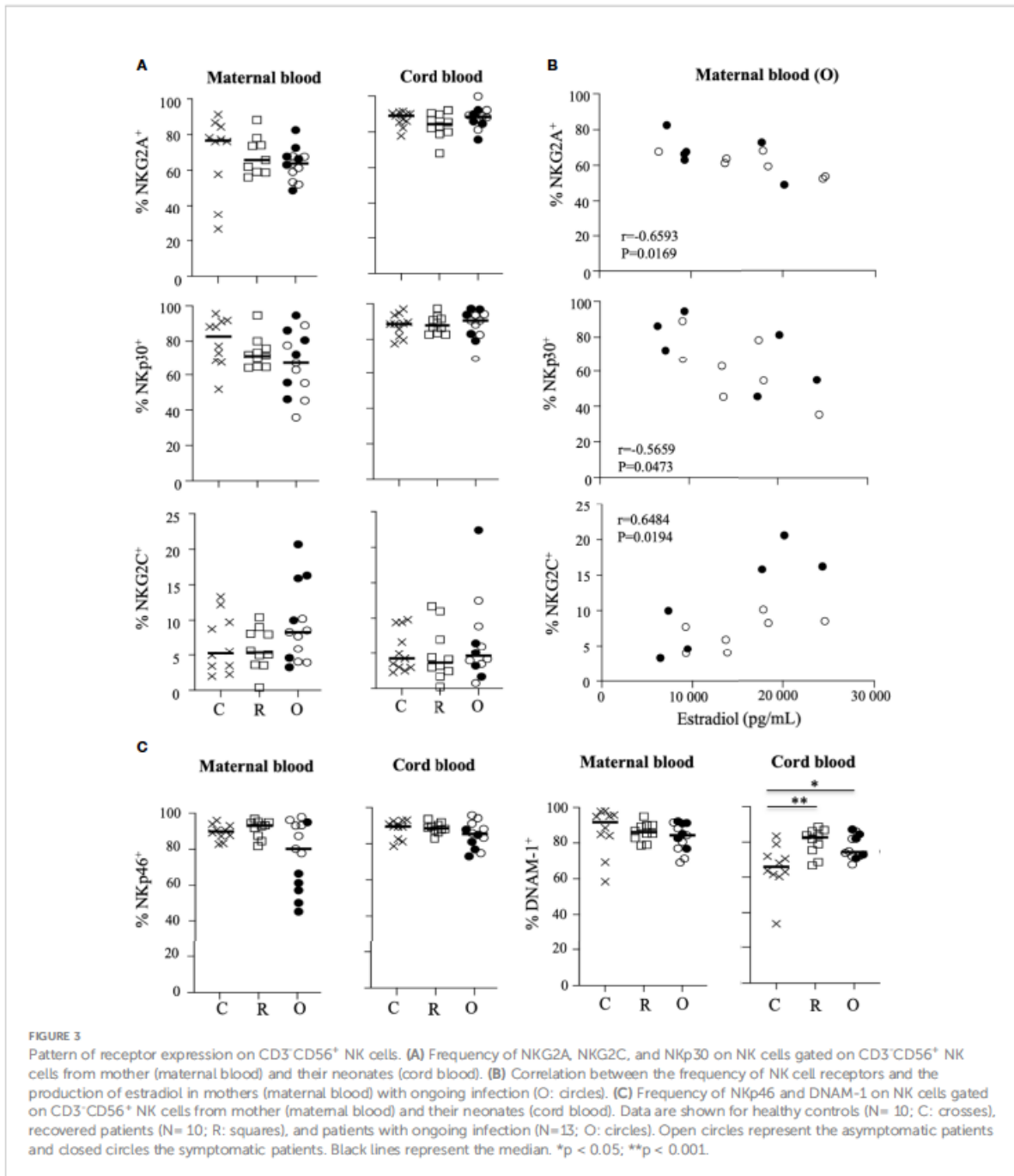




very high production of IFN- $\gamma$  (95.1% vs. 16.6  $\pm$  6.5% in other symptomatic patients) and TNF- $\alpha$  (83.9% vs. 0.6  $\pm$  0.1% in other symptomatic patients) by NK cells after stimulation with IL-12 + IL-18 (Figure 4C and Supplementary Figure 1), whereas the production of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the plasma of this patient was similar to that observed in other individuals (Supplementary Figure 7), suggesting that overexpression of cytokines was specific

to NK cells. However, in the absence of other similar cases, we were unable to establish if this unique immune imprinting was related to the fatal outcome observed in this patient.

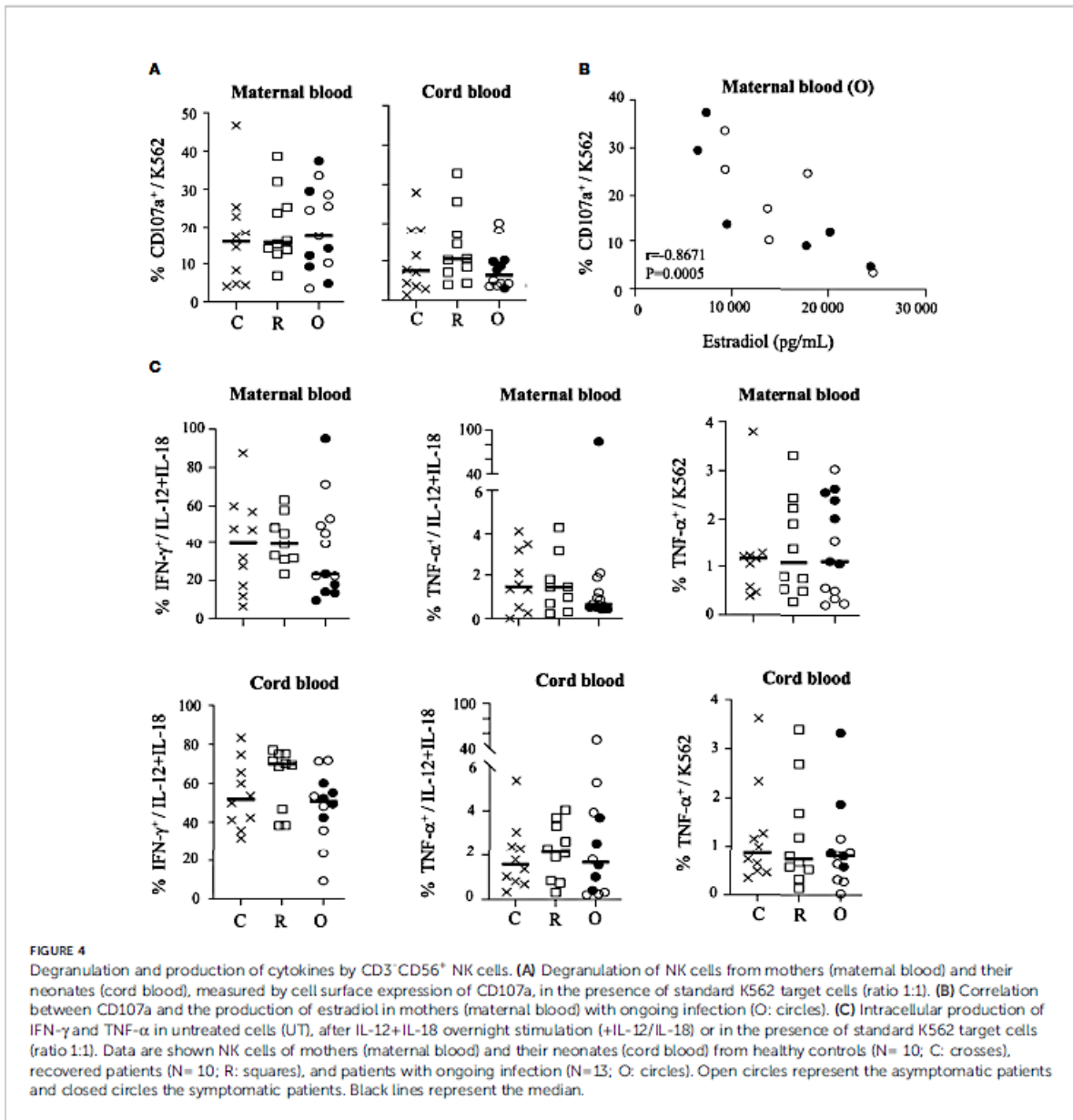
Altogether, these data reveal that the functional capacities of NK cells from mothers with ongoing infection and their neonates were poorly increased after stimulation, except in the patient with severe COVID-19 (p34 patient).



### Characteristics of NK cells from pregnant women and their neonates in COVID-19 are associated with production of specific cytokines

In the general population, infection with SARS-CoV-2 is generally associated with the elevation of proinflammatory

cytokines (22). Hence, we next determined the cytokine response in mothers and neonates by measuring the concentrations of cytokines in maternal and cord blood plasma using a multiplex assay. Plasma samples from non-infected and SARS-CoV-2-infected women were indistinguishable according to the production of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, and IL-6, and of IL-10, for which very low levels were observed (Supplementary Figure 7). In contrast,



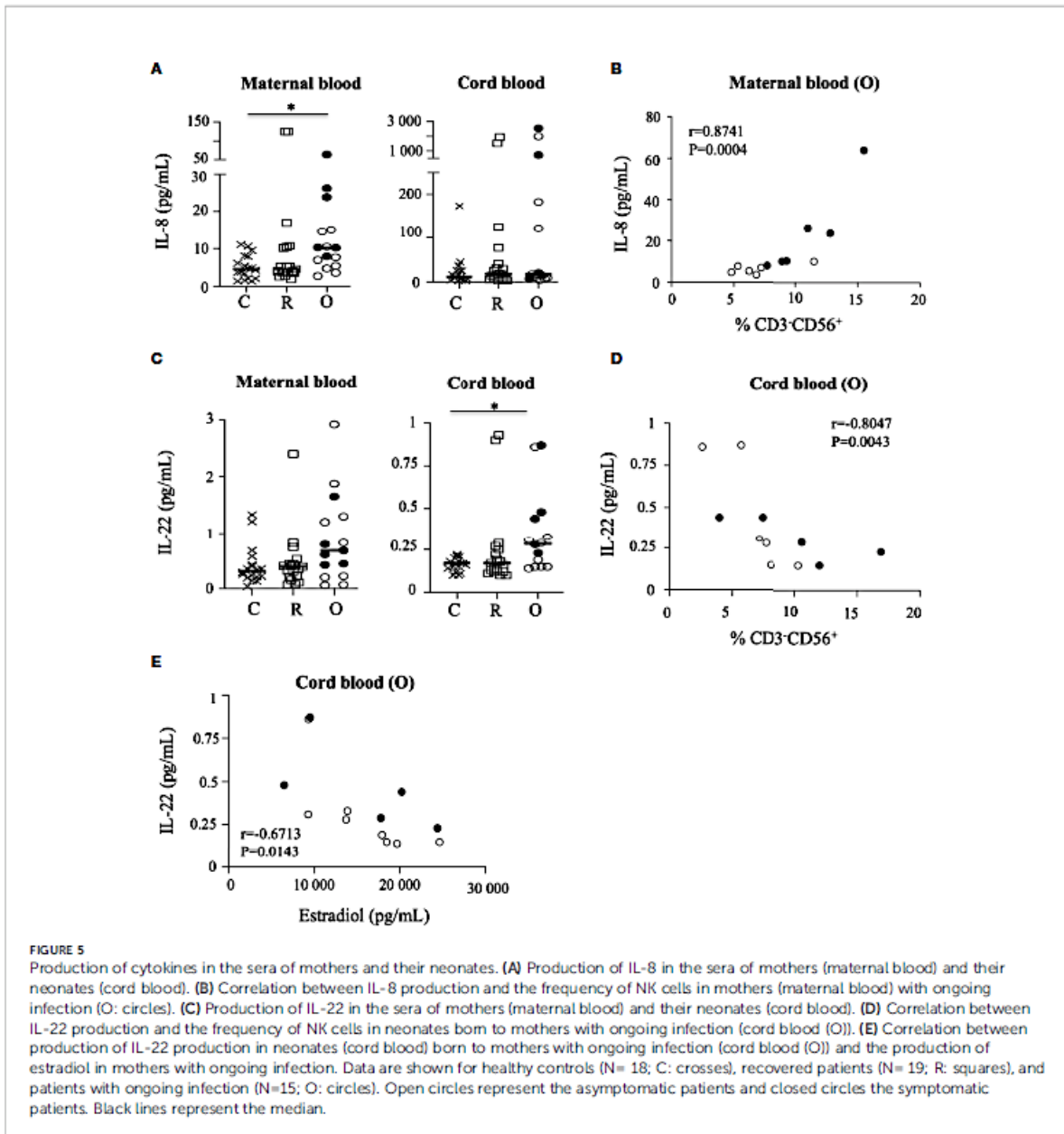
the production of IL-8 ( $p = 0.0277$ ) and IL-10 ( $p = 0.0449$ ) was significantly increased in patients with ongoing infection, as compared to recovered patients and healthy donors (Figure 5A and Supplementary Figure 7), as reported previously (19). Importantly, the production of IL-8 was also very significantly correlated with the frequency of maternal NK cells in patients with ongoing infection ( $r = 0.8741$ ;  $p = 0.0004$ ) (Figure 5B).

When assessing neonatal cytokine levels in cord blood, most of the cytokines tested were mostly undetectable in samples from non-infected and infected mothers (Supplementary Figure 7), except for IL-22, the production of which was significantly increased in neonates of patients with ongoing infection ( $p =$

0.0497) (Figure 5C). Although the level quantified remained low, IL-22 production in cord blood samples from patients with ongoing infection was significantly correlated with the frequency of NK cells in neonates ( $r = -0.8047$ ;  $p = 0.0043$ ) (Figure 5D) and the production of estradiol ( $r = -0.6713$ ;  $p = 0.0143$ ) (Figure 5E).

## Discussion

The present study provides novel insights into the role of NK cells in the pathophysiology of pregnant women infected by SARS-CoV-2 and their neonates early after birth. As previously



observed, the absolute value of NK cells from pregnant women was significantly decreased in COVID-19 (19), while the frequency of activated HLA-DR<sup>+</sup> NK cells in pregnant women infected with SARS-CoV-2, and their neonates, was not increased and remained similar to that observed in healthy pregnant women controls. The absence of strong peripheral NK cell activation, generally observed in the general population infected with SARS-CoV-2, could be explained by assuming that to tolerate the fetus, the maternal immune system is modified during pregnancy (13, 23–25).

According to the fine-tuned equilibrium between inhibitory and activating NK cell receptors, early reports suggested that inhibitory checkpoint receptors on NK cells might contribute to the dysfunctional status of COVID-19-associated NK cells in the general population, although conflicting data have been reported; Demaria et al. (26) detected a higher level of NKG2A in COVID-19-associated NK cells from the peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid, whereas Maucourant et al. (13) reported an increase in NKG2C<sup>+</sup> adaptive NK cells in patients with severe disease, as previously described in other acute

infections (27–29). In pregnant women close to delivery, the phenotype of maternal NK cells was similar in infected patients and healthy controls, suggesting limited NK cell derangement in pregnant women infected by the SARS-CoV-2. Unexpectedly, expression of NKp30 and NKG2A in NK cells from pregnant women with ongoing infection was negatively correlated with estradiol in the serum, whereas NKG2C expression was positively correlated with estradiol, suggesting a role of estradiol in NK cell activity. Several studies have shown that the immune response to viruses can be modified by estradiol, as shown during SARS-CoV and MERS (Middle East respiratory syndrome coronavirus) epidemics. Furthermore, animal studies have shown that the use of estradiol receptor antagonists favors SARS-CoV infection (30). In COVID-19, estradiol could be linked to different mechanisms of action such as the reduction of expression of ACE-2 (angiotensin-converting enzyme 2), a SARS-CoV-2 receptor on target cells, and/or anti-inflammatory and immunomodulation effects (31). Consistently, the frequency of NK cells from pregnant women with ongoing infection able to degranulate is strongly inversely correlated with estradiol in the serum of normal pregnant women (32). Furthermore, a negative correlation between NK cell cytotoxicity and increasing doses of estradiol has been observed (32).

Altogether, these data suggest that high doses of estradiol could contribute to pregnancy-associated NK cell suppression, and indirectly to the control of SARS-CoV-2 infection, highlighting the key role of estradiol in the phenotypic and functional control of maternal NK cells during SARS-CoV-2 infection.

We also observed that the level of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in NK cells was decreased, more especially in symptomatic patients with ongoing infection, as previously observed in individuals with severe disease. It has been suggested that the decrease of cytokine production could be linked to the ability of COVID-19-associated NK cells to reduce viral protein levels in SARS-CoV-2-infected cells (33). This effect was not observed in the plasma of pregnant patients infected by SARS-CoV-2, suggesting a specific control of cytokine production by NK cells from pregnant women. On the contrary, very high levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were produced by NK cells from the symptomatic p34 patient, suggesting a possible role in the fetal demise. However, in the absence of other similar clinical cases we cannot conclude their participation in the cytokine storm observed in patients with severe disease (34, 35), which could possibly mediate pregnancy complications and fetal developmental pathology (36, 37). In accordance with Garcia-Flores (19), we also observed that pregnant women mount a specific inflammatory response to SARS-CoV-2, characterized by significantly increased levels of IL-8 and IL-10, also described in non-pregnant individuals with SARS-CoV-2 infection (38). One explanation for the seemingly paradoxical observation of concurrently elevated IL-10 and IL-8 levels is the ability of IL-10 to act as a proinflammatory and immune-stimulatory molecule in certain contexts (39). Interestingly, we found that IL-8

production was significantly correlated with frequency of NK cells from patients with ongoing infection. IL-8 is a canonical proinflammatory cytokine whose primary function is neutrophil recruitment to sites of injury (40). Recent studies have proposed that IL-8 can serve as a biomarker for the prediction of disease severity of patients infected with SARS-CoV-2 (41).

Next, we determined the effect of maternal infection with SARS-CoV-2 on NK cells in neonates; the hypothesis was that *in utero* exposure to infection and/or maternal inflammation could affect the NK cell system of the neonate and subsequently the response to the infection and possibly the future development of the baby. Consistently, we observed that both the absolute value and frequency of NK cells of neonates born to women with ongoing infection were significantly decreased. Despite the fact that a decrease in peripheral NK cells was previously observed in the general population, including in cases of severe COVID-19 (12, 14) but not in pregnant women, it is unclear whether this decrease in the number of NK cells in newborn babies was due to NK cell trafficking to infected tissues or cell death in the periphery. More importantly, the frequency of cord blood NK cells from mothers with ongoing infection was directly correlated with estradiol, suggesting that estradiol could play a key role in features of NK cells from women and their neonates. Further studies to investigate the underlying mechanism of estradiol in the maternal-fetal interaction NK cell responses triggered by SARS-CoV-2 should be performed.

In addition, we observed that the functional capacities of NK cells of neonates from COVID-19<sup>+</sup> women were weak. This could be related to the absence of direct infection by SARS-CoV-2 at any point during gestation (42) or to their immaturity. Consistently, NK cells from neonates displayed specific phenotypic features associated with a less mature stage of differentiation that differed from adult NK cells (7, 43, 44). However, NK cells of neonates born to mothers infected with SARS-CoV-2 were similar to those of healthy controls, except for DNAM-1, an activating receptor significantly increased in COVID-19 that promotes activation, proliferation, cytokine production, and cytotoxic activity in NK cells (45, 46). The role of DNAM-1 in the control of viral infections has been underlined by the absence of control of lymphocytic choriomeningitis virus infection in DNAM-1<sup>-/-</sup> mice (47), the NK cell recognition of virus-infected cells during early infection (48), and the capacity of DNAM-1<sup>+</sup> NK cells to produce high levels of inflammatory cytokines (49). Consistently, the production of IL-22 was significantly increased in the serum of neonates from women infected with SARS-CoV-2, inversely correlated with both the frequency of NK cells in neonates and the level of estradiol quantified in the serum of pregnant women. IL-22 is a member of the IL-10 family of cytokines implicated in antiviral immune responses, and more especially during pulmonary infection; like IL-10, it has the double function of suppressing or encouraging inflammation in various disease models (50), but its role in COVID-19 remains elusive.

Altogether, these data highlight that SARS-CoV-2 infection induces phenotypic and functional modulations of peripheral NK cells from mothers and their neonates in correlation with inflammation markers, and estradiol.

There are several limitations to our study, in particular the relatively small number of symptomatic infected individuals, and more particularly patients with severe forms of COVID-19, with regard to the unexpected data obtained with p34 patient in whom infection caused fetal death, in accordance with recent data (51). In order to have more homogeneous groups, the pregnant women were included over a short period of time to limit the potential problems associated with successive appearance of the different variants and the bias posed by vaccination. It is understood, however, that it would be interesting to be able to apprehend them in subsequent studies. Furthermore, we only studied peripheral blood and cord blood NK cells and were not able to sample lung-resident NK cells or decidual NK cells. We also had limited data reflecting the history of the pregnant and control women; thus, we cannot exclude that some unmeasured factor could have influenced the NK cell phenotype and the quality of the NK cell responses to COVID-19. Finally, although new clinical data were obtained 1 month postpartum for the majority of mothers and their neonates, long-term follow-up of the newborns in our study would establish if maternal exposure to SARS-CoV-2 has some long-lasting impact on NK cells in the child.

Although the mechanisms underpinning our observations require further investigations, it seems clear that NK cells are associated with important aspects of COVID-19 pathophysiology in pregnant women and their neonates.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The MaterCov study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, as well as French statutory and regulatory law, and received approval from the Institutional Review Board of Ouest V Rennes in December 2020 IRB number 2020-A03115-34, and declared as clinical trial

## References

1. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science* (2020) 369(6508):eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511

(N°NCT04726111). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

MC, JA, and VV designed the study. AH, MC, CD, and MV contributed to clinical and biological data acquisition. NT, OG, VM, and AR carried out the experimental work. VV, MC, NT, OG, and CD contributed to data acquisition, analysis and interpretation. VV and TK performed statistical analysis. JA and VV provided financial support. VV, MC, and CD wrote the manuscript. All authors contributed to reviewing the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This project has received internal funding from Foch Foundation and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), France.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.893450/full#supplementary-material>

2. Ramsey PS, Ramin KD. Pneumonia in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* (2001) 28(3):553–69. doi: 10.1016/s0889-8545(05)70217-5

3. Jafari M, Pormohammad A, Sheikh Neshin SA, Ghorbani S, Bose D, Alimohammadi S, et al. Clinical characteristics and outcomes of pregnant women with COVID-19 and comparison with control patients: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol* (2021) 31(5):1–16. doi: 10.1002/rmv.2208

4. Conde-Agudelo A, Romero R. SARS-CoV-2 infection during pregnancy and risk of preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* (2022) 226(1):68–89 e3. doi: 10.1016/j.ajog.2021.07.009
5. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* (2006) 12(9):1065–74. doi: 10.1038/nm1452
6. Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, Hidaka Y, Mitsuda N, Morimoto Y, et al. Changes in T, b, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol* (1997) 37(5):368–77. doi: 10.1111/j.1600-0897.1997.tb00246.x
7. Le Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, et al. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* (2010) 9(4):527–35. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00584.x
8. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* (2006) 118(1):1–10. doi: 10.1016/j.cim.2005.10.011
9. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? the example of natural killer cells. *Science* (2011) 331(6013):44–9. doi: 10.1126/science.1198687
10. Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: Parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol* (2011) 11(10):645–57. doi: 10.1038/nri3044
11. Koehl U, Toubert A, Pittari G. Editorial: Tailoring NK cell receptor-ligand interactions: An art in evolution. *Front Immunol* (2018) 9:351. doi: 10.3389/fimmu.2018.00351
12. Zheng M, Gao Y, Liu S, Sun D, Yang F, Zong L, et al. Serum inflammatory factors are positively correlated with the production of specific antibodies in coronavirus disease 2019 patients. *Cell Mol Immunol* (2020) 17(11):1180–2. doi: 10.1038/s41423-020-00551-1
13. Maucourant C, Filipovic I, Ponzetta A, Aleman S, Cornillet M, Hertwig I, et al. Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci Immunol* (2020) 5(50):eabd6832. doi: 10.1126/sciimmunol.abd6832
14. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, Roque J, Martinez-Colon GJ, McKechnie JL, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med* (2020) 26(7):1070–6. doi: 10.1038/s41591-020-0944-y
15. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, Rotola A, Rizzo R. SARS-CoV-2 spike 1 protein controls natural killer cell activation via the HLA-E/NKG2A pathway. *Cells* (2020) 9(9):1975. doi: 10.3390/cells9091975
16. Gee S, Chandiramani M, Seow J, Pollock E, Modestini C, Das A, et al. The legacy of maternal SARS-CoV-2 infection on the immunology of the neonate. *Nat Immunol* (2021) 22(12):1490–502. doi: 10.1038/s41590-021-01049-2
17. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andra I, Annunziato F, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol* (2017) 47(10):1584–797. doi: 10.1002/eji.201646632
18. Bennabi M, Tarantino N, Gaman A, Scheid I, Krishnamoorthy R, Debre P, et al. Persistence of dysfunctional natural killer cells in adults with high-functioning autism spectrum disorders: Stigma/Consequence of unresolved early infectious events? *Mol Autism* (2019) 10:22. doi: 10.1186/s13229-019-0269-1
19. Garcia-Flores V, Romero R, Xu Y, Theis KR, Arenas-Hernandez M, Miller D, et al. Maternal-fetal immune responses in pregnant women infected with SARS-CoV-2. *Nat Commun* (2022) 13(1):320. doi: 10.1038/s41467-021-27745-z
20. Schwane V, Huynh-Tran VH, Vollmers S, Yakup VM, Sauter J, Schmidt AH, et al. Distinct signatures in the receptor repertoire discriminate CD56Bright and CD56dim natural killer cells. *Front Immunol* (2020) 11:568927. doi: 10.3389/fimmu.2020.568927
21. Cifaldi L, Doria M, Cotugno N, Zicari S, Cancrini C, Palma P, et al. DNAM-1 activating receptor and its ligands: How do viruses affect NK cell-mediated immune surveillance during the various phases of infection? *Int J Mol Sci* (2019) 20(15):3715. doi: 10.3390/ijms20153715
22. Coomes EA, Haghbayan H. Interleukin-6 in covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol* (2020) 30(6):1–9. doi: 10.1002/rmv.2141
23. Manickam C, Sugawara S, Reeves RK. Friends or foes? the knowns and unknowns of natural killer cell biology in COVID-19 and other coronaviruses in July 2020. *PLoS Pathog* (2020) 16(8):e1008820. doi: 10.1371/journal.ppat.1008820
24. Ander SE, Diamond MS, Coyne CB. Immune responses at the maternal-fetal interface. *Sci Immunol* (2019) 4(31):eaat6114. doi: 10.1126/sciimmunol.aat6114
25. Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic function and composition changes of immune cells during normal and pathological pregnancy at the maternal-fetal interface. *Front Immunol* (2019) 10:2317. doi: 10.3389/fimmu.2019.02317
26. Demaria O, Carvelli J, Batista L, Thibault ML, Morel A, Andre P, et al. Identification of druggable inhibitory immune checkpoints on natural killer cells in COVID-19. *Cell Mol Immunol* (2020) 17(9):995–7. doi: 10.1038/s41423-020-0493-9
27. Björkstam NK, Lindgren T, Stoltz M, Fauriat C, Braun M, Evander M, et al. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med* (2011) 208(1):13–21. doi: 10.1084/jem.201100762
28. Maucourant C, Nonato Queiroz GA, Corneau A, Leandro Gois L, Meghraoui-Kheddar A, Tarantino N, et al. NK cell responses in zika virus infection are biased towards cytokine-mediated effector functions. *J Immunol* (2021) 207(5):1333–43. doi: 10.4049/jimmunol.2001180
29. Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, Beziat V, Debre P, Leroy EM, et al. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog* (2011) 7(9):e1002268. doi: 10.1371/journal.ppat.1002268
30. Channappanavar R, Fett C, Mack M, Ten Eyck PP, Meyerholz DK, Perlman S. Sex-based differences in susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Immunol* (2017) 198(10):4046–53. doi: 10.4049/jimmunol.1601896
31. Nakaya M, Tachibana H, Yamada K. Effect of estrogens on the interferon-gamma producing cell population of mouse splenocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* (2006) 70(1):47–53. doi: 10.1271/bbb.70.47
32. Gabrilovic J, Zadjelovic J, Osmak M, Suchanek E, Zupanovic Z, Boranic M. NK cell activity and estrogen hormone levels during normal human pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* (1988) 25(3):165–72. doi: 10.1159/000293766
33. Bi J. NK cell dysfunction in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol* (2022) 19(2):127–9. doi: 10.1038/s41423-021-00825-2
34. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Moller R, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell* (2020) 181(5):1036–45 e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026
35. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* (2020) 130(5):2620–9. doi: 10.1172/JCI137244
36. Robertson SA, Chin PY, Femia JG, Brown HM. Embryotoxic cytokines-potential roles in embryo loss and fetal programming. *J Reprod Immunol* (2018) 125:80–8. doi: 10.1016/j.jri.2017.12.003
37. Yockey LJ, Iwasaki A. Interferons and proinflammatory cytokines in pregnancy and fetal development. *Immunity* (2018) 49(3):397–412. doi: 10.1016/j.immuni.2018.07.017
38. Kunnumpuram AB, Rana V, Parama D, Banik K, Girisa S, Henamaye S, et al. COVID-19, cytokines, inflammation, and spices: How are they related? *Life Sci* (2021) 284:119201. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119201
39. Islam H, Chamberlain TC, Mui AL, Little JP. Elevated interleukin-10 levels in COVID-19: Potentiation of pro-inflammatory responses or impaired anti-inflammatory action? *Front Immunol* (2021) 12:677008. doi: 10.3389/fimmu.2021.677008
40. Azevedo MLV, Zanchettin AC, Vaz de Paula CB, Motta Júnior JDS, Malaquias MAS, Raboni SM, et al. Lung neutrophilic recruitment and IL-8/IL-17a tissue expression in COVID 19. *Front Immunol* (2021) 12:656350. doi: 10.3389/fimmu.2021.656350
41. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med* (2020) 26(10):1636–43. doi: 10.1038/s41591-020-1051-9
42. Anderson J, Thang CM, Thanh LQ, Dai VTT, Phan VT, Nhu BTH, et al. Immune profiling of cord blood from preterm and term infants reveals distinct differences in pro-inflammatory responses. *Front Immunol* (2021) 12:777927. doi: 10.3389/fimmu.2021.777927
43. Dalle JH, Menezes J, Wagner E, Blagdon M, Champagne J, Champagne MA, et al. Characterization of cord blood natural killer cells: Implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res* (2005) 57(5 Pt 1):649–55. doi: 10.1203/01.PDR.0000156501.55431.20
44. Sarvaria A, Jawdat D, Madrigal JA, Saudemont A. Umbilical cord blood natural killer cells, their characteristics, and potential clinical applications. *Front Immunol* (2017) 8:329. doi: 10.3389/fimmu.2017.00329
45. Shibuya A, Shibuya K. DNAM-1 versus TIGIT: Competitive roles in tumor immunity and inflammatory responses. *Int Immunol* (2021) 33(12):687–92. doi: 10.1093/intimm/ixab085
46. Cifaldi L, Doria M, Cotugno N, Zicari S, Cancrini C, Palma P, et al. DNAM-1 activating receptor and its ligands: How do viruses affect the NK cell-mediated immune surveillance during the various phases of infection? *Int J Mol Sci* (2019) 20(15):3715. doi: 10.3390/ijms20153715
47. Welch MJ, Tejero JR, Lewicki HA, Colonna M, Oldstone MB. CD8 T cell defect of TNF-alpha and IL-2 in DNAM-1 deficient mice delays clearance *in vivo* of a persistent virus infection. *Virology* (2012) 429(2):163–70. doi: 10.1016/j.virol.2012.04.006
48. Tomasec P, Wang EC, Davison AJ, Vojtesek B, Armstrong M, Griffin C, et al. Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nat Immunol* (2005) 6(2):181–8. doi: 10.1038/ni1156
49. Martinet L, Ferrari De Andrade L, Guillerrey C, Lee JS, Liu J, Souza-Fonseca-Guimaraes F, et al. DNAM-1 expression marks an alternative program of NK cell maturation. *Cell Rep* (2015) 11(1):85–97. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.006
50. Alcorn JF. IL-22 plays a critical role in maintaining epithelial integrity during pulmonary infection. *Front Immunol* (2020) 11:1160. doi: 10.3389/fimmu.2020.01160
51. Male V. SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccination in pregnancy. *Nat Rev Immunol* (2021) 21(4):200–1. doi: 10.1038/s41577-021-00525-y





# Discussion

## **Particularités Immunitaires dans le rejet en transplantation utérine**

Dans l'étude rétrospective (article 1), nous avons trouvé différents marqueurs de rejet aigu à médiation T comme des gènes en lien avec l'expression du TCR sur les lymphocytes T (CD3G, CD3E et ZAP70), la transduction du signal intracellulaire TCR (LCP2), IL7R (qui code pour la protéine CD127), l'activation des lymphocytes T (BCL2A1 et CCR7), la régulation des lymphocytes T (IL2RA et TIGIT), la différenciation des lymphocytes T CD8+ (BATF) et la production de protéases cytotoxiques (GZMB). Les expériences ont également permis d'observer l'infiltration de cellules T à la jonction des épithéliums et du stroma par imagerie, comme cela a déjà été décrit (115). De manière plus surprenante, nous avons mis en évidence deux mécanismes immunologiques de rejet qui n'avaient pas été décrits auparavant dans la transplantation utérine : de possibles structures lymphoïdes tertiaires et des macrophages sécrétant le granzyme B.

### **1) Les TLS en transplantation utérine**

Une découverte majeure de nos travaux est d'avoir mis en évidence dans le col utérin, dans 3 rejets sur 5, des structures comportant des lymphocytes B qui pourraient être affiliées à des structures lymphoïdes tertiaires (TLS). Les TLS ont été observés dans presque tous les types de greffons humains qui ont été prélevés en raison d'un rejet chronique, y compris les reins, les poumons, les cœurs et même VCA (157). Dans les TLS, on observe des centres germinaux ectopiques, au sein desquels les cellules B naïves en contact avec les cellules T se différencient en plasmocytes producteurs d'anti-HLA et en cellules B mémoires. La libération continue

d'allo antigènes à partir du tissu lésé entraîne une réponse immunitaire excessive dans le TLS qui contribue au rejet de l'allogreffe (67).

Les TLS les plus structurés dans notre étude rétrospective (article 1) ont été observés chez une patiente ayant des signes de rejet chronique sur l'hystérectomie et l'apparition d'anticorps anti-HLA peu de temps après (DSA). De plus, nous avons trouvé, en cas de rejet, des gènes up-régulés en rapport avec des immunoglobulines (FGR3A qui code pour la protéine CD16) et du complément (C3) soulignant la part du rejet humoral. La première analyse de la patiente greffée Française (article 2), révèle également des signes de rejet humoral sur la pièce d'hystérectomie avec la positivité des c4d et l'augmentation des plasmocytes sanguins. Il est intéressant de noter que des agrégats de cellules immunitaires ont été retrouvés sur le fond utérin et le col lors de l'explantation de cette patiente, pouvant se rapprocher de TLS. En effet, les voisinages des cellules par imagerie montraient des interactions entre les lymphocytes B, T CD4+, T CD8+ et les macrophages.

Néanmoins, la corrélation entre TLS et rejet est controversée, la présence de TLS a également été associée à de nombreuses greffes de SOT sans aucun signe de rejet, apparaissant 1 mois après la transplantation et augmentant pour atteindre près de 50 % des greffes à un an (70, 71). Des publications sur des allogreffes rénales et cardiaques ont rapporté que la présence de TLS, dans certaines conditions, favorisait la tolérance et la fonction de l'allogreffe, en amplifiant les réponses immunitaires bénéfiques qui sont associées aux cellules B et aux cellules T présentant un profil régulateur (158, 159). Certains auteurs ont trouvé cependant, que les structures les plus organisées comprenant des cellules dendritiques folliculaires, étaient associées à un dysfonctionnement d'organe et à un rejet chronique indépendant de l'inflammation interstitielle (71).

Nos résultats de l'article 1 suggèrent la présence de différents états de TLS avec une structuration augmentant dans le temps : pour la patiente #5 un début d'organisation en TLS a été observé 1 mois après TU pour les patientes #2 (premier épisode de rejet) et #3, des TLS plus évolués ont été observés plus d'un an après TU. Par contre, nous n'avons jamais observé de TLS sur les lames sans rejet. De plus, par RNAseq nous avons mis en évidence une proportion élevée de cellules T naïves et activées et un profil de différenciation et d'activation T et B en accord avec ce qui est couramment observé dans des TLS dans les deux cas les plus évolués (patient #2, premier épisode de rejet, et patient #3). La limite de cette étude est l'absence de marqueurs plus spécifiques des TLS comme CD21 (spécifique des cellules dendritiques folliculaires), DC-Lamp, PNA<sup>d</sup> (160)... Il serait donc intéressant de ré-analyser les lames avec un panel exhaustif d'anticorps spécifiques des TLS mais également de regarder plus d'échantillons en longitudinal sur différentes patientes, notamment celles qui ont développé un rejet chronique et/ou humoral ce que nous envisageons par la suite. Enfin, la formation des TLS est un processus parcellaire et il est donc probable que la formation des TLS puisse être manquée lors du prélèvement d'une biopsie dont l'analyse est limitée à un endroit restreint. Cependant, la recherche des TLS en anatomopathologie sur les biopsies devraient être encouragée en pratique courante, elle pourrait ainsi permettre d'affiner le diagnostic de rejet et optimiser le traitement (161).

## **2) Macrophages dans le rejet et potentiels biomarqueurs**

Notre deuxième découverte importante est la présence de macrophages sécrétant du granzyme B dans 2 cas de rejet sévère chez la même patiente suite à une chorioamniotite avec une fausse couche tardive (article 1). Cette patiente dont le rejet a été très difficile à traiter, présenta par la

suite plusieurs fausses couches précoces et échecs d'implantation et n'a pas pu obtenir une grossesse à terme sans rejet chronique mis en évidence sur la pièce d'hystérectomie.

En général, l'allo-réponse en cas de rejet résulte de réponses immunitaires adaptatives. Cependant la part de l'immunité innée est de plus en plus étudiée et de nombreuses données indiquent que ces deux mécanismes ne sont pas distincts et qu'un certain nombre de cellules « font le pont » (162). Nous avons trouvé une forte proportion de macrophages en cas de rejet. Même si cela n'est pas bien connu, les macrophages ont été identifiés dans le rejet aigu et chronique de greffe (163). Les macrophages peuvent se différencier en deux états polarisés selon leur fonction et leur phénotype : les macrophages classiquement activés (type M1) et les macrophages alternativement activés (type M2) (164). Les deux états sont observés dans le rejet aigu. Les M1 sécrètent des facteurs inflammatoires qui endommagent directement les tissus du greffon ou/et activent les cellules endothéliales et induisent les cellules T cytotoxiques (4). Dans notre étude, nous avons trouvé des niveaux élevés d'IL-1 $\beta$  (Log2 Fold change : 4.6), TNF- $\alpha$ , et CCL3 par RNA seq, produits par les macrophages M1 activés dans les échantillons de rejet (article 1) (5). De plus, les niveaux d'expression d'IL1- $\beta$  mesurés par PCR dans le sang total et la biopsie semblaient corrélés dans la seconde étude (article 2). L'IL1- $\beta$  pourrait donc être un potentiel marqueur de rejet non-invasif à confirmer dans les prochaines études sur les TUs, mais son implication dans d'autres rejets de greffes d'organes a déjà été confirmée (165). Nous avons pu identifier des cellules qui pourraient s'apparenter à des macrophages M1 activés par imagerie, qui expriment HLA-DR et CD16 (6). L'expression de HLA-DR sur les macrophages est essentielle pour la présentation d'allo-peptides dérivés aux cellules T CD4+, initiant ainsi une réponse immunitaire spécifique visant à éliminer les pathogènes potentiels (166).

S'il est bien établi que l'activation de l'immunité innée favorise la réponse adaptative par la production de certaines cytokines, un concept émergent est celui d'un modèle inverse dans

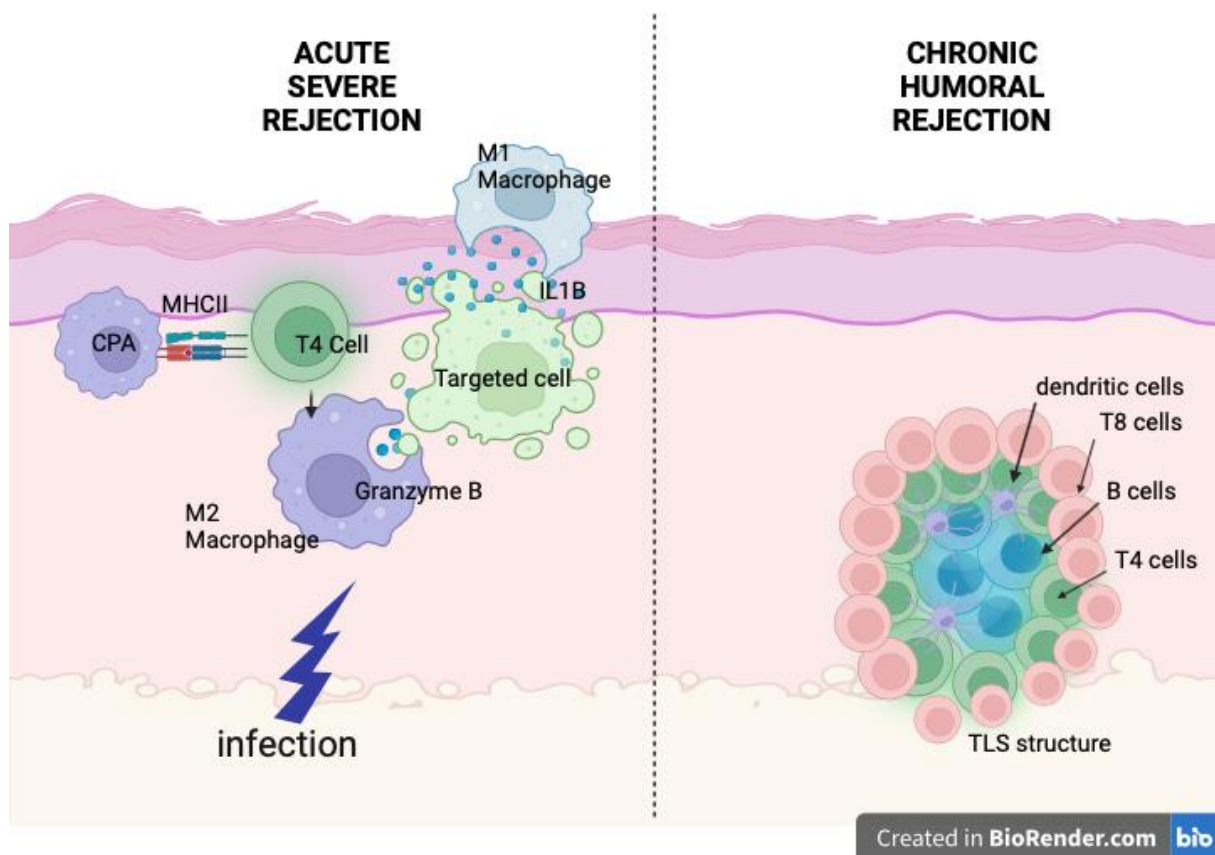
lequel le système immunitaire adaptatif détecte des antigènes spécifiques pour ensuite activer l'immunité innée afin d'augmenter encore les réponses alloréactives. Les cellules T CD4+ sont essentielles pour que les macrophages naïfs acquièrent la capacité de rejeter les allogreffes. Elles reconnaissent les anticorps et participent ainsi à l'immunité acquise. Il a été rapporté que les macrophages pouvaient rejeter des cellules tumorales cibles via la voie perforine/granzyme B (7) qui est généralement reconnue comme la voie effectrice prédominante employée par les cellules NK et les cellules T CD8+ pour tuer les cellules cibles (8). Le granzyme B et la perforine ont également été décrits comme des molécules effectrices pour le rejet des allogreffes de peau par les macrophages (167). Il a ainsi été identifié comme un biomarqueur non invasif du rejet dans les SOT dans les lymphocytes du sang périphérique et les urines (168-171). Il pourrait être particulièrement intéressant dans la TU, étant détectable à la surface de l'épithélium (article 1). Malheureusement, notre évaluation préliminaire de marqueurs de rejet non-invasifs (article 2), a montré que les mesures de biomarqueurs potentiels sur le frottis n'étaient pas toujours corrélées à la biopsie, suggérant que les prélèvements vaginaux manqueraient de spécificité, possiblement en lien avec des phénomènes inflammatoires vaginaux. Ces premières données devront cependant être confirmées. En revanche, sur le sang total, nous avons montré par qPCR que l'expression du granzyme B augmentait au moment de l'explantation, ce qui pourrait être en accord avec le rejet humoral constaté sur la pièce d'hystérectomie (article 2). Cette piste devra être également confirmée sur plus d'échantillons, ainsi que le dosage de granzyme B dans le plasma.

Les macrophages impliqués dans la réponse adaptative pourraient être principalement des M2 car ils produisent 6 fois plus de granzyme B que les M1 et expriment faiblement HLA-DR (9, 10). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la présence de macrophages de type M2

produisant du granzyme B, observés dans nos deux rejets de grade 3, pourraient être associés à la sévérité du rejet aigu.

Les macrophages de type M2 sont connus pour leurs propriétés « anti-inflammatoires » (172). Néanmoins, ils peuvent également produire des métalloprotéinases matricielles contribuant au renouvellement de la matrice extracellulaire et à la fibrose (173). Ces dernières ont été associées à de moins bons résultats en cas de sepsis, de cancer (9, 10) mais également en cas de transplantation avec une fibrose à long terme et une perte de la fonction de l'organe, également appelée rejet chronique (6). Les métalloprotéinases matricielles sériques 3 (MMP3) ont été identifiées comme un biomarqueur potentiel de rejet sévère dans les VCA (171). Ce type de rejet pourrait peut-être prédire un dysfonctionnement du greffon à long terme comme c'est le cas pour la patiente #2 de notre article 1(174). Une explication des fausses couches récurrentes et des échecs d'implantation pourrait être due à un remodelage excessif des vaisseaux sanguins de la caduque en début de grossesse, associé à un stress oxydatif dû à des anomalies immunitaires (50). D'autres analyses sont nécessaires pour confirmer l'impact des macrophages et de leur production de granzyme B dans le rejet en transplantation utérine.

Les chapitres 1 et 2 sont résumés dans la **figure 20**.



**Figure 20:** Schéma des 2 mécanismes de rejet mis en évidence dans l'article 1.

Image obtenue avec Biorender. CPA : cellule présentatrice d'antigènes.

### 3) La transplantation utérine : Un VCA à part

La transplantation d'utérus fait partie des tissus composites greffés (VCA) qui impliquent de multiples tissus, dont généralement la peau et les tissus mous et parfois les structures musculo-squelettiques. Les VCA présentent un taux élevé de rejet aigu, affectant 75 à 88 % des patients au cours de la première année suivant la transplantation (175). Ce rejet est diagnostiqué par une combinaison d'évaluation clinique (érythème et œdème) et de biopsie tissulaire (Il s'agit principalement d'un rejet à médiation cellulaire T). Actuellement, l'évaluation histologique par biopsie tissulaire est le seul substitut clinique du rejet utilisé de manière fiable dans le domaine des VCA. Les épisodes aigus de rejet sont faciles à contrôler avec des bolus de corticostéroïdes.



Au contraire, dans les transplantations d'organes solides (SOT), les rejets aigus sont peu fréquents : environ 7,5% la première année après la transplantation rénale. Ils sont asymptomatiques, suspectés en cas de marqueurs biologiques anormaux (88). Ils sont médiés par les lymphocytes T et B. La principale limite des deux types de greffes est le rejet chronique survenant des années après la transplantation avec des signes cliniques de perte du greffon (lésions cutanées nécrotiques pour les VCA, perte de fonction du greffon pour les SOT) et des observations anatomopathologiques associant vasculopathie, atrophie et sclérose du greffon (176). La deuxième limite est constituée par les effets secondaires induits par les traitements immunosuppresseurs (infections et cancers). L'optimisation de la balance bénéfique/risque du traitement immunosuppresseur, la détection précoce des épisodes de rejet et un traitement adéquat sont des préoccupations majeures en transplantation.

La TU est un type de VCA, qui pose néanmoins des problèmes spécifiques : La durée de greffe est limitée à quelques années, puisque l'utérus est retiré après une ou deux grossesses (idéalement moins de 6 ans selon les recommandations de la société internationale de greffe utérine), le but de la TU étant la capacité de l'utérus à porter une grossesse jusqu'à la naissance d'un enfant en bonne santé. Par ailleurs, dans cette greffe non-vitale, il est important de diminuer les risques et en particulier ceux associés au traitement immunosuppresseur. En outre, les réponses allo-immunes et l'immunosuppression peuvent interférer avec la complexité de l'interface materno-fœtale affectant la placentation, la grossesse et l'accouchement dans ce modèle unique, où l'organe transplanté porte la grossesse (124). Le rejet dans la transplantation utérine comporte des caractéristiques de VCA et des SOT. Contrairement aux autres VCA, le rejet est asymptomatique dans la TU, le taux de rejet aigu étant d'environ 60 % (115, 116) principalement à médiation cellulaire T. Il répond bien à la corticothérapie. Environ 30 % des receveuses subiront des rejets au cours des 5 premiers mois et environ 20 % entre 6 et 10 mois

(105). Même si le greffon utérin n'inclut pas de peau, connue pour être très antigénique (177), le taux relativement élevé de rejet pourrait être lié à la présence de muqueuses, comme cela a déjà été bien décrit dans les greffes de visage (178). Les mécanismes impliqués dans le rejet de la muqueuse et les résultats microscopiques sont proches du rejet de la peau dans les autres VCA. De plus, l'épithélium de Malpighi de l'exocol étant kératinisé, il pourrait être ainsi le plus précocement altéré en cas de rejet de l'utérus. En effet, les kératinocytes expriment du CMH de classe II et peuvent ainsi activer les cellules T CD4+ lorsqu'ils sont stimulés par l'inflammation (179). Cela pourrait expliquer que nous ayons trouvé de nombreux marqueurs cutanés down-régulés en cas de rejet (LCE3E, CDSN, LOR, RPTN, KRT1) dans notre étude rétrospective (article 1). Au cours du rejet cutané, les molécules d'adhésion présentes sur les lymphocytes sont up-régulées et corrélées à la sévérité du rejet (180). Un certain nombre de cytokines et de chimiokines activant les leucocytes sont libérées ou exprimées par les cellules endothéliales, notamment VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine, trois marqueurs que nous avons également observés up-régulés dans notre étude rétrospective (article 1). Nous avons constaté que l'expression de la kératine 1 était down-régulée en cas de rejet, au niveau transcriptionnique et protéique. La kératine 1 (KRT1) et son partenaire hétérodimère, la kératine 10 (KRT10), sont des constituants majeurs du cytosquelette de filaments intermédiaires dans l'épiderme supra basal. Ils jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de la peau. Ce biomarqueur intéressant pourrait donc être corrélé à la destruction de l'épithélium. La kératine a également été décrite comme la cible des cellules anti-endothéliales dans le rejet de la greffe (181). Néanmoins, elle semble peu spécifique car associée à des maladies inflammatoires de la peau chez l'homme (182). Dans l'analyse prospective de la première patiente greffée Française (article 2), nous avons dû l'exclure de nos analyses, du fait de sa non-spécificité.

# Rejet et infection

## 1) Effets de l'infection sévère sur le rejet

Pour notre patiente #2 de la série rétrospective (article 1), la survenue de ses premiers épisodes de rejet sévères caractérisés par des macrophages sécrétant du granzyme B a été marquée par une fausse couche récente à 15 semaines d'aménorrhée de sa première grossesse dans un contexte de chorioamnionite, et a été contemporain d'une infection vaginale à E-coli. Les macrophages ont une plasticité fonctionnelle et peuvent modifier leurs profils fonctionnels en réponse à des stimuli environnementaux. La polarisation M2 a été associée à différents pathogènes bactériens qui échappent à l'élimination en manipulant les fonctions des macrophages M1. Il a été récemment démontré qu'une reprogrammation vers des macrophages de type M2 par des pathogènes bactériens est possible et associée à l'évolution chronique de maladies infectieuses (11). L'infection pourrait ainsi jouer le rôle de catalyseur de rejet. Chez notre patiente 2 qui a eu plusieurs épisodes de rejet, la résolution de ses épisodes de rejets n'a été obtenue que grâce aux antithymocytes (183); les doses accrues de corticoïdes s'étant avérées inefficaces. Les glucocorticoïdes qui peuvent polariser les macrophages vers un phénotype M2, pourraient avoir participé au processus de rejet et à l'échec du traitement de l'infection à E Coli (184). Ceci suggère également l'importance de traiter les infections. A l'avenir, l'identification du phénotype des macrophages spécifiquement associés à des associés aux infections en cas de rejet pourrait nous aider à mieux définir le type de thérapie immunosuppressive à utiliser, et, à terme, peut-être à diminuer les échecs répétés d'implantation et les fausses couches.

## **2) Microbiote vaginal, infections et immunité innée**

La prévention et le traitement des infections d'origine vaginales, en particulier pendant la grossesse, est un enjeu majeur dans la transplantation utérine, car elle pourrait influencer le rejet et la fonctionnalité de l'organe à long terme, en plus de compromettre les grossesses, comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent. Ce point est particulièrement crucial chez les patientes MRKH, car un certain nombre d'entre elles ont des plasties vaginales pour leur permettre d'avoir un vagin d'une longueur compatible avec des rapports sexuels et la greffe utérine. Dans le registre de l'ISUTx, 10 % des patientes avaient un vagin créé par une greffe de peau entraînant la colonisation de bactéries qui ne font pas partie de la flore vaginale (105). C'était le cas de notre patiente 2 (article 1). Il est intéressant de noter que l'un des autres cas de fausses couches à répétition et d'échecs d'implantation a été rapporté chez une patiente MRKH ayant bénéficié d'une reconstruction vaginale à l'aide d'un lambeau intestinal (185). L'influence du microbiome vaginal et la nécessité de l'explorer a déjà été évoquée dans la littérature (99). Dans notre protocole prospectif MARNI (biobanque de prélèvements sanguins, biopsies, frottis et prélèvement vaginal réalisés en longitudinal durant tout le processus de greffe utérine) nous analyserons le microbiote vaginal, ainsi que le microbiote du méconium à la naissance. Pour notre première patiente greffée, nous avons déjà mis en évidence une forte altération du microbiote vaginal avec une réduction des lactobacilles (186), alors que cette patiente n'avait subi aucune intervention de plastie vaginale. Cela confirme l'impact des traitements immunosuppresseurs sur le microbiote, comme dans d'autres greffes d'organes (187). L'impact du microbiote sur les réponses immunitaires en cas de transplantation a également été démontré (81). S'il est difficile de tirer des conclusions sur 1 premier cas, nous pouvons néanmoins constater que son microbiote vaginal était normal pendant la grossesse.

Ceci pourrait s'expliquer par la « protection » hormonale liée à celle-ci (188). Le microbiote néonatal était proche de celui de la mère et différent des cas témoins. Il est connu que la césarienne peut être responsable d'un appauvrissement du microbiote du nouveau-né(189), la part attribuable aux traitements immunosuppresseurs reste à être évaluée ainsi que l'évolution à moyen et long terme de l'enfant. La littérature est très pauvre concernant le microbiote néonatal des enfants de patientes transplantés et leur devenir à moyen et long terme. Cependant c'est un point crucial car des altérations du microbiote néonatal ont été incriminées dans l'apparition de terrain allergiques chez l'enfant et d'un certain nombre de pathologies chroniques (190, 191). En plus des altérations du microbiote, on remarque dans ce premier cas, un certain nombre d'infections vaginales et urinaires, ainsi qu'une infection de la sphère ORL à mettre en relation avec l'augmentation de l'expression de NKG2C sur les cellules NK, associée à une modulation de l'expression de HLA-DR (marqueur d'activation tardif) et de CD107a (marqueur associé à la dégranulation). On peut ainsi formuler l'hypothèse que le microbiote altéré et les infections entraîne une activation de la réponse NK qui pourrait jouer un rôle dans l'initiation du rejet humoral observé lors de l'explantation. Cela conforte le lien infection>immunité innée>rejet. Des données complémentaires seront cependant nécessaires pour conforter cette hypothèse.

# **L'interface materno-fœtale**

Nous avons pu appréhender l'interface materno-fœtale par deux biais : l'analyse du sang de la mère et du nouveau-né dans le sang de cordon (cellules immunitaires et cytokines) et l'analyse au niveau placentaire de l'interface materno-foetale à proprement parlé grâce à l'imagerie par cytométrie de masse. Malheureusement cette dernière analyse n'a pas pu être faite sur notre case report en raison de problèmes techniques sur les lames.

## **1) Immunomodulation des cellules immunitaires et de la production en cytokines dans le sang maternel et le sang de cordon : le rôle des oestrogènes**

On a observé dans notre article 3, une bonne protection du nouveau-né par la mère contre l'infection à SARS-CoV-2, ce qui confirme le rôle protecteur de l'interface materno-fœtale appelée aussi à juste titre barrière. Dans l'infection à SARS-CoV-2, on objective des modifications des cellules NK dans le sang maternel, incluant une augmentation de leur fréquence mais également une modification de leur phénotype (diminution des cellules NK<sup>bright</sup> qui représentent normalement 10% des cellules NK périphériques avec une diminution de leur production en IFN-g et en TNF- $\alpha$ ). Parallèlement, on objective une augmentation de la production d'interleukines 8, une cytokine pro-inflammatoire, dans le serum maternel. Nous avons pu corrélérer ces modifications avec les taux d'oestrogènes, démontrant un effet protecteur de ces hormones sur la réaction immunitaire et en particulier l'inflammation. En effet, nous avons une corrélation négative entre la cytotoxicité et la dégranulation des NK et le taux d'oestrogène. Ceci diminuerait le risque de « tempête cytokinique » pourvoyeuse de formes

graves. Le rôle protecteur des oestrogènes a déjà été largement prouvé par exemple sur la production d'interféron-g (192). Il avait également été montré que l'infection par les coronavirus donnait des formes moins sévères chez les femmes du fait de leur protection hormonale (193). Cet aspect hormonal semble donc important à prendre en compte pour analyser l'immunomodulation de la grossesse.

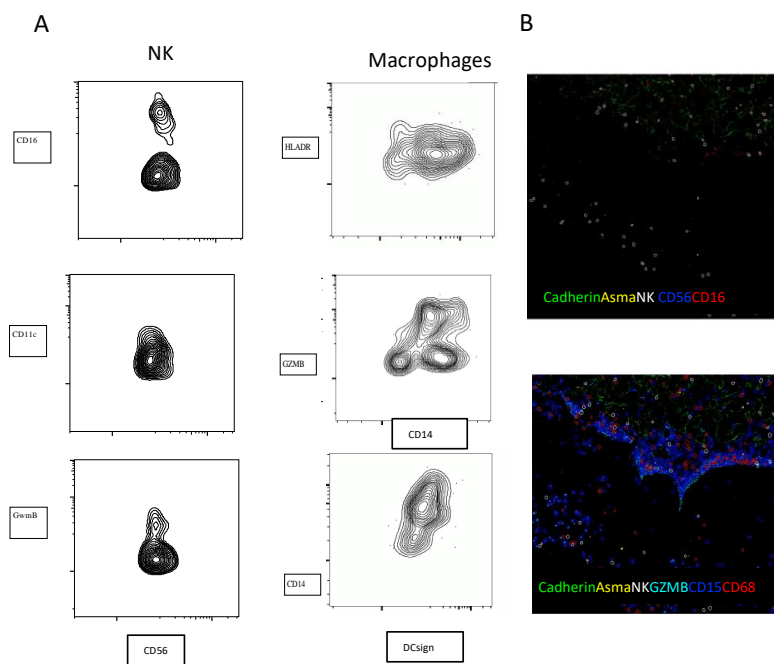
Concernant le nouveau-né, celui-ci est plutôt bien protégé contre l'infection à SARS-CoV-2, comme l'ont montré plusieurs études avec une transmission verticale du SARS-CoV-2 est très limitée (3,5 %) (145). Dans le sang de cordon, le nombre de cellules NK est classiquement supérieur à celui retrouvé chez l'adulte (30 % vs 10 %), mais les cellules sont phénotypiquement et fonctionnellement immatures (153). Nous avons identifié une chute des NK périphériques et une augmentation de l'IL22 chez le nouveau-né à la naissance en cas d'infection de la mère (article 3). Si nous ne pouvons conclure sur le devenir de ces altérations immunitaires, elles témoignent d'une empreinte à minima de l'immunité maternelle sur le nouveau-né dont les conséquences à plus long terme sont inconnues (154). Ces enjeux d'empreinte immunitaires sont également transposables à la transplantation utérine et à toute autre transplantation d'organe réalisée sur une femme enceinte, exposant la mère et le fœtus à des altérations immunitaires en lien avec des immunosuppresseurs et parfois des phénomènes de rejet. Le fait que l'utérus dans la TU soit à la fois l'organe greffé et le lieu de l'interface materno-fœtale complexifie encore plus la compréhension des mécanismes mis en jeu. Dans l'analyse de notre case report, nous n'avons pas mis en évidence d'altération au niveau des cellules NK de sang de cordon par rapport aux témoins. En revanche, nous avons observé que le microbiote était perturbé. Des analyses plus poussées et à plus long terme seront nécessaires sur les enfants issus de greffes.

## **2) Comment expliquer les cas qui « échappent » : à propos de notre mort fœtale in utero dans l'étude MATERCOV et de notre prééclampsie chez la patiente greffée françaises**

Il est intéressant de comparer nos deux modèles, celui de la greffe utérine et de l'infection au SARS-CoV-2, en ce qui concerne les cas qui ont échappé à la protection de la barrière materno-fœtale et ont entraîné des pathologies liées au placenta : Celui de la mort fœtale in utero suite à un hématome rétro placentaire dans un cas d'infection à SARS-CoV-2 symptomatique et celui de la première grossesse de notre patiente greffée marquée par une prééclampsie et une insuffisance rénale aigue ayant nécessité une césarienne et la naissance d'un enfant prématuré. Dans le cas de la mort fœtale, on peut remarquer que les NK périphériques produisaient massivement des cytokines pro-inflammatoires et en particulier en IFN-g et TNF- $\alpha$  (article 3). En revanche, au niveau placentaire, les NK déciduales semblaient « anergiques » (**Figure 21**) alors qu'une population bright apparaissait bien en cas d'infection à SARS-CoV-2 chez les autres patientes (travail en cours). Nous pourrions expliquer cela par une incapacité des cellules NK à migrer dans le placenta et donc à s'accumuler en périphérie et donc à participer à l'orage cytokinique. Par ailleurs, nous avons observé des modulations en macrophages Granzyme-B+ dans la mort fœtale, qui sont normalement observés lors des guérisons et chez les contrôles (**Figure 21**) (travail en cours). Nous pouvons faire le corolaire avec la production anormale de M2 dans notre article 2 dans un cas de rejet sévère suite à la pré-éclampsie qui est normalement due à une invasion insuffisante de la caduque, en particulier de la paroi des artères spiralées utérines, par le trophoblaste extravillousitaire (57). La prééclampsie serait liée à une modification



de la composition des cellules immunitaires à l'interface materno-fœtale, ainsi qu'à une activation massive des macrophages et des cellules NK déciduales, qui produisent de manière excessive du TNF- $\alpha$ . (194). Dans notre cas de prééclampsie, nous retrouvons également des altérations des cellules immunitaires périphériques de l'immunité innée, avec en particulier, une augmentation des cellules NK qui expriment faiblement NKp46, associée à une production massive de granzyme B au niveau périphérique (article 2), qui a déjà été décrite en cas de cas de prééclampsie (195). Ces données suggèrent que la part de l'immunité innée dans ces pathologies liées à la grossesse semblent majeures. Ceci devra cependant être confirmé dans des études ultérieures.



**Figure 21 : Modifications des cellules NK et des macrophages dans l'étude MATERCOV au niveau de l'interface materno-fœtale par imagerie de cytométrie de masse Hyperion™ dans le cas de la mort fœtale. (A) Flow cytometry contour plots of NK cells according to CD16, CD56, granzyme B and CD11c and macrophages according to CD14, granzyme B, CD11c and HLADR. (B) IMC pseudocolored images.**

## Perspectives

Sur la base des données obtenues, nous souhaiterions à l'avenir d'effectuer une analyse approfondie des TLS et des macrophages produisant du granzyme B afin d'obtenir une compréhension plus profonde des mécanismes immunitaires en jeu dans le rejet de TU. Ainsi nous souhaitons mener 2 types de travaux :

1. Confirmer nos données préliminaires et mieux définir le rôle des TLS et des macrophages produisant du granzyme B dans le rejet de TU dans une nouvelle collection rétrospective de biopsies exo-cervicales longitudinales incluses en paraffine (FFPE) prélevées à différents moments de la greffe utérine par transcriptomique et par hyperion<sup>TM</sup> (plateforme CyPS, Sorbonne Université) : au moins 5 times points pour 10 patientes, dont 5 patientes ayant des rejets chroniques et/ou fausses couches à répétition et/ou échecs d'implantation.

2. Explorer les effets des TLS et des macrophages produisant du granzyme B dans une collection biologique prospective chez des patientes avec TU pour comparer les données des biopsies exo-cervicales, et utérines obtenues par des approches multi-omiques (transcriptomique et hyperion<sup>TM</sup>), avec celles des prélèvements sanguins (analyse phénotypique et fonctionnelle des cellules et production de cytokines), des frottis du col et du microbiote vaginal. Le retentissement sur l'interface materno-fœtale sera également évalué dans le sang de cordon ombilical, sur le placenta (face maternelle) et sur le microbiote fécal du nouveau-né. La partie rétrospective sera réalisée avec de nouveaux échantillons suédois. La partie prospective appelée le projet MARNI (NCT04615221), sera menée avec des échantillons français (hôpital Foch : 3 patientes déjà incluses à ce jour ; Rennes à venir), suédois (1 patiente incluse), allemands (à venir) et américains (Houston, Texas, à venir). Des demandes de financements

sont en cours. Nous espérons ainsi confirmer et affiner nos données préliminaires sur l'impact du TLS et du granzyme B sécrété par les macrophages sur l'interface materno-fœtale et le greffon. Nous espérons également trouver des biomarqueurs associés au rejet dans des échantillons non invasifs et /ou confirmer le rôle de la granzyme B et IL1 $\beta$ , afin d'améliorer la gestion clinique des patientes avec TU en limitant la nécessité de biopsies cervicales. Nous espérons également mieux évaluer le rôle du microbiote et des infections. Cette étude originale devrait non seulement permettre de mieux comprendre la physiopathologie du rejet de TU et son impact sur la grossesse, mais aussi d'améliorer la robustesse et la précision du diagnostic du rejet, et enfin de permettre des traitements ciblés aussi précoces que possible pour améliorer la fonction utérine et les chances de naissance vivante.

De même, il serait intéressant de suivre les cohortes d'enfants issus de TU, afin d'évaluer les conséquences immunologiques pour eux à moyen et long terme.

# Conclusion

Mes travaux ont permis de mettre en évidence différents phénomènes impliqués dans le rejet de greffe utérine qui n'avaient pas été encore décrits. Le premier est la présence de structures lymphoïdes tertiaires, dont les plus évoluées seraient en lien avec le rejet humoral et le rejet chronique. Le deuxième est la présence de macrophages sécrétant du granzyme B, qui pourraient être le reflet de rejets sévères, altérant la fonction utérine au point de la rendre impropre à la grossesse, qui est la finalité de la transplantation utérine. Les épisodes infectieux utérins et vaginaux sévères pourraient potentialiser les phénomènes de rejet par l'activation de l'immunité innée (NK et macrophages notamment). J'ai effectué des travaux préliminaires à la recherche de marqueurs non invasifs de rejet. Les marqueurs granzyme B et IL1 $\beta$  au niveau sanguin pourraient être de bons candidats. La réalisation d'une biobanque de patientes greffées provenant d'une étude prospective multicentrique sera indispensable afin de mieux comprendre les marqueurs associés au rejet et valider des biomarqueurs non invasifs. C'est ce que j'espère pouvoir continuer avec la cohorte MARNI.

L'impact de la transplantation utérine sur la grossesse au niveau immunologique peut se mesurer au niveau des cellules immunitaires dans la circulation sanguine et localement au sein du placenta au niveau de l'interface materno-fœtale. Le traitement immunosuppresseur entraîne des altérations immunologiques et du microbiote vaginal. Il est intéressant de constater que ces altérations sont partiellement corrigées notamment grâce à l'imprégnation hormonale, ce que nous avons également mis en évidence dans notre étude sur l'infections par le SARS-CoV-2. Il est difficile à ce jour d'expliquer les cas qui « échappent » et entraînent des pathologies spécifiques de l'interface materno-fœtale, comme notre cas de pré éclampsie chez la première patiente greffée française ou la mort fœtale in utero sur hématome retro placentaire chez une patiente ayant contracté la COVID-19. Une dysfonction des cellules NK a été constatée dans les 2 cas et pourrait être une piste intéressante de réflexion. Si notre étude sur le SARS-CoV-2

a montré que l'interface materno-fœtale protégeait bien le fœtus contre l'infection, elle a également révélé le passage de l'inflammation au niveau du sang fœtal par le biais de certaines cytokines. Le retentissement sur l'immunité à court, moyen et long terme de l'enfant après greffe utérine et plus largement après toute greffe est peu étudié. L'évaluation de cohortes à long terme semble donc indispensable.

# Bibliographie

1. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009;457(7229):557-61.
2. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016;44(3):439-49.
3. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(6):349-62.
4. Kloc M, Uosef A, Kubiak JZ, Ghobrial RM. Macrophage Proinflammatory Responses to Microorganisms and Transplanted Organs. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24).
5. Tian H, Wu J, Ma M. Implications of macrophage polarization in corneal transplantation rejection. *Transpl Immunol*. 2021;64:101353.
6. van den Bosch TP, Caliskan K, Kraaij MD, Constantinescu AA, Manintveld OC, Leenen PJ, et al. CD16+ Monocytes and Skewed Macrophage Polarization toward M2 Type Hallmark Heart Transplant Acute Cellular Rejection. *Front Immunol*. 2017;8:346.
7. Baba T, Ishizu A, Iwasaki S, Suzuki A, Tomaru U, Ikeda H, et al. CD4+/CD8+ macrophages infiltrating at inflammatory sites: a population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype. *Blood*. 2006;107(5):2004-12.
8. Basu R, Whitlock BM, Husson J, Le Floch A, Jin W, Oyler-Yaniv A, et al. Cytotoxic T Cells Use Mechanical Force to Potentiate Target Cell Killing. *Cell*. 2016;165(1):100-10.
9. Zaki MA, Wada N, Ikeda J, Shibayama H, Hashimoto K, Yamagami T, et al. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch*. 2011;459(4):361-6.
10. Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett*. 2004;95(2):193-8.
11. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, et al. Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. 2000;287(5458):1655-8.
12. Segura E, Amigorena S. [Inflammatory dendritic cells]. *Med Sci (Paris)*. 2014;30(1):64-8.
13. Breton G. [Origin and development of human dendritic cells]. *Med Sci (Paris)*. 2015;31(8-9):725-7.
14. Chakravarti A, Allaey I, Poubelle PE. [Neutrophils and immunity: is it innate or acquired?]. *Med Sci (Paris)*. 2007;23(10):862-7.
15. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol*. 2006;118(1):1-10.
16. Sarvaria A, Jawdat D, Madrigal JA, Saudemont A. Umbilical Cord Blood Natural Killer Cells, Their Characteristics, and Potential Clinical Applications. *Front Immunol*. 2017;8:329.
17. van Eeden C, Khan L, Osman MS, Cohen Tervaert JW. Natural Killer Cell Dysfunction and Its Role in COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17).
18. Lundqvist A, Kremer V. "Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions.". *Cytometry B Clin Cytom*. 2017;92(2):98-9.
19. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9.
20. Abbas AK. *Cellular and Molecular Immunology*: Elsevier; 2015.
21. Kleinstein J, Westermann W, Mennenga K, Gustmann C, Gips H. Estrogen induces expression of endometrial epidermal growth factor receptors before implantation. *Am J Reprod Immunol*. 1993;30(2-3):58-62.

22. Kurita T, Young P, Brody JR, Lydon JP, O'Malley BW, Cunha GR. Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*. 1998;139(11):4708-13.
23. Park DW, Yang KM. Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin Exp Reprod Med*. 2011;38(4):179-85.
24. Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev*. 2007;28(1):117-49.
25. Kim SM, Kim JS. A Review of Mechanisms of Implantation. *Dev Reprod*. 2017;21(4):351-9.
26. Ye X. Uterine Luminal Epithelium as the Transient Gateway for Embryo Implantation. *Trends Endocrinol Metab*. 2020;31(2):165-80.
27. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update*. 2005;11(6):613-30.
28. Nardo LG, Sabatini L, Rai R, Nardo F. Pinopode expression during human implantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002;101(2):104-8.
29. Stavreus-Evers A, Nikas G, Sahlin L, Eriksson H, Landgren BM. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril*. 2001;76(4):782-91.
30. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):731-46.
31. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, et al. Embryo implantation. *Dev Biol*. 2000;223(2):217-37.
32. Aplin JD, Ruane PT. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci*. 2017;130(1):15-22.
33. Zhu JY, Pang ZJ, Yu YH. Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol*. 2012;5(3-4):e137-43.
34. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med*. 2006;12(9):1065-74.
35. Soares MJ, Iqbal K, Kozai K. Hypoxia and Placental Development. *Birth Defects Res*. 2017;109(17):1309-29.
36. Whitley GS, Cartwright JE. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta*. 2010;31(6):465-74.
37. Red-Horse K, Rivera J, Schanz A, Zhou Y, Winn V, Kapidzic M, et al. Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation. *J Clin Invest*. 2006;116(10):2643-52.
38. Smith SK. Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod*. 2000;15 Suppl 6:59-66.
39. Maltepe E, Fisher SJ. Placenta: the forgotten organ. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2015;31:523-52.
40. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(8):487-514.
41. Mezouar S, Katsogiannou M, Ben Amara A, Bretelle F, Mege JL. Placental macrophages: Origin, heterogeneity, function and role in pregnancy-associated infections. *Placenta*. 2021;103:94-103.
42. Zhang X, Wei H. Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications. *Front Immunol*. 2021;12:728291.
43. Jamieson DJ, Theiler RN, Rasmussen SA. Emerging infections and pregnancy. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(11):1638-43.
44. Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic Function and Composition Changes of Immune Cells During Normal and Pathological Pregnancy at the Maternal-Fetal Interface. *Front Immunol*. 2019;10:2317.
45. Watanabe M, Iwatani Y, Kaneda T, Hidaka Y, Mitsuda N, Morimoto Y, et al. Changes in T, B, and NK lymphocyte subsets during and after normal pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1997;37(5):368-77.



46. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav.* 2012;62(3):263-71.
47. Li X, Zhou J, Fang M, Yu B. Pregnancy immune tolerance at the maternal-fetal interface. *Int Rev Immunol.* 2020;39(6):247-63.
48. Le Bouteiller P, Tabiasco J. Killers become builders during pregnancy. *Nat Med.* 2006;12(9):991-2.
49. ACOG Practice Bulletin No. 200 Summary: Early Pregnancy Loss. *Obstet Gynecol.* 2018;132(5):1311-3.
50. Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol.* 2003;162(1):115-25.
51. Fu B, Li X, Sun R, Tong X, Ling B, Tian Z, et al. Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(3):E231-40.
52. Branch DW, Gibson M, Silver RM. Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med.* 2010;363(18):1740-7.
53. Garmi G, Salim R. Epidemiology, etiology, diagnosis, and management of placenta accreta. *Obstet Gynecol Int.* 2012;2012:873929.
54. Garmi G, Goldman S, Shalev E, Salim R. The effects of decidual injury on the invasion potential of trophoblastic cells. *Obstet Gynecol.* 2011;117(1):55-9.
55. Mahmood S, Johannesson L, Testa G, de Prisco G. DUETS (Dallas UtErus Transplant Study): The role of imaging in uterus transplantation. *SAGE Open Med.* 2019;7:2050312119875607.
56. James JL, Saghian R, Perwick R, Clark AR. Trophoblast plugs: impact on utero-placental haemodynamics and spiral artery remodelling. *Hum Reprod.* 2018;33(8):1430-41.
57. Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi JM. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag.* 2011;7:467-74.
58. Wedenoja S, Yoshihara M, Teder H, Sariola H, Gissler M, Katayama S, et al. Fetal HLA-G mediated immune tolerance and interferon response in preeclampsia. *EBioMedicine.* 2020;59:102872.
59. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111(5):649-58.
60. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Zeisler H, Calda P, et al. New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertension.* 2014;63(2):346-52.
61. Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD, Knofler M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):812-22.
62. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2010;376(9741):631-44.
63. Pereira L. Congenital Viral Infection: Traversing the Uterine-Placental Interface. *Annu Rev Virol.* 2018;5(1):273-99.
64. Neu N, Duchon J, Zachariah P. TORCH infections. *Clin Perinatol.* 2015;42(1):77-103, viii.
65. Tullius SG, Milford E. Kidney allocation and the aging immune response. *N Engl J Med.* 2011;364(14):1369-70.
66. Jose MD, Ikezumi Y, van Rooijen N, Atkins RC, Chadban SJ. Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection. *Transplantation.* 2003;76(7):1015-22.
67. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(7):447-62.
68. Thauinat O. Pathophysiological significance of B-cell clusters in chronically rejected grafts. *Transplantation.* 2011;92(2):121-6.

69. Hautz T, Zelger BG, Nasr IW, Mundinger GS, Barth RN, Rodriguez ED, et al. Lymphoid neogenesis in skin of human hand, nonhuman primate, and rat vascularized composite allografts. *Transpl Int*. 2014;27(9):966-76.
70. Hasegawa T, Iacono A, Yousem SA. The significance of bronchus-associated lymphoid tissue in human lung transplantation: is there an association with acute and chronic rejection? *Transplantation*. 1999;67(3):381-5.
71. Lee YH, Sato Y, Saito M, Fukuma S, Saito M, Yamamoto S, et al. Advanced Tertiary Lymphoid Tissues in Protocol Biopsies are Associated with Progressive Graft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2022;33(1):186-200.
72. Koenig A, Mezaache S, Callemeyn J, Barba T, Mathias V, Sicard A, et al. Missing Self-Induced Activation of NK Cells Combines with Non-Complement-Fixing Donor-Specific Antibodies to Accelerate Kidney Transplant Loss in Chronic Antibody-Mediated Rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(2):479-94.
73. Gratwohl A, Dohler B, Stern M, Opelz G. H-Y as a minor histocompatibility antigen in kidney transplantation: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2008;372(9632):49-53.
74. Mak RH, Hoffman HM. Transplantation: Outcomes of prenatal immunosuppression. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(7):390-1.
75. Koenig A, Chen CC, Marcais A, Barba T, Mathias V, Sicard A, et al. Missing self triggers NK cell-mediated chronic vascular rejection of solid organ transplants. *Nat Commun*. 2019;10(1):5350.
76. Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med*. 2018;379(12):1150-60.
77. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work G. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009;9 Suppl 3:S1-155.
78. Port FK, Dykstra DM, Merion RM, Wolfe RA. Organ donation and transplantation trends in the USA, 2003. *Am J Transplant*. 2004;4 Suppl 9:7-12.
79. Kaneku HK, Terasaki PI. Thirty year trend in kidney transplants: UCLA and UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl*. 2006:1-27.
80. Roux A, Bendib Le Lan I, Holifanjaniaina S, Thomas KA, Hamid AM, Picard C, et al. Antibody-Mediated Rejection in Lung Transplantation: Clinical Outcomes and Donor-Specific Antibody Characteristics. *Am J Transplant*. 2016;16(4):1216-28.
81. Bartman C, Chong AS, Alegre ML. The influence of the microbiota on the immune response to transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(1):1-7.
82. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, Walker N, Scales BS, Beck JM, et al. Changes in the lung microbiome following lung transplantation include the emergence of two distinct *Pseudomonas* species with distinct clinical associations. *PLoS One*. 2014;9(5):e97214.
83. Fricke WF, Maddox C, Song Y, Bromberg JS. Human microbiota characterization in the course of renal transplantation. *Am J Transplant*. 2014;14(2):416-27.
84. Poggio ED, Augustine JJ, Arrigain S, Brennan DC, Schold JD. Long-term kidney transplant graft survival-Making progress when most needed. *Am J Transplant*. 2021;21(8):2824-32.
85. McKay DB, Josephson MA. Pregnancy in recipients of solid organs--effects on mother and child. *N Engl J Med*. 2006;354(12):1281-93.
86. Bedin A, Carbonnel M, Snanoudj R, Roux A, Vanlieferinghen S, Marchiori C, et al. Pregnancies and Gynecological Follow-Up after Solid Organ Transplantation: Experience of a Decade. *J Clin Med*. 2022;11(16).
87. Petruzzo P, Dubernard JM. The International Registry on Hand and Composite Tissue allotransplantation. *Clin Transpl*. 2011:247-53.
88. Group CSC, Haynes R, Harden P, Judge P, Blackwell L, Emberson J, et al. Alemtuzumab-based induction treatment versus basiliximab-based induction treatment in kidney transplantation (the 3C Study): a randomised trial. *Lancet*. 2014;384(9955):1684-90.
89. Morelon E, Petruzzo P, Kanitakis J, Dakpe S, Thaunat O, Dubois V, et al. Face Transplantation: Partial Graft Loss of the First Case 10 Years Later. *Am J Transplant*. 2017;17(7):1935-40.

90. Petruzzo P, Kanitakis J, Testelin S, Pialat JB, Buron F, Badet L, et al. Clinicopathological Findings of Chronic Rejection in a Face Grafted Patient. *Transplantation*. 2015;99(12):2644-50.
91. Johannesson L, Jarvholm S. Uterus transplantation: current progress and future prospects. *Int J Womens Health*. 2016;8:43-51.
92. Ledig S, Wieacker P. Clinical and genetic aspects of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Med Genet*. 2018;30(1):3-11.
93. Brannstrom M, Johannesson L, Bokstrom H, Kvarnstrom N, Molne J, Dahm-Kahler P, et al. Livebirth after uterus transplantation. *Lancet*. 2015;385(9968):607-16.
94. Carbonnel M, Ayoubi JM. [Uterine transplantation: a treatment for absolute uterine infertility]. *Rev Prat*. 2023;73(5):471-6.
95. Brannstrom M, Johannesson L, Dahm-Kahler P, Enskog A, Molne J, Kvarnstrom N, et al. First clinical uterus transplantation trial: a six-month report. *Fertil Steril*. 2014;101(5):1228-36.
96. Brucker SY, Brannstrom M, Taran FA, Nadalin S, Konigsrainer A, Rall K, et al. Selecting living donors for uterus transplantation: lessons learned from two transplantations resulting in menstrual functionality and another attempt, aborted after organ retrieval. *Arch Gynecol Obstet*. 2018;297(3):675-84.
97. Brannstrom M, Dahm-Kahler P, Ekberg J, Akouri R, Groth K, Enskog A, et al. Outcome of Recipient Surgery and 6-Month Follow-Up of the Swedish Live Donor Robotic Uterus Transplantation Trial. *J Clin Med*. 2020;9(8).
98. Carbonnel M, Revaux A, Menzhulina E, Karpel L, Snanoudj R, Le Guen M, et al. Uterus Transplantation with Live Donors: Screening Candidates in One French Center. *J Clin Med*. 2020;9(6).
99. Jones BP, Saso S, L'Heveder A, Bracewell-Milnes T, Thum MY, Diaz-Garcia C, et al. The vaginal microbiome in uterine transplantation. *BJOG*. 2020;127(2):230-8.
100. Fageeh W, Raffa H, Jabbad H, Marzouki A. Transplantation of the human uterus. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;76(3):245-51.
101. Ozkan O, Akar ME, Erdogan O, Ozkan O, Hadimioglu N. Uterus transplantation from a deceased donor. *Fertil Steril*. 2013;100(6):e41.
102. Ozkan O, Ozkan O, Dogan NU, Bahceci M, Mendilcioglu I, Boynukalin K, et al. Birth of a Healthy Baby 9 years after a Surgically Successful Deceased Donor Uterus Transplant. *Ann Surg*. 2021.
103. Johannesson L, Kvarnstrom N, Molne J, Dahm-Kahler P, Enskog A, Diaz-Garcia C, et al. Uterus transplantation trial: 1-year outcome. *Fertil Steril*. 2015;103(1):199-204.
104. Karlsson CC, Dahm-Kahler P, Kvarnstrom N, Molne J, Broecker V, Brannstrom M. Hysterectomy after uterus transplantation and detailed analyses of graft failures. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2021.
105. Brannstrom M, Tullius SG, Brucker S, Dahm-Kahler P, Flyckt R, Kisu I, et al. Registry of the International Society of Uterus Transplantation: First Report. *Transplantation*. 2023;107(1):10-7.
106. Ayoubi JM, Carbonnel M, Racowsky C, de Ziegler D, Gargiulo A, Kvarnstrom N, et al. Evolving clinical challenges in uterus transplantation. *Reprod Biomed Online*. 2022;45(5):947-60.
107. Brannstrom M, Racowsky C, Carbonnel M, Wu J, Gargiulo A, Adashi EY, et al. Uterus transplantation: from research, through human trials and into the future. *Hum Reprod Update*. 2023.
108. Johannesson L, Richards E, Reddy V, Walter J, Olthoff K, Quintini C, et al. The First 5 Years of Uterus Transplant in the US: A Report From the United States Uterus Transplant Consortium. *JAMA Surg*. 2022;157(9):790-7.
109. Ayoubi JM, Carbonnel M, Kvarnstrom N, Revaux A, Poulain M, Vanlieferinghen S, et al. Case Report: Post-Partum SARS-CoV-2 Infection After the First French Uterus Transplantation. *Front Surg*. 2022;9:854225.
110. Hoeltzenbein M, Elefant E, Vial T, Finkel-Pekarsky V, Stephens S, Clementi M, et al. Teratogenicity of mycophenolate confirmed in a prospective study of the European Network of Teratology Information Services. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(3):588-96.
111. Testa G, McKenna GJ, Gunby RT, Jr., Anthony T, Koon EC, Warren AM, et al. First live birth after uterus transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2018;18(5):1270-4.

112. Johannesson L, Wall A, Putman JM, Zhang L, Testa G, Diaz-Garcia C. Rethinking the time interval to embryo transfer after uterus transplantation - DUETS (Dallas UtErus Transplant Study). *BJOG*. 2019;126(11):1305-9.
113. Johannesson L, Enskog A, Molne J, Diaz-Garcia C, Hanafy A, Dahm-Kahler P, et al. Preclinical report on allogeneic uterus transplantation in non-human primates. *Hum Reprod*. 2013;28(1):189-98.
114. Cendales LC, Kanitakis J, Schneeberger S, Burns C, Ruiz P, Landin L, et al. The Banff 2007 working classification of skin-containing composite tissue allograft pathology. *Am J Transplant*. 2008;8(7):1396-400.
115. Molne J, Broecker V, Ekberg J, Nilsson O, Dahm-Kahler P, Brannstrom M. Monitoring of Human Uterus Transplantation With Cervical Biopsies: A Provisional Scoring System for Rejection. *Am J Transplant*. 2017;17(6):1628-36.
116. Agarwal A, Johannesson L, Findeis SK, Punar M, Askar M, Ma TW, et al. Clinicopathological Analysis of Uterine Allografts Including Proposed Scoring of Ischemia Reperfusion Injury and T-cell-mediated Rejection-Dallas UtErus Transplant Study: A Pilot Study. *Transplantation*. 2022;106(1):167-77.
117. Broecker V, Brannstrom M, Ekberg J, Dahm-Kahler P, Molne J. Uterus transplantation: Histological findings in explants at elective hysterectomy. *Am J Transplant*. 2021;21(2):798-808.
118. Chmel R, Novackova M, Janousek L, Matecha J, Pastor Z, Maluskova J, et al. Reevaluation and lessons learned from the first 9 cases of a Czech uterus transplantation trial: Four deceased donor and 5 living donor uterus transplantations. *Am J Transplant*. 2019;19(3):855-64.
119. Pescovitz MD, Book BK, Henson S, Leapman SB, Milgrom ML, Kimball J, et al. The addition of sirolimus to cyclosporine and steroids inhibits the anti-equine antibody response in renal transplant recipients treated with antithymocyte globulin. *Am J Transplant*. 2003;3(4):497-500.
120. Flyckt R, Falcone T, Quintini C, Perni U, Eghtesad B, Richards EG, et al. First birth from a deceased donor uterus in the United States: from severe graft rejection to successful cesarean delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(2):143-51.
121. Bergfeld W, Klimczak A, Stratton JS, Siemionow MZ. A four-year pathology review of the near total face transplant. *Am J Transplant*. 2013;13(10):2750-64.
122. Brucker SY, Kramer B, Abele H, Henes M, Hoopmann M, Scholler D, et al. Uterine allograft removal by total laparoscopic hysterectomy after successful cesarean delivery in a living-donor uterus recipient with uterovaginal agenesis (MRKHS). *Arch Gynecol Obstet*. 2023;307(3):827-40.
123. Richards EG, Farrell RM, Ricci S, Perni U, Quintini C, Tzakis A, et al. Uterus transplantation: state of the art in 2021. *J Assist Reprod Genet*. 2021;38(9):2251-9.
124. Iske J, Elkhali A, Tullius SG. The Fetal-Maternal Immune Interface in Uterus Transplantation. *Trends Immunol*. 2020;41(3):213-24.
125. Bonny V, Maillard A, Mousseaux C, Placais L, Richier Q. [COVID-19: Pathogenesis of a multi-faceted disease]. *Rev Med Interne*. 2020;41(6):375-89.
126. Chen R, Zhang S, Su S, Ye H, Shu H. Interactions Between Specific Immune Status of Pregnant Women and SARS-CoV-2 Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:721309.
127. Varchetta S, Mele D, Oliviero B, Mantovani S, Ludovisi S, Cerino A, et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(3):604-12.
128. Gralinski LE, Menachery VD. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*. 2020;12(2).
129. Cui S, Chen S, Li X, Liu S, Wang F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(6):1421-4.
130. Mauvais-Jarvis F, Klein SL, Levin ER. Estradiol, Progesterone, Immunomodulation, and COVID-19 Outcomes. *Endocrinology*. 2020;161(9).
131. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Oldridge DA, Greenplate AR, Wu JE, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*. 2020;369(6508).

132. Liu Z, Long W, Tu M, Chen S, Huang Y, Wang S, et al. Lymphocyte subset (CD4+, CD8+) counts reflect the severity of infection and predict the clinical outcomes in patients with COVID-19. *J Infect.* 2020;81(2):318-56.
133. Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, Alsabbagh M, Zian Z, Hamedifar H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scand J Immunol.* 2021;93(4):e12998.
134. Tarantino N, Litvinova E, Samri A, Soulie C, Morin V, Rousseau A, et al. Identification of natural killer markers associated with fatal outcome in COVID-19 patients. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1165756.
135. Hirano T, Murakami M. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. *Immunity.* 2020;52(5):731-3.
136. Chen R, Lan Z, Ye J, Pang L, Liu Y, Wu W, et al. Cytokine Storm: The Primary Determinant for the Pathophysiological Evolution of COVID-19 Deterioration. *Front Immunol.* 2021;12:589095.
137. Zheng M, Gao Y, Liu S, Sun D, Yang F, Zong L, et al. Serum inflammatory factors are positively correlated with the production of specific antibodies in coronavirus disease 2019 patients. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(11):1180-2.
138. Maucourant C, Filipovic I, Ponzetta A, Aleman S, Cornillet M, Hertwig L, et al. Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci Immunol.* 2020;5(50).
139. Bortolotti D, Gentili V, Rizzo S, Rotola A, Rizzo R. SARS-CoV-2 Spike 1 Protein Controls Natural Killer Cell Activation via the HLA-E/NKG2A Pathway. *Cells.* 2020;9(9).
140. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.* 2020;369(6504):718-24.
141. Berhan Y. What immunological and hormonal protective factors lower the risk of COVID-19 related deaths in pregnant women? *J Reprod Immunol.* 2020;142:103180.
142. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update.* 2003;9(4):347-57.
143. Robinson DP, Lorenzo ME, Jian W, Klein SL. Elevated 17beta-estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. *PLoS Pathog.* 2011;7(7):e1002149.
144. Ramsey PS, Ramin KD. Pneumonia in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001;28(3):553-69.
145. Jafari M, Pormohammad A, Sheikh Neshin SA, Ghorbani S, Bose D, Alimohammadi S, et al. Clinical characteristics and outcomes of pregnant women with COVID-19 and comparison with control patients: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2021;31(5):1-16.
146. Daclin C, Carbonnel M, Rossignol M, Abbou H, Trabelsi H, Cimmino A, et al. Impact of COVID-19 infection in pregnancy and neonates: A case control study. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2022;51(5):102366.
147. Carbonnel M, Daclin C, Tourne M, Roux E, Le-Marchand M, Racowsky C, et al. Impact of COVID-19 on Subclinical Placental Thrombosis and Maternal Thrombotic Factors. *J Clin Med.* 2022;11(14).
148. Algarroba GN, Rekawek P, Vahanian SA, Khullar P, Palaia T, Peltier MR, et al. Visualization of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 invading the human placenta using electron microscopy. *Am J Obstet Gynecol.* 2020;223(2):275-8.
149. Di Mascio D, Khalil A, Saccone G, Rizzo G, Buca D, Liberati M, et al. Outcome of coronavirus spectrum infections (SARS, MERS, COVID-19) during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol MFM.* 2020;2(2):100107.
150. Wastnedge EAN, Reynolds RM, van Boeckel SR, Stock SJ, Denison FC, Maybin JA, et al. Pregnancy and COVID-19. *Physiol Rev.* 2021;101(1):303-18.

151. Di Girolamo R, Khalil A, Alameddine S, D'Angelo E, Galliani C, Matarrelli B, et al. Placental histopathology after SARS-CoV-2 infection in pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* MF. 2021;3(6):100468.
152. Suhren JT, Meinardus A, Hussein K, Schaumann N. Meta-analysis on COVID-19-pregnancy-related placental pathologies shows no specific pattern. *Placenta*. 2022;117:72-7.
153. Le Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, et al. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*. 2010;9(4):527-35.
154. Gee S, Chandiramani M, Seow J, Pollock E, Modestini C, Das A, et al. The legacy of maternal SARS-CoV-2 infection on the immunology of the neonate. *Nat Immunol*. 2021;22(12):1490-502.
155. Male V. SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccination in pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(5):277-82.
156. Holt PG, Yabuhara A, Prescott S, Venaille T, Macaubas C, Holt BJ, et al. Allergen recognition in the origin of asthma. *Ciba Found Symp*. 1997;206:35-49; discussion -55, 106-10.
157. Thauinat O, Patey N, Caligiuri G, Gautreau C, Mamani-Matsuda M, Mekki Y, et al. Chronic rejection triggers the development of an aggressive intragraft immune response through recapitulation of lymphoid organogenesis. *J Immunol*. 2010;185(1):717-28.
158. Brown K, Sacks SH, Wong W. Tertiary lymphoid organs in renal allografts can be associated with donor-specific tolerance rather than rejection. *Eur J Immunol*. 2011;41(1):89-96.
159. Le Texier L, Thebault P, Lavault A, Usal C, Merieau E, Quillard T, et al. Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant*. 2011;11(3):429-38.
160. Garaud S, Dieu-Nosjean MC, Willard-Gallo K. T follicular helper and B cell crosstalk in tertiary lymphoid structures and cancer immunotherapy. *Nat Commun*. 2022;13(1):2259.
161. Thauinat O, Patey N, Gautreau C, Lechaton S, Fremeaux-Bacchi V, Dieu-Nosjean MC, et al. B cell survival in intragraft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation*. 2008;85(11):1648-53.
162. Gasteiger G, Rudensky AY. Interactions between innate and adaptive lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(9):631-9.
163. Li J, Li C, Zhuang Q, Peng B, Zhu Y, Ye Q, et al. The Evolving Roles of Macrophages in Organ Transplantation. *J Immunol Res*. 2019;2019:5763430.
164. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol*. 2015;36(4):229-39.
165. Hoffmann MW, Wonigeit K, Steinhoff G, Herzbeck H, Flad HD, Pichlmayr R. Production of cytokines (TNF-alpha, IL-1-beta) and endothelial cell activation in human liver allograft rejection. *Transplantation*. 1993;55(2):329-35.
166. Perry SE, Mostafa SM, Wenstone R, Shenkin A, McLaughlin PJ. Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? *Intensive Care Med*. 2003;29(8):1245-52.
167. Chu Z, Sun C, Sun L, Feng C, Yang F, Xu Y, et al. Primed macrophages directly and specifically reject allografts. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(3):237-46.
168. Lo DJ, Kaplan B, Kirk AD. Biomarkers for kidney transplant rejection. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(4):215-25.
169. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, et al. Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation*. 1998;66(5):562-6.
170. Heng B, Li Y, Shi L, Du X, Lai C, Cheng L, et al. A Meta-analysis of the Significance of Granzyme B and Perforin in Noninvasive Diagnosis of Acute Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2015;99(7):1477-86.
171. Kollar B, Uffing A, Borges TJ, Shubin AV, Aoyama BT, Dagot C, et al. MMP3 Is a Non-invasive Biomarker of Rejection in Skin-Bearing Vascularized Composite Allotransplantation: A Multicenter Validation Study. *Front Immunol*. 2019;10:2771.

172. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69.
173. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723-37.
174. Brannstrom M, Dahm-Kahler P, Kvarnstrom N, Enskog A, Olofsson JI, Olausson M, et al. Reproductive, obstetric, and long-term health outcome after uterus transplantation: results of the first clinical trial. *Fertil Steril.* 2022;118(3):576-85.
175. Petruzzo P, Lanzetta M, Dubernard JM, Landin L, Cavadas P, Margreiter R, et al. The International Registry on Hand and Composite Tissue Transplantation. *Transplantation.* 2010;90(12):1590-4.
176. Morelon E, Petruzzo P, Kanitakis J. Chronic rejection in vascularized composite allotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2018;23(5):582-91.
177. Lee WP, Yaremchuk MJ, Pan YC, Randolph MA, Tan CM, Weiland AJ. Relative antigenicity of components of a vascularized limb allograft. *Plast Reconstr Surg.* 1991;87(3):401-11.
178. Kauke M, Safi AF, Zhegibe A, Haug V, Kollar B, Nelms L, et al. Mucosa and Rejection in Facial Vascularized Composite Allotransplantation: A Systematic Review. *Transplantation.* 2020;104(12):2616-24.
179. Black AP, Ardern-Jones MR, Kasprovicz V, Bowness P, Jones L, Bailey AS, et al. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(6):1485-93.
180. Hautz T, Zelger B, Grahammer J, Krapf C, Amberger A, Brandacher G, et al. Molecular markers and targeted therapy of skin rejection in composite tissue allotransplantation. *Am J Transplant.* 2010;10(5):1200-9.
181. Guo X, Hu J, Luo W, Luo Q, Guo J, Tian F, et al. Analysis of Sera of Recipients with Allograft Rejection Indicates That Keratin 1 Is the Target of Anti-Endothelial Antibodies. *J Immunol Res.* 2017;2017:8679841.
182. Roth W, Kumar V, Beer HD, Richter M, Wohlenberg C, Reuter U, et al. Keratin 1 maintains skin integrity and participates in an inflammatory network in skin through interleukin-18. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 22):5269-79.
183. Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Hagel LM, Podgorny P, et al. Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy.* 2012;14(10):1258-75.
184. Olivares-Morales MJ, De La Fuente MK, Dubois-Camacho K, Parada D, Diaz-Jimenez D, Torres-Riquelme A, et al. Glucocorticoids Impair Phagocytosis and Inflammatory Response Against Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli. *Front Immunol.* 2018;9:1026.
185. Ozkan O, Ozkan O, Dogan NU, Bahceci M, Mendilcioglu I, Boynukalin K, et al. Birth of a Healthy Baby 9 Years After a Surgically Successful Deceased Donor Uterus Transplant. *Ann Surg.* 2022;275(5):825-32.
186. Chen X, Lu Y, Chen T, Li R. The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:631972.
187. Mouraux S, Bernasconi E, Pattaroni C, Koutsokera A, Aubert JD, Claustre J, et al. Airway microbiota signals anabolic and catabolic remodeling in the transplanted lung. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(2):718-29 e7.
188. Fuhler GM. The immune system and microbiome in pregnancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2020;44-45:101671.
189. Song SJ, Wang J, Martino C, Jiang L, Thompson WK, Shenhav L, et al. Naturalization of the microbiota developmental trajectory of Cesarean-born neonates after vaginal seeding. *Med.* 2021;2(8):951-64 e5.
190. Akagawa S, Kaneko K. Gut microbiota and allergic diseases in children. *Allergol Int.* 2022;71(3):301-9.

191. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med.* 2016;22(7):713-22.
192. Nakaya M, Tachibana H, Yamada K. Effect of estrogens on the interferon-gamma producing cell population of mouse splenocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70(1):47-53.
193. Channappanavar R, Fett C, Mack M, Ten Eyck PP, Meyerholz DK, Perlman S. Sex-Based Differences in Susceptibility to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *J Immunol.* 2017;198(10):4046-53.
194. Xanthoulea S, Pasparakis M, Kousteni S, Brakebusch C, Wallach D, Bauer J, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. *J Exp Med.* 2004;200(3):367-76.
195. Du M, Wang W, Huang L, Guan X, Lin W, Yao J, et al. Natural killer cells in the pathogenesis of preeclampsia: a double-edged sword. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2022;35(6):1028-35.





## Case Report: Post-Partum SARS-CoV-2 Infection After the First French Uterus Transplantation

Jean Marc Ayoubi<sup>1\*</sup>, Marie Carbonnel<sup>1</sup>, Niclas Kvarnström<sup>2</sup>, Aurelie Revaux<sup>1</sup>, Marine Poulain<sup>1</sup>, Sarah Vanlieferinghen<sup>1</sup>, Yves Coatantiec<sup>3</sup>, Mathilde Le Marchand<sup>4</sup>, Morgan Tourne<sup>5</sup>, Paul Pirtea<sup>1</sup>, Renaud Snanoudj<sup>6</sup>, Morgan Le Guen<sup>7</sup>, Pernilla Dahm-Kähler<sup>8</sup>, Catherine Racowsky<sup>9</sup> and Mats Brännström<sup>3,10</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics Gynecology and Reproductive Medicine, Foch Hospital - Paris Ouest Medicine University (UVSQ), Suresnes, France, <sup>2</sup>Department of Transplantation, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden, <sup>3</sup>Neonatal Care Unit, Foch Hospital, Suresnes, France, <sup>4</sup>Department of Clinical Research, Foch Hospital, Suresnes, France, <sup>5</sup>Department of Pathology, Hospital - Paris Ouest Medicine University (UVSQ), Suresnes, France, <sup>6</sup>Department of Nephrology and Transplantation, Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France, <sup>7</sup>Department of Anesthesiology, Foch Hospital - Paris Ouest Medicine University (UVSQ), Suresnes, France, <sup>8</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden, <sup>9</sup>Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA, <sup>10</sup>Stockholm IVF-EUGIN, Stockholm, Sweden

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Andrea Tinelli,  
Xi'an Jiaotong University, China

#### Reviewed by:

Stefan Guenther Tullius,  
Brigham and Women's Hospital,  
Harvard Medical School,  
United States  
Heloise Delagrèverie,  
AP-HP, France

#### \*Correspondence:

Jean Marc Ayoubi  
jm.ayoubi@hopital-foch.com

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Obstetrics and Gynecological  
Surgery, a section of the journal  
Frontiers in Surgery

Received: 13 January 2022

Accepted: 11 April 2022

Published: 28 June 2022

#### Citation:

Ayoubi JM, Carbonnel M,  
Kvarnström N, Revaux A, Poulain M,  
Vanlieferinghen S, Coatantiec Y, Le  
Marchand M, Tourne M, Pirtea P,  
Snanoudj R, Le Guen M, Dahm-  
Kähler P, Racowsky C and  
Brännström M (2022) Case Report:  
Post-Partum SARS-CoV-2 Infection  
After the First French Uterus  
Transplantation.  
Front. Surg. 9:854225.  
doi: 10.3389/fsurg.2022.854225

Absolute uterus factor infertility, whether congenital or acquired, renders the woman unable to carry a child. Although uterus transplantation (UTx) is being increasingly performed as a non-vital procedure to address this unfortunate condition, the immunosuppression required presents risks that are further compounded by pregnancy and during the puerperium period. These vulnerabilities require avoidance of SARS-CoV-2 infection in pregnant UTx recipients especially during the third trimester, as accumulating evidence reveals increased risks of morbidity and mortality. Here we describe a successful UTx case with delivery of a healthy child, but in which both mother and neonate developed asymptomatic SARS-CoV-2 infection seven days after RNA vaccination, on day 35 post-partum. Although the patient was successfully treated with a combination therapy comprised of two monoclonal antibodies, this case highlights the challenges associated with performing UTx in the era of Covid-19. More broadly, the risks of performing non-vital organ transplantation during a pandemic should be discussed among team members and prospective patients, weighing the risks against the benefits in improving the quality of life, which were considerable for our patient who achieved motherhood with the birth of a healthy child.

**Keywords:** uterus transplantation, immunotherapy, COVID-19, SARS-CoV-2, case report

### INTRODUCTION

Uterine factor infertility (UFI), a condition estimated to affect 1%–5% of women, is classified either as congenital or acquired. Absolute uterine factor infertility (AUFI), which renders the patient unable to carry a pregnancy successfully, affects approximately 1 in 500 women (1). Among them, Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome with uterine agenesis affects 1 in 4,500 births.

Until recently, the only option for patients with UFI to have biologically related children was through surrogacy, which is banned in many countries and unregulated in others. However, after the first live birth following uterus transplantation (UTx) in 2014 (2), patients suffering from AUI now have this promising alternative to carry their own child. With 64 published UTx procedures and 24 live births from 15 countries, this transplantation procedure is being increasingly performed, with UTx programs being established by many teams around the world (3).

The SARS-CoV-2 pandemic has significantly impacted solid organ transplantation (SOT) as immunosuppression therapy and associated co-morbidities are responsible for increased risks of severity and mortality (4). Moreover, SARS-CoV-2 infection in the third trimester of pregnancy is associated with an increased risk of maternal and neonatal complications (5). Thus, pregnant UTx recipients who contract SARS-CoV-2 are at potentially high risk of complications. Here we present a patient who underwent successful UTx and delivery of a healthy live born. However, both she and her child contracted the virus in the puerperium period. Despite asymptomatic, our case highlights the risks associated with performing a non-vital organ transplantation procedure in the era of this unprecedented global pandemic.

## CASE REPORT

This study was approved by the Ethics Committee of Paris University in November 2016 (Hôtel Dieu CPP), IRB number IORG0008387.

### The Patient and Her Donor

The patient was a 34-year-old with MRKH syndrome type 1 and no comorbidity. She was identified with MRKH on imaging (the presence of normal ovaries but absent uterus) when she presented with primary amenorrhea at age 17 years of age. She and her 31-year-old husband were first seen in our clinic in 2018 January, expressing the desire to have a biologically related child with UTx. As use of a gestational carrier is not permitted in France, the only option for our couple to achieve this goal was to proceed with UTx after undergoing in vitro fertilization (IVF) and a subsequent thawed embryo transfer.

Our patient's uterus donor was her 57-year-old mother, who had no severe comorbidity. She was gravida 3, para 3; all three pregnancies were normal and resulted in vaginal deliveries. Both the recipient and donor met the inclusion criteria of our UTx clinical trial (N° NCT03689842) (6).

### Psychological Counselling and Evaluation

Prior to signing informed consent, the medical team and a multidisciplinary independent committee provided extensive counselling to both patient and mother regarding surgical risks, medical management both prior to and after surgery, and the likelihood of a successful transplantation and birth of a healthy child. Both the patient and her donor had individual interviews with the psychologist to evaluate their ability to

participate in the UTx trial and to ensure that there was no undue familial pressure, especially to the mother. After the first and second interview (following a 3-month reflection period), the multidisciplinary uterine transplantation committee decided that the patient, her husband, and mother were eligible to proceed with the treatment.

Psychological support was provided to all three individuals throughout the entire process. Psychological follow up was performed by a dedicated psychologist at each medical appointment using standardized surveys (SF36 for quality of life and HADS for anxiety and depression for the patient, her husband and donor; and FertiQoL for the fertility quality of life for the patient and her husband).

### Clinical Evaluation

Serology for HHV8 were negative for both donor and patient, and Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, HHV6, toxoplasma and VZV were positive for both. Gynecological examination with sampling for sexually transmitted diseases, including high-risk human papilloma virus and herpes simplex virus PCR, were negative. The donor's cervical smear was normal. The patient had a Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) profile. The patient and donor blood groups matched (O+), and they shared eight HLA antigens. Tests for anti-HLA reactive antibodies (with Luminex Single Antigen) and flow cytometry cross-match were negative.

An endometrial biopsy and transvaginal ultrasound revealed a normal uterus in the donor. Conventional angiography successfully confirmed absence of arteriosclerosis and appropriate diameters of the proximal portion of uterine arteries at 1.88 millimeters on the right and 2.25 millimeters on the left. The donor received 3 months of hormone replacement therapy before UTx.

In all, the pre-transplantation process lasted 14 months.

### In Vitro Fertilization

Because preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) is not permitted in France, aggressive ovarian stimulation in two cycles of *in vitro* fertilization (IVF) was performed to ensure enough embryos were frozen for our patient. After the first cycle, 77 oocytes were retrieved from which 34 blastocysts fulfilled our criteria for cryopreservation. However, 29 (85%) showed abnormal developmental kinetics or abnormal developmental phenotypes by time-lapse imaging, despite being suitable for cryopreservation. These abnormalities have been associated with decreased implantation potential (7). We therefore proceeded with a second IVF cycle, from which 44 oocytes were retrieved and 23 blastocysts were frozen; 18 (78%) showed abnormal kinetics and/or abnormalities. In total, 57 blastocysts were frozen, but only 12 revealed no developmental abnormalities. The patient experienced mild ovarian hyperstimulation syndrome in both cycles.

### UTx Surgery

The UTx was performed on March 31, 2019.

**The Donor**

Initial dissection of vessels, achieved using robotic-assisted laparoscopy as used in radical hysterectomy, followed the same steps as described by the Swedish team, including an extensive bilateral ureterolysis (8,9). Final dissection and clamping of vessels was performed after conversion with an infra-umbilical midline incision. The anterior branches of the internal iliac arteries, a patch of the internal iliac vein and uterine branch of the utero-ovarian veins, were clamped bilaterally. On the right side, both uterine and utero-ovarian veins were prepared to allow sufficient venous outflow. On the left, only the uterine vein was prepared. The surgery was completed after 13 h, with blood loss of 150 mL. After two days in the ICU, the donor was discharged on day 11 of post-operative care but required readmission on day 16 for an E. Coli pyelonephritis and sepsis, which was treated with 10 days of iv antibiotics. A left side distal ureteral injury necessitated a ureteral stent on day 17 and six months later, a ureteral reimplantation was necessary because of ureteral stenosis.

The SF36 quality of life survey results for the donor showed a decreased average score 1-month post-hysterectomy compared with that before surgery (60% versus 92%, respectively). However, the score rebounded and had stabilized to 90% by 3 months. Her HADS scores ( $\leq 7$ ) indicated no sign of anxiety

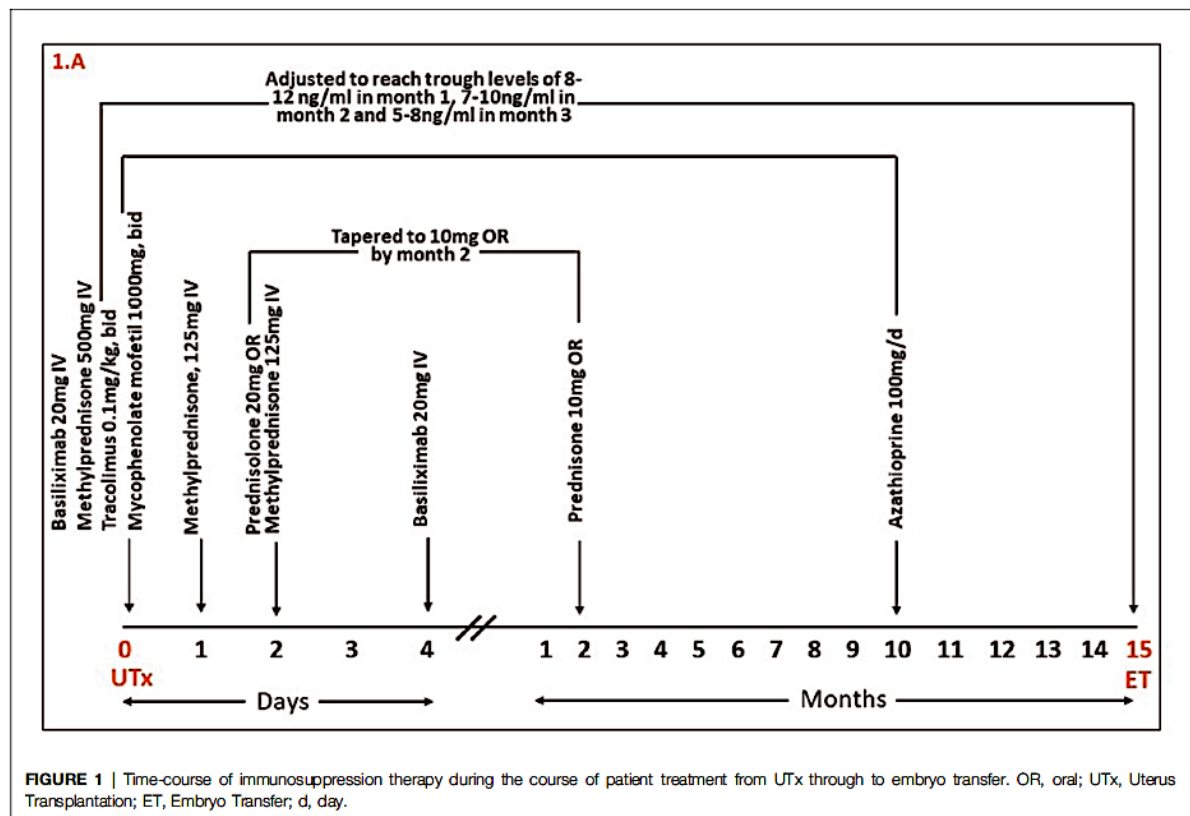
or depression except during the week before the UTx, when her anxiety score was 9.

**The Patient**

Surgical steps for the UTx were as previously described (10). A laparotomy through a sub-umbilical median incision was performed in the patient. The uterine graft was placed in an orthotopic position and bilateral end-to-side vascular anastomosis was performed between segments of the internal iliac vessels of the graft and the external iliac vessels. The surgery proceeded uneventfully (blood loss of 200 mL) and was completed after 6.5 h. The total ischemic time of the uterine graft was 3 h (1 h cold ischemia and 2 h warm ischemia). Following two days in the ICU, the patient was discharged 11 days post-op.

**Immunosuppression Therapy and Patient Follow-Up**

Administration of immunosuppression therapies are summarized in Figure 1. Immunosuppression was achieved with Basiliximab (Simulect\*, Novartis) on days 0 and 4; methylprednisolone (Mylan) on days 0 and 1; and prednisolone thereafter. The patient also received mycophenolate mofetil (MMF; Cellcept\*, Roche) and tacrolimus (Adoport\*, Sandoz) from day 0, which was



**FIGURE 1 |** Time-course of immunosuppression therapy during the course of patient treatment from UTx through to embryo transfer. OR, oral; UTx, Uterus Transplantation; ET, Embryo Transfer; d, day.

adjusted to reach trough levels of 8–12 ng/mL during the first month, 7–10 ng/mL during the second and third month and then 5–8 ng/mL thereafter. MMF was switched to Azathioprine (Imurel®, HAC Pharma) 10 months after UTx and 2 months before the planned embryo transfer, to avoid potentially teratogenic effects of MMF on the fetus.

Acetylsalicylic acid (ASA) and heparin were administered from the day after surgery. Heparin was stopped after 5 weeks, while ASA was stopped 5 days before the C-section, after which it was resumed and will continue until graft removal. As shown in Table 1A, rejection was evaluated with cervical biopsies (according Mölne’s classification) (11) and donor specific antibodies (DSA). Regular clinical evaluation, cervical biopsies, pelvic ultrasonography and blood tests, including assessment of tacrolimus serum levels, were also performed. Frequencies of these evaluations are shown in Table 1B.

The patient’s first menstruation occurred spontaneously 14 days after the UTx with regular menstruation thereafter. The endometrium showed typical changes in thickness, and blood flow velocity waveforms of uterine arteries were within the low to normal range throughout the observation period. No episode of rejection was noticed. Due to the SARS-CoV-2 pandemic and the first French lockdown, embryo transfer was delayed for 3 months, from 12 to 15 months post-UTx.

### Pregnancy

After transfer of one blastocyst to the uterus with an endometrial thickness of 12 mm, the patient conceived and was treated with oral folic acid, vaginal progesterone

(Utrogestan®, Besins international, 400 mg × 2/d, for 12 weeks) and subcutaneous progesterone (Progiron®, Genevier, 25 mg/d for 5 days) (12). During the first trimester, minimal vaginal bleeding occurred (brown discharge, treated with progesterone [25 mg s.c./d] from 8 to 12 weeks of gestation). Fetal growth and blood flow of uterine and umbilical arteries were normal throughout pregnancy. A unilateral adrenal anechoic cyst of diameter 9.7 mm was observed on the 29-week ultrasound and grew to 18 mm by week 32. Creatinine concentrations increased during pregnancy; serum tacrolimus concentrations tended to decrease during the first trimester requiring a doubling in dose thereafter (Figure 2).

The patient was admitted at 30 weeks and 4 days due to increased uterine contractions, and cardiotocography showed occasional variable decelerations. The cervical length was initially 70 mm and remained stable during the hospitalization. Her medications and clinical presentation during hospitalization are summarized in Figure 3. A subacute Cesarean section was performed at 32+4 weeks due to high blood pressure and increased creatine concentrations. Only mild adhesions were observed, and the C-section was uneventful. A healthy girl (1845 g, 42 cm) was delivered with Apgar scores of 7/8/10. The umbilical artery pH was 6.94 with normalization 1 h later. Histological examination showed a normotrophic placenta with disorders of the utero-placental vascularization, but absence of chorioamnionitis. The uterus was retained because the patient expressed her intention to have a second child.

The SF36 quality of life scores for the patient and her husband were good during the entire process (an average of 73% for the patient despite lower scores on physical limitations [60%], and 79% for her husband). Both their HAD scores that revealed no sign of anxiety or depression (scores ≤7). Mean Fertiqol scores were 87.1% for the patient and 79% for her husband.

### Postpartum

Acute renal failure and high blood pressure resolved 1 and 3 weeks, respectively, after delivery (Figure 3). Proteinuria occurred transiently, and the SFlt-1/plgf ratio (a biomarker of preeclampsia) was positive. The neonate was in good condition and stayed on room air although she had a bilateral inguinal hernia. Both the patient and baby were discharged on day 48 post-delivery. During hospitalization, our patient wore a FFP2/N95 respiratory mask and was only visited by her husband. She and all health care workers regularly used hydro-alcoholic hand rub gel and respected social distancing when feasible.

Per our hospital protocols, three systematic RT-PCR tests were performed on day 0, 2 and 7 of hospitalization for all patients; anyone who tested positive was triaged into a dedicated ward where 70% of healthcare workers had received at least one dose of SARS-CoV-2 vaccination (13). Tests on all three days for our patient were negative and she received one injection of mRNA vaccine (BNT162b2; Comirnaty®, Pfizer-BioNTech) on day 28 post-partum. However, both she and her baby tested positive for SARS-CoV-2 infection the day before planned discharge (day 35 post-partum), although both were asymptomatic (her

TABLE 1 | Patient management after UTx and during gestation.

Table 1A Timeline for patient management between UTx and achievement of pregnancy

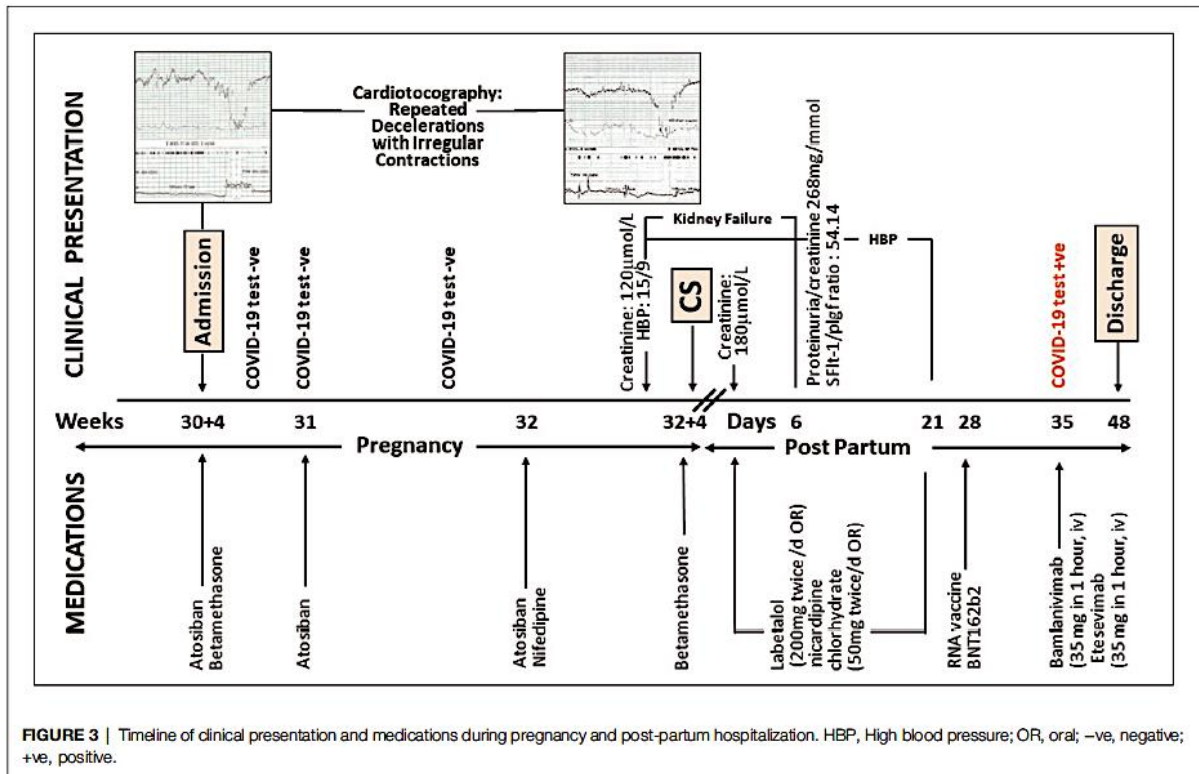
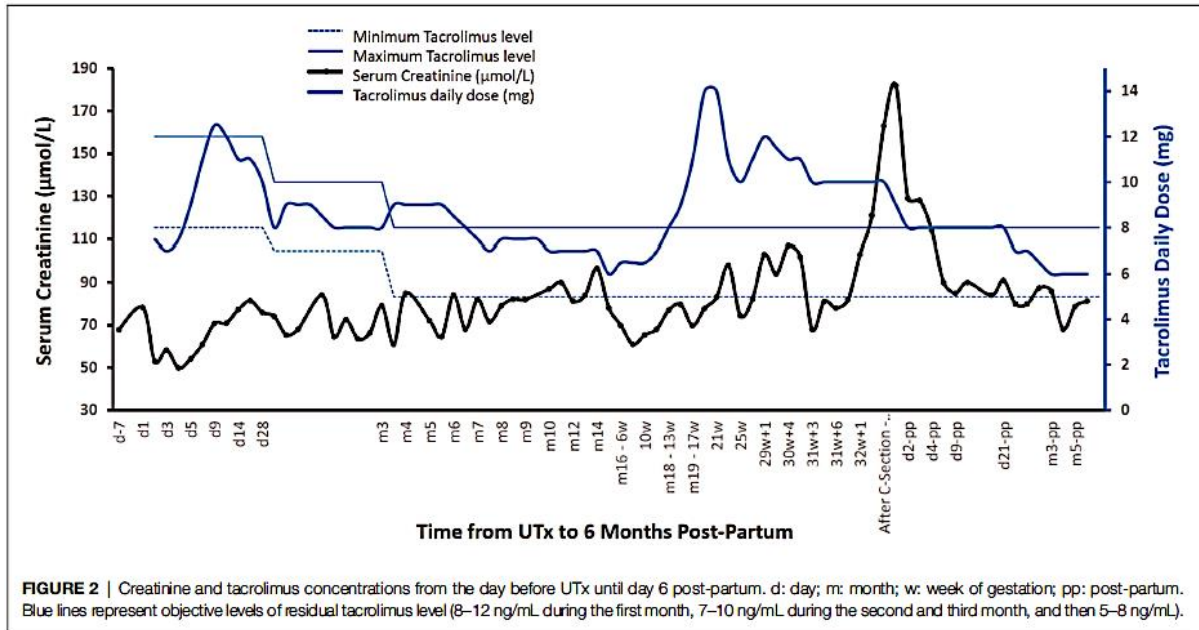
Variable	Month Post-UTx Before Pregnancy														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CBx	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
U/S	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
TAC	10	5	4	3	2	2	2	2	2	1	2	0	1	1	1
Visits	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
DSA	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Table 1B Timeline for patient management during gestation

Variable	Month of Gestation						
	1	2	3	4	5	6	7
CBx		←-1→				←-0→	
U/S	1	0	1	0	1	1	1
TAC	2	3	2	2	2	3	6
Visits	2	1	1	1	2	2	N/A
DSA	0	0	1	0	0	0	0

CBx, Cervical Biopsy; U/S, Ultrasound; TAC, Tacrolimus; DSA, Donor Specific Antibodies.

Fetal heart monitoring from 29 weeks of gestation.



previous test was negative on day 21 post-partum and still positive 45 days post-partum). Azathioprine to the patient was stopped for 4 days and a combination of two monoclonal antibodies, Bamlanivimab and Etesevimab, started. She was finally discharged with her baby 48 days post-partum and tested negative for SARS-CoV-2 1.5 months later. She received her second injection of mRNA vaccine (Cominati®, Pfizer-BioNTech) 3 months after testing positive; 2.5 months later, her blood SARS-CoV-2 antibodies were 8932 Ua/mL. The baby weighed 2976 g at discharge and underwent bilateral inguinal hernia repair at age 3 months without complications; her adrenal cyst disappeared at 4 months.

The patient and donor individually expressed complete satisfaction with their treatment outcomes, culminating in the birth of their healthy daughter/granddaughter. Team members were fully satisfied with the entire process, even though they were stressed by the realization that the first UTx case in France was being performed with the increased risks of complications to the patient if she contracted SARS-CoV-2.

## DISCUSSION

We present a case of post-partum SARS-CoV-2 infection after UTx. Although SOT recipients have been reported to be at higher risk of severe SARS-CoV-2 infection, information is lacking regarding the risk of such infection in UTx patients (14). A recent meta-analysis confirmed that SARS-CoV-2 infection is associated with significantly increased risks of morbidity and mortality in SOT recipients (15), which may partially be explained by the higher incidence of comorbidities in this population. Although our patient had no comorbidities, she was immunosuppressed and thus more susceptible to infection. Taken together, our observations support the need for great caution and extensive counseling to prospective UTx recipients regarding the risks associated with SARS-CoV-2 infection before undertaking this non-vital organ transplantation in the era of the pandemic.

UTx combines two major risk factors: immunosuppressive therapy and pregnancy. The physiological changes that occur during pregnancy increase susceptibility to infection in the puerperium period (16), which may partly explain why our patient tested positive for SARS-CoV-2. The origin of her nosocomial infection remains unidentified, although we assume that incomplete vaccination of our medical health workers was involved. Of note, vaccines in France only became available to the public in January 2021, one month before our patient's delivery.

Despite some disagreement that immunosuppression is a risk factor of severe COVID-19 disease after SOT (17,18), immunomodulatory therapies have been used to treat severe cases because they reduce the inflammatory response by blunting excessive cytokine release (19). In our case, daily steroids were used prophylactically, yet our patient still developed SARS-CoV-2 infection, albeit asymptotically. This steroid therapy, combined with treatment of two neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 with proven efficacy in reducing viral load in mild to moderate (20,21), as well as

asymptomatic (21) SARS-CoV-2 infections, may have collectively reduced the severity of her disease.

Early monoclonal antibody therapy has previously been shown to have favorable outcomes in SOT recipients with minimal adverse effects and no graft rejections (22). Of note, this treatment is recommended by the National Institutes of Health in the United States, for mild and moderate COVID-19 disease in SOT recipients (23). As highlighted in these recommendations, clinicians should pay careful attention to potential drug-drug interactions and overlapping toxicities with immunosuppressants, prophylactic antimicrobials, and other medications when treating SARS-CoV-2 infection in transplantation patients.

The one-week interval between our patient's first dose of mRNA vaccine and her positive SARS-CoV-2 test was too short to allow an adequate neutralizing antibody response as the IgG response starts after 10 days (24). However, 2.5 months after her second vaccination, her antibody level reached a level sufficient for good coverage, at least for a few months. The antibody response in patients after transplantation is lower than in the general population, which may be associated with their immunosuppressive state (25). A third dose of mRNA vaccine (given at least 4 weeks after the second dose) is currently recommended by the Centers for Disease Control and Prevention for SOT recipients (23).

As with other UTx pregnancies (14), our patient experienced some adverse outcomes, including prematurity and inguinal hernia in the neonate. Obstetricians need to be aware that UTx patients do not feel contractions and so must be especially vigilant regarding the possibility of premature delivery. Our patient also experienced preeclampsia and acute renal failure, which were likely attributable to a renal vasoconstrictive effect of tacrolimus and/or to the uterine graft itself. For all these reasons, intensive follow up of the pregnancy is required by a multidisciplinary team including obstetricians, nephrologists, and specialists in neonate intensive care.

Despite the complications, the extensive surveillance and treatments, the uncertainty of success and the risks associated with a possible SARS-CoV-2 infection, our patient, her husband, and her donor were all satisfied with the entire process, as evidenced by the good quality of life scores and no excessive anxiety. Our observations confirm their determination and highlight the importance of childbearing for those wishing to bear a child who suffer from AUF1.

In conclusion, our patient had a successful UTx which enabled her to carry a child. She suffered premature contractions, high blood pressure and increased creatine levels at 32 + 3 weeks, which together led to premature delivery by C-section at 32 + 4 weeks. She contracted an asymptomatic SARS-CoV-2 infection in the puerperium period, which was successfully treated with a combination of two monoclonal antibodies. The primary take-away points from our case are: (1) UTx is an alternative to childlessness or surrogacy for patients suffering from AUF1; (2) Due to their immunosuppressive state, UTx recipients should be adequately informed of the potential high risk of SARS-CoV-2 complications, which may become more severe with pregnancy; (3) In case of severe cases, the additional risks

associated with pregnancy, which is sole goal of UTX, must be extensively covered including the possibility of transplantectomy; (4) UTX recipients who test positive for COVID-19, even when asymptomatic, should be treated with monoclonal antibodies within the first 5 days of infection; (5) Postponement of a non-vital transplantation such as UTX should be discussed with prospective recipients but balanced against their desire to conceive.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Hôtel Dieu CPP IRB number IORG0008387. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## REFERENCES

1. Sieunarine K, Zakaria FB, Boyle DC, Corless DJ, Noakes DE, Lindsay I, et al. Possibilities for fertility restoration: a new surgical technique. *Int Surg.* (2005) 90(5):249–56. PMID: 16624951
2. Brannstrom M, Johannesson L, Bokstrom H, Kvarnstrom N, Molne J, Dahm-Kahler P, et al. Livebirth after uterus transplantation. *Lancet (London, England).* (2015) 385(9968):607–16. doi: 10.1016/s0140-6736(14)61728-1
3. Brannstrom M, Belfort MA, Ayoubi JM. Uterus transplantation worldwide: clinical activities and outcomes. *Curr Opin Organ Transplant.* (2021) 26(6):616–26. doi: 10.1097/MOT.0000000000000936
4. Azzi Y, Bartash R, Scalea J, Loarte-Campos P, Akalin E. COVID-19 and solid organ transplantation: a review article. *Transplantation.* (2021) 105(1):37–55. doi: 10.1097/TP.00000000000003523
5. Villar J, Ariff S, Gunier RB, Thiruvengadam R, Rauch S, Kholin A, et al. Maternal and neonatal morbidity and mortality among pregnant women with and without COVID-19 infection: the INTERCOVID multinational cohort study. *JAMA Pediatr.* (2021) 175(8):817–26. doi: 10.1001/jamapediatrics.2021.1050
6. Carbonnel M, Revaux A, Menzhulina E, Karpel L, Snanoudj R, Le Guen M, et al. Uterus transplantation with live donors: screening candidates in one French center. *J Clin Med.* (2020) 9(6):2001. doi: 10.3390/jcm9062001
7. Minasi MG, Greco P, Varricchio MT, Barillari P, Greco E. The clinical use of time-lapse in human-assisted reproduction. *Ther Adv Reprod Health.* (2020) 14:2633494120976921. doi: 10.1177/2633494120976921
8. Carbonnel M, Dahm-Kahler P, Revaux A, Brannstrom M, Ayoubi JM. Adapting surgical skills from robotic-assisted radical hysterectomy in cervical cancer to uterine transplantation: a look to an optimistic future! *J Robot Surg.* (2020) 14(6):841–7. doi: 10.1007/s11701-020-01058-7
9. Brannstrom M, Kvamstrom N, Groth K, Akouri R, Wiman L, Enskog A, et al. Evolution of surgical steps in robotics-assisted donor surgery for uterus transplantation: results of the eight cases in the Swedish trial. *Fertil Steril.* (2020) 114(5):1097–107. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.05.027
10. Brannstrom M, Dahm-Kahler P, Ekberg J, Akouri R, Groth K, Enskog A, et al. Outcome of recipient surgery and 6-month follow-up of the Swedish live donor robotic uterus transplantation trial. *J Clin Med.* (2020) 22(9):2338. doi: 10.3390/jcm9082338
11. Molne J, Broecker V, Ekberg J, Nilsson O, Dahm-Kahler P, Brannstrom M. Monitoring of human uterus transplantation with cervical biopsies: a

Written informed consent was obtained from the individual for the publication of any potentially 303 identifiable images or data included in this article.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC was responsible for data collection and wrote the paper. NK, AR, MP, SV, YC, MLM, MT, PP, RS, MLG and PD-K collected data. JMA, MB, CR supervised and wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

The study was supported by Foch foundation.

## ACKNOWLEDGMENTS

Department of clinic research Foch Hospital

- provisional scoring system for rejection. *Am J Transplant.* (2017) 17(6):1628–36. doi: 10.1111/ajt.14135
2. de Ziegler D, Pirtea P, Ayoubi JM. Implantation failures and miscarriages in frozen embryo transfers timed in hormone replacement cycles (HRT): a narrative review. *Life (Basel).* (2021) 11(12):1357. doi: 10.3390/life11121357
3. Murtada R, Carbonnel M, Revaux A, Favre-Inhofer A, Ayoubi JM. Managing a department of obstetrics and gynecology in times of COVID-19 outbreak: the Foch hospital experience. *Front Surg.* (2021) 8:564145. doi: 10.3389/fsurg.2021.564145
4. Richards EG, Farrell RM, Ricci S, Perni U, Quintini C, Tzakis A, et al. Uterus transplantation: state of the art in 2021. *J Assist Reprod Genet.* (2021) 38(9):2251–9. doi: 10.1007/s10815-021-02245-7
5. Ao G, Wang Y, Qi X, Nasr B, Bao M, Gao M, et al. The association between severe or death COVID-19 and solid organ transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Transplant Rev (Orlando).* (2021) 35(3):100628. doi: 10.1016/j.trre.2021.100628
6. Vojtek I, Dieussaert I, Doherty TM, Franck V, Hanssens L, Müller J, et al. Maternal immunization: where are we now and how to move forward? *Ann Med.* (2018) 50(3):193–208. doi: 10.1080/07853890.2017.1421320
7. Chavarot N, Gueguen J, Bonnet G, Jdidou M, Trimaille A, Burger C, et al. COVID-19 severity in kidney transplant recipients is similar to nontransplant patients with similar comorbidities. *Am J Transplant.* (2021) 21(3):1285–94. doi: 10.1111/ajt.16416
8. Caillard S, Chavarot N, Francois H, Matignon M, Greze C, Kamar N, et al. Is COVID-19 infection more severe in kidney transplant recipients? *Am J Transplant.* (2021) 21(3):1295–303. doi: 10.1111/ajt.16424
9. Group RC, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, et al. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med.* (2021) 384(8):693–704. doi: 10.1056/NEJMoa2021436
10. Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, Boscia J, Heller B, Morris J, et al. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. *JAMA.* (2021) 325(7):632–44. doi: 10.1001/jama.2021.0202
11. O'Brien MP, Forleo-Neto E, Musser BJ, Isa F, Chan KC, Sarkar N, et al. Subcutaneous REGEN-COV antibody combination to prevent Covid-19. *N Engl J Med.* (2021) 385(13):1184–95. doi: 10.1056/NEJMoa2109682
12. Yetmar ZA, Beam E, O'Horo JC, Ganesh R, Bierle DM, Brumble L, et al. Monoclonal antibody therapy for COVID-19 in solid organ transplant recipients. *Open Forum Infect Dis.* (2021) 8(6):ofab255. doi: 10.1093/ofid/ofab255

23. COVID-19 Treatment Guidelines Panel. *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) treatment guidelines*. National Institutes of Health (2022). Available at <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>.
24. Lustig Y, Sapir E, Regev-Yochay G, Cohen C, Fluss R, Olmer L, et al. BNT162b2 COVID-19 vaccine and correlates of humoral immune responses and dynamics: a prospective, single-centre, longitudinal cohort study in health-care workers. *Lancet Respir Med*. (2021) 9(9):999–1009. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00220-4
25. Yi SG, Moore LW, Eagar T, Graviss EA, Nguyen DT, Ibrahim H, et al. Risk factors associated with an impaired antibody response in kidney transplant recipients following 2 doses of the SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *Transplant Direct*. (2022) 8(1):e1257. doi: 10.1097/TXD.0000000000001257

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Ayoubi, Carbonnel, Kvamström, Revaux, Poulain, Vanlieferinghen, Coatantiec, Le Marchand, Tourne, Pirtea, Snanoudj, Le Guen, Dahm-Kähler, Racowsky and Brännström. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## Annexe 2 : article “Impact de la COVID-19 sur les thromboses placentaires infracliniques et les facteurs maternels thrombotiques » (147)

### Article

## Impact of COVID-19 on Subclinical Placental Thrombosis and Maternal Thrombotic Factors

Marie Carbonnel <sup>1,2,\*</sup>, Camille Daclin <sup>1,†</sup>, Morgan Tourne <sup>2,3</sup>, Emmanuel Roux <sup>4</sup>, Mathilde Le-Marchand <sup>4</sup>, Catherine Racowsky <sup>4</sup>, Titouan Kennel <sup>4</sup>, Eric Farfour <sup>6</sup>, Marc Vasse <sup>6,7</sup> and Jean-Marc Ayoubi <sup>1,2</sup>

- <sup>1</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Foch, 40, Rue Worth, 92150 Suresnes, France; camille.daclin@wanadoo.fr (C.D.); cracowsky@bwh.harvard.edu (C.R.); jm-ayoubi@hopital-foch.com (J.-M.A.)
  - <sup>2</sup> Medical School, University of Versailles, Saint-Quentin-en-Yvelines, 55, Avenue de Paris, 78000 Versailles, France; m.tourne@hopital-foch.com
  - <sup>3</sup> Department of Pathology, Hospital Foch, Hospital Foch, 40, Rue Worth, 92150 Suresnes, France
  - <sup>4</sup> Department of Clinic Research, Hospital Foch, 40, Rue Worth, 92150 Suresnes, France; e.roux@hopital-foch.com (E.R.); m.le-marchand@hopital-foch.com (M.L.-M.); t.kennel@hopital-foch.com (T.K.)
  - <sup>5</sup> Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02115, USA
  - <sup>6</sup> Department of Clinical Biology, Hospital Foch, 40, Rue Worth, 92150 Suresnes, France; e.farfour@hopital-foch.com (E.F.); m.vasse@hopital-foch.com (M.V.)
  - <sup>7</sup> UMR-S 1176, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Paris-Saclay, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France
- \* Correspondence: carbonnelmarie@gmail.com  
† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Carbonnel, M.; Daclin, C.; Tourne, M.; Roux, E.; Le-Marchand, M.; Racowsky, C.; Kennel, T.; Farfour, E.; Vasse, M.; Ayoubi, J.-M. Impact of COVID-19 on Subclinical Placental Thrombosis and Maternal Thrombotic Factors. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 4067. <https://doi.org/10.3390/jcm11144067>

Academic Editor: Yoav Yinon

Received: 2 June 2022

Accepted: 9 July 2022

Published: 14 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Background: In the context of the SARS-CoV-2 pandemic, our interest was to evaluate the effect of COVID-19 during pregnancy on placenta and coagulation factors. Methods: a prospective cohort study between January and July 2021 of 55 pregnant women stratified into: Group O, 16 patients with ongoing SARS-CoV-2 infection at delivery; Group R, 21 patients with a history of SARS-CoV-2 infection during pregnancy but who recovered prior to delivery; Group C, 18 control patients with no infection at any time. All women had nasopharyngeal SARS-CoV-2 RT-PCR tests performed within 72 h of delivery. Obstetrical complications were recorded and two physiological inhibitors of coagulation, protein Z (PZ) and dependent protease inhibitor (ZPI), were analyzed in maternal and cord blood. All placentae were analyzed by a pathologist for vascular malperfusion. Results: No patient in any group had a severe COVID-19 infection. More obstetrical complications were observed in Group O (O:  $n = 6/16$  (37%), R:  $n = 2/21$  (10%), C:  $n = 1/18$  (6%),  $p = 0.03$ ). The incidence of placental vascular malperfusion was similar among the groups (O:  $n = 9/16$  (56%), R:  $n = 8/21$  (42%), C:  $n = 8/18$  (44%),  $p = 0.68$ ). No PZ or ZPI deficiency was associated with COVID-19. However, an increased ZPI/PZ ratio was observed in neonates of Group R (O: 82.6 (min 41.3–max 743.6), R: 120.7 (29.8–203.5), C: 66.8 (28.2–2043.5),  $p = 0.04$ ). Conclusion: COVID-19 was associated with more obstetrical complications, but not an increased incidence of placental lesions or PZ and ZPI abnormalities.

**Keywords:** COVID-19; pregnancy; placental vascular pathology; thrombotic; protein Z; ZPI; estradiol

### 1. Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a major public health challenge that rapidly spread around the world [1]. In the general population, the main complication of COVID-19 is an acute respiratory distress syndrome [2]. The infection also increases the risk of venous thromboembolism [3] caused by an exaggerated inflammation response called the cytokine storm.

The association of SARS-CoV-2 infection and the prothrombotic state of pregnancy due to estrogens may result in a major risk of thrombotic events [4]. This might be added to other thrombotic risk factors, such as history of thromboembolic disease, thrombophilia or obesity [4]. SARS-CoV-2 infection during pregnancy is associated with more maternal and fetal complications, including preeclampsia (OR 1.6), intrauterine growth restriction (OR 9), preterm delivery (OR 1.48) and stillbirth (OR 2.36) [5–7].

These obstetrical complications involve coagulation disorders and placental vascular pathologies [8]. There is an increased thrombin generation because of activation of a coagulation cascade in the maternal circulation due to pathological processes, including inflammation and depletion of anticoagulation proteins. Protein S, protein C and protein Z are implicated in the inhibitory control of the coagulation cascade. Protein Z (PZ) is a cofactor of a serpin, the protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI), and the PZ-ZPI complex inhibits activated factor X and has an important anticoagulant role [9]. Therefore, a deficiency in PZ or ZPI induces a prothrombotic state in general population. An altered plasma PZ concentration is also associated with adverse pregnancy outcomes (miscarriage, stillbirth, intra uterine growth restriction and preeclampsia) [10–13]. Furthermore, ZPI has an anti-inflammatory role, and there is a major increase in the level of ZPI in response to inflammation [14]. As a result, an increased ratio of ZPI/Z suggests an inflammatory state.

The above coagulation changes could lead to thrombosis and vascular abnormality of the placenta at the maternal–fetal interface. Indeed, the villous trophoblast expresses heparin sulfate, protein C and protein Z on its surface [8]. Thrombotic events of placental vessels can cause an impairment of placental perfusion, leading to fetal growth restriction, preeclampsia and fetal death. Lesions on the maternal side include placental abruption and lesions related to maternal malperfusion (increased intervillous fibrin deposition, villous infarcts . . . ). Lesions on the fetal side include vascular lesions consistent with fetal thrombo-occlusive disease, such as thrombosis of the chorionic plate, hypo-vascular and avascular villi [15,16]. Analysis of placentae from patients infected with SARS-CoV-2 showed histopathologic findings of thrombosis, infarcts and vascular wall remodeling, suggestive of placental hypoperfusion and inflammation [17–19], but did not necessarily lead to adverse pregnancy outcomes [19]. Studies also revealed rare cases of placental infection without necessarily vertical infection to the fetus [20,21].

In this prospective cohort study, we analyzed the impact of SARS-CoV-2 infection during pregnancy and during delivery on placenta histology and coagulation by studying the PZ-ZPI complex. The primary outcome was the occurrence of placental lesions, and the secondary outcome was the decrease in levels of PZ or rate of ZPI.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Approval and Registration

We designed a prospective cohort study, the MaterCov Study, in the Obstetric Department of Foch hospital (Suresnes, France). The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, as well as French statutory and regulatory laws, and received approval from the Institutional Review Board of Ouest V Rennes in December 2020 (IRB number 2020-A03115-34), and clinical trial N° NCT04726111. Patients received information about research to be performed on their biological samples and provided written informed consent to participate. Partners also provided consent for neonate clinical data and cord blood assays.

### 2.2. Participants and Data Collection

The MaterCov study included pregnant women between January and July 2021. Inclusion criteria were pregnant women carrying a singleton and with healthcare insurance, who were admitted for delivery after 20 weeks of gestation (WG). They were systematically tested with a SARS-CoV-2 RT-PCR by nasopharyngeal swab, and IGG anti SARS-CoV-2 serology was performed within 72 h before delivery. The type of SARS-CoV-2 variant was not researched. Exclusion criteria were infection by human immunodeficiency virus,

toxoplasmosis, rubeola, cytomegalovirus or syphilis during pregnancy, as well as infection by influenza virus within 10 days prior to delivery. Patients under 18 years or patients under guardianship were also excluded. For the control group, patients with comorbidities, such as diabetes, preeclampsia and high blood pressure, were also excluded. We obtained 3 groups: Group O for patients with ongoing infection during delivery; Group R for patients who developed SARS-CoV-2 infection during pregnancy and who recovered before delivery; and Group C for control patients, who had never had COVID-19.

Maternal data concerning SARS-CoV-2 infection during pregnancy were collected from a survey administered prior to inclusion or were extracted from medical records. Medical records were reviewed using the hospital's computerized database for collection of the following variables: age, body mass index (BMI) and co-morbidities before pregnancy including BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>, asthma, diabetes, high blood pressure (HBP), smoking, medical and obstetrical past history, parity and RT-PCR testing for SARS-CoV-2 virus. Variables were also collected regarding positive testing for SARS-CoV-2 virus during pregnancy, the presence of COVID-19 symptoms, severity (defined as pulmonary embolism, intensive care unit (ICU) hospitalization or maternal death), routine laboratory screens, treatments, hospitalization, maternal and fetal complications (stillbirth, HBP, preeclampsia, threat of premature delivery (TPD), intra uterine growth restriction (IUGR), mode of delivery and maternal death. Neonate variables collected included birthweight, pH at birth, presence of respiratory distress, infection, transfer to the neonatal intensive care unit (NICU) and neonatal death. One month after delivery, patients were contacted by phone and responded to a few questions about their health and that of their newborn.

### 2.3. Biological and Placenta Analysis

Peripheral blood samples were collected within the 24 h before delivery, and cord blood samples and SARS-CoV-2 RT-PCR testing of tissue on both the maternal and fetal sides of the placenta were collected at birth (Figure 1). Biological samples were analyzed by the biology department of Foch Hospital. SARS-CoV-2 RT-PCR testing was performed using Alinity M SARS-CoV-2 RT-PCR assay; Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA. SARS-CoV-2 antibody detection was conducted with the SARS-CoV-2 IgG II Quant assay, (Abbott). Maternal peripheral serum concentrations of estradiol and progesterone were performed (Chemiluminescent Microparticle Immunoassays, Abbott). The expressions of PZ and ZPI were measured by ELISA assays (ZYMUTEST™ Protein Z ELISA kit, HyphenBioMed Neeuville sur Oise, France and Human Serpin A10/ZPI DuoSet ELISA, R&D Systems, Abingdon, UK) in maternal and cord samples. Usual values of PZ (5th–95th percentiles) in healthy controls were 0.9 to 3.5 µg/mL and 50% to 158% for ZPI, and ZPI/PZ ratio was 28 to 89. We considered that PZ level < 0.9 µg/mL and protein ZPI < 50% constituted a risk factor for a pro-thrombotic state [22], while a ZPI/Z ratio ≥ 90 was a sign of inflammation [23]. All placentas underwent histopathological examination by the Anatomical Pathology Department of Foch Hospital and were examined by the same pathologist. If delivery occurred during the day, the placentae were sent fresh and secondarily fixed in formalin; if delivery occurred at night, the placentae were directly fixed in formalin. After a minimum of 24 h of fixation, macroscopic examination was performed to evaluate the membranes, umbilical cord, placental dimensions, basal plate, chorionic plate and appearance of the section slices. For each patient, two umbilical cord specimens, one membrane specimen and five placental specimens, (all formalin-fixed and paraffin-embedded), were studied microscopically by grading the following lesions according to the 2016 Amsterdam Consensus Conference: maternal vascular malperfusion lesions (villous infarction, microthrombi, decidual arteriopathy, retroplacental hematoma) and fetal vascular malperfusion lesions (subchorionic thrombosis, obliteration of chorionic plate vessels and inflammatory remodeling (acute and chronic chorioamnionitis, villitis)), separating maternal and fetal response. Lesions were considered significant when they represented more than 5% of the placental volume. The maternal COVID-19 status was known by the pathologist for safety reasons.

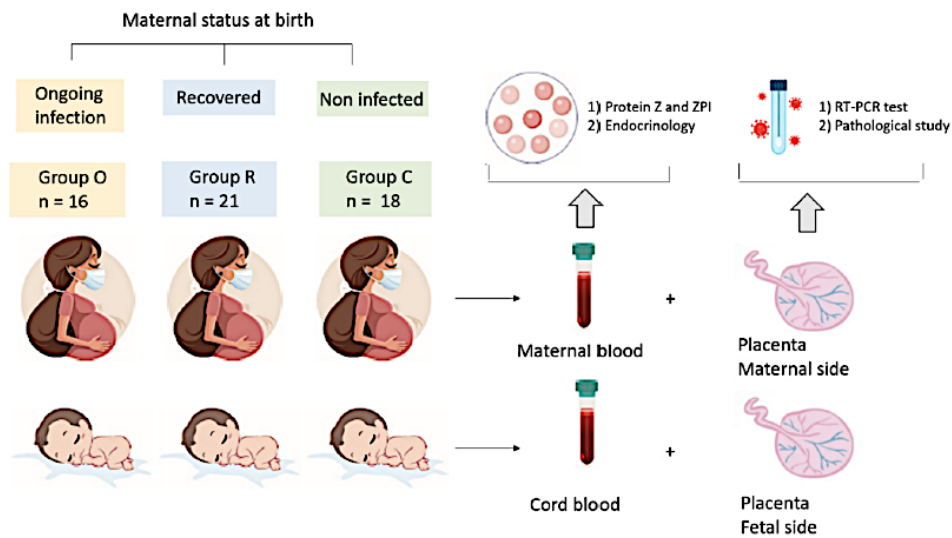


Figure 1. Study outline of the recruitment of neonates and mothers.

#### 2.4. Statistical Analysis

For clinical and biological data, Microsoft Excel software was used for data recording and analyses were performed using SAS v9.4. The quantitative data are described as median values [Interquartile] and categorial variables as frequencies and percentages. For quantitative variables, the non-parametric Kruskal–Wallis tests were used for comparison between groups. For qualitative variables, chi-square tests were used to compare groups or Fisher tests when expected values were below 5. Correlations between variables were calculated using the non-parametric Spearman rank-order test.  $p$  values < 0.05 were considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Demographic and Clinical Features of Study Groups

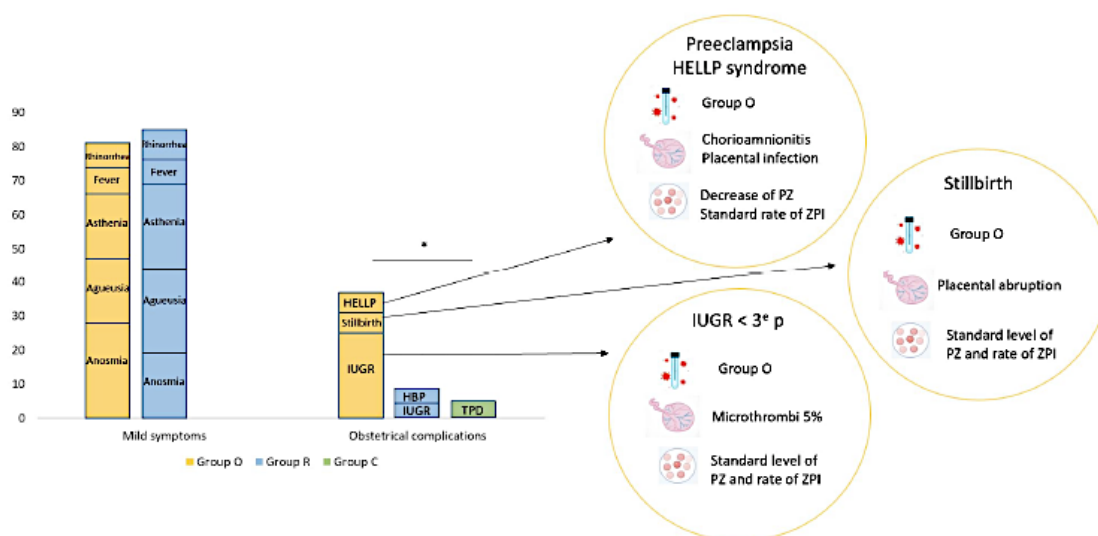
Fifty-five patients met our inclusion criteria for one of the three study groups and were enrolled to participate; 16 patients had an ongoing COVID-19 infection (RT-PCR SARS-CoV-2 positive at delivery; Group O); 21 patients were RT-PCR SARS-CoV-2 positive during pregnancy but recovered and tested RT-PCR SARS-CoV-2 negative at delivery (Group R); and 18 patients had no history of COVID-19 infection either during their pregnancy or at delivery (RT-PCR SARS-CoV-2 negative anti-SARS-Cov-2 IgG serology negative at delivery). None of the patients were vaccinated against COVID-19.

Demographic and clinical features of study patients are summarized in Table 1. All three groups were comparable for age, BMI, incidence of obesity, gravidity, parity and all assessed comorbidities. Regarding thrombotic risk factors, they appeared to be similar between the groups. No history of thromboembolic disease was mentioned, but one patient in control group had an antiphospholipid syndrome and had taken a prophylactic dose of heparin during pregnancy. Patients with COVID-19 and obesity also had prophylactic doses of heparin during infection. No other infections were observed during pregnancy. The median gestational age at which COVID-19 occurred was 38 WG (30–41) for pregnant women with ongoing infection (Group O) and 27 WG (8–37) for recovered patients (Group R) ( $p < 0.001$ ). All recovered patients had positive RT-PCR SARS-CoV-2 during pregnancy and negative RT-PCR SARS-CoV-2 at delivery. There was no difference between the two groups concerning symptoms; 18 (86%) recovered patients and 13 (87%) patients with ongoing infection were symptomatic. The most common symptoms were anosmia ( $n = 17$ , 46%), ageusia ( $n = 16$ , 43%), asthenia ( $n = 16$ , 43%), rhinorrhea ( $n = 10$ , 27%) and fever ( $n = 9$ , 24%).

**Table 1.** Maternal and Neonatal clinical characteristics.

Maternal SARS-CoV-2 Status	Group O	Group R	Group C	<i>p</i> Value
Maternal Characteristics ( <i>n</i> )	<i>n</i> = 16	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 18	
Median age, years (min–max)	34.0 (21–40)	31.0 (24–43)	32.5 (26–44)	0.52
Median BMI (min–max)	28.4 (21–36)	25.5 (19–31)	27.0 (22–34)	0.09
BMI > 30 kg/m <sup>2</sup>	4 (25%)	2 (9.5%)	4 (22%)	0.29
Gravidity, mean (min–max)	1.0 (1–3)	1.5 (1–7)	1.0 (1–3)	0.65
Parity, mean (min–max)	0 (0–2)	1.0 (0–3)	1.0 (0–3)	0.08
Asthma	0	2 (10%)	2 (11%)	0.54
High blood pressure	0	0	0	NA
History of Preeclampsia	1 (6%)	0	0	0.29
Diabetes	0	0	0	NA
Gestational age of COVID-19 infection Median (min–max)	38 (30–41)	27 (8–37)	NA	<0.001
Days between positive SARS-CoV-2+ status (nasopharyngeal swab) and birth, median (min–max)	7 (0–56)	84 (21–225)	NA	<0.001
Positive IgG serology at inclusion	8 (50%)	15 (71%)	0	<0.001
COVID-19 symptoms	13 (87%)	18 (86%)	NA	1
Fever	4 (25%)	5 (24%)	NA	1
Cough	6 (37%)	9 (43%)	NA	0.74
Asthenia	5 (31%)	11 (52%)	NA	0.20
Anosmia	7 (44%)	10 (48%)	NA	0.81
Ageusia	5 (31%)	11 (52%)	NA	0.20
Rhinorrhea	3 (19%)	7 (33%)	NA	0.46
Asymptomatic	3 (14%)	2 (13%)	NA	1
Severity signs	2 (12%)	1 (5%)	NA	0.56
Hospitalization	3 (19%)	0	3 (17%)	0.09
Hospitalization for COVID-19	1 (6%)	0	0	0.29
Total number of obstetrical complications	6 (37%)	2 (10%)	1 (6%)	0.03
Stillbirth	1 (6%)	0	0	0.29
High Blood Pressure	0	1 (5%)	0	1
Preeclampsia	1 (6%)	0	0	0.29
Threat of premature delivery	1 (6%)	0	1 (6%)	0.52
IUGR	4 (25%)	1 (5%)	0	0.10
Term at birth median (min–max)	39 (29–41)	40 (37–41)	39.5 (37–41)	0.68
Pyrexia during labor	1 (6%)	0	0	0.29
Neonatal characteristics ( <i>n</i> )	<i>n</i> = 16	<i>n</i> = 21	<i>n</i> = 18	
Cesarean section (mode of delivery)	3 (19%)	4 (19%)	1 (6%)	0.45
Weight median (g) (min–max)	3100 (1484–4140)	3320 (2760–4270)	3515 (2660–4198)	0.13
pH median (min–max)	7.25 (7.20–7.35)	7.24 (7.08–7.43)	7.23 (7.09–7.45)	0.26
Transfer to ICU	2 (13%)	0	0	0.07
Respiratory distress	1 (6%)	1 (5%)	0	0.75

Only two (12%) patients in Group O and one (5%) patient in Group R (who had no associated comorbidities) required oxygen therapy. No patients had deep vein thrombosis, none were admitted to the ICU and there was no case of maternal death. All patients had a complete recovery. Obstetrical complications were significantly increased in Group O ( $n = 6$ ; 37%) compared with Group R ( $n = 2$ ; 10%) and Group C ( $n = 1$ ; 6%) ( $p = 0.03$ ) (Figure 2). One patient with an ongoing infection had preeclampsia with HELLP syndrome (association of hemolysis, elevated transaminases and low platelet). This patient developed symptoms of COVID-19 at 37 weeks of gestation. She had a normal pregnancy and no comorbidities. She was admitted at 38 weeks for a fever of 39.5 °C, myalgia and asthenia. Blood testing indicated normal hemoglobin (13.2 g/dL), lymphopenia (0.9 G/L), low platelet (60 G/L), cytolysis (9-fold the normal value) and an increased protein C reactive (CRP) (101 mg/L). She had an induction of labor for HELLP syndrome, and finally a C-section for anomaly of the fetal heart rate. Her eutrophic newborn was transferred to the NICU for respiratory distress. Mother and child both had favorable outcomes without sequels of SARS-CoV-2 infection. Another patient in Group O, who had had COVID-19 symptoms for 15 days, was admitted at 29 weeks of gestation for oxygen therapy. She had no associated comorbidities, but blood testing found an increased CRP (22 mg/L) and cytolysis (increased three-fold above the normal value). On the second day of hospitalization, her fetus underwent demise, and the same day she delivered a eutrophic stillbirth (1480 gr), with a placental abruption. The mother achieved complete recovery from SARS-CoV-2 infection. The other complications in Group O were IUGR ( $n = 4$ , 25%). At birth, the weights of three neonates were less than the tenth percentile and one was less than the third percentile. In Group R, complications were high blood pressure for one patient and IUGR for another one, without consequences for delivery or for the newborn. In the healthy controls (Group C), the sole complication was a threat of preterm birth for one patient, who delivered at term.



**Figure 2.** Clinical data of SARS-CoV-2 infection. HELLP: hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count; IUGR: intra uterine growth restriction; HBP: high blood pressure; TPD: threat of premature delivery, \*  $p < 0.05$ .

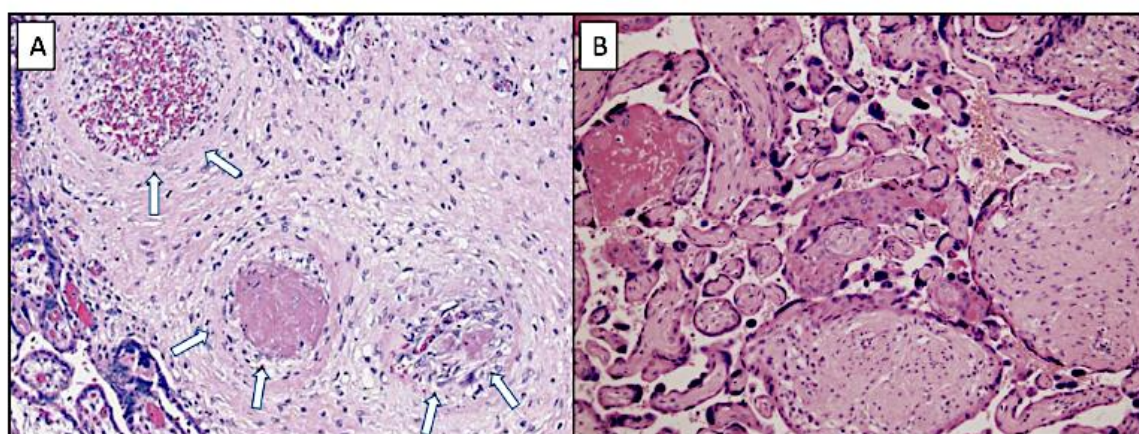
The median gestational age at term was similar in all groups (Group O: 39 weeks (range, 29–41); Group R: 40 weeks (range 37–41); and Group C: 39.5 WG (range 37–41). No case of preterm delivery was observed except for the stillbirth. One (6%) patient in Group O required induced labor at 38 weeks and oxygen therapy. However, there was no

complication for either mother or newborn at delivery and no clinical signs of infection were reported for any of the neonates.

One month after birth, 33 (60%) mothers answered the phone survey (10 in Group O, 12 in Group R, 11 in Group C). No mother had sequels of SARS-CoV-2 infection or complications due to COVID-19, while two (4%) children were hospitalized for 3 to 8 days for pulmonary infection not related to COVID-19. No cases of SARS-CoV-2 infection or additional complications were reported for the children.

### 3.2. Placenta and Protein Z and ZPI Analysis

Results are summarized in Table 2. Regarding histopathological analysis, the incidence of significant vascular malperfusion was similar for both groups of women infected by COVID-19 compared to the control group (Group O:  $n = 9$  (56%); Group R:  $n = 8$  (42%) versus Group C:  $n = 8$  (44%),  $p = 0.68$ ) (Figure 3). Regarding signs of maternal vascular malperfusion, there was no difference among the three groups in the presence of villous infarct (Group O:  $n = 5$  (31%); Group R:  $n = 4$  (21%); Group C:  $n = 6$  (33%),  $p = 0.68$ ) or microthrombi (Group O:  $n = 6$  (37%); Group R:  $n = 6$  (32%); Group C:  $n = 4$  (22%),  $p = 0.62$ ). There were 5% of vessels affected by microthrombi in Group O and C. Placental analysis of the fetus diagnosed with IUGR (estimated as lower than the 3rd percentile) found two old and marginal villous infarcts of 10 and 15 mm, which represented a volume of 4%, and the presence of microthrombi (5% of affected vessels). The placentae of other two fetuses diagnosed with IUGR (estimated inferior to 10th percentile) in Group O and R exhibited no anomalies. There were no cases of decidual arteriopathy. We reported one recent placental abruption of 43 mm, responsible for the stillbirth described previously. Regarding signs of fetal vascular malperfusion, although more subchorionic thrombosis was observed in both COVID-19 groups than in the control group, there was no statistical difference (Group O:  $n = 3$  (19%), Group R:  $n = 3$  (16%); Group C:  $n = 0$ ,  $p = 0.11$ ). There was no case of chorionic thrombosis. Regarding signs of inflammation, there were more cases of acute chorioamnionitis in the COVID-19 groups than in the control group, but again there was no statistical difference (Group O:  $n = 3$  (19%); Group R:  $n = 1$  (5%), Group C:  $n = 0$ ,  $p = 0.10$ ). Placental analysis of patients with preeclampsia found signs of acute chorioamnionitis, classified as stage 2 on the maternal side and stage 1 on the fetal side, without signs of vascular malperfusion [24]. The RT-PCR tests on the placenta were positive for SARS-CoV-2 virus. Placental analysis of the patients with high blood pressure (Group R) and with threat of preterm delivery (Group C) were normal.



**Figure 3.** Maternal vascular malperfusion lesions associated with fibrinonecrotic microthrombi at different stages of formation ((A): HES  $\times 20$ ) within capillary vascular structures (arrows) and avascular terminal villi ((B): HES  $\times 20$ ).

**Table 2.** Placenta histopathologic analysis.

	Group O n = 16	Group R n = 19	Group C n = 18	p Value
Vascular malperfusion	9 (56%)	8 (42%)	8 (44%)	0.68
Maternal side				
Villous infarct	5 (31%)	4 (21%)	6 (33%)	0.68
Volume (%)	3 (2–4)	3 (1–5)	2 (2–5)	0.67
Microthrombi	6 (37%)	6 (32%)	4 (22%)	0.62
Affected vessels (%)	5 (2–5)	5 (2–5)	2 (2–5)	0.19
Deciduous arteriopathy	0	0	0	-
Retroplacental hemorrhage	1 (6%)	0	0	1
Fetal side				
Subchorionic thrombosis	3 (19%)	3 (16%)	0	0.11
Surface (%)	5 (2–20)	2 (1–2)	-	0.16
Chorionic thrombosis	0	0	0	-
Acute chorioamnionitis	3 (19%)	1 (5%)	0	0.10

The analysis of PZ and ZPI levels (Table 3) revealed no difference in rates of PZ or ZPI in either maternal blood or fetal cord blood among the three groups (PZ in mothers  $p = 0.49$ , in fetal cord  $p = 0.49$ ; ZPI in mothers  $p = 0.51$ , in fetal cord  $p = 0.3$ ). However, for the patient with preeclampsia and HELLP syndrome, the level of the PZ was decreased (PZ: 0.75). The ZPI/PZ ratio was significantly higher in neonates of Group R than in Group C (Group R ZPI/Z ratio = 120.7 (29.8–203.5), group C ZPI/Z ratio = 66.8 (28.2–2043.5),  $p = 0.04$ ).

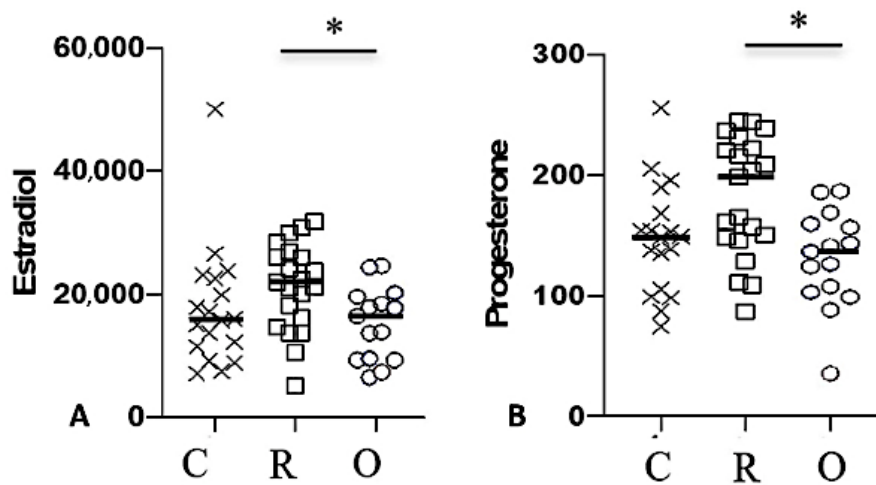
**Table 3.** Protein Z and ZPI levels.

	Group O n = 14	Group R n = 16	Group C n = 18	p Value
Maternal blood				
PZ	2.7 (0.6–4.4)	2.3 (0.9–4.4)	2.1 (1.2–4.6)	0.49
ZPI	173.5 (63.0–247.0)	187.5 (89.0–288.0)	164.5 (81.0–276.0)	0.51
Ratio ZPI/Z	64.4 (44.8–216.7)	66.7 (42.7–145.0)	69.9 (38.5–130.7)	0.87
Fetal cord blood				
PZ	0.4 (0.1–2.3)	0.4 (0.2–0.7)	0.5 (0.02–0.7)	0.49
ZPI	34.0 (17.0–194.0)	45.0 (17.0–92.0)	35.0 (15.0–55.0)	0.3
Ratio ZPI/Z	82.6 (41.3–743.6)	120.7 (29.8–203.5)	66.8 (28.2–2043.5)	<b>0.04</b>

PZ: protein Z; ZPI: protein Z-dependent protease inhibitor.

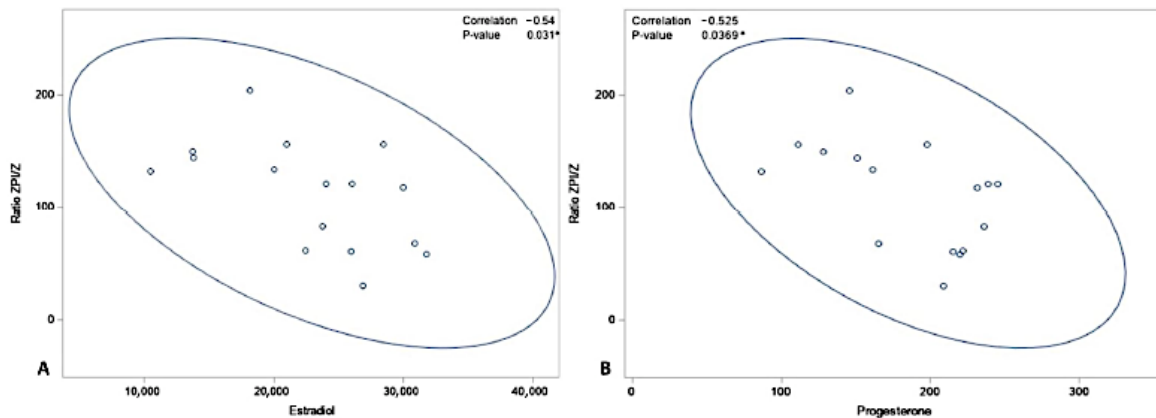
The progesterone concentration in maternal serum was higher in Group R (200.9 ng/mL (86.8–245.0)) than in Group O (136.7 ng/mL (35.5–186.8)) ( $p = 0.009$ ). The estradiol concentration in maternal serum was also higher in Group R (22,210 pg/mL (10,450–31,760)) than in either Group O (16,400 pg/mL (6455–24,590)) or C (15,710 pg/mL (7086–50,000)) ( $p = 0.007$ ). Estradiol and progesterone were both significantly decreased in patients with ongoing infection, as compared to the recovered and control groups (Figure 4).





**Figure 4.** Concentrations of estradiol (pg/mL) and progesterone (ng/mL) in mothers. Data are shown for healthy controls (n = 18; C: crosses), recovered patients (n = 21; R: open squares) and patients with ongoing infection (n = 16; O: circles). Black lines represent the median. \*  $p < 0.05$ .

A Pearson’s correlation test was performed between the ZPI/Z ratio and the concentrations of progesterone and estradiol for each of the three groups. In contrast to Groups O and C, for which no significant correlations were found (data not shown), this analysis revealed a correlation between the ZPI/Z ratio and the concentration of both estradiol ( $p = 0.03$ ) and progesterone ( $p = 0.04$ ) in newborns of Group R (Figure 5).



**Figure 5.** Pearson correlation test between ZPI/Z ratio in neonate and of the concentration of estradiol (A) and progesterone (B) in mothers, \*  $p < 0.05$ .

#### 4. Discussion

This prospective cohort study with pregnant women investigated the association between SARS-CoV-2 infection and obstetrical and perinatal outcomes, and on placental modifications by studying placenta histology and the PZ-ZPI complex.

The incidence of obstetrical complications was significantly increased in those patients with COVID-19 at the time of delivery (Group O: 37%) versus those who had recovered from COVID-19 (Group R: X%) and those who had never tested positive (Group C: Y%). Four patients in Group O developed severe obstetrical complications, including preeclampsia with HELLP syndrome ( $n = 1$ , 6%), stillbirth ( $n = 1$ , 6%) and fetal growth restriction

( $n = 4$ , 25%). Although the number of patients we were able to enroll was relatively small, the incidence of preeclampsia and fetal growth restriction we observed were not unlike those of Villar et al. who reported an 8% risk of developing preeclampsia, a 22.5% risk of premature birth and a 20.5% risk of low birth weight [25]. De Sisto and al. reported an incidence of 1.3% for stillbirth [26]. Of note, the risk of these complications increases in the third trimester [27]. There was no difference concerning delivery and neonatal outcomes.

Pregnant women included in this study did not develop COVID-19 requiring ICU, nor were there any maternal deaths. This is in line with our department's experience in the first year of the pandemic, in which we observed a low ICU hospitalization rate of 1.2% for COVID-19 patients [28]. One of the explanations for this low rate could be a low incidence of associated comorbidities in this patient population. According to Vivanti and al., pregnant women had an increased risk of developing severe COVID-19 if they had associated comorbidities [29]. An ICU-admission rate of 8.4% and a mortality rate of 1.6% is described in literature regarding pregnant women with COVID-19 [25].

This study did not highlight more placental pathologies in pregnant women infected by SARS-CoV-2. Shortly after the onset of the pandemic, studies described placental vascular malperfusion on both the maternal and fetal sides, including retroplacental hematoma, accelerated villous maturation and intramural fibrin deposition in COVID-19 pregnant patients [19]. These pathological changes were not specific to SARS-CoV-2 infection, and one of the hypotheses was an abnormal uterine perfusion due to maternal hypoxia secondary to severe COVID-19 [30]. Another could be inflammatory changes affecting the placenta [7]. These could lead to clinical preeclampsia, preterm birth, fetal demise and fetal growth restriction [8]. Furthermore, placental pathology was associated with more severe neonatal outcomes, with a higher rate of admission to the NICU [31]. Nevertheless, a recent meta-analysis of 30 studies concluded that the incidence of vascular and inflammatory lesions was comparable to that of non-COVID-19 pregnancies, and there was no specific lesion associated with COVID-19 [32]. These results are consistent with the assumption that SARS-CoV-2 does not directly induce placental injury. Another explanation could be the increased levels of circulating extracellular vesicles induced by COVID-19 [33], which are already known to be involved in the hypercoagulable and pro-inflammatory intravascular reactions during preeclampsia [34].

We observed one case of placental infection with detection of SARS-CoV-2 virus by RT-PCR test on placental tissue, although the neonate showed no signs of infection, allowing us to conclude that there were no signs of vertical transmission. However, the placental analysis revealed signs of chorioamnionitis. Male et al. described perivillous fibrin deposition, histiocytic intervillitis and trophoblast necrosis in infected placentae [7]. There are very few cases describing placental infection in women with severe SARS-CoV-2 infection, and they do not necessarily lead to neonate infection, as the rate is estimated to be between 0.9 and 2.8% [7,20,21]. Taken together, the available data regarding neonatal COVID-19 cases are reassuring: the vast majority of infants do not experience significant morbidity and mortality [35].

To our knowledge, the study we report here is the first to analyze PZ and ZPI levels during COVID-19 in pregnant women. There was no difference in the expression of PZ and ZPI among the three groups. Because of the inflammation state caused by COVID-19 and the activation of coagulation, we should expect a decrease in the PZ levels and an increase in ZPI. A decrease in the level of PZ I was described in cases of thrombosis, suggesting an important anticoagulant role [9]. The levels of PZ in this study were consistent with the clinical data finding no increased risk of thrombosis related to COVID-19 in pregnant women [4,36]. The physiopathological reason for these phenomena is unknown. A decreased PZ-ZPI complex is also described in such obstetrical complications as fetal growth restriction, preeclampsia and stillbirth [11–13]. We observed a deficit of PZ in the patient with preeclampsia and HELLP syndrome.

The ZPI/Z ratio can be used as a marker of inflammation because of the excess of production of ZPI in inflammation [14]. In our study, the ZPI/Z ratio was significantly

increased in newborns of the recovered group compared to the control group. This could be explained by a potential inflammation state in neonates born to mothers who infected by SARS-CoV-2 during pregnancy. Inflammation states with increased cytokine levels have been previously described in neonates [7].

We also investigated the rate of pregnancy hormones, which have a role in inflammation and prothrombotic states [37]. Progesterone and estradiol levels appeared to be higher in pregnant women who contracted SARS-CoV-2 infection during pregnancy compared to pregnant women with SARS-CoV-2 infection at delivery. It has been reported that higher rates of estradiol and progesterone modulate inflammatory response to infection and have a protective role for women [38].

In this study, we highlighted a link between ZPI/Z ratio in neonates and rates of both estradiol and progesterone in pregnant women from the recovered group. The ZPI/Z ratio decreased when the estradiol and progesterone levels rose. As a result, we can hypothesize that both estradiol and progesterone could have a role in decreasing neonate inflammation states induced by COVID-19. In the literature, there are reports attesting to a protective role of hormones in women [37,38].

One of the strengths of this study was that it was conducted at the beginning of the pandemic and included naïve patients without any vaccination or history of previous COVID-19. This was ideal to better understand the physiopathological mechanisms involved. Indeed, to date, most of the population has either been infected by SARS-CoV-2 or has been vaccinated. Furthermore, the population involved in this study, presenting mainly with mild symptoms, was more representative of the majority of cases of COVID 19 in pregnancy, with, fortunately, only a few severe cases, due to a systematic screening of the patients at the beginning of labor [39]. The histology analysis was performed by one pathologist, which reduced inter-individual biases. This study was also the first study to evaluate the impact of COVID-19 on PZ and ZPI during pregnancy. There are several limitations to our study; these include in particular the relatively small number of individuals in each study group, and more particularly, the small number of patients with severe forms of COVID-19. We chose to divide our patients into an Ongoing Infection group and a Recovery group. We did not study the effects of the delay between the beginning of the infection and delivery. The pregnant women were included over a short period of time to limit the potential bias associated with the successive appearance of the different variants. Nevertheless, even in this short period, two variants gained successive dominance: VOC-202012/01 (Alpha variant) and B.1.617.2 (Delta variant), with different impacts on pregnancy, as Delta showed worse outcomes [26]. As the variant was not a focus of this study, this could have induced heterogeneous groups. It would be interesting to be able to apprehend them in subsequent studies. Furthermore, other proteins of coagulation, already described in obstetrical complications, could have been studied, such as protein S, protein C, antithrombin and factor V Leiden. The fact that non-blind analysis of the placenta was performed by the pathologist is another limitation.

## 5. Conclusions

To conclude, the MaterCov study found an increased risk of developing obstetrical complications in pregnant women with COVID-19. There were no more placental pathologies in pregnant women infected by SARS-CoV-2 compared with other pregnant women. Placental thrombotic and inflammation lesions were found in patients with obstetrical complications. There was one case of placental infection. We did not highlight a decrease in PZ or ZPI levels.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.C. and J.-M.A.; methodology, M.C., M.T., M.V., E.F. and C.D.; validation, M.C.; formal analysis, T.K.; investigation, M.C. and C.D.; writing—original draft preparation, C.D.; writing—review and editing, M.C., M.T., M.V., C.D., C.R. and J.-M.A.; supervision, M.C.; project administration, M.L.-M. and E.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Foch Foundation.

**Institutional Review Board Statement:** The MaterCov study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, as well as French statutory and regulatory law, and received approval from the Institutional Review Board of Ouest V Rennes in December 2020 IRB number 2020-A03115-34 and declared as clinical trial (N°NCT04726111). Patients received information about research to be performed on their biological samples and provided written informed consent to participate. Partners also provided consent for cord blood assays.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical.

**Acknowledgments:** We thank the patients and their families for placing their trust in us. We thank the members of the Department of Clinical Research, Foch Hospital for monitoring of the study. We thank the Foch clinical team for inclusion of the patients, and we thank the members of the Foch Biological Data Collection Center for their help in collecting and packing biological samples. We thank the department of clinical biology for CyToff, hormonal and viral analyses. We thank the Anatomical Pathology Department.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. Available online: <https://covid19.who.int> (accessed on 16 December 2021).
2. Xie, Y.; Wang, Z.; Liao, H.; Marley, G.; Wu, D.; Tang, W. Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of the COVID-19 in the current pandemic: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* **2020**, *20*, 640. [CrossRef] [PubMed]
3. Cui, S.; Chen, S.; Li, X.; Liu, S.; Wang, F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* **2020**, *18*, 1421–1424. [CrossRef] [PubMed]
4. Benhamou, D.; Keita, H.; Ducloy-Bouthors, A.S.; Bonnet, M.P.; Bonnin, M.; Bouthors, A.S.; Bouvet, L.; Castel, A.; Chassard, D.; Dewandre, P.Y.; et al. Coagulation changes and thrombotic risk in COVID-19 obstetric patients. *Anaesth. Crit. Care Pain Med.* **2020**, *39*, 351–353. [CrossRef]
5. Jafari, M.; Pormohammad, A.; Sheikh Neshin, S.A.; Ghorbani, S.; Bose, D.; Alimohammadi, S.; Basirjafari, S.; Mohammadi, M.; Rasmussen-Ivey, C.; Razizadeh, M.H.; et al. Clinical characteristics and outcomes of pregnant women with COVID-19 and comparison with control patients: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* **2021**, *31*, 1–16. [CrossRef]
6. Conde-Agudelo, A.; Romero, R. SARS-CoV-2 infection during pregnancy and risk of preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2022**, *226*, 68–89.e3. [CrossRef]
7. Male, V. SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccination in pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* **2022**, *22*, 277–282. [CrossRef]
8. Mastrolia, S.A.; Mazor, M.; Loverro, G.; Klaitman, V.; Erez, O. Placental vascular pathology and increased thrombin generation as mechanisms of disease in obstetrical syndromes. *PeerJ* **2014**, *2*, e653. [CrossRef]
9. Huang, X.; Swanson, R.; Kroh, H.K.; Bock, P.E. Protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) is a physiologically significant inhibitor of prothrombinase function. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 7644–7657. [CrossRef]
10. Bretelle, F.; Arnoux, D.; Shojai, R.; D'Ercole, C.; Sampol, J.; Dignat, F.; Camoin-Jau, L. Protein Z in patients with pregnancy complications. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2005**, *193*, 1698–1702. [CrossRef]
11. Zhang, P.; Li, Y.C.; Li, L.; Lu, Y. Plasma concentration of protein Z-dependent protease inhibitor and ZPI exon 3 mutations in preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol.* **2021**, *41*, 1053–1056. [CrossRef]
12. Almawi, W.Y.; Al-Shaikh, F.S.; Melemedjian, O.K.; Almawi AWPprotein, Z. An anticoagulant protein with expanding role in reproductive biology. *Reproduction* **2013**, *146*, R73–R80. [CrossRef] [PubMed]
13. Pan, C.; Huang, Y.; Guo, X.; Gu, C.; Guo, J.; Luo, X. Expression and diagnostic value of serum protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in fetal growth restriction. *Ginekol. Pol.* **2022**; Online ahead of print.
14. Razanakolona, M.; Adam, F.; Bianchini, E.; Saller, F.; Carvalho, A.; de Diehl, J.L.; Denis, C.V.; Meziani, F.; Borgel, D.; Helms, J.; et al. Anti-inflammatory Activity of the Protein Z-Dependent Protease Inhibitor. *TH Open* **2021**, *5*, e220–e229. [CrossRef] [PubMed]
15. Redline, R.W.; Heller, D.; Keating, S.; Kingdom, J. Placental diagnostic criteria and clinical correlation—A workshop report. *Placenta* **2005**, *26* (Suppl. A), S114–S117. [CrossRef] [PubMed]
16. Cromi, A.; Ghezzi, F.; Dürig, P.; Di Naro, E.; Raio, L. Sonographic umbilical cord morphometry and coiling patterns in twin-twin transfusion syndrome. *Prenat Diagn.* **2005**, *25*, 851–855. [CrossRef]
17. Shanes, E.D.; Mithal, L.B.; Otero, S.; Azad, H.A.; Miller, E.S.; Goldstein, J.A. Placental Pathology in COVID-19. *Am. J. Clin. Pathol.* **2020**, *154*, 23–32. [CrossRef]
18. Flores-Pliego, A.; Miranda, J.; Vega-Torreblanca, S.; Valdespino-Vázquez, Y.; Helguera-Repetto, C.; Espejel-Núñez, A.; Borboa-Olivares, H.; Espino y Sosa, S.; Mateu-Rogell, P.; León-Juárez, M.; et al. Molecular Insights into the Thrombotic and Microvascular Injury in Placental Endothelium of Women with Mild or Severe COVID-19. *Cells* **2021**, *10*, 364. [CrossRef]

19. Jaiswal, N.; Puri, M.; Agarwal, K.; Singh, S.; Yadav, R.; Tiwary, N.; Tayal, P.; Vats, B. COVID-19 as an independent risk factor for subclinical placental dysfunction. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2021**, *259*, 7–11. [CrossRef]
20. Hecht, J.L.; Quade, B.; Deshpande, V.; Mino-Kenudson, M.; Ting, D.T.; Desai, N.; Dygulska, B.; Heyman, T.; Salafia, C.; Shen, D.; et al. SARS-CoV-2 can infect the placenta and is not associated with specific placental histopathology: A series of 19 placentas from COVID-19-positive mothers. *Mod. Pathol.* **2020**, *33*, 2092–2103. [CrossRef]
21. Penfield, C.A.; Brubaker, S.G.; Limaye, M.A.; Lighter, J.; Ratner, A.J.; Thomas, K.M.; Meyer, J.A.; Roman, A.S. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in placental and fetal membrane samples. *Am. J. Obstet. Gynecol. MFM* **2020**, *2*, 100133. [CrossRef]
22. Sofi, F.; Cesari, F.; Abbate, R.; Gensini, G.F.; Broze, G.; Fedi, S. A meta-analysis of potential risks of low levels of protein Z for diseases related to vascular thrombosis. *Thromb. Haemost.* **2010**, *103*, 749–756.
23. Girard, T.J.; Lasky, N.M.; Tuley, E.A.; Broze G]Protein, Z. protein Z-dependent protease inhibitor (serpinA10), and the acute-phase response. *J. Thromb. Haemost.* **2013**, *11*, 375–378. [CrossRef] [PubMed]
24. Khong, T.Y.; Mooney, E.E.; Ariel, L.; Balmus, N.C.M.; Boyd, T.K.; Brundler, M.A.; Derricott, H.; Evans, M.J.; Faye-Petersen, O.M.; Gillan, J.E.; et al. Sampling and Definitions of Placental Lesions: Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2016**, *140*, 698–713. [CrossRef] [PubMed]
25. Villar, J.; Ariff, S.; Gunier, R.B.; Thiruvengadam, R.; Rauch, S.; Kholin, A.; Roggero, P.; Prefumo, F.; Vale, M.S.D.; Cardona-Perez, J.A.; et al. Maternal and Neonatal Morbidity and Mortality Among Pregnant Women with and Without COVID-19 Infection: The INTERCOVID Multinational Cohort Study. *JAMA Pediatr.* **2021**, *175*, 817–826. [CrossRef] [PubMed]
26. DeSisto, C.L.; Wallace, B.; Simeone, R.M.; Polen, K.; Ko, J.Y.; Meaney-Delman, D.; Ellington, S.R. Risk for Stillbirth Among Women with and Without COVID-19 at Delivery Hospitalization—United States, March 2020–September 2021. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2021**, *70*, 1640–1645. [CrossRef] [PubMed]
27. Peyronnet, V.; Sibuide, J.; Huissoud, C.; Lescure, F.X.; Lucet, J.C.; Mandelbrot, L.; Nisand, I.; Belaish-Allart, J.; Vayssière, C.; Yazpandanah, Y.; et al. Infection with SARS-CoV-2 in pregnancy. Update of Information and proposed care. *CNGOF Gynecol. Obstet. Fertil. Senol.* **2020**, *48*, 858–870.
28. Daclin, C.; Carbonnel, M.; Rossignol, M.; Abbou, H.; Trabelsi, H.; Cimmino, A.; Delmas, J.; Rifai, A.-S.; Coiquaud, L.-A.; Tiberon, A.; et al. Impact of COVID-19 infection in pregnancy and neonates: A case control study. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* **2022**, *51*, 102366. [CrossRef] [PubMed]
29. Vivanti, A.J.; Mattern, J.; Vauloup-Fellous, C.; Jani, J.; Rigonnot, L.; Hachem, L.E.; Le Gouez, A.; Desconclois, C.; Ben M'Barek, I.; Sibuide, J.; et al. Retrospective Description of Pregnant Women Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, France—Volume 26, Number 9—September 2020—Emerging Infectious Diseases Journal—CDC. Available online: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/9/20-2144\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/9/20-2144_article) (accessed on 22 December 2021).
30. Wong, Y.P.; Khong, T.Y.; Tan, G.C. The Effects of COVID-19 on Placenta and Pregnancy: What Do We Know So Far? *Diagnostics* **2021**, *11*, 94. [CrossRef]
31. Mavedatnia, D.; Tran, J.; Oltean, I.; Bijelić, V.; Moretti, F.; Lawrence, S.; El Demellawy, D. Impact of Co-Existing Placental Pathologies in Pregnancies Complicated by Placental Abruptio and Acute Neonatal Outcomes. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 5693. [CrossRef]
32. Suhren, J.T.; Meinardus, A.; Hussein, K.; Schaumann, N. Meta-analysis on COVID-19-pregnancy-related placental pathologies shows no specific pattern. *Placenta* **2022**, *117*, 72–77. [CrossRef]
33. Campello, E.; Radu, C.M.; Simion, C.; Spiezia, L.; Bulato, C.; Gavasso, S.; Tormene, D.; Perin, N.; Turatti, G.; Simioni, P. Longitudinal Trend of Plasma Concentrations of Extracellular Vesicles in Patients Hospitalized for COVID-19. *Front. Cell. Dev. Biol.* **2021**, *9*, 770463. [CrossRef]
34. Campello, E.; Spiezia, L.; Radu, C.M.; Dhima, S.; Visentin, S.; Valle, F.D.; Tormene, D.; Woodhams, B.; Cosmi, E.; Simioni, P. Circulating microparticles in umbilical cord blood in normal pregnancy and pregnancy with preeclampsia. *Thromb. Res.* **2015**, *136*, 427–431. [CrossRef] [PubMed]
35. Kotlyar, A.M.; Grechukhina, O.; Chen, A.; Popkhadze, S.; Grimshaw, A.; Tal, O.; Taylor, H.S.; Tal, R. Vertical transmission of coronavirus disease 2019: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2021**, *224*, 35–53.e3. [CrossRef] [PubMed]
36. D'Souza, R.; Malhamé, I.; Teshler, L.; Acharya, G.; Hunt, B.J.; McLintock, C. A critical review of the pathophysiology of thrombotic complications and clinical practice recommendations for thromboprophylaxis in pregnant patients with COVID-19. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2020**, *99*, 1110–1120. [CrossRef] [PubMed]
37. Mauvais-Jarvis, F.; Klein, S.L.; Levin, E.R. Estradiol, Progesterone, Immunomodulation, and COVID-19 Outcomes. *Endocrinology* **2020**, *161*, bqaa127. [CrossRef]
38. Zafari Zangeneh, F.; Sarmast Shoushtari, M. Estradiol and COVID-19: Does 17-Estradiol Have an Immune-Protective Function in Women Against Coronavirus? *J. Fam. Reprod. Health* **2021**, *15*, 150–159. [CrossRef]
39. Murtada, R.; Carbonnel, M.; Revaux, A.; Favre-Inhofer, A.; Ayoubi, J.M. Managing a Department of Obstetrics and Gynecology in Times of COVID-19 Outbreak: The Foch Hospital Experience. *Front. Surg.* **2021**, *8*, 564145. [CrossRef]

## Table des illustrations

<b>Figure 1 : Echelle de temps de l'immunité innée et adaptative.</b> .....	16
<b>Figure 2 : Schéma représentant le fonctionnement d'une cellule NK et la balance entre les récepteurs activateurs et inhibiteurs.</b> .....	23
<b>Figure 3 : Les sous populations immunitaires de l'immunité adaptative (20)</b> .....	25
<b>Figure 4: coupe frontale de l'utérus et des annexes</b> issu de <a href="https://microbiologiemedicale.fr/appareil-genital-feminin/">https://microbiologiemedicale.fr/appareil-genital-feminin/</a> .....	27
<b>Figure 5: cycle menstruel féminin</b> issu de <a href="https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle_menstruel#/media/Fichier:Cycle_menstruel.svg">https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle_menstruel#/media/Fichier:Cycle_menstruel.svg</a> .....	29
<b>Figure 6 : Schéma général du placenta : A droite vue macroscopique</b> .....	33
<b>Figure 7 : La réponse immunitaire pendant la grossesse dans la décidue. (47)</b> .....	35
<b>Figure 8 : Schéma du microenvironnement placentaire.</b> .....	38
<b>Figure 9 : possibles processus physiopathologiques impliqués dans la prééclampsie (62)</b> .....	43
<b>Figure 10 : Schéma montrant l'allorecognition directe et indirecte et la phase effectrice</b> (inspiré d'Abbas, Basic immunology, 4eme édition) .....	47
<b>Figure 11 : Allo-recognition adaptative et innée dans la greffe de rein</b> (m/s n° 11, vol. 36, novembre 2020, <a href="https://doi.org/10.1051/medsci/2020183">https://doi.org/10.1051/medsci/2020183</a> ) .....	50
<b>Figure 12 : Mécanismes moléculaires des traitements immunosuppresseurs</b> (Abbas, Basic immunology, 4eme édition) .....	53
<b>Figure 13 : Approches thérapeutiques pour le rejet médié par les anticorps (76)</b> .....	54
<b>Figure 14 : Cohorte de grossesses chez des patientes greffées pulmonaires et rénales à l'hôpital Foch (86)</b> .....	58
<b>Figure 15 : Rejet chronique de greffe de face.</b> Nécrose du greffon de peau sentinelle (novembre 2014) ; (B) Rejet de grade IV du greffon de peau sentinelle selon Banff (novembre 2014) : infiltration dermique diffuse et très dense de lymphocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles, sous un épiderme nécrosé ; (C) Histologie du vaisseau pédiculaire du greffon de peau sentinelle (novembre 2014) : épaissement fibreux de toute la paroi avec épaissement intimal focal et rétrécissement lumenale ; (D) Zones nécrotiques sur les lèvres, la zone périorale et le menton (mai 2015) ; FŒTALE Rejet de grade IV de Banff du greffon facial (mai 2015) : nécrose ischémique massive de l'épiderme et du derme. Une artère avec une thrombose extensive est visible dans l'hypoderme ; (F) grossissement plus important du panneau E, montrant une thrombose artérielle avec occlusion lumenale et un infiltrat périvasculaire dense de neutrophiles (89). .....	60
<b>Figure 16 : Schéma global de la transplantation utérine (94).</b> .....	62
<b>Figure 17 : Différents grades de rejet cellulaire sur biopsies cervicales</b> .....	69
<b>Figure 18 : Mécanismes immunologiques entre cellules pulmonaires infectées par le SARS-CoV-2 et les cellules NK</b> .....	79
<b>Figure 19 : Effets directs (rouge) et indirects (bleu) de l'infection à SARS-CoV-2 sur la mère et le fœtus(155).</b> .....	82
<b>Figure 20: Schéma des 2 mécanismes de rejet mis en évidence dans l'article 1.</b> .....	189

**Figure 21 : Modifications des cellules NK et des macrophages dans l'étude MATERCOV au niveau de l'interface materno-fœtale par imagerie de cytométrie de masse Hyperion™ dans le cas de la mort foetale. (A) Flow cytometry contour plots of NK cells according to CD16, CD56, granzyme B and CD11c and macrophages according to CD14, granzyme B, CD11c and HLADR. (B) IMC pseudocolored images. .... 198**

## **Table des tableaux**

<b>Tableau 1 Critères d'inclusion Français de la transplantation utérine (Hôpital Foch) ..</b>	<b>64</b>
<b>Tableau 2 Etat des lieux de la transplantation utérine (Allocution du Pr JM Ayoubi, 3rd State of the art, Paris, octobre 2022) ..</b>	<b>67</b>



## Résumé :

La transplantation utérine est un nouveau traitement permettant aux femmes avec une infertilité utérine d'être enceintes. Cette greffe d'organe est tout à fait unique car son but est l'obtention d'un enfant en bonne santé et le greffon est transitoire. Néanmoins, elle nécessite un traitement immunosuppresseur comme les autres greffes d'organes. Le but de mon travail de thèse était de mieux comprendre les mécanismes en jeu dans le rejet de greffe utérine et l'impact des altérations immunologiques sur l'interface materno-foetale. Sur une série rétrospective de biopsies de col analysées par RNA seq et imagerie de spectrométrie de masse, j'ai pu identifier certains mécanismes dont 2 inédits : la présence de structures lymphoïdes tertiaires en lien avec le rejet chronique et humoral et des macrophages sécrétant du granzyme B en lien avec un rejet sévère et une altération définitive de l'utérus le rendant impropre à porter une grossesse à terme. J'ai initié une cohorte prospective (MARNI) afin de regarder de manière longitudinale et plus précise ces mécanismes. Sur l'analyse de la première patiente, j'ai conforté certains résultats rétrospectifs et mis en évidence deux potentiels biomarqueurs de rejet sanguin (granzyme B et IL1 $\beta$ ). J'ai constaté une immunomodulation particulière liée aux immunosuppresseurs et à la grossesse. Je retrouve dans mes travaux un lien entre altérations du microbiote, infection, modulation de l'immunité innée et rejet. Afin de mieux appréhender l'interface materno-foetale, j'ai mené en parallèle une étude sur le SARS-CoV-2 et la grossesse (MATERCOV). J'ai constaté que dans la majorité des cas, le rôle de barrière était rempli par une modulation des cellules immunitaires innées NK et macrophages ainsi que le rôle protecteur des oestrogènes. Des anomalies des cellules NK ont été responsables de pathologies impliquant le placenta comme celui de la mort fœtale dans MATERCOV et celui de la prééclampsie dans la greffe utérine. J'ai montré une empreinte immunitaire du nouveau-né dans MATERCOV. Dans la greffe utérine, elle reste à évaluer, bien que nous puissions déjà mentionner une altération du microbiote. La poursuite de mes travaux sur une plus grande série, ainsi que le suivi des enfants à moyen et long terme seront nécessaires pour étayer mes hypothèses.

Mots clés : transplantation, utérus, rejet, biomarqueur, SARS-CoV-2, COVID-19, grossesse

## Abstract :

Uterine transplantation is a new treatment enabling women with uterine infertility to become pregnant. This organ transplant is unique in that its aim is to have a healthy child, and the graft is transient. Nevertheless, it requires immunosuppressive treatment like other organ transplants. The aim of my phd was to gain a better understanding of the mechanisms involved in uterine graft rejection and the impact of immunological alterations on the maternal-fetal interface. Based on a retrospective series of cervical biopsies analyzed by RNA seq and imaging mass cytometry, I was able to identify some mechanisms, including 2 novel ones: the presence of tertiary lymphoid structures associated with chronic, humoral rejection, and granzyme B secreting macrophages associated with severe rejection and definitive alteration of the uterus, making it unfit to carry a pregnancy to term. I set up a prospective cohort (MARNI) to take a longitudinal and more precise look at these mechanisms. Based on the analysis of the first patient, I confirmed some retrospective results and highlighted two potential biomarkers of blood rejection (granzyme B and IL1 $\beta$ ). I observed a particular immunomodulation linked to immunosuppressive therapy and pregnancy. My work showed a link between alterations in the microbiota, infection, modulation of innate immunity and rejection. In parallel, to better understand the materno-foetal interface I conducted a study on SARS-CoV-2 and pregnancy (MATERCOV). I found that in the majority of cases, the placenta barrier role was fulfilled by modulation of the innate immune cells NK and macrophages, as well as the protective role of estrogens. Abnormalities in NK cells were responsible for pathologies involving the placenta, such as fetal death in MATERCOV and preeclampsia in uterine transplantation. I have shown an immune imprinting of the newborn in MATERCOV. In uterine transplantation, this remains to be assessed, although we can already mention an alteration in the microbiota. Further work on a larger series, as well as medium- and long-term follow-up of the children, will be necessary to substantiate my hypotheses.

Keywords : transplantation, uterus, rejection, biomarker, SARS-CoV-2, COVID-19, pregnancy