Université de Paris

École doctorale BioSPC – ED 562

UMR-S 1139 Physiopathologie et Pharmacotoxicologie Placentaire Humaine, Microbiote Pré et Post natal (3PHM)

IMPACT DES NANOCERIA SEULES OU EN ASSOCIATION AVEC LE BENZO(A)PYRENE SUR L'INTEGRITE ET LES FONCTIONS DE LA BARRIERE PLACENTAIRE HUMAINE

Par Margaux Nedder

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire

Dirigée par Thierry Fournier

Présentée et soutenue publiquement le 06 octobre 2020

Devant un jury composé de :

Pr Vincent Sapin, Université Clermont Auvergne, rapporteur
Dr Marie Carrière, CEA Grenoble, rapporteur
Pr Saadia Kerdine-Römer, Université Paris Saclay, examinatrice
Dr Anne Tarrade, INRAE, examinatrice
Dr Ioana Ferecatu, Faculté de Pharmacie de Paris, examinatrice
Dr Thierry Fournier, Faculté de Pharmacie de Paris, directeur de thèse

Except where otherwise noted, this is work licensed under
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Je remercie le Dr **Thierry Fournier**, directeur de l'unité INSERM U1139, pour m'avoir accueillie dans le laboratoire pour mon stage de M2 puis d'avoir accepté de diriger ma thèse. Je vous remercie pour votre confiance, vos nombreux conseils avisés lors des réunions scientifiques et votre implication tout au long de ce travail.

Je remercie le Dr **Ioana Ferecatu** de m'avoir encadré très largement au niveau scientifique et expérimental pendant ces quatre années, depuis mon stage de M2 jusqu'à la fin de ma thèse. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet passionnant, pour les nombreux conseils et corrections, que ce soit pour les différentes présentations tout au long de cette thèse mais également pour ce manuscrit, fruit d'un travail collaboratif.

Je remercie les membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail, par leurs expertises dans le domaine du placenta ou de la nanotoxicologie : Pr **Vincent Sapin**, Dr **Marie Carrière**, Pr **Saadia Kerdine-Römer** et Dr **Anne Tarrade**.

Je remercie grandement **Sonja Boland** et **Stéphanie Devineau** pour le partage de leurs expertises dans le domaine des nanoparticules et pour leur contribution à ce travail de thèse, qui n'aurait pas été ce qu'il est autrement. Je remercie également **Xavier Coumoul** pour ces nombreux conseils et encouragements, notamment lors des réunions scientifiques ANSES. Enfin, je remercie **Anaïs Wakx**, qui m'a beaucoup appris sur la thématique lors de mon stage de Master 2 et avec qui j'ai apprécié travailler.

Je remercie M. **René Lai-Kuen** pour m'avoir initiée à la microscopie électronique, pour sa grande disponibilité et sa gentillesse.

Je remercie les membres du labo U1139 pour leur soutien et leur contribution tout au long de ce travail : **Amal Zerrad-Saadi**, **Jean Guibourdenche**, **Josette Badet**, **Giovanna Vinci**, **Sophie Gil**, **Anne Gaël Cordier**, **Isabelle Hernandez**, **Séverine Degrelle, Christelle Simasotchi**. Une mention spéciale pour **Jasmina Rogozarski** qui a fortement égayé mes quatre années passées dans ce laboratoire. Je remercie également personnellement **Françoise Vibert** et **Audrey Chissey** pour m'avoir appris toutes les techniques expérimentales et pour le temps que vous m'avez consacré. Enfin, je remercie mes co-thésards : **Camille Fraichard** et **Jessica Dalmasso**, merci pour toutes ces discussions et ces moments partagés. Je vous souhaite le meilleur pour vos futures carrières.

Une pensée pour **Eva Guilloteau**, pour ces quelques mois passés ensemble au labo lors de ton stage. J'espère te revoir !

Je remercie les quatre stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, pour leur sérieux, leur motivation, leur travail acharné et qui ont aidé à faire avancer significativement le projet : **Blandine Fruchet**, **Ibtissem Baya**, **Stacy Colzin** et **Gaëlle Deval**. Je vous souhaite le meilleur pour vos futures carrières dans la recherche ou ailleurs.

A mes amis depuis l'université **Laura Ben Driss** et **Vincent Pacini,** co-thésards d'autres labos. Je te remercie Laura pour toutes ces années passées depuis notre rencontre qui restera marquée dans nos esprits, autour de ce livre. Merci pour tout le soutien, les discussions scientifiques et surtout non-scientifiques. Je te remercie Vincent pour tous ces moments partagés au téléphone ou ailleurs et ton soutien quotidien qui m'ont fait tenir le coup ces trois dernières années. On y est arrivés !

Je remercie ma meilleur amie **Gwendoline Moirez**. Merci pour ces nombreuses années d'amitié depuis le lycée, de près ou de loin.

Je remercie infiniment mes parents **Suzelle** et **Michel**. Aucun mot ne sera assez fort pour vous exprimer ma gratitude. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui et je vous dois cette thèse. J'espère que vous êtes fiers de moi. Une pensée émue pour **Christiane**, ma grand-mère, qui n'aura pas eu l'occasion de voir la fin de ce travail. Merci à mes chères sœurs, **Anne-Lise** et **Marine**, pour leur soutien.

Je remercie d'autres membres de ma famille pour leurs encouragements tout au long de cette thèse : **Roselyne**, **Roland**, **Audrey** et **Guillaume** pour la famille Noël, **Jean-François** et **Isabelle** pour le côté Rochefeuille et mes grands parents **Elisabeth** et **Mahi** ainsi que **Guillaume** et **Vincent** pour le côté Nedder.

À **M. D.** merci d'être toi**,** de ta présence et de ton soutien.

Table des matières

VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE **7**

LISTE DES ABREVIATIONS **9**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX **13**

INTRODUCTION **15**

1. Le placenta humain **16**

1.1. Description anatomique **16**

1.2. Développement du placenta humain **18**

1.2.1. Genèse 18

1.2.1.1. Stade pré-villeux (pré-lacunaire et lacunaire) 19

1.2.1.2. Stade villeux 20

1.2.2. Différenciation trophoblastique 21

1.2.2.1. Trophoblastes villeux et villosités flottantes 22

1.2.2.1.1. Mécanismes mis en jeu lors de la différenciation des CTV en ST 24

1.2.2.1.2. Conséquences de la différenciation des CTV en ST 29

1.2.2.2. Trophoblastes extravilleux et villosités crampons 30

1.2.2.3. Les bouchons trophoblastiques 31

1.2.3. Mise en place des circulations maternelle et fœtale 31

1.2.3.1. Circulation fœtale 31

1.2.3.2. Circulation maternelle 32

1.3. Fonctions du placenta **33**

1.3.1. Tolérance immunitaire 33

1.3.2. Endocrine 33

1.3.2.1. Les hormones polypeptidiques placentaires 34

1.3.2.1.1. L'hCG 34

1.3.2.1.2. L'hPL 36

1.3.2.1.3. La GH placentaire 37

1.3.2.1.4. Autres hormones polypeptidiques 37

1.3.2.2. Les hormones stéroïdes 38

1.3.2.2.1. La progestérone 38

1.3.2.2.2. Les œstrogènes 41

1.3.3. Echanges 43

1.3.3.1. Mécanismes des échanges 43

1.3.3.2. Transfert des gaz respiratoires 44

1.3.3.3. Transport des nutriments 45

1.3.3.4. Transfert de l'eau et des ions 46

1.3.3.5. Transfert du fer 46

1.3.3.6. Transfert des immunoglobulines 46

1.3.3.7. Transfert des xénobiotiques et polluants 46

1.3.4. Barrière 47

1.4. Pathologies liées au placenta **48**

1.4.1. Retard de croissance intra-utérin 48

1.4.2. Pré-éclampsie 48

1.4.3. DOHaD 49

1.5. Modèles d'étude du placenta **49**

1.5.1. Spécificité placentaire 50

1.5.2. Culture primaire de trophoblastes 51

1.5.3. Lignées cellulaires trophoblastiques 51

1.5.4. Explants 53

1.5.5. Perfusion 54

1.5.6. Cellules souches embryonnaires et trophoblastiques 54

2 – Les polluants et la grossesse **54**

2.1. Effets du tabagisme maternel **56**
2.2. Effets de la pollution de l'air **57**
2.3. Effets des pesticides **58**

3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques **59**
3.1. Généralités **59**
3.1.1. Propriétés physico-chimiques 59
3.1.2. Sources de production 60
3.1.3. Réglementation 61
3.2. Le benzo(a)pyrène **62**
3.2.1. Caractéristiques du benzo(a)pyrène 62
3.2.2. Classification du benzo(a)pyrène 62
3.2.3. Voies d'exposition et métabolisation 62
3.2.3.1. Absorption 62
3.2.3.1.1. Respiratoire 63
3.2.3.1.2. Digestive 63
3.2.3.1.3. Cutanée 63
3.2.3.2. Distribution 64
3.2.3.3. Activation du benzo(a)pyrène 66
3.2.3.3.1. Bio-transformation 66
3.2.3.3.2. Phase I 68
3.2.3.3.3. Phase II 68
3.2.3.4. Elimination 69
3.2.4. Effets toxiques 69
3.2.4.1 Effets généraux 69
3.2.4.2. Effets cancérigènes 69
3.2.5. Benzo(a)pyrène, grossesse et placenta 70
3.3. Le récepteur des hydrocarbures aromatiques polycycliques (AhR) **72**
3.3.1. Structure 72
3.3.1.1. Domaine bHLH 73
3.3.1.2. Domaine PAS 73
3.3.1.3. Domaine de transactivation 74
3.3.2. Expression d'AhR 74
3.3.3. Voies de signalisation AhR-dépendantes 74
3.3.3.1. Voie génomique 74
3.3.3.1.1. Complexe cytoplasmique d'AhR 74
3.3.3.1.2. Complexe nucléaire 76
3.3.3.1.3. Batterie de gènes cibles d'AhR 76
3.3.3.2. Voie non génomique 77
3.3.3.3. Ligands d'AhR 79
3.3.3.3.1. Ligands exogènes 79
3.3.3.3.2. Ligands endogènes 80
3.3.3.4. Régulation de l'activité d'AhR ligand-indépendante 81
3.3.3.5. Régulation de la signalisation AhR 82
3.3.3.5.1. Dégradation par le protéasome 82
3.3.3.5.2. Le répresseur AhRR 82
3.3.4. Rôles et fonctions d'AhR 83
3.3.4.1. Métabolisme des xénobiotiques 83
3.3.4.2. Rôles physiologiques 84

4 – Les nanomatériaux **85**
4.1. Les nanomatériaux en général **85**
4.1.1. Définition et classification 85
4.1.2. Contexte économique des nanomatériaux 87
4.1.3. Réglementation 87
4.1.4. Procédés de fabrication 88
4.1.5. Propriétés physico-chimiques des nanoparticules 89

4.1.6. Nanotoxicologie 94
4.1.6.1. Définition du risque nano 94
4.1.6.2. Voies d'exposition 95
4.1.6.3. Caractérisation physico-chimique des NP 95
4.1.6.3.1. Taille primaire, degré d'agrégation/agglomération et forme 95
4.1.6.3.2. Composition chimique 96
4.1.6.3.3. Charge de surface 97
4.1.6.3.4 Surface spécifique 97
4.2. Les nanoparticules de dioxyde de cérium 98
4.2.1. L'élément chimique Cérium 98
4.2.2. Synthèse des nanoparticules de dioxyde de cérium 98
4.2.2.1. Méthodes chimiques 99
4.2.2.2. Méthodes respectueuses de l'environnement 99
4.2.3. Propriétés redox des nanoparticules de CeO_2 100
4.2.4. Applications des nanoparticules de CeO_2 101
4.2.4.1. Utilisation industrielle 102
4.2.4.2. Applications biologiques et biomédicales 103
4.2.5. Revue de littérature des études sur les effets des NP de CeO_2 105
4.2.5.1. Bio-distribution et effets à l'échelle de l'organe des NP de CeO_2 105
4.2.5.2. Mécanismes d'internalisation cellulaire des NP de CeO_2 106
4.2.5.3. Effets cellulaires et cytotoxiques 107
4.2.5.4. Effets sur le stress oxydant 108
4.2.5.5. NP de CeO_2, grossesse et placenta 109

MATERIEL ET METHODES 113
1. Obtention du matériel tissulaire et cellulaire 114
1.1. Recueil placentaire 114
1.2. Isolement de villosités choriales et culture d'explants 114
1.3. Isolement et purification des cytotrophoblastes villeux (CTV) 114
1.4. Culture de la lignée trophoblastique BeWo 115
1.5. Autres types cellulaires 116
2. Polluants et drogues utilisées 116
2.1. Benzo(a)pyrène 116
2.2. Nanoparticules de dioxyde de cérium 116
2.3. Inhibiteur d'AhR 117
2.4. Témoins positifs d'expérience 117
3. Caractérisation des nanoparticules de dioxyde de cérium 117
4. Etude de l'expression protéique 118
4.1. Extraction protéique 118
4.1.1. Villosités choriales 118
4.1.2. Trophoblastes en culture 118
4.2. Dosage des protéines 118
4.3. Electrophorèse monodimensionnelle, transfert sur membrane et immunodétection 118
5. Etude de l'expression génique 120
5.1. Extraction d'ARN 120
5.1.1. Villosités choriales 120
5.1.2. Trophoblastes en culture 120
5.2. Reverse transcription 120
5.3. PCR classique 121
5.4. PCR quantitative 121
6. Etude de la localisation intracellulaire protéique 122
6.1. Immunomarquages 122
6.1.1. Villosités choriales 122
6.1.2. Cellules trophoblastiques 123
6.2. Microscopie à fluorescence 123
7. Etude de l'internalisation des nanoparticules dans les trophoblastes 123

7.1. Microscopie électronique à transmission (MET) ... 123
7.2. MET à balayage (STEM) et analyses EDX ... 124
8. Etude de la viabilité et les fonctions du trophoblaste ... 125
8.1. Viabilité cellulaire par test WST1 ... 125
8.2. Cytotoxicité par dosage de la LDH ... 125
8.3. Activation des caspases par le test Apo-ONE® ... 125
8.4. Production d'espèces réactives de l'oxygène par sonde CM-H_2DCFDA ... 126
8.5. Différenciation trophoblastique par calcul de l'index de fusion ... 126
8.6. Fonction hormonale par dosage ... 127
8.7. Etude du stress cellulaire sur puce ... 128
9. Analyses statistiques ... 129

CONTEXTE DE L'ETUDE ET OBJECTIFS ... 130

RESULTATS ... 133
PARTIE 1 : ... 134
Article 1. CARTOGRAPHIE D'AhR DANS LE PLACENTA HUMAIN. ... 134
Résultats supplémentaires de la Partie 1 ... 137
1. Expression d'IDO1 dans les villosités et trophoblastes primaires humains à terme de grossesse ... 137
2. Localisation d'IDO1 dans les villosités choriales et trophoblastes purifiés ... 141
3. Rôle d'IDO1 dans l'activation intrinsèque d'AhR ... 143
PARTIE 2 : ... 145
Article 2. INTERNALISATION ET EFFETS DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE CERIUM SUR LA DIFFERENCIATION ET LES FONCTIONS DU TROPHOBLASTE HUMAIN. ... 145
Résultats supplémentaires de la Partie 2 ... 148
1. Exposition des syncytiotrophoblastes : étude de viabilité par le test WST1 ... 148
2. Internalisation des NP de CeO_2 au niveau tissulaire ... 150
PARTIE 3 : ... 151
Article 3. EFFETS DU BENZO(A)PYRENE SEUL OU EN CO-EXPOSITION AVEC DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE CERIUM SUR LES TROPHOBLASTES HUMAINS. ... 151
1. Etude de l'effet du BaP sur les trophoblastes ... 152
2. Etude de l'effet de la co-exposition au BaP et aux NP de CeO_2 sur les trophoblastes ... 155

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES ... 159
I. Cartographie de l'expression, de la localisation et de l'activité d'AhR dans le placenta humain ... 160
1. L'expression et l'activité d'AhR dans le placenta sont augmentées à terme de grossesse ... 160
2. AhR a une localisation nucléaire constitutive dans les trophoblastes ... 163
II. Effet du benzo(a)pyrène en exposition individuelle sur la barrière placentaire humaine ... 165
1. Etude des effets du BaP sur la cytotoxicité et le stress oxydant des cytotrophoblastes primaires humains ... 166
2. Le BaP active la voie de signalisation d'AhR et impacte la stabilité d'IDO1 ... 168
III. Effet des NP de CeO_2 en exposition individuelle sur la barrière placentaire humaine ... 169
1. Caractérisation des NP de CeO_2 utilisées ... 169
2. Les NP de CeO_2 sont internalisées dans les trophoblastes ... 170
3. Effet des NP de CeO_2 sur la cytotoxicité, le stress oxydant et la différenciation des cytotrophoblastes primaires humains ... 172
IV. Effet du benzo(a)pyrène et des NP de CeO_2 en co-exposition sur la barrière placentaire humaine ... 177

1. Effet de la co-exposition sur l'activité métabolique des cytotrophoblastes primaires humains 177
2. Effet de la co-exposition sur la fusion des cytotrophoblastes primaires humains 177
3. Effet de la co-exposition sur le stress cellulaire des cytotrophoblastes primaires humains 178

CONCLUSION 181

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 183

ANNEXE 215

VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

- Publications internationales dans des revues à comité de lecture

« Expression, localization and activity of the aryl hydrocarbon receptor in the human placenta »

A. Wakx, M. Nedder, C. Tomkiewicz-Raulet, J. Dalmasso, A. Chissey, S. Boland, F. Vibert, S.A. Degrelle, T. Fournier, X. Coumoul, S. Gil* and I. Ferecatu* (2018) Int. J. Mol. Sci. 19(12), 3762 (IF 4,183) (*contribution équivalente)

« Uptake of cerium dioxide nanoparticles and impact on viability, differentiation and functions of primary trophoblast cells from human placenta »

Nedder M, Boland S, Devineau S, Zerrad-Saadi A, Rogozarski J, Lai-Kuen R, Baya I, Guibourdenche J, Vibert F, Chissey A, Gil S, Coumoul X, Fournier T*, Ferecatu I* (2020) Nanomaterials. Jul 3;10(7):E1309 (IF 4,324) (*contribution équivalente)

« Effects of benzo(a)pyrene and cerium dioxide nanoparticles in co-exposure on human trophoblast cell stress »

Nedder M, Fournier T, Boland S, Colzin S, Laguillier-Morizot C, Chissey A, Coumoul X, Zerrad-Saadi A, Ferecatu I, en préparation

- Chapitre de livre

« Physiologie et hormonologie du placenta humain »

Margaux Nedder, Ioana Ferecatu, Thierry Fournier, A paraître, John Libbey Eurotext (épreuves du chapitre présentées en annexe)

- Communications orales

« Conséquence de l'exposition de la barrière placentaire humaine aux nanoparticules et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques »

M. Nedder, S. Boland, X. Coumoul, A. Zerrad-Saadi, J. Rogozarski, S. Gil, T. Fournier et I. Ferecatu, Groupe Francophone Placentaire, Mars 2019, Paris, France.

« Conséquence de l'exposition de la barrière placentaire humaine aux nanoparticules et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques »

M. Nedder, S. Boland, S. Devineau, A. Zerrad-Saadi, R. Lai-Kuen, J. Guibourdenche, J. Rogozarski, S. Gil, X. Coumoul, T. Fournier, I. Ferecatu, Société de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire, Juin 2019, Paris, France.

- Communications écrites sous forme de posters

« Role of Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) in the activity of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in human placenta »

M. Nedder, A. Wakx, F. Vibert, A. Chissey, C. Tomkiewicz-Raulet, X. Coumoul, S. Boland, T. Fournier, S. Gil* et I. Ferecatu* (*contribution équivalente). Congrès de la Société Française de Toxicologie, Novembre 2017, Paris, France.

« Impact of exposure to nanoparticles and polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants on human placental barrier »

M. Nedder, S. Boland, X. Coumoul, K. Andreau, A. Chissey, C. Tomkiewicz-Raulet, A. Zerrad-Saadi, F. Vibert, T. Fournier, S. Gil* et I. Ferecatu* (*contribution équivalente). Nanotox, Septembre 2018, Neuss, Allemagne.

« Consequences of nanoparticle exposure on the integrity and functions of the human placental barrier »

M. Nedder, S. Boland, X. Coumoul, K. Andreau, A. Zerrad-Saadi, A. Chissey, C. Tomkiewicz, F. Vibert, T. Fournier, S. Gil* et I. Ferecatu* (*contribution équivalente). IFPA, Septembre 2018, Tokyo, Japon.

« Impact of exposure to nanoparticles and polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants on human placental barrier »

M. Nedder, S. Boland, S. Devineau, X. Coumoul, K. Andreau, A. Chissey, C. Tomkiewicz-Raulet, A. Zerrad-Saadi, F. Vibert, T. Fournier, S. Gil* et I. Ferecatu* (*contribution équivalente). Forum des doctorants ED BioSPC, Décembre 2018, Dourdan, France.

« Consequences of human placental barrier exposure to nanoceria and to Benzo(a)pyrene »

M. Nedder, S. Boland, S. Devineau, A. Zerrad-Saadi, R. Lai-Kuen, J. Guibourdenche, X. Coumoul, S. Gil, T. Fournier* et I. Ferecatu* (*contribution équivalente). IFPA, Septembre 2019, Buenos Aires, Argentine.

LISTE DES ABREVIATIONS

3β-HSD	3β-hydroxystéroïde-deshydrogénase
17β-HSD	17β-hydroxystéroïde-deshydrogénase
AC	Anhydrase carbonique
ADEME	Agence de l'environnement et de la maitrise de l'énergie
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Récepteur des hydrocarbures aromatiques
AhRR	Répresseur d'AhR
AKR	Aldo-Keto réductase
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNT	*AhR nuclear translocator*
ASCT2	*Alanine serine cysteine transporter 2*
ATP	Adénosine triphosphate
BaP	Benzo(a)pyrène
bHLH	*Basic helix-loop-helix*
BET	Brunauer, Emmet et Teller
BPDE	Benzo(a)pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde
Brg-1	*Brahma-related gene 1*
CARM1	*Cofactor-associated arginine [R] methyltransferase 1*
CBP	*CREB binding protein*
CDK8	*Cyclin-dependent kinase 8*
Ce	Cérium
CeO_2	Dioxyde de cérium
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
CO	Monoxyde de carbone
COX2	Cyclooxygénase 2
CREB	*cAMP response element-binding protein*
CTV	Cytotrophoblaste villeux
CTEV	Cytotrophoblaste extravilleux
CYP	Cytochrome P450
Cx-43	Connexine-43
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHEAS	Sulfate de déhydroépiandrostérone
DLS	*Dynamic light scattering*
DOHaD	Origines développementales de la santé et des maladies
E1	Œstrone
E2	17β-œstradiol
E3	Œstriol

E4	Œstetrol
EDX	Energy-dispersive X-ray
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
EGF	*Epidermal growth factor*
ERα/β	Récepteur des œstrogènes α/β
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FAK	*Focal adhesion kinase*
FICZ	6-formylindolo[3,2-b]carbazole
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GCM1	*Glial cell missing 1*
GLUT	Transporteur de glucose
GM-CSF	*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
GSK3β	Glycogène synthase kinase 3β
GST	Glutathion S transférase
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HbA	Hémoglobine maternelle
HbF	Hémoglobine fœtale
hCG	Hormone chorionique gonadotrope humaine
HCl	Chlorure d'hydrogène
hCS	Hormone chorionique somatotrope
HIF	*Hypoxia inducible factor*
HLA	*Human leukocyte antigen*
HO-1	Hème oxygénase 1
hPL	Hormone placentaire lactogène humaine
Hsp90	Protéine de choc thermique 90
HTA	Hypertension artérielle
I3C	Indole-3-carbinole
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
IDO1	Indoleamine 2,3-dioxygénase 1
IFN	Interféron
IFITM	*IFN-induced transmembrane protein*
IgG	Immunoglobuline G
INRS	Institut national de recherche et de sécurité
IVG	Interruption volontaire de grossesse
L-Kyn	L-Kynurénine
L-Trp	L-Tryptophane
LH	Hormone lutéinisante
LHCGR	Récepteur de l'hCG
LDL	*Low density lipoprotein*
LIF	*Leukemia inhibitory factor*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MEB	Microscopie électronique à balayage

MET	Microscopie électronique à transmission
MLN64	*Metastatic lymph node 64*
MFSD2	*Major facilitator superfamily domain containing 2*
MPR	Récepteur nucléaire de la progestérone
MRP	*Multiple drug resistance –associated protein*
NcoA2	*Nuclear coactivator 2, SRC-2*
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NDMA	N-nitrosodiméthylamine
NES	Signal d'export nucléaire
NLS	Signal d'import nucléaire
NO_2	Dioxyde d'azote
NP	Nanoparticule
NQO1	NAD(P)H quinone oxygénase 1
NRF2	*Nuclear factor erythroid-2-related factor*
O_3	Ozone
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique
OMS	Organisation mondiale de la santé
p/CIP	*p300/CBP cointegrator protein*, SRC-3
P4	Progestérone
P450scc	*Cytochrome P450 side chain cleavage*
PCB	Biphényles polychlorés
pGH	Hormone de croissance placentaire
PlGF	*Placental growth factor*
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PM	Particules fines
pO_2	Pression partielle en oxygène
Pol II	ARN polymérase II
POP	Polluant organique persistant
PPAR-γ	*Peroxisome proliferator-activated receptor γ*
PR	Récepteur nucléaire de la progestérone
pRB	Protéine du rétinoblastome
PRMT1	*Protein arginine [R] transferase*
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RIP140	*Receptor-interacting protein 140*
SA	Semaine d'aménorrhée
SCP2	*Sterol carrier protein 2*
sFlt1	Récepteur soluble du VEGF
SiO_2	Dioxyde de silice
SO_2	Dioxyde de soufre
SOD1/2	Superoxyde dismutase 1/2
SRC-1	*Steroid receptor coactivator 1*
ST	Syncytiotrophoblaste

StAR	*Steroidogenic acute regulatory protein*
STEM	Microscopie électronique à transmission en balayage
TBP	*TATA binding protein*
TBHP	Hydroperoxyde de tert-butyle
TiO_2	Dioxyde de titane
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TDO	Tryptophane 2,3-dioxygénase
TFIIB/F	Facteurs généraux de la transcription II B/F
TGF-β	*Transforming growth factor β*
TNF-α	*Tumor necrosis factor α*
TSH	Thyréostimuline
uNK	*Uterine natural killer*
US-EPA	Agence de protection environnementale américaine
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
VLDL	*Very low density lipoprotein*
XAP2	*Hepatitis B virus X-associated protein 2*
XRE	Elément de réponse aux xénobiotiques
ZnO	Oxyde de zinc
ZnS	Sulfure de zinc
ZO-1	Zonula occludens-1

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Photographies d'un placenta humain à terme de grossesse
Figure 2. Schéma de l'organisation du placenta humain
Figure 3. Etapes précoces du développement placentaire humain
Figure 4. Schéma des voies de différenciation du cytotrophoblaste
Figure 5. Schéma d'une coupe longitudinale et transversale d'une villosité choriale
Figure 6. Jonctions inter-cellulaires impliquées dans le processus de fusion des cytotrophoblastes villeux
Figure 7. Représentation schématique en coupe de l'évolution des villosités choriales au cours de la grossesse
Figure 8. Circulations maternelle et fœto-placentaire
Figure 9. Concentrations maternelles plasmatiques d'hPL et d'hCG au cours de la grossesse
Figure 10. Schéma de la synthèse de progestérone dans le syncytiotrophoblaste
Figure 11. Concentrations maternelles plasmatiques d'œstradiol et de progestérone au cours de la grossesse
Figure 12. Schéma de la synthèse des œstrogènes dans le syncytiotrophoblaste
Figure 13. Principaux mécanismes d'échanges du syncytiotrophoblaste
Figure 14. Structures chimiques des 16 HAP considérés comme polluants prioritaires
Figure 15. Structure chimique du benzo(a)pyrène
Figure 16. Distribution dans l'organisme du benzo(a)pyrène et de ses métabolites
Figure 17. Schéma général du métabolisme du benzo(a)pyrène
Figure 18. Voies de métabolisation du benzo(a)pyrène
Figure 19. Structure de la protéine AhR
Figure 20. Voie génomique de la signalisation d'AhR
Figure 21. Voies non génomiques de la signalisation d'AhR
Figure 22. Structure des protéines ARNT et AhRR
Figure 23. Procédés de fabrication des nanomatériaux
Figure 24. Agglomération et agrégation des nanoparticules à l'état de poudre et en dispersion liquide
Figure 25. Méthodes de synthèse des nanoparticules de dioxyde de cérium
Figure 26. Activité redox des nanoparticules de dioxyde de cérium

Figure 27. Applications biologiques et biomédicales des nanoparticules de dioxyde de cérium
Figure 28. Agrégation et fusion des cytotrophoblastes primaires humains en culture
Figure 29. Profil d'expression d'IDO1 dans les trophoblastes à terme de grossesse au cours de la différenciation et en fonction des conditions de culture
Figure 30. Immunomarquage d'IDO1 dans les villosités choriales à terme de grossesse
Figure 31. Immunomarquage d'IDO1 dans les cellules trophoblastiques primaires humaines au cours de la différenciation
Figure 32. Expression génique de CYP1A1 et CYP1B1 dans les trophoblastes avant et après leur mise en culture
Figure 33. Test d'activité métabolique WST1 après exposition des syncytiotrophoblastes aux nanoparticules de dioxyde de cérium
Figure 34. Internalisation des NP de CeO_2 par les villosités choriales
Figure 35. Effet du benzo(a)pyrène sur la viabilité des trophoblastes primaires humains
Figure 36. Effet du benzo(a)pyrène sur l'état redox des trophoblastes primaires humains
Figure 37. Effet de la co-exposition du benzo(a)pyrène et des nanoparticules de dioxyde de cérium sur la viabilité des trophoblastes primaires humains
Figure 38. Effet des nanoparticules de dioxyde de cérium et du benzo(a)pyrène en exposition individuelle ou combinée sur la fusion des cytotrophoblastes

Tableau 1. Principaux facteurs régulant la différenciation et la fusion des cytotrophoblastes villeux en syncytiotrophoblastes
Tableau 2. Concentrations mesurées du benzo(a)pyrène dans le sang maternel, le placenta, le sang de cordon ombilical et le lait maternel
Tableau 3. Liste des anticorps primaires utilisés pour les Western blots et l'immunofluorescence
Tableau 4. Liste des anticorps secondaires utilisés pour les Western blots et l'immunofluorescence
Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour la PCR quantitative

INTRODUCTION

1. Le placenta humain

1.1. Description anatomique

Le placenta humain est un organe transitoire de forme discoïde d'environ 22 centimètres de diamètre et de 2 à 3 centimètres d'épaisseur à la délivrance pour un poids avoisinant les 500 grammes à terme de grossesse [1].

Le placenta possède les caractéristiques et spécificités suivantes [2] :

- chorio-allantoïdien : la circulation placentaire choriale (côté fœtal) est reliée à la circulation fœtale allantoïdienne (circulation systémique du fœtus)
- hémochorial : les villosités placentaires d'origine fœtale sont en contact direct avec le sang maternel
- pseudo-cotylédoné : les villosités sont regroupées en amas appelés cotylédons, séparés par des cloisons incomplètes appelées septa inter-cotylédonaires
- décidual : le placenta envahit l'endomètre maternel décidualisé et lors de la délivrance, le placenta entraine une partie de la muqueuse utérine, appelée décidue (muqueuse de l'endomètre transformée au niveau histologique après la nidation de l'embryon)

Le placenta possède deux faces (Figure 1) : la face chorionique orientée vers le fœtus et à laquelle le cordon ombilical est relié et la face basale ancrée dans l'endomètre maternel. Sur le versant fœtal, on observe l'arborisation des vaisseaux ombilicaux ainsi que la membrane amniotique. Sur le versant maternel, les cotylédons ont une surface irrégulière et sont séparés par des sillons qui délimitent 10 à 40 lobules placentaires.

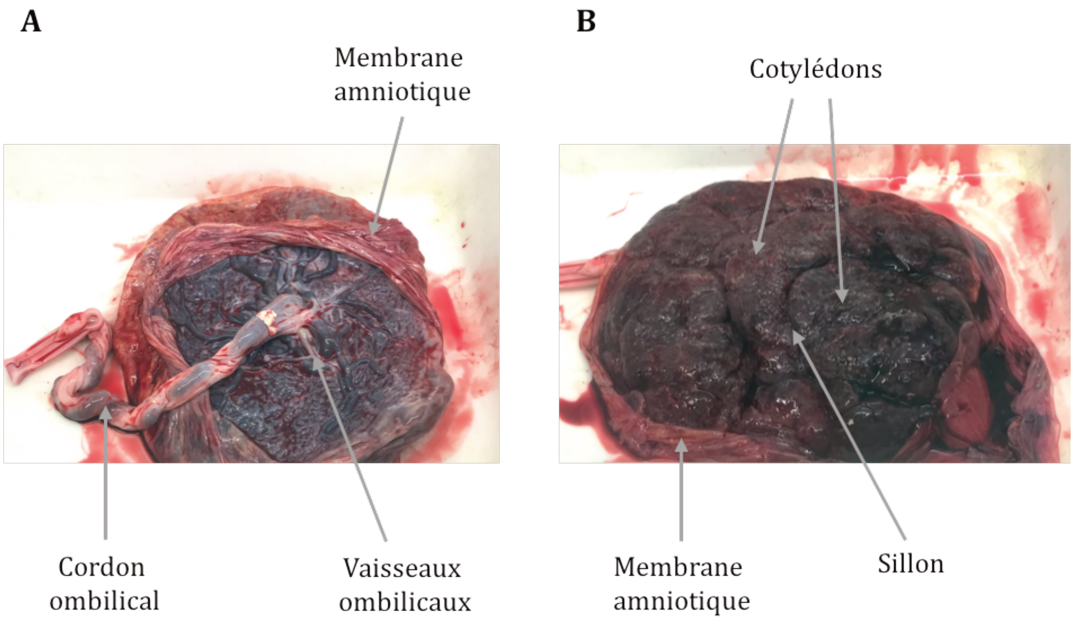


Figure 1. Photographies d'un placenta humain à terme de grossesse
A : Face fœtale avec l'insertion du cordon ombilical. **B :** Face maternelle avec les cotylédons séparés par des sillons

Le placenta humain est un placenta de type villeux : il est constitué de villosités choriales, ou placentaires, qui représentent les unités structurales et fonctionnelles du placenta (Figure 2). Ces villosités sont insérées entre les plaques choriales et basales et baignent dans du sang maternel au niveau de la chambre intervilleuse, perfusée par les artères utérines spiralées. La structure hémochoriale de la placentation chez l'humain permet l'apposition la plus intime des circulations maternelle et fœtale parmi les différents types de placentation existants. En effet, à terme de grossesse, seulement deux couches de chorion séparent les circulations maternelle et fœtale : le syncytiotrophoblaste en bordure de villosité et en contact avec le sang maternel, et les cytotrophoblastes villeux qui forment un épithélium continu en contact avec les cellules endothéliales des capillaires fœtaux et le mésenchyme de la villosité ; le placenta est de type hémodichorial.

Tout comme le fœtus, le placenta évolue en poids, taille et morphologie tout au long de la grossesse, ce que l'on définit comme l'ontogenèse placentaire. Le rapport poids du placenta/poids du fœtus s'inverse au au cours des 9 mois de grossesse, ce qui est un indicateur du bon développement fœtal et placentaire (efficience placentaire).

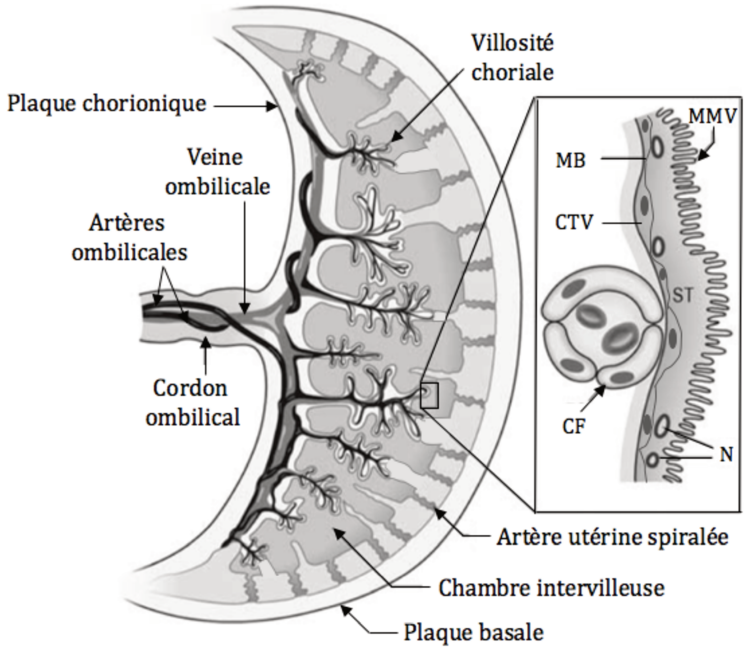


Figure 2. Schéma de l'organisation du placenta humain

Le placenta possède une cavité en son centre : la chambre intervilleuse, remplie de sang maternel en provenance des artères utérines spiralées et dans laquelle baignent les villosités choriales. Ces villosités représentent l'unité structurale et fonctionnelle du placenta. Elles sont bordées d'un syncytium trophoblastique polarisé. Les circulations maternelle et fœtale sont séparées par le syncytiotrophoblaste, les cytotrophoblastes sous-jacents et par les cellules endothéliales des capillaires fœtaux localisées dans le mésenchyme des villosités. CF : capillaire fœtal ; CTV : cytotrophoblaste villeux ; MB : membrane basale ; MMV : membrane microvillositaire ; N : noyau ; ST : syncytiotrophoblaste

Adapté d'après Gaccioli F, 2013 [3]

1.2. Développement du placenta humain

1.2.1. Genèse

Le développement embryonnaire est initié lors de l'union d'un gamète femelle (ovocyte) et d'un gamète mâle (spermatozoïde) lors de la fécondation. L'ovocyte fécondé subit une série de divisions cellulaires mitotiques au cours de sa migration dans les trompes de Fallope vers l'utérus, formant d'abord une masse cellulaire (stade morula). Le phénomène de cavitation provoque le creusement de cette morula, faisant apparaître ainsi une cavité à contenu liquidien appelée blastocèle. L'embryon arrivé à ce stade de blastocyste a une forme sphérique et présente une couche de cellules externes (trophectoderme), une masse de cellules internes (embryoblaste) et une cavité (blastocèle) (Figure 3). Le placenta et les membranes extra-embryonnaires associées sont formées dès le début de la grossesse à partir du zygote et possèdent ainsi le même

patrimoine génétique que le fœtus. Le développement morphologique du placenta se divise en stades pré-villeux (pré-lacunaire et lacunaire) et villeux [4].

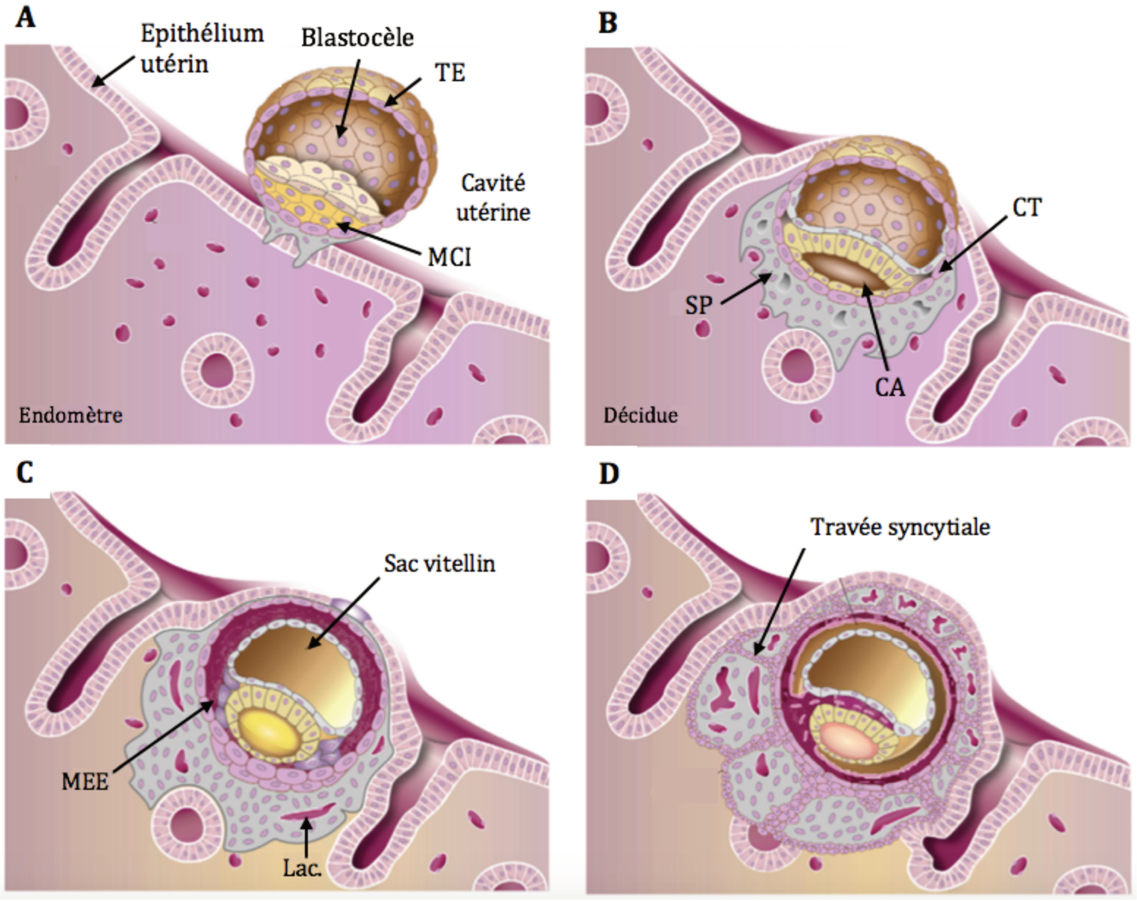


Figure 3. Etapes précoces du développement placentaire humain

A, B : Stade pré-lacunaire. L'embryon au stade blastocyste présent dans la cavité utérine est formé d'une couche cellulaire externe (trophectoderme), d'une masse cellulaire interne et est creusé d'une cavité (blastocèle). L'embryon s'implante dans l'épithélium utérin par le trophectoderme qui se différencie alors en une assise cellulaire interne (trophoblastes mononucléés) et une assise cellulaire externe composés de syncytiotrophoblastes (syncytium primaire). **C :** Stade lacunaire. La masse syncytiale est percée de lacunes délimitant des travées syncytiales qui formeront la chambre intervilleuse. **D :** Stade villeux primaire. Les cytotrophoblastes envahissent les travées syncytiales pour former les villosités choriales primaires. CA : cavité amniotique ; CT : cytotrophoblaste ; MCI : masse cellulaire interne ; Lac : lacune ; MEE : mésoderme extra-embryonnaire ; SP : syncytium primaire ; TE : Trophectoderme ; TM : trophoblaste mononucléé

D'après Turco MY, 2019 [4]

1.2.1.1. Stade pré-villeux (pré-lacunaire et lacunaire)

A six jours post-fécondation, les réserves nutritives du blastocyste tendent à s'épuiser et le conceptus s'implante dans la cavité utérine pour poursuivre son développement. C'est par la couche de cellules externes (trophectoderme) que le

blastocyste va s'accoler à l'épithélium utérin (Figure 3A). Le premier événement de différenciation cellulaire durant le développement embryonnaire est l'établissement de la lignée trophoblastique à partir des cellules constituant la coque externe du blastocyste : le trophectoderme. Il se différencie en une assise cellulaire interne, formée par les cytotrophoblastes, et une assise cellulaire externe, le syncytiotrophoblaste qui se forme par fusion des cytotrophoblastes. C'est la phase pré-lacunaire du développement placentaire [5]. Le conceptus est alors nourri par diffusion des sécrétions des glandes utérines (histotrophe).

Le syncytiotrophoblaste primitif très invasif est pourvu de capacités enzymatiques lytiques lui permettant de digérer et de pénétrer l'épithélium utérin et l'endomètre, réalisant l'enfouissement du blastocyste au sein de la muqueuse utérine (Figure 3B et 3C). L'implantation embryonnaire est différente selon les espèces, ce qui influe sur l'organisation des cellules trophoblastiques et la placentation [6].

Au 8ème jour post-fécondation, la masse syncytiale est percée de vacuoles (Figure 3C). Ces vacuoles vont former des lacunes délimitant des travées syncytiales, constituant ainsi un espace qui deviendra la chambre intervilleuse. C'est la phase lacunaire du développement placentaire.

1.2.1.2. Stade villeux

Au 13ème jour post-fécondation, les cytotrophoblastes envahissent les travées de syncytium pour former les villosités choriales primaires : le stade villeux du développement placentaire débute (Figure 3D). En parallèle, les vacuoles formées par les travées syncytiales entrent en contact avec des vaisseaux utérins et se remplissent de sang maternel pour constituer la chambre intervilleuse. Aux alentours du 17ème-18ème jour post-fécondation, le mésenchyme allantoïdien d'origine embryonnaire envahit les villosités primaires pour former ainsi les villosités secondaires. Les villosités tertiaires sont formées à partir du 18ème jour post-fécondation avec l'apparition des capillaires fœtaux, issus des hémangioblastes différenciés à partir des cellules mésenchymateuses dans l'axe mésenchymateux et l'élaboration des arbres villositaires se poursuit jusqu'au terme de la grossesse [7]. L'unité structurale et fonctionnelle du placenta, représentée par la villosité choriale, est donc mise en place dès la 3ème semaine après la fécondation dans sa structure définitive. L'arbre villositaire continue de s'étendre tout au long de la

grossesse par branchements et élongation. Dans la chambre intervilleuse, ces villosités sont flottantes. A l'interface fœto-maternelle (plaque basale), au niveau du site d'implantation, les villosités sont ancrées dans l'endomètre maternel : on parle alors de villosités crampons.

Le placenta atteint sa structure définitive en fin de premier trimestre (vers la 14ème semaine de grossesse). Il est constitué de la plaque choriale, de la chambre intervilleuse dans laquelle flotte les villosités choriales et de la plaque basale.

1.2.2. Différenciation trophoblastique

La cellule trophoblastique progénitrice, située à la base de la villosité choriale, se différencie selon deux voies distinctes (Figure 4) : d'une part en cytotrophoblastes villeux (CTV) situés au niveau des villosités flottantes, qui assurent les échanges fœto-maternels, les fonctions endocrines et la fonction de barrière, et d'autre part en cytotrophoblastes extravilleux (CTEV) invasifs situés au niveau des villosités crampons, indispensables à l'implantation, à l'immunotolérance du conceptus (considéré comme une greffe semi-allogénique par l'organisme maternel) et au remodelage des vaisseaux utérins. Les trophoblastes arrivés à un stade de différenciation terminale sont sortis du cycle cellulaire : syncytiotrophoblaste (ST) différencié à partir des CTV, cellules géantes issues des CTEV, CTEV endovasculaire.

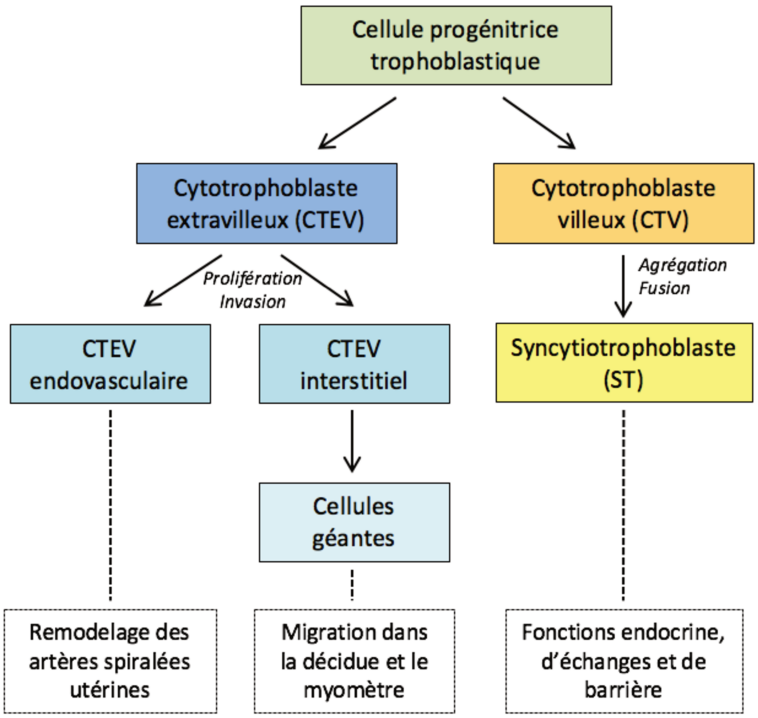


Figure 4. Schéma des voies de différenciation du cytotrophoblaste

La cellule progénitrice trophoblastique se différencie selon deux voies : le cytotrophoblaste extravilleux (CTEV) et le cytotrophoblaste villeux (CTV). Le CTEV prolifère, devient invasif et migre dans la décidue et le myomètre pour coloniser les vaisseaux maternels ou se différencier en cellules géantes. Le CTV s'agrège et fusionne pour former le syncytiotrophoblaste, responsable majoritaire des fonctions endocrine, d'échanges et de barrière du placenta.

Adapté d'après Gude et al., 2004 [8] et Evain-Brion D. et Malassiné A., 2010 [9]

1.2.2.1. Trophoblastes villeux et villosités flottantes

La villosité choriale flottante dans sa structure finale est formée d'un axe mésenchymateux dans lequel se trouvent les vaisseaux fœtaux qui se développent par vasculogenèse (formation de vaisseaux *de novo*) et angiogenèse (formation de vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants), des fibroblastes et des cellules immunitaires (macrophages, aussi appelés cellules de Hofbauer). Ce mésenchyme est bordé par un épithélium de cellules trophoblastiques mononucléées (CTV) reposant sur une membrane basale. Cet épithélium est recouvert d'un syncytium, le syncytiotrophoblaste (ST), dont les microvillosités sont en contact direct avec le sang maternel. Ce dernier est une masse cytoplasmique polynucléée, polarisée et possédant à sa surface apicale des microvillosités (filaments d'actine), augmentant ainsi sa surface d'un facteur 5 à 7 [10], ce qui favorise sa fonction d'échange (Figure 5).

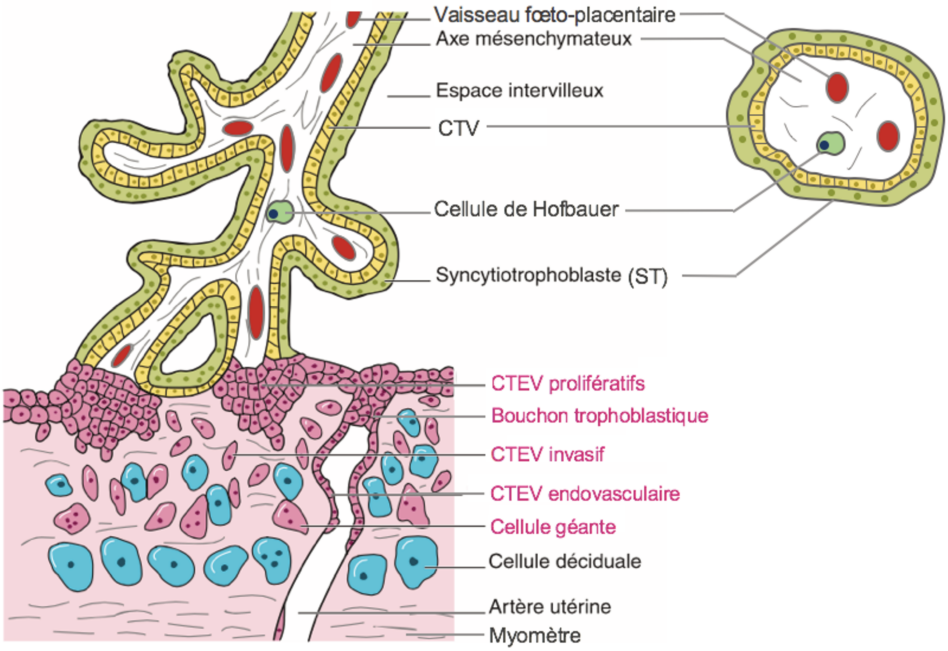


Figure 5. Schéma d'une coupe longitudinale et transversale d'une villosité choriale
La villosité choriale est constituée d'un axe mésenchymateux dans lesquels se situent les vaisseaux fœto-placentaires et des macrophages placentaires (cellules de Hofbauer), bordé d'un épithélium trophoblastique et d'un syncytium : les cytotrophoblastes villeux mononucléés (CTV) au-dessus desquels se situe le syncytiotrophoblaste polynucléé (ST), issu de la fusion des CTV sous-jacents. La villosité crampon est ancrée dans l'endomètre maternel décidualisé par des colonnes de cytotrophoblastes extravilleux (CTEV) qui envahissent la paroi et les artères utérines.

Adapté d'après Evain-Brion D. et Malassiné A., 2010 [9]

Le ST représente la cellule en différenciation terminale, sortie du cycle cellulaire donc ne possédant pas de capacité de prolifération, tout comme le CTV. Le ST est en contact direct avec le sang maternel, participant aux fonctions placentaires (nutrition fœtale, échanges gazeux, biosynthèse de protéines et d'hormones, barrière… qui seront abordées plus en détail dans le chapitre 1.3). Ce syncytium se renouvelle tout au long de la grossesse par agrégation et fusion avec les CTV sous-jacents. Une fois les noyaux des cytotrophoblastes intégrés au syncytium, l'activité de transcription est maintenue, puis est suivie d'une phase de différenciation terminale dans laquelle les noyaux changent de forme et perdent leur activité transcriptionnelle, dû à la condensation globale de la chromatine [11]. D'autres organites tels que les mitochondries subissent un remodelage lors de la syncytialisation et leur morphologie est modifiée ainsi que leurs fonctions (acquisition de la machinerie de stéroïdogenèse) [12]. Par conséquent, l'activité fonctionnelle du ST dépend de l'incorporation continue d'ARNm, protéines et organelles via la fusion du contenu cytoplasmique provenant des CTV. Pour équilibrer

l'incorporation constante de nouveaux organites par ce processus de fusion, les organites vieillissants du ST sont empaquetés dans des structures semblables à des vésicules apoptotiques et se desquament dans la chambre intervilleuse, formant ainsi des débris syncytiaux polynucléés, appelés « syncytial knots », libérés dans la circulation maternelle [13]. Ces débris, incluant des fragments membranaires et cytoplasmiques, sont en grande partie à l'origine des fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN) fœto-placentaires circulant dans le sang maternel. En clinique, depuis 2009, la présence de ces fragments d'ADN dans la circulation maternelle permet le dépistage non invasif (prise de sang) des anomalies génétiques du fœtus telles que les trisomies. Le nombre de ces débris syncytiaux est augmenté en cas de souffrance placentaire, comme lors de la pré-éclamspie [14].

1.2.2.1.1. Mécanismes mis en jeu lors de la différenciation des CTV en ST

L'événement de fusion des CTV est complexe et les mécanismes mis en jeu ne sont pas totalement élucidés. Cependant, cela implique trois étapes étroitement régulées dans l'espace et le temps : l'acquisition de la compétence pour la fusion, l'engagement dans le processus de fusion et la fusion proprement dite.

Compétence pour la fusion

De nombreux facteurs d'origine maternelle, placentaire ou fœtale activant ou inhibant la formation du ST ont été identifiés grâce au développement de modèles *in vitro* d'étude du trophoblaste (Tableau 1) [9], [15]–[22]. Il s'agit notamment de :

- hormones : l'activine-A, l'hCG, l'œstradiol
- facteurs de transcription : GCM1 (glial cell missing 1), Twist1 et NRF2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2)
- récepteurs nucléaires : le PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)
- facteurs régulant l'hypoxie : SOD-1 (superoxyde dismutase 1)
- facteurs de croissance : le système EGF/récepteur EGF (epidermal growth factor), le VEGF (vascular endothelial growth factor), le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
- cytokines : le LIF (leukemia inhibitory factor), le TNF-α (tumor necrosis factor α), le TGF-β1 (transforming growth factor β1), le PL74 (membre de la superfamille

du TGF-β), l'interféron de type I (IFN) et les IFITMs (IFN-induced transmembrane proteins)

- neuropeptides : l'endothéline

	Activateurs	Inhibiteurs
Hormones	• Activine A • hCG • Œstradiol	
Facteurs de transcription	• GCM1 • Twist1 • NRF2	
Récepteurs nucléaires	• PPAR-γ	
Facteurs régulant l'hypoxie		• SOD-1
Facteurs de croissance	• EGF/EGF-R • VEGF • GM-CSF	
Cytokines	• PL74	• LIF • TNF-α • TGF-β1 • IFN/IFITMs
Neuropeptides		• Endothéline

Tableau 1. Principaux facteurs régulant la différenciation et la fusion des cytotrophoblastes villeux en syncytiotrophoblastes
Actualisé d'après Evain-Brion D. et Malassiné A., 2010 [9]

Les mécanismes mis en jeu restent peu décrits. Cependant, l'activine-A sécrétée par les cellules mésenchymateuses des villosités choriales a été montrée comme favorisant la fusion trophoblastique par un mécanisme paracrine dépendant de Smad (un acteur des voies de signalisation généralement impliqué dans la prolifération, la différenciation cellulaire et la transition épithélio-mésenchymateuse) [15]. Egalement, le TGF-β n'étant exprimé que par les syncytiotrophoblastes, cela pourrait indiquer un rétro-contrôle négatif de la fusion des cytotrophoblaste par le ST [23]. Les IFITMs, une famille de protéines bloquant l'étape d'entrée cellulaire de nombreux virus, ont été montrées comme inhibant la fusion des trophoblastes médiée par les syncytines (protéines d'origine rétrovirale décrites ci-après dans ce paragraphe) [22]. L'hCG est sécrétée au début du développement embryonnaire humain par les cellules trophoblastiques

embryonnaires et pourrait agir comme déclencheur de la formation du syncytium primaire [24] puis est produite majoritairement par le ST et favorise la syncytialisation de manière autocrine-paracrine [25]. Cet effet de l'hCG est médié par sa liaison à son récepteur LHCGR (récepteur liant également l'hormone lutéinisante LH) qui induit la production du second messager AMP cyclique dans les trophoblastes [25], [26], ce qui conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA). La PKA phosphoryle et active le facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein), ce qui augmente la transcription de facteurs impliqués dans la fusion (notamment hCG, GCM1, connexine 43 et syncytines) [27]. NRF2 promeut la différenciation en induisant l'expression de PPAR-γ, l'aromatase (impliquée dans la synthèse des hormones stéroïdes) et du micro-ARN miR-1246 (ciblant GSK3β et AXIN2, deux inhibiteurs de la voie Wnt/β-caténine, voie de signalisation impliquée dans la fusion des trophoblastes) [18]. PPAR-γ exercerait son effet activateur de la différenciation trophoblastique en induisant l'expression de GCM1 [28].

Engagement dans le processus de fusion

Cette phase d'engagement se caractérise par des processus d'adhérence et de communication entre les CTV eux-mêmes et les CTV et le ST. Cela implique l'E-cadhérine et la cadhérine-11 des jonctions adhérentes, la zonula occludens-1 (ZO-1) des jonctions serrées et la connexine-43 (Cx-43) des jonctions gap (Figure 6).

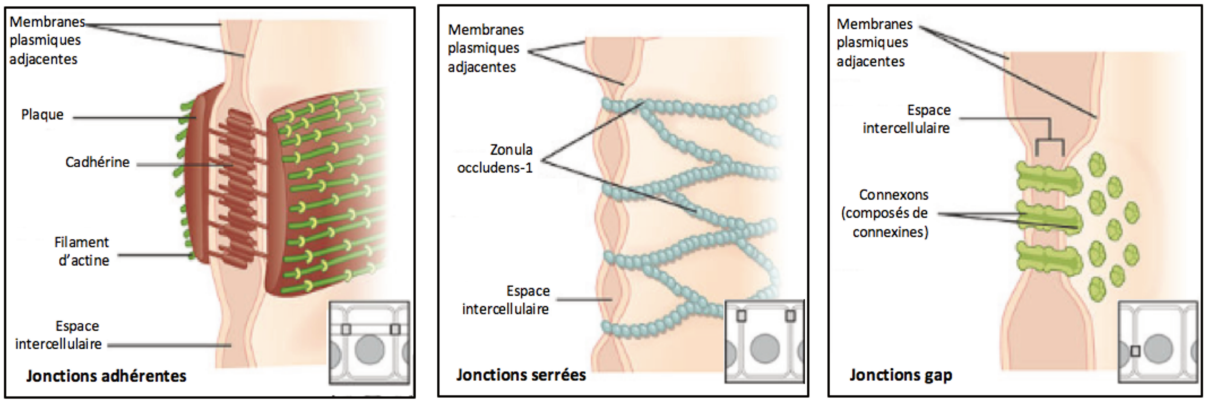


Figure 6. Jonctions intercellulaires impliquées dans le processus de fusion des cytotrophoblastes villeux

Les CTV adhèrent et communiquent entre eux grâce à trois types de jonctions. Les jonctions adhérentes attachent les cellules entre elles grâce à la cadhérine et par l'implication du cytosquelette d'actine. Les jonctions serrées sont des jonctions étanches entre les cellules et impliquent la zonula occludens-1 (ZO-1). Les jonctions gap permettent la communication intercellulaire par la formation de canaux appelés connexons (composés de connexines) qui transmettent les signaux entre les cellules.

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires impliquées dans l'adhérence intercellulaire par la formation de jonctions adhérentes. L'expression de la protéine E-cadhérine diminue pendant la fusion cellulaire et est absente dans le ST [29] alors que l'expression de la cadhérine-11 augmente lors de la fusion trophoblastique [30]. Les cadhérines stabilisent les membranes cellulaires voisines en les ancrant les unes aux autres, puis déclenchent l'étape d'apposition membranaire du processus de fusion cellulaire. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'implication de la E-cadhérine et de la cadhérine-11 dans la régulation de la fusion cellulaire restent peu décrits. L'utilisation d'anticorps spécifiques contre le domaine extracellulaire de la E-cadhérine perturbe l'agrégation des CTV et bloque la syncytialisation des trophoblastes humains [29].

Les jonctions serrées sont composées de protéines qui assurent la jonction entre les membranes des cellules voisines. ZO-1 est exprimé dans les cytotrophoblastes et son expression diminue lors de la fusion cellulaire, lié à la fusion des membranes. La diminution de l'expression de ZO-1 par ARN interférent dans les cytotrophoblastes humains bloque à la fois l'adhérence intercellulaire et la fusion et est associé à une diminution de l'expression de la Cx-43 [31] ainsi que de l'E-cadhérine [32].

La communication entre cellules adjacentes est médiée par des jonctions gap, composées d'héxamères de connexine (Cx) et formant des demi-canaux qui s'alignent permettant l'échange de petites molécules, ions, métabolites et seconds messagers, facilitant ainsi la coordination cellulaire et la différenciation [33]. La Cx-43 participe à la régulation de la fusion des trophoblastes humains par le contrôle de la communication cellulaire [34].

Fusion médiée par les syncytines

La dernière étape du processus de fusion cellulaire est définie par la fusion des deux membranes plasmiques et le mélange des contenus cytoplasmiques. Cette dernière étape est médiée par les syncytines, qui sont des glycoprotéines d'origine rétrovirales intégrées dans le génome humain il y a environ 40 millions d'années.

La syncytine 1 a été la première protéine fusogène montrée comme contrôlant la fusion des trophoblastes humains grâce à ses propriétés de type enveloppe rétrovirale

(protéine d'enveloppe de HERV-W) [35]. La syncytine 1 interagit avec son récepteur ASCT2 (alanine serine cysteine transporter 2), un transporteur d'acide aminé neutre. L'ASCT2 est co-localisée in vitro avec la Cx-43 [34], [36]. La syncytine 2 (protéine d'enveloppe de HERV-FRD) interagit avec un autre récepteur transmembranaire qui lui est spécifique, MFSD2 (major facilitator superfamily domain containing 2). Les deux syncytines diffèrent dans leur sites d'expression trophoblastique : la syncytine 1 est exprimée à la fois dans les CTV, ST et CTEV alors que la syncytine 2 n'est exprimée que dans le CTV [37], [38]. Il a été démontré que l'expression d'ASCT2 se limite au cytotrophoblaste villeux [39] tandis que MFSD2 s'exprime exclusivement dans le syncytiotrophoblaste [40]. De nombreuses études existent sur la régulation de l'expression des syncytines et cela dépend du facteur de transcription GCM1 notamment [41]. La syncytine 2 jouerait un rôle plus important dans la fusion des cytotrophoblastes, comparé à la syncytine 1 [42].

Le mode d'action de la syncytine 1 est mieux caractérisé que pour la syncytine 2. La syncytine 1 par la liaison à son récepteur situé sur la membrane d'une autre cellule ancre la membrane cible et induit une flexion locale de la bicouche membranaire de la cellule compétente voisine. Cela établit un contact rapproché des feuillets des membranes des deux cellules, permettant ainsi la fusion. La flexion médiée par les syncytines génère des changements locaux dans la composition lipidique en déstabilisant les bicouches lipidiques membranaires. Ce phénomène pourrait expliquer le flip de phosphatidylsérine dans les trophoblastes. Les phosphatidylsérines sont distribuées de façon asymétrique dans la membrane plasmique et se situent du côté cytosolique. Cette relocalisation de phosphatidylsérine vers le feuillet externe de la membrane plasmique est initialement connue dans le processus apoptotique des cellules [43] mais dans le cas particulier des trophoblastes, il est une condition préalable à la fusion syncytiale (en dehors de tout processus apoptotique) [44], [45]. Rote et ses collègues ont pu inhiber la fusion en appliquant un anticorps monoclonal dirigé contre la phosphatidylsérine dans une lignée de choriocarcinome [46].

1.2.2.1.2. Conséquences de la différenciation des CTV en ST

Au début de la grossesse, les CTV forment une couche continue qui borde le ST sur le versant fœtal et sont de forme cuboïde avec un grand ratio noyau/cytoplasme. Au fur et à mesure de l'avancement de la grossesse, les arbres villositaires s'étendent et la couche de CTV s'amincit et 75% de la surface villositaire à terme n'est recouverte que de fins allongements cytoplasmique des CTV [47] (Figure 7). Seulement une fine couche d'épithélium trophoblastique sépare donc l'axe mésenchymateux du sang maternel en fin de grossesse. En effet, la distance entre la circulation maternelle et la circulation fœtale est réduite à environ 5 µm à terme, alors qu'elle est d'environ 50 µm au premier trimestre de grossesse [48].

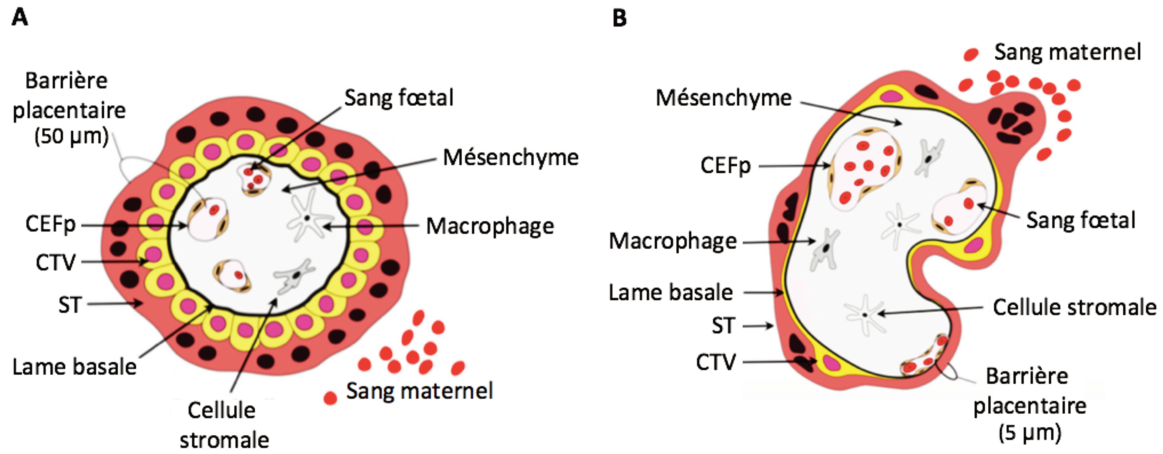


Figure 7. Représentation schématique en coupe de l'évolution des villosités choriales au cours de la grossesse

Schéma de coupes d'une villosité choriale de premier trimestre **(A)** et à terme **(B)** de grossesse montrant les principaux types cellulaires et la barrière placentaire. La barrière placentaire constituée de la bicouche trophoblastique s'amincit au cours de l'ontogenèse placentaire. La couche de cytotrophoblaste s'amincit et consiste principalement en de fins allongements cytoplasmiques à terme. La distance entre la circulation maternelle et la circulation fœtale est réduite à environ 5 µm à terme, alors qu'elle est d'environ 50 µm au premier trimestre de grossesse. CEFp : cellule endothéliale fœtale placentaire ; CTV : cytotrophoblaste villeux ; ST : syncytiotrophoblaste

Adapté d'après Chatuphonprasert, 2018 [49]

La syncytialisation s'accompagne notamment de la différenciation fonctionnelle, marquée entre autres par l'expression de certains gènes spécifiques du ST comme ceux de l'hormone placentaire lactogène (hPL), de l'hormone de croissance placentaire (PGH), ou encore du cytochrome P450 aromatase impliqué dans la stéroïdogenèse placentaire pour la production d'œstrogènes.

1.2.2.2. Trophoblastes extravilleux et villosités crampons

Le trophoblaste extravilleux se caractérise par son phénotype migratoire et invasif, capable d'envahir la décidue et le myomètre jusqu'au tiers supérieur et de remodeler les tissus maternels utérins, notamment les artères spiralées utérines pour assurer l'apport sanguin maternel à l'unité fœto-placentaire. Il « dialogue » également avec les cellules immunitaires utérines (lymphocytes T, macrophages, cellules utérines Natural Killer uNK). A l'endroit où les cytotrophoblastes sont en contact avec la décidue (à l'interface fœto-maternelle), les cellules trophoblastiques envahissent la décidue et se différencient en CTEV. Ces CTEV sont donc situés à la base de la villosité crampon et regroupés sous forme de colonnes de cellules polarisées et agrégées les unes aux autres (Figure 5).

A la base de la villosité crampon, les CTEV sont prolifératifs et forment des colonnes qui pénètrent dans la *decidua basalis*, permettant l'ancrage des villosités choriales. Cette capacité de prolifération est ensuite perdue lorsque les cellules s'éloignent de l'axe mésenchymateux de la villosité. En effet, les CTEV s'arrêtent de proliférer (sortie du cycle cellulaire) et deviennent invasifs (transition épithélio-mésenchymateuse) [50]. Il est intéressant de noter que les CTEV invasifs sont aneuploïdes par des phénomènes d'endoréplication successifs, dont les rôles ne sont actuellement pas complètement élucidés. Deux types de trophoblastes invasifs ont été identifiés : interstitiels et endovasculaires. Les CTEV interstitiels sont responsables de la colonisation de l'endomètre et du myomètre superficiel et terminent leur parcours en se différenciant en cellules géantes multinucléées par fusion et endoréplication. Les CTEV endovasculaires participent au remodelage vasculaire utérin. Ces cellules infiltrent les vaisseaux utérins par voie endovasculaire et périvasculaire (extravasation) [51], en particulier les artères et les artérioles et supplantent l'endothélium vasculaire par destruction de la tunique élastique artérielle et remplacement par une paroi fibreuse atone insensible aux substances vaso-actives. Ces vaisseaux ne subissent donc pas de modification de leur calibre, ce qui permet un maintien d'un afflux constant de sang dans la chambre intervilleuse. On observe alors des bouchons de cellules trophoblastiques obstruant la lumière de ces artères utérines au premier trimestre de grossesse.

En plus de ces mécanismes caractérisés depuis de nombreuses années, l'invasion trophoblastique commencerait déjà au moment de l'implantation, permettant une nutrition histiotrophique de l'embryon avant la perfusion du placenta par le sang maternel [52]. Une invasion trophoblastique des vaisseaux lymphatiques de l'utérus a également été décrite. L'invasion des artères spiralées par les trophoblastes interviendrait ensuite pour laisser place à une nutrition hémotrophique du fœtus.

1.2.2.3. Les bouchons trophoblastiques

Les bouchons trophoblastiques sont formés par les CTEV. Ces cellules empêchent les éléments figurés du sang maternel d'entrer dans la chambre intervilleuse jusqu'à environ la 8ème semaine d'aménorrhée (SA). De ce fait, l'environnement placentaire est pauvre en oxygène durant cette période, avec une pression partielle en oxygène (pO_2) à 20 mmHg à la 8ème SA. On observe le délitement progressif de ces bouchons à partir de la 10ème SA, la chambre intervilleuse se remplit alors de sang maternel et la pO_2 augmente jusqu'à 55 mmHg à 12 SA.

1.2.3. Mise en place des circulations maternelle et fœtale

1.2.3.1. Circulation fœtale

A terme de grossesse, le réseau vasculaire placentaire est très développé et a une longueur de plus de 550 km. La vasculogenèse fœtale commence environ au 20ème jour post-fécondation et est initiée par la différenciation d'hémangioblastes au niveau local, précurseurs des cellules endothéliales. Les premières lumières vasculaires au sein de la villosité flottante apparaissent au 23ème jour post-fécondation et la circulation entre l'embryon et le placenta s'établit à ce moment. Cette différenciation des hémangioblastes est induite par le Vascular endothelial growth factor (VEGF-A), produit par les cellules trophoblastiques, qui agit via deux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Le trophoblaste produit également du PlGF (placental growth factor), un facteur pro-angiogénique. Ces facteurs angiogéniques sont régulés par les concentrations locales en oxygène. La faible pression partielle en oxygène pendant le premier trimestre de grossesse est favorable à l'angiogenèse et la vasculogenèse placentaire.

Le cordon ombilical est constitué de 2 artères conduisant le sang de l'embryon vers le placenta et d'une veine qui ramène le sang ayant circulé dans les villosités choriales vers l'embryon (Figure 8). Le sang circule dans les artères ombilicales à une

pression de 50 mmHg, passe par les ramifications qui traversent la plaque choriale puis dans les capillaires où la pression est de 30 mmHg.

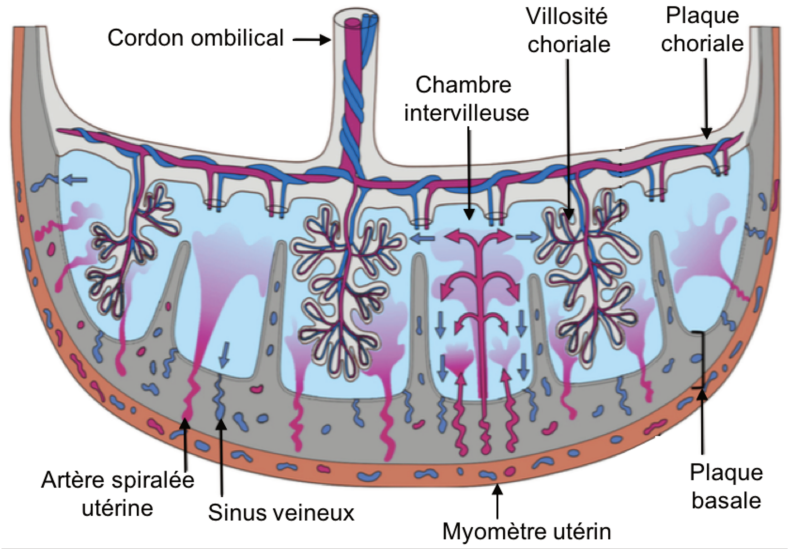


Figure 8. Circulations maternelle et fœto-placentaire

Le sang maternel arrive dans la chambre intervilleuse par les artères spiralées utérines, irrigue les villosités placentaires et retourne vers l'organisme maternel par les sinus veineux. Le cordon ombilical est constitué de deux artères conduisant le sang fœtal vers les villosités et d'une veine qui ramène le sang des villosités vers l'embryon.

Adapté d'après Chatuphonprasert, 2018 [49]

1.2.3.2. Circulation maternelle

Le sang maternel arrive dans la chambre intervilleuse par les artères spiralées utérines, qui se situent dans le myomètre (Figure 8). Après avoir irrigué les villosités, ce sang repart vers l'organisme maternel par les sinus veineux. La chambre intervilleuse est un vaste espace dont le volume augmente au cours de la grossesse et atteint 150 à 200 ml à terme, avec un débit de 600 ml/min. Le sang maternel circule dans les artères spiralées à une pression de 70 mmHg et cette pression sanguine diminue dans la chambre intervilleuse puisqu'elle n'est que de 10 mmHg. Cette pression basse permet aux vaisseaux fœtaux de la villosité choriale de ne pas être comprimés et ne pas se collaber. Le flux du sang maternel circulant autour des villosités placentaires joue un rôle dans les échanges materno-fœtaux. De plus, le flux sanguin et la stimulation mécanique des cellules par les forces de cisaillement générées, appelées « shear stress », sont critiques pour le développement placentaire en ce qui concerne l'homéostasie vasculaire des villosités (expansion et remodelage vasculaire) et les échanges materno-fœtaux [53].

1.3. Fonctions du placenta

Le placenta possède de multiples fonctions nécessaires au bon déroulement de la grossesse : tolérance immunitaire du fœtus dans l'environnement maternel, fonctions endocrines, échanges fœto-maternels, fonction de barrière. Des liens ont été établis entre des dysfonctionnements placentaire et des pathologies de la grossesse telles que la pré-éclamspie ou le retard de croissance intra-utérin (RCIU) [54]. Les cellules trophoblastiques participent au développement fœtal en facilitant la délivrance des ressources maternelles au fœtus et protègent le fœtus d'expositions adverses émanant du côté maternel.

1.3.1. Tolérance immunitaire

Le trophoblaste ayant pour origine le trophectoderme, il possède le même caryotype que le fœtus. Les cellules trophoblastiques expriment donc aussi des molécules d'origine paternelle en contact direct avec les tissus maternels et qui devraient être reconnues par la mère comme du « non-soi ». Le ST fonctionne comme une barrière protectrice immunologique locale, car il n'exprime aucun antigène humain de leucocyte (HLA pour human leukocyte antigen). Malgré la présence du fœtus allogénique, les cellules immunitaires circulantes dans le sang maternel ne détectent donc pas le ST comme du « non-soi » [55]. Le non-rejet des CTEV par les cellules immunitaires maternelles est lié à l'expression à leur surface d'antigènes de classe 1 appelés HLA-G et à la sécrétion de nombreuses cytokines et facteurs immunomodulateurs [56]. Les CTEV établissent donc un dialogue avec les cellules de la décidue maternelle et jouent un rôle prépondérant dans le non-rejet de l'unité fœto-placentaire par l'organisme maternel [57].

1.3.2. Endocrine

Le placenta est également un organe endocrine majeur, sécrétant plus de 100 hormones peptidiques et stéroïdes qui modulent la physiologie maternelle permettant ainsi l'adaptation de l'organisme maternel à la grossesse [58]. Les hormones placentaires jouent des rôles importants dans différents évènements de la grossesse : implantation, placentation, remodelage vasculaire, immunomodulation, lactation. La fonction endocrine placentaire est cruciale pour le bon déroulement de la grossesse. La source majeure d'hormones placentaires est le syncytiotrophoblaste, qui exprime la

machinerie nécessaire pour la biosynthèse de nombreuses hormones incluant les hormones stéroïdes (progestérone, œstrogènes), les hormones polypeptidiques (hormone chorionique gonadotrope hCG, hormone lactogène placentaire hPL, hormone de croissance placentaire PGH, leptine) ainsi qu'une variété de facteurs de croissance, cytokines et autres peptides impliqués dans la physiologie de la grossesse par un rôle autocrine ou paracrine [59]. L'activité hormonale du ST est fortement polarisée : il sécrète plus de 99% de ces hormones dans la circulation maternelle.

1.3.2.1. Les hormones polypeptidiques placentaires

1.3.2.1.1. L'hCG

La gonadotrophine chorionique humaine (hCG) est une des plus importantes hormones liées à la grossesse. Cette hormone de 37 kDa, spécifique de l'espèce humaine, appartient à la famille des hormones glycoprotéiques, dont fait également partie les hormones hypophysaires LH, FSH et TSH. Ces hormones sont composées de deux sous-unités : une sous unité α commune et une sous-unité β leur conférant leur spécificité. La sous-unité β est codée par un cluster de gènes localisé sur le chromosome 19 [60] issu de la duplication au cours de l'évolution du gène de la LH. La sous-unité β de l'hCG est caractérisée par une forte glycosylation : 2 sites de N-glycosylation et 4 sites de O-glycosylation dans sa partie C-terminale. Il existe 5 isoformes majeures d'hCG connues : l'hétérodimère hCG, l'hétérodimère hCG hyperglycosylé, l'hCG sulfaté, la sous-unité β-hCG libre, et la sous-unité β-hCG libre hyperglycosylée. Les deux premières isoformes produites par le placenta sont impliquées dans le processus de placentation et dans la grossesse. L'hCG sulfaté d'origine hypophysaire intervient pendant le cycle menstruel en participant à l'ovulation et la formation du corps jaune cyclique. Les deux dernières isoformes sont majoritairement produites par les cellules tumorales notamment dans les cancers des cellules endométriales et des cellules germinales ovariennes et testiculaires [61].

Dès le 7ème jour post-fécondation au moment de l'implantation, l'hCG est le premier message soluble produit par le trophoblaste vers l'organisme maternel. L'hCG est donc détectable très tôt dans l'organisme maternel et son dosage est d'ailleurs utilisé pour diagnostiquer une grossesse. Cette hormone possède un grand nombre de fonctions biologiques. L'hCG est indispensable au déroulement de la grossesse chez la

femme, puisqu'elle permet la transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gravidique, qui assure le maintien de la sécrétion ovarienne de progestérone, œstrone et œstradiol durant les 6 premières semaines de grossesse [62]. Passé ce délai, l'unité fœto-placentaire prend le relai et supplée aux fonctions ovariennes, illustrant ainsi l'indépendance du système endocrine placentaire vis-à-vis de l'organisme maternel. L'hCG joue également un rôle dans l'implantation en contribuant à la réceptivité endométriale de la décidue et en modulant les réponses immunitaires utérines, dans l'angiogenèse et la vasculogenèse au niveau de l'endothélium utérin et dans la maintenance de la quiescence myométriale [62]. De plus, l'hCG contribue à l'immunotolérance maternelle par la régulation des cellules T, dendritiques, uNK et cellules B régulatrices [63] et joue un rôle important dans la différenciation du trophoblaste par un mécanisme autocrine [64]. *In vitro*, la production d'hCG favorise et reflète la bonne différenciation fonctionnelle des CTV en ST. Cette hormone semble également avoir des effets protecteurs contre le cancer du sein, dû à la différenciation du tissu mammaire après une grossesse menée à terme [61]. Ces effets sont médiés par la liaison de l'hCG à son récepteur appelé LHCGR, un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à la voie de signalisation de l'AMP cyclique et de la phospholipase C. Ce récepteur est exprimé par les CTV, CTEV et à un moindre degré par le ST [25].

Le ST est la principale source de production d'hCG tout au long de la grossesse, sécrétée à 99% dans le sang maternel. Compte tenu de son importante copule glycanique qui lui confère une demi-vie élevée, l'hCG est considérée comme un super agoniste de la LH.

Au premier trimestre de grossesse, le trophoblaste extravilleux invasif produit également de l'hCG : une forme comparable à celle sécrétée par le ST et une forme hyperglycosylée (hCG-H) comparable à celle produite par le choriocarcinome. L'hCG-H stimule l'invasion du trophoblaste de façon autocrine et contribuerait à la modulation du processus physiologique d'invasion trophoblastique en début de grossesse [65]. L'hCG-H stimule également de façon paracrine l'angiogenèse en interagissant avec le récepteur du TGF-β et activant la voie de signalisation Smad de façon indépendante du LHCGR [66].

La concentration d'hCG dans l'organisme maternel augmente progressivement dès l'implantation de l'embryon pour atteindre un pic vers la 10ème semaine post-fécondation puis diminue de manière drastique jusqu'au 3ème mois de grossesse pour rester stable jusqu'à l'accouchement (Figure 9).

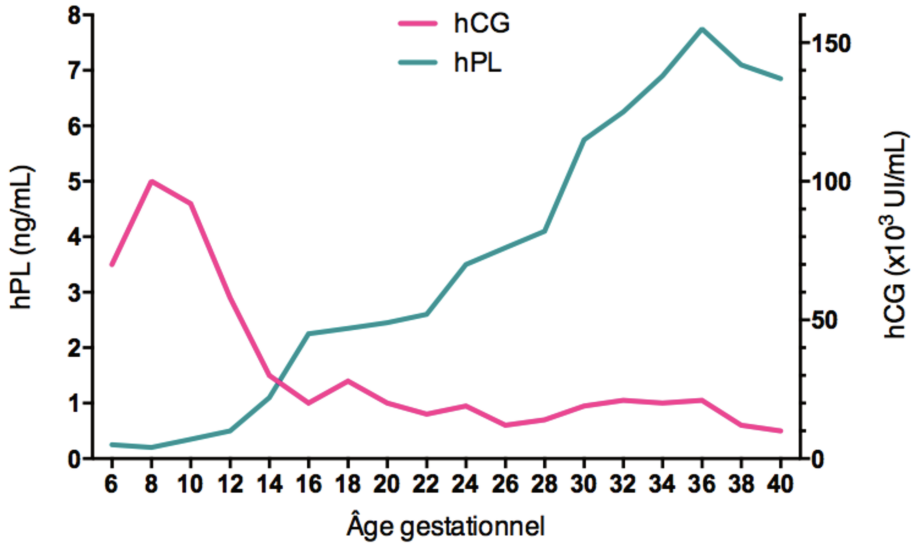


Figure 9. Concentrations maternelles plasmatiques d'hPL et d'hCG au cours de la grossesse

Les valeurs moyennes sont exprimées en fonction de l'âge gestationnel en semaines de grossesse.

1.3.2.1.2. L'hPL

L'hormone placentaire lactogène (hPL), aussi appelée hormone chorionique somatotrope (hCS), est une hormone constituée d'une seule chaine polypeptidique de 23 kDa. Elle est produite principalement par le syncytiotrophoblaste, mais les CTEV peuvent également en produire [67]. Détectable dès la 3ème semaine de grossesse dans le sang maternel, l'augmentation de sa sécrétion au cours de la grossesse suit l'évolution de la masse placentaire (Figure 9). Le rôle de cette hormone est peu caractérisé mais elle préparerait la lactation en induisant la prolifération et différenciation des cellules de la glande mammaire. De plus, cette hormone interviendrait dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique maternel en augmentant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose pendant la grossesse, important pour l'homéostasie énergétique de la mère et du fœtus [68], [69].

1.3.2.1.3. La GH placentaire

L'hormone de croissance placentaire (PGH ou GHv) est une protéine de 25 kDa, partiellement glycosylée. La PGH possède une forte homologie avec l'hPL et est encodée par le même cluster de gènes. Cette hormone est sécrétée par le trophoblaste invasif au premier trimestre de la grossesse et stimule de façon autocrine l'invasion [70]. Le syncytiotrophoblaste sécrète à partir du deuxième trimestre la PGH dans le sang maternel de manière continue. La PGH est donc détectable dans le sang maternel à 15-20 semaines post-fécondation et son niveau augmente de manière importante durant le troisième trimestre de grossesse. La PGH ne semble pas avoir d'effet direct sur la croissance fœtale car cette hormone n'est pas détectable dans la circulation fœtale [71] mais pourrait agir indirectement sur cette croissance en modifiant la disponibilité placentaire des éléments nutritifs par la régulation de la résistance à l'insuline maternelle [72].

1.3.2.1.4. Autres hormones polypeptidiques

Le syncytiotrophoblaste sécrète également d'autre hormones polypeptidiques au cours de la grossesse telles que l'activine A et l'inhibine A, deux membres de la superfamille du TGF-β, ainsi que des régulateurs de l'homéostasie énergétique tels que la leptine, la résistine et l'adiponectine.

Activine A et inhibine A

Comme décrit dans le paragraphe 1.2.2.1.1., l'activine A est un activateur de la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste. De plus, l'activine et l'inhibine modulent la sécrétion placentaire d'hCG et de progestérone [73]. La concentration maternelle d'activine augmente graduellement durant la grossesse et atteint un maximum à terme et le placenta est la principale source de production [69].

Leptine

Le ST produit également de la leptine, une adipokine impliquée dans la régulation de l'appétit et stimulant la sécrétion d'insuline, et possède des récepteurs pour cette hormone. Pendant la grossesse, la leptine synthétisée par le placenta est sécrétée dans la circulation maternelle et fœtale et dans le liquide amniotique [74]. La concentration sérique maternelle de leptine augmente au cours de la grossesse et atteint un maximum

à terme et un taux élevé est observé en cas de diabète maternel ou de pré-éclampsie [74]. La principale source de production est le ST mais les CTEV sont également capable de la sécréter et la production est plus importante au premier trimestre qu'à terme de grossesse [74]. La leptine possède des effets pléiotropes sur les trophoblastes en modulant la fonction endocrine du ST en stimulant la sécrétion d'hCG et inhibant celle de progestérone et d'œstradiol [74]. Après le second trimestre, la grossesse est généralement un état physiologique de résistance à la leptine causé par les autres hormones de la gestation (progestérone, œstrogènes et hPL), requis pour l'apport nutritif au fœtus et pour la préparation du corps à la demande métabolique de la lactation [75].

Résistine

La résistine possède une action métabolique opposée à celle de la leptine et est produite par le ST qui possède d'ailleurs des récepteurs pour cette hormone [76].

Adiponectine

L'adiponectine est une adipokine. Cette hormone promeut la sensibilité à l'insuline, a des effets anti-inflammatoires et son taux est inversement corrélé avec la graisse corporelle [77]. Sa production par le placenta est controversée [77]–[80].

1.3.2.2. Les hormones stéroïdes

1.3.2.2.1. La progestérone

Durant les six premières semaines de grossesse, la progestérone est produite par le corps jaune gravidique stimulé par l'hCG placentaire. Le placenta prend ensuite le relai dans la production de cette hormone avec la mise en place progressive dans le ST des différentes enzymes de la stéroïdogenèse.

La progestérone (P4) a pour précurseur le cholestérol, véhiculé par les lipoprotéines du plasma maternel. Le ST, en contact direct avec le sang maternel, possède des récepteurs spécifiques pour les lipoprotéines : les récepteurs LDL (low density lipoprotein) et VLDL (very low density lipoprotein). Ces récepteurs permettent au ST de capturer les LDL maternels circulants par le mécanisme classique d'internalisation médiée par récepteur. Le cholestérol ainsi internalisé sera utilisé pour

la biosynthèse des membranes cellulaires placentaires et pour la stéroïdogenèse. Ce cholestérol intracellulaire est transporté par la Sterol Carrier Protein-2 (SCP2) à la membrane externe de la mitochondrie. Contrairement aux autres organes stéroïdogènes, le placenta n'exprime pas la StAR (steroidogenic acute regulatory protein), une protéine qui transfère le cholestérol vers la membrane mitochondriale interne, qui est une étape critique et limitante dans la synthèse de la progestérone. Cette fonction est assurée par le Metastatic Lymph Node 64 (MLN64). La première étape de la sétroïdogenèse est la conversion du cholestérol en prégnénolone sous l'action du cytochrome P450 side chain cleaveage (P450scc), codé par le gène CYP11A1. La progestérone est ensuite synthétisée à partir de la prégnénolone grâce à la 3β-hydroxystéroide-deshydrogénase (3β-HSD), également localisée dans la mitochondrie (Figure 10).

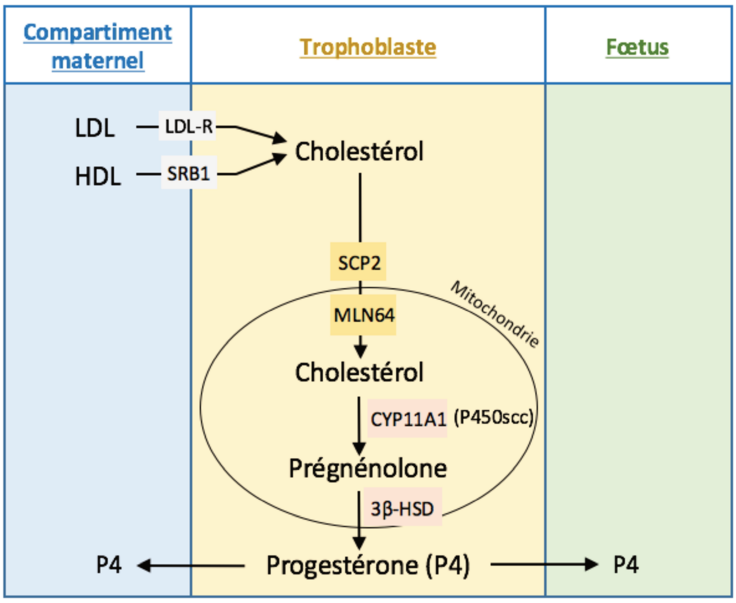


Figure 10. Schéma de la synthèse de progestérone dans le syncytiotrophoblaste
Le cholestérol provenant de la circulation maternelle est internalisé dans le syncytiotrophoblaste et est transporté dans la mitochondrie par les transporteurs SCP2 (transporteur de la membrane externe) et MLN64 (transporteur de la membrane interne). L'enzyme CYP11A1 catalyse le clivage de la chaine latérale du cholestérol pour former la prégnénolone qui sera ensuite pris en charge par l'enzyme 3β-HSD pour obtenir la progestérone.

Le taux sanguin de progestérone augmente au cours de la grossesse, avec un pic pendant les 4 dernières semaines de grossesse et une diminution après le travail et la délivrance [81] (Figure 11).

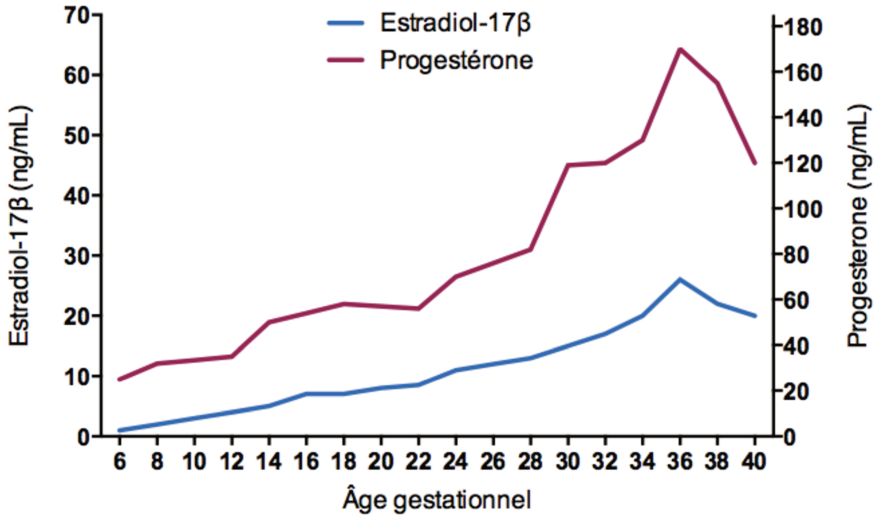


Figure 11. Concentrations maternelles plasmatiques d'œstradiol et de progestérone au cours de la grossesse

Les valeurs moyennes sont exprimées en fonction de l'âge gestationnel en semaines de grossesse.

La P4 possède une action myorelaxante du myomètre utérin et promeut la quiescence utérine tout au long de la grossesse [82], ce qui est indispensable à son bon déroulement. La P4 joue également un rôle dans l'immunotolérance en stimulant l'expression de cytokines par les lymphocytes T maternels et en inhibant l'activité des cellules uNK (uterine Natural Killer) [82]. Il a également été montré *in vitro* que la progestérone inhibe la fonction endocrine du placenta humain, en réduisant la sécrétion de l'hCG, la leptine et la résistine. De plus, la progestérone prépare la glande mammaire à la lactation en stimulant la prolifération de l'épithélium mammaire et empêche la lactation avant le travail, ayant donc un effet antagoniste de la prolactine. Enfin, la P4 participe aux changements métaboliques pendant la grossesse, en favorisant l'hyperphagie, le stockage des lipides et la résistance à l'insuline [83].

La progestérone exerce ses effets par des voies génomiques et non-génomiques en activant différent récepteurs. Pour la voie génomique, cela passe par le récepteur nucléaire de la progestérone (PRα et PRβ), exprimés de manière ubiquitaire dans le placenta. Ce récepteur se dimérise après la liaison de la progestérone, médiant son action génomique par sa liaison à des éléments de réponse dans les promoteurs des gènes cibles. L'effet non-génomique passe par des voies de signalisation cytoplasmiques, médié par un récepteur membranaire à la progestérone (membrane-associated progesterone receptor, MPR) et inclue l'activation des MAPK, une diminution de la production d'AMPc et une mobilisation du calcium intracellulaire [74].

1.3.2.2.2. Les œstrogènes

Les œstrogènes placentaires sont un groupe de 4 hormones stéroïdes : œstrone (E1), 17β-œstradiol (E2), œstriol (E3) et œstetrol (E4). Il existe pour la synthèse des œstrogènes une coopération entre l'organisme maternel, le fœtus et le placenta car ce dernier est dépourvu du complexe enzymatique 17α-hydroxylase/17-20-lyase, nécessaire à la conversion de la pregnénolone en androgènes, eux-mêmes substrats de la synthèse des œstrogènes. Ce sont les glandes surrénales maternelles et fœtales qui participent à la production placentaire d'œstrogènes en fournissant le sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEAS), un précurseur androgène, qui pénètre dans le ST par simple diffusion. Une stéroïde sulfatase placentaire hydrolyse ce précurseur en DHEA, puis les enzymes 3β-HSD et 17β-HSD forment de la testostérone et le cytochrome P450 aromatase (CYP19) convertit cette testostérone en œstrogènes (œstrone, œstradiol, œstriol) (Figure 12). Cette coopération entre le fœtus et le placenta a conduit au concept d'unité fœto-placentaire.

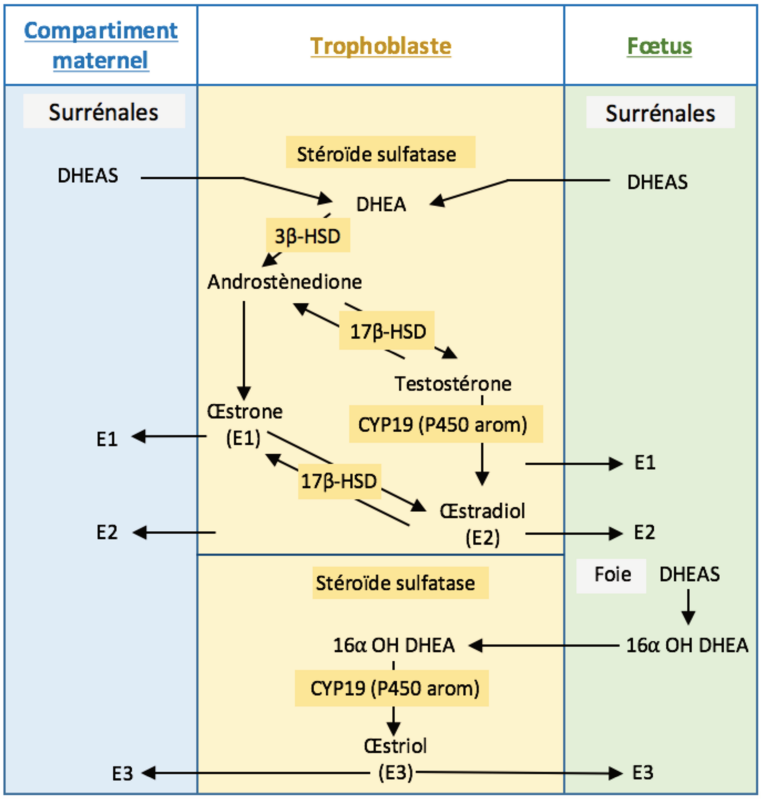


Figure 12. Schéma de la synthèse des œstrogènes dans le syncytiotrophoblaste

La synthèse placentaire des œstrogènes dépend du sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEAS) produit par les surrénales maternelles et fœtales ainsi que du 16α-hydroxydéhydro-épiandrostérone (16α OH DHEAS) produit par le foie fœtal. Ces précurseurs sont hydrolysés dans le syncytiotrophoblaste par la stéroïde sulfatase puis pris en charge par la 3β-HSD, la 17β-HSD et le cytochrome P450 aromatase pour former les œstrogènes : œstrone (E1), œstradiol (E2) et œstriol (E3).

Durant les premières semaines de grossesse, les œstrogènes sont produits par le corps jaune puis le placenta prend le relai. Le niveau sanguin maternel d'œstrogènes augmente tout au long de la grossesse, avec un pic à terme, et l'œstradiol (E2) en est le plus abondant au niveau plasmatique [74].

Les œstrogènes exercent plusieurs rôles pendant la gestation. Ils induisent notamment l'expression des récepteurs à la progestérone dans le muscle lisse utérin. Leurs effets sont classiquement médiés par l'activation des récepteurs nucléaires des œstrogènes ERα et ERβ. Comme pour la progestérone, ces récepteurs se dimérisent après liaison d'un ligand et modulent l'expression de nombreux gènes. Les œstrogènes peuvent également activer des récepteurs membranaires, ayant des effets non-génomiques incluant la mobilisation du calcium intracellulaire, l'activation de l'adénylyl cyclase conduisant à l'augmentation du niveau d'AMPc et à l'activation des MAPK [74]. Dans le placenta, l'expression de ERα est restreinte au CTV alors que ERβ est plus exprimé dans le ST [84].

Œstriol

L'œstriol est le plus abondant des œstrogènes dans l'urine. Sa principale fonction serait d'augmenter le flux sanguin utéroplacentaire et aurait un possible rôle dans l'initiation du travail en augmentant la communication intercellulaire par jonctions gap dans les cellules du myomètre [74].

Œstetrol

L'œstetrol est exclusivement produite par le foie fœtal, détectable à partir de la neuvième semaine post-fécondation, ses fonctions biologiques restent à identifier [74].

Œstradiol

L'œstradiol (E2) promeut l'implantation embryonnaire, stimule la croissance et la différentiation endométriale [74]. De plus, l'E2 promeut l'angiogenèse et la vasodilatation des artères placentaires et utérines, indiquant un rôle dans la régulation du flux sanguin utéroplacentaire [74]. Tout comme l'œstriol, l'E2 joue un rôle dans la contraction du myomètre par formation de jonctions gap [74]. L'E2 stimule également la prolifération de l'épithélium mammaire, en préparation à la lactation [74]. Le rôle de l'œstradiol sur les trophoblastes reste peu élucidé, cette hormone a été montrée comme

stimulant la syncytialisation des CTV primaires humains via ERα [84]. De plus, *in vitro* chez l'humain, l'E2 stimule la formation du ST à partir de la fusion des CTV. Sa concentration maternelle plasmatique augmente au cours de la grossesse pour atteindre un pic en fin de grossesse, tout comme la progestérone (Figure 11).

1.3.3. Echanges

La surface d'échange au niveau des villosités choriales représente 12 à 14 m^2 à terme de grossesse [85] et les capillaires fœtaux contiennent environ 80 ml, soit 25% du total du volume de sang fœto-placentaire [86]. De plus, comme expliqué dans le paragraphe 1.2.2.1.2., la distance entre les circulations maternelle et fœtale s'amoindrit au cours de la grossesse. La qualité des échanges entre la mère et le fœtus dépend en grande partie de la circulation du sang maternel dans la chambre intervilleuse et de l'intégrité de la surface du ST qui est couvert de microvillosités. Le ST étant en contact direct avec le sang maternel, les altérations d'origine infectieuse ou environnementale (tabac, alcool, pollution) du développement et/ou des fonctions du ST peuvent interférer sur les fonctions assurées par le ST et qui sont indispensables à la croissance fœtale. Le ST est le siège de toutes les fonctions d'échange du placenta et possède à ce titre de nombreux transporteurs à ses surfaces basale et apicale.

1.3.3.1. Mécanismes des échanges

La première étape limitante au passage d'une substance à travers le placenta hémochorial est son transport de l'autre côté de la membrane microvillositaire du ST. Pour atteindre la circulation fœtale, ces substances doivent ensuite traverser le mésenchyme villositaire puis l'endothélium des capillaires fœtaux. Les échanges à travers une barrière placentaire intacte peuvent se faire par trois mécanismes principaux : par diffusion passive ou facilitée, par des transporteurs et par transcytose (endocytose/exocytose) (Figure 13). L'efficacité des échanges placentaires est gouverné par des interactions complexes entre la croissance placentaire, l'expression de transporteurs, le flux sanguin placentaire, les gradients de concentrations transmembranaires et les demandes métaboliques des tissus placentaires.

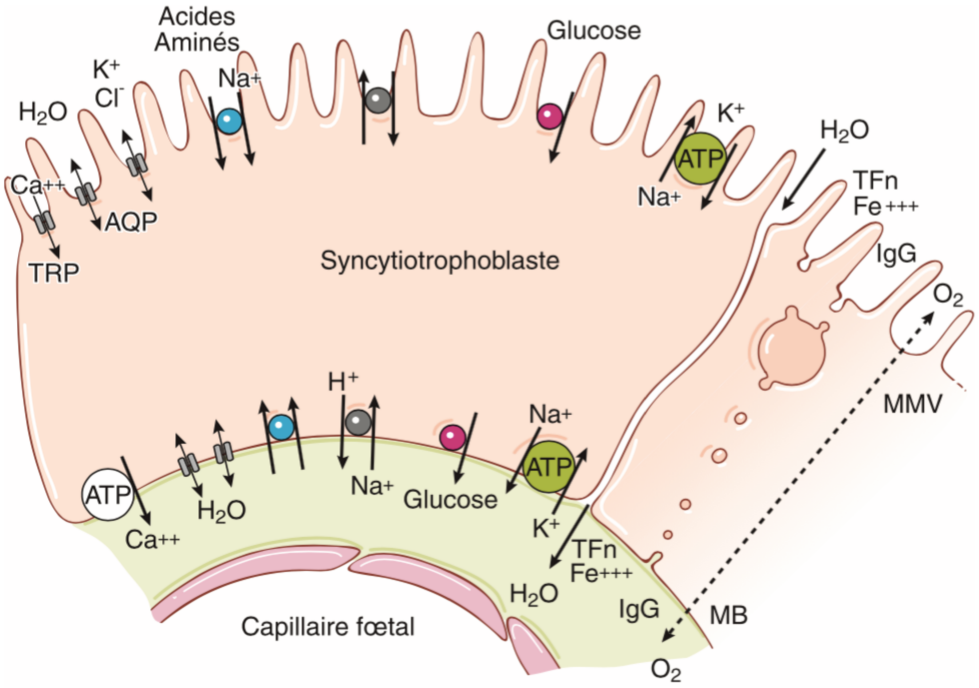


Figure 13. Principaux mécanismes d'échanges du syncytiotrophoblaste

Les échanges à travers la barrière placentaire sont de plusieurs types : transport médié par des protéines membranaires et transport actif (canaux ioniques, transporteurs) pour l'eau, les ions, les acides aminés et le glucose, diffusion passive pour les gaz respiratoires. La route paracellulaire permet également le passage d'eau. La trans-endocytose permet le passage du fer lié à la transferrine ainsi que celui des immunoglobulines. AQP : aquaporine ; IgG : immunoglobuline G ; MB : membrane basale ; MMV : membrane microvillositaire ; TRP : canal calcique ; TFn : transferrine

D'après Evain-Brion D. et Malassiné A., 2010 [9]

1.3.3.2. Transfert des gaz respiratoires

Le placenta est très perméable aux gaz respiratoires. La pO_2 fœtale est plus faible que la pO_2 maternelle, permettant ainsi à l'oxygène de diffuser de manière passive du sang maternel vers le sang fœtal. De plus, l'hémoglobine fœtale (HbF) possède une plus forte affinité pour l'oxygène que l'hémoglobine maternelle (HbA) ce qui facilite le transfert de l'oxygène vers le fœtus. Le dioxyde de carbone, au contraire, diffuse de manière passive du sang fœtal vers le sang maternel en raison des différences de pression partielle.

1.3.3.3. Transport des nutriments

Glucose

Le glucose maternel est la source d'énergie fondamentale du fœtus pour sa croissance et son développement, en raison de l'absence de néoglucogenèse fœtale significative. Le transport du glucose maternel vers le compartiment fœtal se fait par diffusion facilitée *via* les transporteurs de glucose GLUT présents à la membrane des trophoblastes et de l'endothélium des capillaires fœtaux [87]. Une grande partie du glucose ainsi extrait de la circulation maternelle, environ 60%, est utilisé par le placenta pour son propre métabolisme.

Acides aminés

Les acides aminés sont nécessaires pour la synthèse protéique mais également comme métabolites énergétiques et comme précurseurs de molécules non protéiques telles que les nucléotides, les neurotransmetteurs par exemple. Exceptés pour deux acides aminés, le glutamate et l'aspartate, la concentration en acides aminés dans la circulation maternelle est plus faible que dans la circulation fœtale, le placenta les transporte alors de manière active vers le fœtus. Le transport de la circulation maternelle vers le ST nécessite une dépense d'énergie pouvant impliquer la Na^+/K^+ ATPase, Mg^{2+} dépendante. Les acides aminés diffusent ensuite librement à travers l'axe mésenchymateux villositaire et l'endothélium des capillaires vers le sang fœtal [88].

Lipides

La plupart des lipides sont liés à des protéines circulantes dans le sang maternel, formant ainsi des complexes lipoprotéiques. Les lipides comprennent des acides gras, des phospholipides, des glycolipides, des triglycérides, des sphingolipides, des esters de cholestérol et d'autres composés. La surface maternelle du placenta comprend des lipoprotéines lipases, permettant la libération des lipides de ces complexes. Le passage transplacentaire des lipides se fait par internalisation de lipoprotéines et par transporteur pour les acides gras [89].

1.3.3.4. Transfert de l'eau et des ions

L'eau diffuse de manière passive grâce aux différences de pression hydrostatique entre les compartiments vasculaires maternels et fœtaux. Ce transfert se fait de manière passive et est facilité par des canaux protéiques transmembranaires appelés aquaporines (route paracellulaire). Les taux de sodium et ions chlorure sont identiques dans le sang maternel et fœtal, alors que les taux de potassium, calcium, magnésium et phosphate sont plus importants dans le sang fœtal [90]. Ces derniers sont donc transportés de manière active à travers la barrière placentaire.

1.3.3.5. Transfert du fer

Le fœtus est dépendant du fer maternel. Dans la circulation maternelle le fer est lié à la transferrine, capable de se lier aux récepteurs de la transferrine localisés sur la membrane microvillositaire du syncytiotrophoblaste. Le complexe est ainsi internalisé dans le trophoblaste et conduit à la libération du fer dans le cytoplasme où il va être transporté vers la membrane basale afin de rejoindre la circulation sanguine fœtale [91].

1.3.3.6. Transfert des immunoglobulines

Le fœtus possède un système immunitaire immature et l'acquisition des immunoglobulines G (IgG) s'effectue exclusivement pendant la grossesse de source maternelle via le placenta. Ces protéines d'un haut poids moléculaire (150 kDa) traversent le placenta par trans-endocytose et confèrent au nouveau-né une immunité qui le protège durant les six premiers mois de vie [92]. Les IgG sont les seules protéines à pouvoir passer la barrière placentaire.

1.3.3.7. Transfert des xénobiotiques et polluants

Tabac

L'exposition du fœtus à la fumée de tabac est reconnue comme le facteur de risque le plus important des complications de la grossesse. La fumée de cigarette contient de nombreuses substances toxiques dont des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les études épidémiologiques ont montré que le tabagisme maternel est associé à de nombreuses pathologies obstétricales telles qu'un retard de

croissance intra-utérin, une insuffisance placentaire et la prématurité [93]. Les HAP possèdent une grande lipo-solubilité et donc traversent la barrière placentaire aisément.

Alcool

L'alcool traverse le placenta par diffusion passive et se retrouve dans le sang fœtal à une concentration plus élevée que chez la mère. La consommation d'alcool par la mère entraine à la fois des effets délétères sur le fœtus (regroupés sous le terme de syndrome d'alcoolisation fœtale) et sur le placenta [94].

Pollution environnementale

L'air contient un certain nombre de polluants : des gaz (ozone O_3, dioxyde d'azote NO_2, dioxyde de soufre SO_2, monoxyde de carbone CO), des métaux lourds, des hydrocarbures aromatiques polycyclique, des particules fines. Ces polluants peuvent se retrouver dans la circulation sanguine maternelle après franchissement de la barrière pulmonaire. Des particules de polystyrène avec un diamètre inférieur à 500 nm ont été montrées comme passant la barrière placentaire et des particules d'un diamètre inférieur à 240 nm sont capables de rejoindre la circulation fœtale [95]. De nombreuses études ont montré une association entre l'exposition prénatale aux particules fines (PM) et une prématurité ou un petit poids de naissance [96].

1.3.4. Barrière

Les risques d'expositions prénatales aux toxiques environnementaux dépendent du transport placentaire de substances de la circulation maternelle vers la circulation fœtale. La barrière placentaire est impliquée dans l'absorption de nutriments aussi bien que dans la protection du fœtus contre des agents chimiques et biologiques. La présence d'une substance dans le sang de cordon ombilical est l'ultime démonstration du passage trans-placentaire de cette substance durant la grossesse.

La barrière placentaire est composée par la bicouche trophoblastique de la villosité ainsi que par les cellules endothéliales des capillaires fœtaux, localisés dans l'axe mésenchymateux de la villosité. Comme énoncé précédemment, cette barrière évolue au cours de la grossesse avec une diminution de son épaisseur, due à la différenciation des CTV en ST, les CTV ne consistant majoritairement plus qu'en de fins

allongements cytoplasmique. L'impact de l'exposition maternelle aux xénobiotiques peut donc être différent en fonction de la période de la grossesse. Le syncytiotrophoblaste est équipé d'une variété d'enzymes et de transporteurs qui assure la détoxification et l'efflux des xénobiotiques, jouant un rôle équivalent des cellules hépatiques adultes [48].

1.4. Pathologies liées au placenta

Un développement placentaire altéré ou anormal est à l'origine de complications de grossesse telles qu'une fausse couche par mort embryonnaire ou fœtale, un retard de croissance intra-utérin ou encore une pré-éclampsie.

1.4.1. Retard de croissance intra-utérin

Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) est diagnostiqué selon l'âge gestationnel et les mensurations du fœtus pendant la grossesse (évaluation du poids, de la taille, des périmètres crânien et abdominal). Ces mesures sont comparées à des courbes de référence et le poids de naissance inférieur au dixième percentile définit le plus souvent en France le RCIU. Le RCIU peut être dépendant de facteurs maternels pour 40% (malformation utérine, maladies chroniques, malnutrition, tabagisme, alcool, drogue), fœtaux pour 25% (facteurs génétiques, anomalies chromosomiques) et placentaires pour 5% (troubles de la placentation, hémangiome placentaire, anomalie chromosomique confinée au placenta, anomalie du cordon) [97]. Les enfants nés avec un RCIU sont plus exposés à des anomalies métaboliques (résistance à l'insuline, dyslipidémie, diabète de type II) et cardiovasculaires à l'âge adulte [98].

1.4.2. Pré-éclampsie

La pré-éclampsie, aussi appelée toxémie gravidique, est une pathologie obstétricale d'origine placentaire spécifique de l'espèce humaine. Elle a une incidence d'environ 2 à 8% des grossesses chaque année selon les pays et l'ethnie et est responsable d'une lourde morbidité maternelle et périnatale. Le diagnostic clinique de la pré-éclampsie est défini par l'association d'une hypertension artérielle (HTA systolique >140 mmHg et/ou HTA diastolique >90 mmHg) et d'une protéinurie (>300 mg/24h) à partir de la 20ème SA. Le seul traitement curatif à l'heure actuelle est l'accouchement, permettant la délivrance du placenta.

La physiopathologie est la suivante [99] :

- un défaut d'invasion et de remodelage des artères spiralées par les CTEV au premier trimestre de grossesse, responsable d'une diminution de l'afflux sanguin maternel vers le placenta
- une prédisposition maternelle génétique et des facteurs environnementaux (pollution atmosphérique, métaux tels que le plomb…)
- un stress oxydant dû à l'ischémie placentaire induisant un dysfonctionnement du ST, qui relargue dans la circulation maternelle des substances inflammatoires, oxydantes et anti-angiogéniques telles que le récepteur soluble du VEGF (sFlt1) et qui provoque l'augmentation du nombre de débris syncytiaux polynucléés [14].

1.4.3. DOHaD

L'étiologie des maladies à l'âge adulte peut avoir une origine fœtale et peut être attribué à des effets d'expositions environnementales délétères in utéro. Ce concept de causalité est connu sous le nom de « Origines développementales de la santé et des maladies » (DOHaD pour Developmental Origins of Health and Disease) [100]. Cette hypothèse d'une origine fœtale des maladies de l'adulte a été posée par David Barker et son équipe dans les années 1980. Ces épidémiologistes anglais ont publié les premiers travaux indiquant une association entre la malnutrition durant la grossesse et le développement de maladies cardio-vasculaires durant la vie adulte [101]. Depuis, plusieurs études renforçant cette hypothèse ont été publiées, notamment en ce qui concerne les effets du tabagisme [102] et de l'exposition à la pollution environnementale [103].

1.5. Modèles d'étude du placenta

Le placenta est composé de nombreux types cellulaires et sa structure et ses fonctions évoluent au cours de la grossesse. Plusieurs modèles expérimentaux ont été développés pour l'étude du placenta humain et ces méthodes sont variées et complémentaires [104].

Pour des raisons éthiques, les études sur le placenta humain sont limitées au premier trimestre de grossesse (IVG) et au terme de grossesse. Seuls des placentas issus d'IMG nous permettent d'accéder aux stades intermédiaires.

1.5.1. Spécificité placentaire

Le placenta humain possède des caractéristiques propres comme énoncées au tout début de cette introduction. Les modèles animaux, notamment souris et rat, sont largement utilisés pour étudier la placentation et en toxicologie mais des différences considérables existent entre les placentas de différentes espèces. En effet, la structure et l'efficacité des fonctions placentaires doit être adaptée à la taille de l'espèce, aux disponibilités maternelles, au régime alimentaire et surtout à la durée de la gestation. Cette variabilité concerne la forme de l'organe, l'arrangement géométrique des interdigitations présentes sur les surfaces maternelles et fœtales et le nombre de couches cellulaires impliquées dans les échanges. Les spécificités temporelles de gestation, morphologiques, histologiques et hormonales entre l'animal et l'humain imposent une grande prudence quant à l'extrapolation des résultats obtenus chez l'animal.

La souris est le modèle animal le plus utilisé pour étudier le placenta. La première différence entre la souris et l'humain est la durée de la gestation : de 19 à 20 jours chez la souris alors que la grossesse dure 270 jours chez la femme. Une autre différence notable entre le placenta des rongeurs et le placenta humain est le nombre de couche séparant la circulation maternelle et fœtale. En effet, le placenta murin est hémotrichorial (les deux circulations sont séparées par trois couches trophoblastiques : deux couches de syncytium en contact avec l'endothélium fœtal et une couche de cytotrophoblastes en contact avec le sang maternel) alors que le placenta humain est hémochorial puisqu' à terme les deux circulations sont séparées par une couche de syncytium et quelques CTV sous-jacents [105]. De plus, le placenta des rongeurs est monocotylédonnaire alors que le placenta humain est multicotylédonnaire et la surface d'échange entre les deux circulations est beaucoup plus développée chez l'Homme que chez le rongeur car les villosités sont très arborisées et les cellules syncytiales possèdent des microvillosités. Malgré ces différences importantes dans le développement placentaire entre la souris et l'humain, certains éléments sont similaires chez ces deux

espèces : la lignée trophoblastique semble suivre les mêmes voies (une voie invasive et une voie d'échange) et des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de gènes placentaires ont été décrit à la fois chez la souris et chez l'humain [106].

1.5.2. Culture primaire de trophoblastes

La première culture cellulaire primaire de trophoblastes villeux à partir de placenta humain à terme de grossesse a été établie en 1986 [107]. Les CTV sont isolés par des digestions enzymatiques séquentielles des villosités choriales suivi d'une séparation sur gradient de Percoll. Les CTV ainsi isolés sont capables de s'agréger dans les premières 24 h et fusionner afin de former des syncytiotrophoblastes après 48 h à 72 h de culture. Le syncytium ainsi formé est fonctionnel au niveau hormonal (hCG, hPL, progestérone ou encore œstradiol). Ce protocole ou des versions modifiées de ce protocole sont actuellement utilisées par différents laboratoires s'intéressant au placenta humain. Ce système de culture présente néanmoins des inconvénients dus aux variations biologiques associées à leur origine, à leur durée de vie limitée en culture (environ 1 semaine) et leur potentielle hétérogénéité.

1.5.3. Lignées cellulaires trophoblastiques

Les lignées trophoblastiques humaines ont été catégorisées en trois principaux groupes par la « International Federation of Placenta Associations » (IFPA), suivant leur origine [108] :

- les lignées générées à partir de choriocarcinomes, des tumeurs malignes d'origine trophoblastique (BeWo, JEG et JAR pour les plus connues)
- les lignées générées à partir de tissu sain (HTR-8, HTR-8/Svneo, HIPEC)
- les lignées générées à partir de carcinomes embryonnaires et présentant une différenciation trophoblastique

Les lignées trophoblastiques ont beaucoup été utilisées comme modèle pour étudier le trophoblaste humain. Ces cellules offrent plusieurs avantages : elles représentent des populations homogènes qui prolifèrent facilement en culture, fournissant une abondance de cellules avec un phénotype censé rester stable au cours des passages. De plus, ces cellules sont facilement transfectables. Par conséquent, les lignées sont largement utilisées comme substituts pour les trophoblastes villeux et

extravilleux. Cependant, les méthodes utilisées pour prolonger la durée de vie de ces cellules en culture peut altérer la régulation du cycle cellulaire et peut entrainer des schémas d'expression génique inhabituels qui ne sont pas observés dans les trophoblastes *in vivo* ou en culture primaire [109]. La majorité des études existantes dans la littérature en toxicologie sur le placenta utilisent des lignées trophoblastiques.

La lignée de choriocarcinome humain BeWo est la première ayant été établie, en 1968 [110], à partir de cellules métastatiques de choriocarcinome isolées dans le cerveau puis transplantées chez le hamster et maintenues pendant 304 transferts sur 8 ans. Dû à l'origine de cette lignée, nous ne savons pas quel stade de la grossesse représentent ces cellules. La lignée de choriocarcinome BeWo est le modèle le plus utilisé pour représenter le cytotrophoblaste villeux, car ces cellules possèdent des caractéristiques similaires aux trophoblastes humains telles que la synthèse d'hormones (hCG, progestérone, œstrogènes) [111] et la capacité de fusion et donc de former du syncytium, qui requiert cependant l'ajout dans le milieu de culture d'AMP cyclique ou de forskoline [112]. Mais ces cellules ne présentent pas le regroupement des noyaux du syncytium, une des étapes finales de la différenciation du syncytiotrophoblaste. De plus, la lignée BeWo est une ligne tumorale et peut donc présenter des caractéristiques propres aux cellules cancéreuses, ce qui pose question par rapport à leur utilisation en tant que représentation du trophoblaste humain.

Les JAR ont été obtenues par mise en culture directe de cellules prélevées lors d'une biopsie de choriocarcinome [113].

Les JEG-3 sont un clone particulier des cellules BeWo, dont elles possèdent le même profil ADN.

Les lignées obtenues à partir de tissu sain ont été immortalisées de différentes manières : par transfection par SV40 (simian virus 40) ou par le papillomavirus humain. C'est le cas des lignées HIPEC [114] et HTR-8/SVneo [115]. La lignée HTR-8 quant à elle est issue de la transformation spontanée des cellules au cours de la culture [116]. Les cellules HIPEC sont issues de cytotrophoblastes extravilleux et conservent le phénotype invasif. L'immortalisation des cellules peut conduire à la perte de caractéristiques

phénotypiques, les lignées alors obtenues peuvent être totalement différentes de la cellule d'origine.

Plusieurs modèles de co-cultures en 2D ou 3D se sont développés, permettant de se rapprocher le plus possible de la réalité physiologique de la structure du placenta. Au cours des dernières années, des progrès rapides ont été réalisés dans les systèmes de culture 3D, avec le développement d'organes miniatures appelés « organoïdes » ainsi que la mise en place d'« organes sur puce », y compris pour le placenta [117]–[119].

1.5.4. Explants

La culture d'explants consiste en l'incubation de fragments de villosités choriales d'environ 1 à 2 mm^3 dans des milieux physiologiques ou de culture. Les cultures peuvent se faire sur une matrice de Matrigel ou de collagène de type I ou alors en suspension, généralement après montage sur aiguilles. Cependant, l'utilisation d'explants de villosité est délicate car plusieurs études ont montré que l'intégrité de la villosité est vite altérée notamment par la nécrose du syncytiotrophoblaste. Cette dégénérescence du syncytiotrophoblaste s'observe généralement après 24h de culture mais est suivie de la formation d'un nouveau syncytiotrophoblaste [120].

L'avantage de cultiver des explants est de maintenir les interactions et régulations paracrines entre le syncytiotrophoblaste, les cytotrophoblastes et les cellules composant l'axe mésenchymateux : les cellules du stroma mésenchymateux (fibroblastes, myofibroblastes, cellules musculaires lisses), les cellules endothéliales, les cellules sanguines et les cellules immunitaires (cellules de Hofbauer). Le fait que les cellules trophoblastiques soient en co-culture avec les cellules appropriées créent les conditions qui sont proches à l'environnement trouvé in vivo. Cependant, cette co-culture résulte aussi en la difficulté d'attribuer les effets observés à un type cellulaire donné.

Cette technique de culture d'explants a premièrement permis d'étudier le transport placentaire, le métabolisme et la fonction endocrine du placenta [121]. La culture d'explants issus de placenta de premier trimestre a permis d'étudier la formation des colonnes et la différenciation des CTEV.

1.5.5. Perfusion

La perfusion *in vitro* de cotylédons placentaires humains est une méthode efficace pour examiner le transport bidirectionnel et la fonction de barrière du placenta humain. Dans cette méthode, le placenta est récupéré à terme de grossesse immédiatement après la délivrance et un cotylédon est perfusé. Les compartiments sanguins maternels et fœtaux sont recréés artificiellement et le passage trans-placentaire d'une substance peut ainsi être étudié [122]. Cependant, cette méthode ne peut représenter que le transport placentaire à terme de grossesse et il n'est pas possible d'extrapoler à d'autres périodes de la grossesse.

1.5.6. Cellules souches embryonnaires et trophoblastiques

Les études sur les cellules souches ont pour objectif de décrypter les étapes précoces de la différenciation des cellules embryonnaires en trophectoderme puis en lignées trophoblastiques villeuses et extravilleuses. Ces cellules souches peuvent être isolées à partir du placenta mais aussi de l'embryon.

2 – Les polluants et la grossesse

Les femmes enceintes sont exposées à une grande variété de xénobiotiques tout au long de la grossesse. Cette exposition est le plus souvent due à la prise de médicaments, à des facteurs liés au mode de vie, tels que le tabagisme, l'usage de drogues et la consommation d'alcool, mais aussi à des sources de pollution environnementale. L'air ambiant est plus ou moins contaminé par des polluants incluant les particules fines, des substances chimiques et biologiques sous forme gazeuse, liquide ou solide d'origine naturelle (émissions par les feux de forêt, les volcans…) ou produits par les activités humaines (usines, pots d'échappements, fumée de tabac, pesticides) [123]. Ces composés peuvent interférer avec les fonctions placentaires à de nombreux niveaux, par exemple lors de l'implantation utérine de l'embryon, au niveau des voies de signalisation pour des fonctions assurées par le placenta, de la production et libération d'hormones et d'enzymes, du transport de nutriments et de déchets, la croissance et différenciation cellulaire, et enfin à la phase terminale de la vie placentaire, c'est-à-dire la délivrance.

Les caractéristiques physico-chimiques inhérentes des xénobiotiques déterminent s'ils peuvent passer à travers le placenta pour atteindre la circulation sanguine fœtale et quel mécanisme de transport est emprunté. La plupart des xénobiotiques traversent le placenta par diffusion passive mais d'autres mécanismes de transport potentiels comprennent la diffusion facilitée et le transport actif [124]. Le placenta possède également un système enzymatique développé à l'instar du foie, avec l'expression de nombreux cytochromes P450. Les enzymes métabolisant les xénobiotiques au niveau placentaire peuvent détoxifier ou au contraire créer une toxicité par les métabolites formés et les transporteurs peuvent empêcher ou permettre l'accumulation cellulaire et le transfert materno-fœtal. La présence de xénobiotiques dans le sang de cordon et le liquide amniotique démontre sans équivoque que le produit chimique est entré dans le compartiment fœtal.

La santé des nouveaux nés est déterminée par une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux et sociaux, incluant la santé maternelle durant la grossesse. Le fœtus était traditionnellement considéré comme ayant une position privilégiée, protégé des effets adverses de l'environnement maternel par l'unité placentaire et les membranes fœtales qui l'entourent : l'amnios au contact du fœtus et le chorion adhérent à la caduque. Entre autres, la catastrophe du thalidomide dans les années 1960 a montré que les composés chimiques peuvent traverser le placenta et provoquer une grave toxicité pour le développement du fœtus. Des données épidémiologiques suggèrent que les conditions de vie précoces, telles que la nutrition maternelle, le stress, le tabagisme et les expositions à des polluants influencent la croissance et le développement du fœtus et le risque de développement de maladies chroniques à l'âge adulte [125]. Les xénobiotiques qui affectent le placenta ou passent dans la circulation sanguine fœtale peuvent produire plusieurs types de complications pendant la grossesse et à la naissance, tels qu'un risque accru de fausse couche, un petit poids de naissance ou encore un retard de croissance intra-utérin (RCIU) qui peut favoriser la survenue de maladies chez l'adulte telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète et l'asthme [126]. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas entièrement compris, mais on pense qu'ils incluent une modification épigénétique, en particulier des changements de type méthylation de l'ADN, dans les cellules fœtales après une exposition maternelle pendant la grossesse [127]. Les expositions maternelles délétères

pour la grossesse incluent notamment le tabagisme maternel, la pollution de l'air ambiant (particules atmosphériques, oxydes d'azote, métaux lourds…) et les polluants environnants (pesticides, phtalates…).

2.1. Effets du tabagisme maternel

Le tabagisme pendant la grossesse demeure un défi de santé publique majeur, malgré les effets délétères bien connus sur la descendance. Bien que les femmes réduisent généralement le nombre de cigarettes, voire arrêtent de fumer pendant la grossesse, elles peuvent tout de même être exposées au tabagisme passif par leur entourage. Le tabagisme pendant la grossesse exerce des effets néfastes sur la mère et sur le conceptus à tous les stades du développement prénatal ainsi qu'à la naissance et plus largement tout au long de la vie future. Les enfants ayant eu une exposition importante à la fumée de tabac *in utero* ont probablement été affectés dans une certaine mesure. Le tabagisme maternel a été associé à une infertilité [128] ainsi qu'à l'avortement spontané dans certaines études, tandis que d'autres n'ont pas trouvé de relation significative [129]. Une relation entre le tabagisme maternel et l'incidence des naissances prématurées [130], [131] ainsi qu'un petit poids de naissance [132], [133] a été démontrée à plusieurs reprises. De plus, de nombreuses études épidémiologiques montrent une relation entre l'exposition à la fumée de tabac et les effets neurocomportementaux, y compris les problèmes de comportement, les troubles du déficit de l'attention, l'hyperactivité, les troubles d'apprentissage de l'enfant à naître et le risque accru de fumer plus tard dans la vie [134], [135]. La majorité des cancérogènes des cigarettes (par exemple HAP, cadmium) sont capables de traverser le placenta. Le tabagisme pendant la grossesse est associé à un risque accru de cancer chez la progéniture, notamment de tumeurs cérébrales et du système nerveux central, de lymphomes, de leucémie et accroit le risque de cancer des testicules à l'âge adulte [136], [137]. De plus, les nouveau-nés de mères fumeuses présentent des niveaux de dommages à l'ADN plus élevés que ceux des mères non-fumeuses [138]. Ces effets génotoxiques sont considérés comme un facteur de risque important de survenue de cancers de l'enfance.

Le tabagisme maternel exerce également des effets délétères sur le placenta en diminuant la vascularisation placentaire, modifiant ainsi le flux sanguin maternel vers le

placenta et en modifiant l'équilibre entre la prolifération et la différenciation du cytotrophoblaste, provoquant un épaississement de la membrane basale trophoblastique et une augmentation du collagène dans le mésenchyme villeux [139], [140]. Ces changements observés dans le placenta des fumeuses étaient également présents, mais sous une forme moins sévère chez les femmes exposées au tabagisme passif pendant la grossesse. Le tabagisme maternel a également été associé au risque accru de placenta prævia [141], qui correspond à un mauvais positionnement placentaire dans l'utérus.

Enfin, une étude sur les profils de méthylation de l'ADN dans le placenta associés à un tabagisme maternel soutenu pendant la grossesse a montré une méthylation différentielle d'AhRR (aryl hydrocarbon receptor repressor) et de CYP1A1 (cytochrome P450 family 1 subfamily A) [142], deux acteurs jouant un rôle clé dans les processus de détoxification des composants de la fumée de tabac, en particulier le benzo(a)pyrène.

2.2. Effets de la pollution de l'air

Il y a une prise de conscience croissante des impacts de la pollution ambiante sur la santé lors de l'exposition prénatale et postnatale [143]. Il est estimé qu'un adulte sain inhale de 10 à 20 m^3 d'air par jour, dépendant de la composition corporelle et de l'activité physique [144]. L'air est plus ou moins contaminé par des polluants dont les plus courants sont le monoxyde de carbone (CO), le dioxyde d'azote (NO_2), le dioxyde de soufre (SO_2), l'ozone (O_3), des métaux lourds (mercure, plomb, cadmium…), des particules fines (PM) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les niveaux de la pollution de l'air ambiant dépendent des sources et types de pollution, des caractéristiques physico-chimiques des polluants, des conditions géographiques et des facteurs météorologiques [145].

Chez la femme enceinte, l'adaptation respiratoire à la grossesse conduit à une augmentation significative de volume respiratoire et à une plus grande consommation d'oxygène [146]. Des études ont montré que l'exposition à la pollution de l'air durant la grossesse peut conduire à des issues de grossesses et néonatales défavorables, impactant la croissance des nouveaux nés avec un risque accru de petits poids de naissance, de prématurité et de retard de croissance intra-utérin (RCIU) [147], perturbant le développement du système immunitaire [148], favorisant le

développement de maladies pulmonaires et problèmes respiratoires notamment de l'asthme [149], de maladies cardiovasculaires, de diabète ainsi que de cancers tels que la leucémie ou le rétinoblastome et des désordres cognitifs tels que l'autisme [150], [151]. L'exposition à la pollution de l'air ambiant peut affecter le fœtus directement par une exposition après un passage transplacentaire ou indirectement en affectant des changements physiologiques chez la mère [152]. Il a été montré l'augmentation des adduits d'ADN et des niveaux de micronoyau (fragment de chromosome non incorporé pendant la division cellulaire) dans le sang de cordon en association avec l'exposition maternelle à la pollution atmosphérique liée notamment au trafic routier [153]. Il a également été démontré que la pollution de l'environnement peut provoquer des mutations chez les fœtus exposés par voie transplacentaire chez l'homme [154].

De plus, une exposition prénatale élevée aux HAP est associée à une fréquence accrue d'aberrations chromosomiques stables [155] et une plus faible méthylation globale [156] dans les globules blancs de sang de cordon, augmentant ainsi le risque de développement de cancers.

Une étude chez la souris a évalué les effets des PM sur la morphologie fonctionnelle du placenta. L'exposition aux particules pendant la gestation induit des changements au niveau placentaire, avec notamment une augmentation de la surface des capillaires fœtaux et une diminution de l'espace vasculaire maternel. Ces altérations ont été associées à une incidence plus élevée de faible poids à la naissance chez les souriceaux issus de souris gestantes exposés [157].

2.3. Effets des pesticides

Un pesticide est défini comme « toute substance ou mélange de substances destiné à prévenir, détruire, repousser ou atténuer tout organisme nuisible ». Cela comprend les insecticides, les herbicides, les fongicides et diverses autres substances. Les pesticides sont utilisés dans de nombreux milieux - dans l'agriculture, les maisons, les jardins et les milieux institutionnels - et les expositions aux pesticides sont omniprésentes. L'exposition à divers pesticides a également été corrélée à l'accouchement prématuré et à la croissance fœtale réduite [158], [159].

3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

3.1. Généralités

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants environnementaux largement répandus, composant une famille de plus de 100 molécules actuellement identifiées alors qu'il peut en exister en théorie plus d'un millier. Ils représentent une classe de composés organiques formés d'un nombre variable de cycles aromatiques avec des structures variées, les cycles pouvant être en arrangement linéaire, angulaires ou groupés [160]. Les HAP sont classés en deux catégories, selon leur poids moléculaire : les HAP légers comprenant deux à trois cycles aromatiques et les HAP lourds comportant quatre cycles aromatiques ou plus.

Les HAP sont considérés comme des polluants organiques persistants (POP). L'Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie (ADEME) propose une définition des POP, non pas à partir de leur nature chimique mais sur la base de quatre propriétés :

- la toxicité : impact avéré sur la santé humaine
- la persistance dans l'environnement : résistance aux dégradations biologiques naturelles
- la bioaccumulation : absorption de la part des tissus vivants et accumulation à chaque maillon de la chaine alimentaire
- la capacité de transport longue distance : des zones à forte activité humaine vers des zones éloignées du lieu d'émission.

Ces composés ont des effets délétères sur la santé humaine, ils sont carcinogènes, tératogènes et mutagènes [161].

3.1.1. Propriétés physico-chimiques

Les HAP sont des molécules apolaires, hydrophobes et ayant une faible volatilité et solubilité dans l'eau [161]. Le caractère hydrophobe et la solubilité de ces composés augmente et diminue respectivement avec le nombre de cycles aromatiques. La propriété hautement lipophile des HAP leur permet de franchir aisément les membranes cellulaires et de facilement s'accumuler dans les organismes vivants, en particulier dans le tissu adipeux. Les HAP possèdent également d'autres propriétés telles qu'une

sensibilité à la lumière, une résistance thermique, une conductivité et possède un spectre d'absorbance caractéristique des UV. La demi-vie des HAP est dépendante du nombre de cycles qui les compose, leur stabilité et leur persistance augmentant avec le nombre de cycles aromatiques.

Les HAP contiennent uniquement des atomes de carbone et d'hydrogène mais des atomes d'azote, de soufre et d'oxygène peuvent facilement se substituer dans le cycle benzénique pour former des composés aromatiques hétérocycliques [160].

3.1.2. Sources de production

Les HAP sont formés par la combustion incomplète ou la pyrolyse de la matière organique lors de processus naturels ou industriels. Les sources majeures de HAP dans l'environnement sont d'origine anthropique et incluent la production et l'utilisation de noir de carbone, de goudron, d'asphalte, d'énergie fossile, les traitements du bois, le chauffage domestique, les gaz de pots d'échappement et la fumée de tabac. D'autres sources, naturelles, incluent l'activité volcanique et les feux de forêt. Les sources nombreuses et variées des HAP sont responsables de leur présence importante dans l'environnement, notamment dans l'air, les sols, l'eau et les sédiments. De plus, les HAP sont également présent dans l'alimentation, dans les fruits et légumes par dépôt atmosphérique et contamination par l'eau et les sols mais également par les processus de cuisson comme les procédés de fumage, friture et grillade [162]. Il n'y a pas d'utilisation commerciale des HAP et ils ne sont manufacturés comme composés individuels qu'uniquement à des fins de recherche.

Lors de leur émission, les HAP se retrouvent soit sous forme gazeuse, soit sous forme particulaire, selon leur poids moléculaire. Les HAP à faible masse moléculaire sont principalement dans la phase gazeuse et ceux à plus haute masse moléculaire se retrouvent adsorbés à des particules fines donc liés majoritairement à la phase particulaire. Les HAP sont généralement produits en mélange et non pas sous forme de composés isolés. Le destin des HAP dans l'environnement et les voies d'exposition humaine sont influencés par le milieu environnemental dans lequel sont les HAP (air, nourriture, eau ou sols) et leurs propriétés physico-chimiques.

3.1.3. Réglementation

L'agence de protection environnementale américaine (US-EPA pour Environment Protection Agency) a considéré 16 HAP comme polluants prioritaires dès 1976, dus à leurs impacts environnementaux et humains du fait de leur toxicité (Figure 14). Ces 16 HAP font actuellement également partie des listes d'évaluation des risques de l'organisation mondiale de la santé (OMS) et de l'Union Européenne. Le benzo(a)pyrène est l'un des plus étudiés d'entre eux et considéré en tant que prototype des HAP.

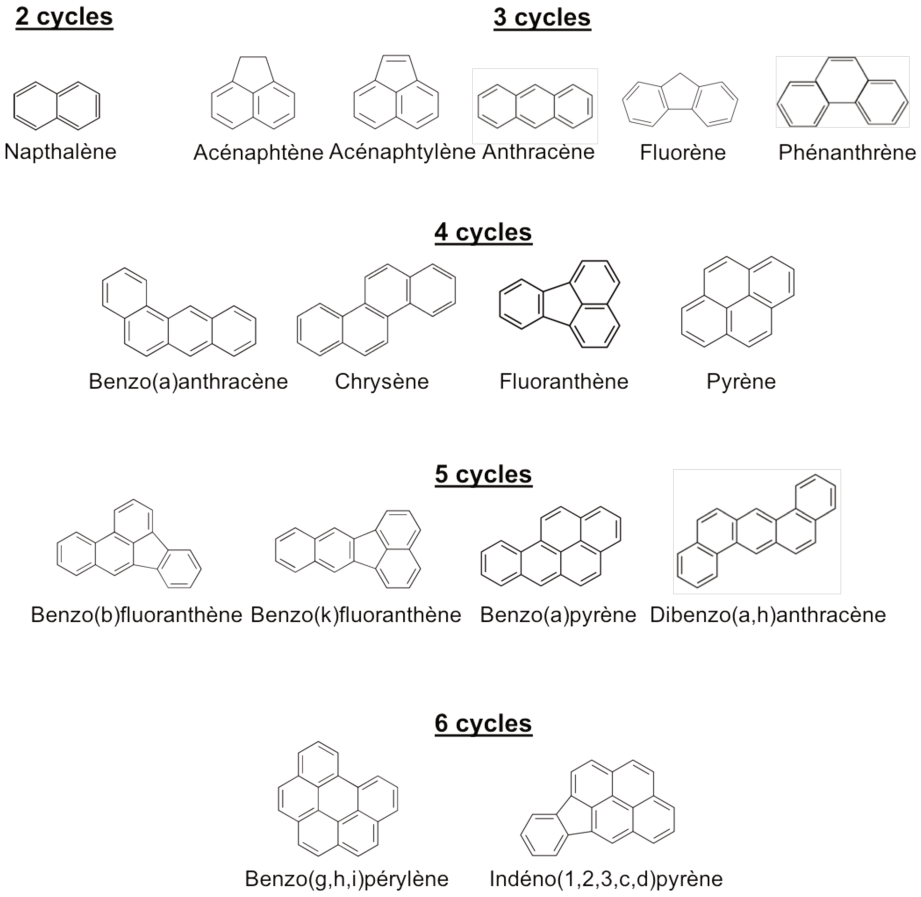


Figure 14. Structures chimiques des 16 HAP considérés comme polluants prioritaires

Au niveau international, les POPs sont réglementés par deux textes majeurs : la convention de Stockholm et le protocole d'Aarhus. Ce protocole adopté en 1998 et entré en vigueur en 2003 fait suite à une convention de Genève de 1979 sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance. Ce traité international vise à contrôler, réduire ou éliminer un certain nombre de substances chimiques particulièrement polluantes dont les HAP en Europe, Amérique du Nord et Asie centrale.

3.2. Le benzo(a)pyrène

3.2.1. Caractéristiques du benzo(a)pyrène

Le benzo(a)pyrène (BaP), de formule brute $C_{20}H_{12}$, est constitué de 5 cycles aromatiques (Figure 15) et a une masse moléculaire de 252,31 g/mol. A température ambiante, il se présente sous forme de cristaux jaunes inodores. Le BaP est très peu soluble dans l'eau mais soluble dans de nombreux solvants organiques (aromatiques, chlorés…). Le BaP est stable jusqu'à des températures très élevées (point de fusion à 175°C et point d'ébullition à 475°C) mais en solution il s'oxyde sous l'influence de la lumière, de l'air de la chaleur.

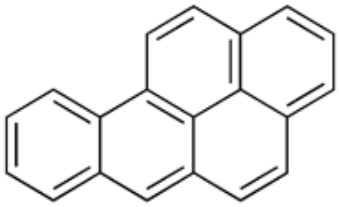


Figure 15. Structure chimique du benzo(a)pyrène

3.2.2. Classification du benzo(a)pyrène

Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC ou IARC en anglais) distingue les composés chimiques ou facteurs physiques selon 4 groupes, sur la base des données scientifiques existantes. Le BaP est classé dans le Groupe 1. Ce groupe est défini ainsi : composé cancérigène pour l'Homme, il existe des indications suffisantes de cancérogénicité pour l'homme après des études solides chez l'animal et chez l'Homme et des mécanismes reconnus. Le BaP est donc reconnu comme cancérigène pour l'Homme. De plus, il est également reconnu comme mutagène et reprotoxique ainsi que comme perturbateur endocrinien avéré.

3.2.3. Voies d'exposition et métabolisation

3.2.3.1. Absorption

L'exposition humaine se fait par voie pulmonaire (inhalation), par voie digestive (ingestion d'eau et de nourriture contaminés) et par voie cutanée. La propriété lipophile du BaP lui permet de franchir les membranes cellulaires aisément, par diffusion passive [163].

3.2.3.1.1. Respiratoire

L'air pollué est une source importante d'exposition. Les doses de BaP auxquelles un individu est exposé *via* l'inhalation varient en fonction de la zone de résidence (urbaine ou rurale) et de son mode de vie (tabagisme, mode de chauffage domestique). L'air ambiant est logiquement plus pollué en milieu urbain dû au trafic routier plus dense donc aux émissions de gaz d'échappement plus élevées qu'en milieu rural (1 à 10 ng/m^3 vs 0,2 ng de BaP/m^3) (EFSA). Toutefois, des variations selon la saison et les villes existent [164], [165].

L'exposition respiratoire se fait également par le tabagisme. Les fumeurs actifs et passifs sont plus exposés au BaP que les non-fumeurs, une cigarette contenant environ 10 à 20 ng de BaP (soit 0,1-0,2 μM) [166].

3.2.3.1.2. Digestive

Il existe deux types de contamination alimentaire : la contamination liée à l'environnement par dépôt de la pollution atmosphérique et la contamination liée à la cuisson des aliments (notamment grill, barbecue, friture et fumage) [167].

Dans la population générale, la principale source d'exposition des HAP alimentaire se fait par les viandes et poissons fumés et grillés, les huiles et graisses végétales ainsi que le thé et le café. De par sa nature lipophile, le BaP a tendance à s'accumuler dans les graisses. Il a été montré que plus l'aliment est riche en matière grasse, plus la quantité de BaP retrouvée est importante [168].

3.2.3.1.3. Cutanée

L'exposition cutanée peut se faire par contact avec des produits contenants des particules fines couvertes de benzo(a)pyrène, du bois traité à la créosote (substance biocide issue de la distillerie du charbon) ou par le biais de chaussures en caoutchouc. Les niveaux d'exposition par voie cutanée au benzo(a)pyrène ne sont pas chiffrés mais sont considérés comme faibles par rapport à l'exposition orale et respiratoire.

3.2.3.2. Distribution

Le BaP est rapidement et largement distribué dans l'organisme en quelques heures, indépendamment de la voie d'absorption (Figure 16) [169]–[171]. Différentes voies d'exposition chez le rat (intraveineuse, intratrachéale, orale et cutanée) au BaP provoquent la détection de métabolites dans le sang et dans les voies d'excrétions (urine et fèces) [172].

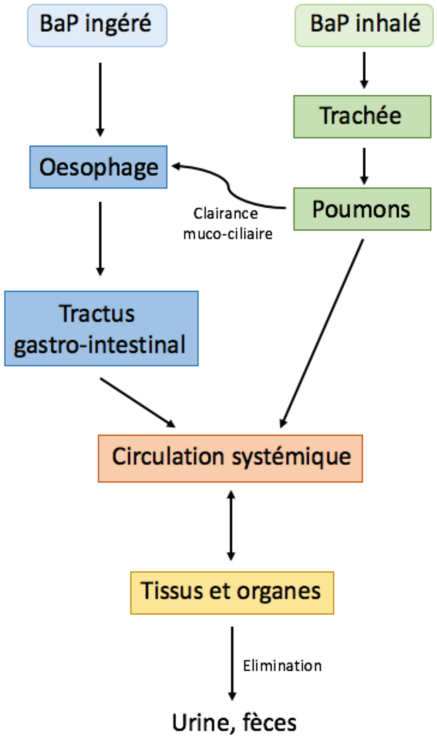


Figure 16. Distribution dans l'organisme du benzo(a)pyrène et de ses métabolites

Le benzo(a)pyrène ingéré ou inhalé ainsi que ses métabolites issus du processus de détoxification sont rapidement distribués dans tout l'organisme par la circulation sanguine. Leur élimination se fait à l'échelle de l'organisme par l'urine et les fèces principalement.

Adapté d'après Ramesh A., 2004 [173]

Pendant la gestation, il a été montré depuis de nombreuses années que le BaP peut facilement traverser la barrière placentaire chez le rat et la souris après administration orale ou inhalation [174]–[176]. Chez l'humain, il existe plusieurs études concernant l'exposition de femmes enceintes à la fumée de cigarette sur la contamination potentielle du fœtus via le placenta. Il a ainsi été démontré par le modèle de perfusion placentaire que le BaP présent dans la circulation maternelle peut franchir la barrière placentaire et rejoindre le compartiment fœtal [177], [178].

Les concentrations de BaP dans le sang maternel, le placenta, le sang de cordon ou encore le lait maternel ont été mesurées chez différentes populations dans le monde (Inde, Ukraine, Chine, Pologne) [179] ainsi qu'aux Etats-Unis et en Italie, preuve que le BaP franchit également la barrière placentaire humaine. Les résultats de ces différentes études sont résumés dans le Tableau 2.

Sang maternel (ng/ml)	**Placenta** (ng/g)	**Sang de cordon ombilical** (ng/ml)	**Lait maternel** ([1] ng/ml ou [2] ng/g)	**Références**
0,04	0,06	0,1	0,26 [1]	Madhavan ND, 1995 [180]
17,28	ND	3,70	ND	Gladen BC, 2000 [181]
ND	ND	ND	0-1,167 [1]	Zanieri L, 2007 [182]
ND	0-6,15	ND	ND	Zhu Y, 2014 [183]
0,75	0,17	ND	ND	Drwal, 2017 [184]
ND	ND	<1,6	ND	Zajda 2017 [185]
ND	ND	ND	0-1,79 [2]	Santonicola S, 2017 [186]
ND	ND	ND	0-3,8 [2]	Acharya N, 2019 [187]

Tableau 2. Concentrations mesurées du benzo(a)pyrène dans le sang maternel, le placenta, le sang de cordon ombilical et le lait maternel

ND = non déterminé

Complété d'après Drwal E, 2019 [179]

L'étude de Zanieri et al. [182] a montré l'effet du tabagisme sur la concentration en BaP dans le lait maternel. En effet, des taux significatifs de BaP ont été mesurés dans le lait maternel de femmes fumeuses (allant de 0 à 1,167 ng/g avec une moyenne de 0,519 ng/g) tandis que chez les femmes non fumeuses, le BaP était en dessous de la limite de détection. L'étude présentée ci-dessus d'Acharya et al. [187] a également établi un lien entre l'obésité et la concentration en BaP puisque le BaP n'a été retrouvé qu'uniquement dans le lait maternel de femmes avec un IMC>30 et n'a pas été détecté chez les femmes ayant un IMC normal. Ce résultat est en concordance avec le tropisme du BaP pour les graisses.

3.2.3.3. Activation du benzo(a)pyrène

3.2.3.3.1. Bio-transformation

Le benzo(a)pyrène est une molécule inerte en tant que telle. Elle acquiert ses propriétés toxiques via une activation métabolique. La présence de benzo(a)pyrène au niveau cellulaire entraîne rapidement la réaction de systèmes enzymatiques de détoxication permettant de rendre ce composé hydrosoluble afin de faciliter son excrétion par voie rénale ou biliaire à l'échelle de l'organisme. Cette métabolisation comporte 3 étapes faisant intervenir des enzymes de phase I conduisant à l'activation du BaP en composés électrophiles, des enzymes de phase II permettant la conjugaison des métabolites issus de la phase I, et des transporteurs permettant l'excrétion des produits issus des réactions enzymatiques des phases I et II [188] (Figure 17).

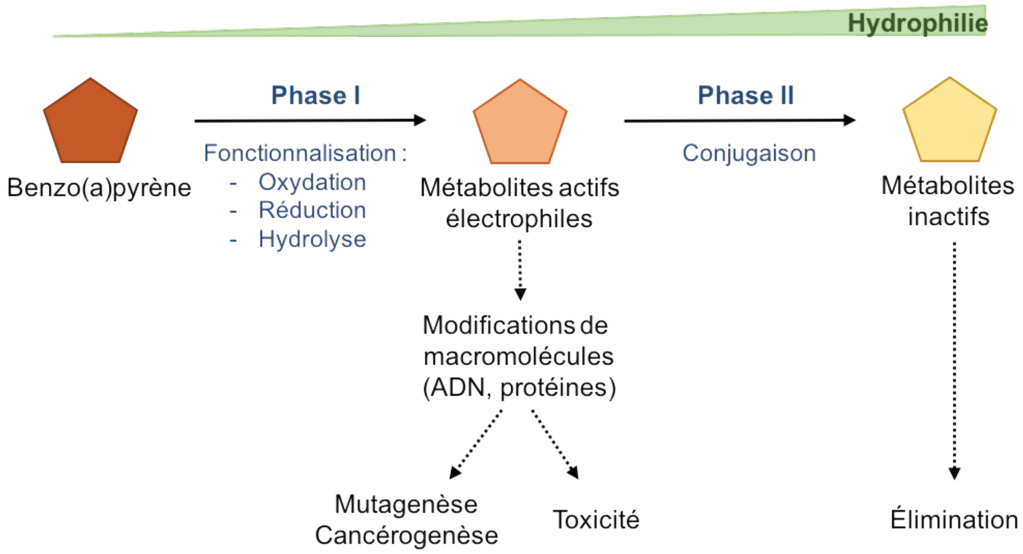


Figure 17. Schéma général du métabolisme du benzo(a)pyrène

La métabolisation du benzo(a)pyrène comprend deux phases afin de le rendre hydrophile pour son élimination à l'échelle de l'organisme, principalement dans les fèces et en moindre mesure dans les urines. La phase I de fonctionnalisation forme des métabolites réactifs électrophiles qui peuvent former des adduits à l'ADN et aux protéines, responsables de la toxicité. La phase II de conjugaison transforme ces métabolites actifs en métabolites inactifs, permettant leur élimination.

Le métabolisme du BaP à l'échelle de l'organisme se fait principalement dans le foie, vers lequel il est transporté. Cependant les enzymes permettant cette métabolisation sont également présentes dans d'autres tissus et types cellulaires. Il existe trois voies principales d'activation du BaP [173] (Figure 18) :

- la voie des diol-époxydes, impliquant une activation du BaP par les cytochromes P450 en intermédiaires diols époxydes (voie majoritaire [189])

- la voie des o-quinones, métabolisant les dihydrodiols formés dans la voie des diol-époxydes en o-quinones
- la voie du radical cation, dans laquelle un carbone du BaP est oxydé et entraine la formation du radical cation

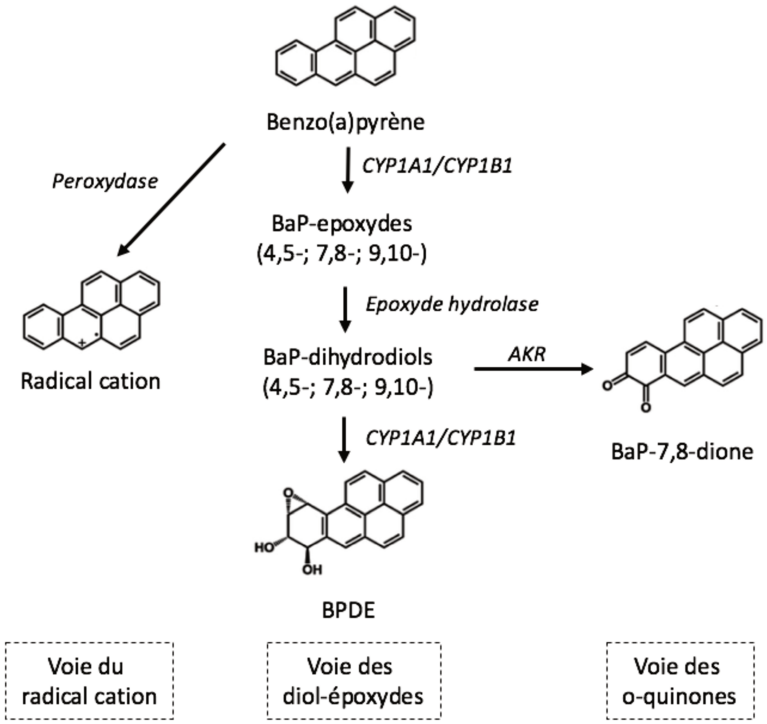


Figure 18. Voies de métabolisation du benzo(a)pyrène

Le benzo(a)pyrène est métabolisé selon trois voies : la voie du radical cation dans laquelle un carbone est oxydé entrainant ainsi la formation du radical cation, la voie des diol-époxydes qui conduit à la formation de BPDE, un des métabolites du BaP les plus réactifs, et la voie des o-quinones qui métabolise les dihydrodiols formés dans la voie des diol-époxydes. AKR : Aldo-Keto réductase ; BaP : benzo(a)pyrène ; BPDE : benzo(a)pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde

Adapté d'après l'INRS et Zhang L., 2012 [190]

La bio-transformation du BaP conduit donc à la formation de métabolites actifs électrophiles qui sont capables d'établir des liaisons covalentes avec les macromolécules nucléophiles, ADN et protéines notamment, formant ainsi des adduits. Les adduits sur l'ADN se forment par liaison du métabolite avec des guanines et conduisent à la modification de la base, d'où un risque de mutation.

L'expression de ces enzymes impliquées dans les phases I et II de la métabolisation du BaP ainsi que les transporteurs de la phase III est induite par le BaP grâce au récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR), décrit dans la partie 3.3 de cette introduction.

3.2.3.3.2. Phase I

De nombreuses enzymes participent à la métabolisation de phase I, mais les plus notables sont les cytochrome P450. Ces enzymes sont capables de métaboliser une grande variété de composés et une même molécule peut être métabolisée par plusieurs CYP. Elles sont présentes dans tous les tissus, y compris le placenta, avec le taux le plus élevé dans le foie [191]. Ces cytochromes sont responsables de la détoxification et/ou bioactivation de nombreux xénobiotiques, dont également beaucoup de médicaments [192]. Le BaP est principalement métabolisé par les CYP1A1 et CYP1A2 mais aussi par CYP1B1 [193]. Les CYP1A2 et CYP1B1 sont peu exprimés dans le placenta humain, comparé à CYP1A1 [194]. Ces cytochromes catalysent la monooxygénation et métabolisent les HAP successivement en époxydes et diol-époxydes [195]. Ces métabolites époxydes et diol-époxydes sont réactifs et ont le potentiel de se lier aux protéines et à l'ADN, causant des dommages cellulaires en formant des adduits et en générant des espèces réactives de l'oxygène lors de leur formation [196]. Les perturbations cellulaires qui en résultent peuvent conduire à des mutations et au développement de tumeurs et de cancers [197]. L'un des diols-époxydes le plus étudié est le BP-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE), capable de former des adduits à l'ADN, faisant de ce composé une molécule cancérogène car une réparation incorrecte de ces adduits peut conduire à l'apparition de mutations [193].

La formation du BaP-7,8-dione entraine la production d'espèces réactives de l'oxygène, notamment d'H_2O_2, par les enzymes AKR, des oxydoréductases dépendantes du NADPH [190].

3.2.3.3.3. Phase II

Les métabolites produits lors des réactions de la phase I de métabolisation (quinones, dihydrodiols, époxydes, diol-époxydes…) subissent ensuite une étape de conjugaison par les enzymes de phase II dont fait partie la glutathion S transférase (GST), la UDP-glucuronosyltransférase ou encore la sulfotransférase [198]. Ces enzymes conjuguent une majorité des métabolites formés au glutathion, à l'acide glucuronique ou à un groupement sulfate, ajoutant ainsi un groupement hydrophile sur la fonction activée, permettant l'obtention de molécules hydrophiles. D'autres enzymes de phase

II sont l'hème oxygénase (HO-1), la superoxyde dismutase 1 et 2 (SOD1/2), la NAD(P)H quinone oxygénase 1 (NQO1), impliqués dans la défense contre le stress oxydant.

3.2.3.4. Elimination

Les métabolites créés lors des étapes de biotransformation en phases I et II sont très hydrophiles et ne peuvent donc pas diffuser librement à travers la membrane plasmique. Ces phases de métabolisation permettent d'augmenter la solubilité du xénobiotique dans les fluides biologiques (urines et selles notamment) afin de favoriser son élimination à l'échelle de l'organisme. Ces composés sont ensuite excrétés au niveau cellulaire par des transporteurs actifs de phase III, comme le Multiple Drug Resistance-associated protein (MRP) avec une consommation d'énergie (hydrolyse de l'ATP) [188].

3.2.4. Effets toxiques

Parmi les HAP, la toxicité du benzo(a)pyrène est la plus documentée. Le BaP est connu pour son effet cancérigène, mutagène, reprotoxique et perturbateur endocrinien. Les effets dépendent principalement de la voie d'exposition et de la concentration. La toxicité du BaP est principalement attribuée à sa capacité à induire la formation d'adduits à l'ADN [199] par l'un de ses métabolites, le BPDE.

3.2.4.1 Effets généraux

Des études chez le rat ont montré une altération de l'immunité (diminution du poids du thymus et atrophie) ainsi que des altérations hépatiques (augmentation du poids du foie) après administration de BaP [200], [201].

Chez l'humain, les effets à court terme sont principalement une irritation et une sensibilisation des muqueuses et de la peau après une exposition au BaP [202].

3.2.4.2. Effets cancérigènes

Des études chez les rongeurs tels que les rats, souris et hamsters ont associé l'exposition au BaP à l'apparition de tumeurs de l'appareil digestif (œsophage, estomac) et de l'appareil respiratoire (larynx, poumons) [203]–[205].

Dans des modèles humains, le BaP a été montré comme favorisant la migration, l'invasion et la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules pulmonaires A549, par une augmentation de l'expression d'un ARN non codant (linc00673) de manière AhR-dépendante [206]. Les mêmes effets pro-carcinogènes médiés par AhR ont été montré dans un autre modèle de cellules pulmonaires BEAS-2B à une concentration de BaP équivalente à celle retrouvée dans le sang (5 μg/L) [207]. Le BaP favorise également la prolifération et la métastase des cellules cancéreuses gastriques par l'augmentation de l'expression de métalloprotéinases et de c-myc, médié par les voies de signalisation d'AhR et ERK [208].

3.2.5. Benzo(a)pyrène, grossesse et placenta

Il apparaît que de nombreux xénobiotiques auxquels la mère est exposée pendant la grossesse sont transportés dans la circulation fœtale (molécules pharmaceutiques, drogues, alcool, composés de la fumée de cigarette, métaux…) [48], [209]. Comme le montre le modèle de perfusion placentaire humaine, cela s'applique à de nombreux cancérogènes chimiques humains connus ou putatifs, comme la NDMA [210], le benzo(a)pyrène [178] ou encore les phtalates [211].

Des études ont rapporté que les HAP peuvent exercer leurs effets toxiques sur la mère et le fœtus *via* le placenta [212]. Des études chez l'animal montrent une association entre l'exposition au BaP et des effets adverses sur le développement des fœtus. L'exposition *in utero* au BaP chez des rats prédispose la descendance à des dysfonctions cardiovasculaires, notamment une pression systolique élevée [213] et chez la souris augmente l'adiposité viscérale et la prise de poids dans les premiers mois de vie, conduisant à une stéatose hépatique [214]. L'exposition *in utero* au BaP peut également avoir des conséquences sur la vie reproductive de la descendance. L'exposition transplacentaire au BaP chez la souris diminue le nombre de follicules ovariens chez les fœtus et augmente le nombre de mutations ovariennes, ce qui pourrait être impliqué dans la pathogenèse des tumeurs épithéliales ovariennes [215]. Le BaP altère également le développement placentaire. Chez la souris, l'exposition au BaP au début de la grossesse altère la décidualisation et l'angiogenèse [216]. Le BaP est reconnu comme un perturbateur endocrinien. L'exposition de rats par inhalation au BaP pendant la gestation entraine une diminution de la survie fœtale de manière dose-dépendante ainsi

qu'une diminution de la concentration des hormones de la gestation progestérone, œstrogènes, prolactine [217]. Chez la souris, l'exposition lors de la gestation provoque une rupture de la balance œstrogène/progestérone avec une augmentation de la concentration plasmatique de ces deux hormones associé à une augmentation de l'expression du récepteur α des œstrogènes (ERα) et une diminution de l'expression du récepteur à la progestérone, conduisant à une modification de la réceptivité de l'endomètre et un nombre réduit de sites d'implantation d'embryons [218].

L'exposition au BaP pendant la grossesse peut également avoir des effets délétères sur la croissance du fœtus et l'issue de la grossesse chez l'humain. Une étude d'une cohorte norvégienne a montré qu'il existe une association entre l'exposition alimentaire au B(a)P pendant la grossesse et un petit poids de naissance [219]. La concentration estimée de HAP parvenant au fœtus est inférieure à celle du sang maternel et du sang de cordon; à l'inverse, la quantité de dommages à l'ADN pour une même concentration de HAP peut être 10 fois plus élevée chez le fœtus que chez la mère, ce qui indique que le fœtus est plus sensible aux effets génotoxiques ou mutagènes [220]. Les adduits BPDE–ADN ont été observés dans le sang maternel et ombilical humain ainsi que dans le placenta humain, indiquant une exposition biologiquement significative et une métabolisation placentaire du BaP [178], [221]. Ces adduits BPDE-ADN s'accumulent dans le placenta et le traverse, causant ainsi des anomalies de développement placentaire et une fœtotoxicité [222]. Des études ont établi un lien possible entre un taux élevé d'adduits BPDE-ADN dans le sang maternel et les risques de fausse couche lors des premiers mois de grossesse [223]. Les niveaux d'adduits à l'ADN dans le sang de cordon ombilical et le placenta ont également été associés à une croissance fœtale altérée avec un poids de naissance, une taille et un périmètre crânien réduits des nouveaux-nés [224] ainsi qu'avec des défauts neuro-développementaux chez les enfants [225]. Le lait maternel semble être la source majeure de HAP durant la première période post-natale [226].

Au niveau cellulaire, il a été mis en évidence que le BaP inhibe la prolifération et l'invasion des trophoblastes extravilleux HTR-8/SVneo par l'activation des voies de signalisation ERK et JNK [227] et conduit à l'arrêt du cycle cellulaire dans la lignée trophoblastique JEG-3 [228], [229]. L'effet anti-prolifération du BaP sur la lignée JEG-3 impliquerait l'activation d'une voie p53-dépendante, une voie de réponse aux

dommages à l'ADN et au stress oxydant, provoquant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M [228]. Une étude des effets d'un mélange des 16 HAP listés comme prioritaires (dont le BaP) à deux concentrations physiologiques (semblables à ce qui est retrouvé dans le sang maternel et dans le placenta) a montré des effets contraires en fonctions de la lignée trophoblastique utilisée : un effet activateur de la prolifération cellulaire pour les JEG3 et inhibiteur pour les BeWo, deux lignées de choriocarcinomes humains [230]. Le BPDE, un des métabolites les plus réactifs du BaP, inhibe également la migration et l'invasion des cellules de lignées de trophoblastes extravilleux HTR-8/SVneo [231] et Swan 71 [232] par inhibition de la formation de filopodes (filaments d'actine réticulés en faisceaux permettant la migration cellulaire) et down-régulation de la voie de signalisation PI3K/AKT. Le BaP ou ses métabolites sont responsables d'une mort cellulaire par apoptose dans les modèles de lignée trophoblastique BeWo [233] et JEG-3 par un mécanisme faisant intervenir le stress du réticulum endoplasmique [234] ainsi qu'un déséquilibre dans la dynamique des membranes mitochondriales (la balance des processus de fusion/fission en faveur de la fission mitochondriale) [235]. De plus, le BaP exerce son effet de perturbateur endocrinien par une augmentation de la production de hCG dans les cellules BeWo [236], affectant de surcroît la différenciation de ces trophoblastes [233].

3.3. Le récepteur des hydrocarbures aromatiques polycycliques (AhR)

3.3.1. Structure

La protéine AhR humaine est un facteur de transcription constitué de 848 acides aminés avec un poids moléculaire de 96 kDa. AhR est codé par un gène situé dans le chromosome 7. Cette protéine est constituée de trois principaux domaines : le domaine bHLH, le domaine PAS et le domaine de transactivation (Figure 19).

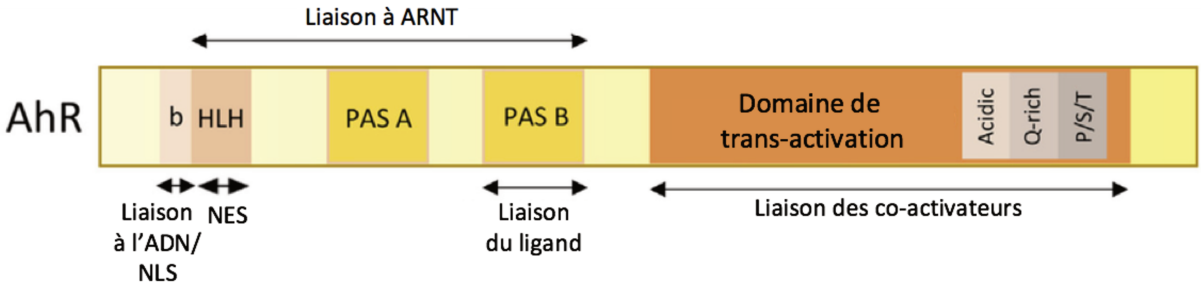


Figure 19. Structure de la protéine AhR

La protéine AhR contient 3 domaines : le domaine bHLH localisé dans la partie N-terminale permettant sa dimérisation avec son partenaire ARNT, sa liaison à l'ADN, les interactions avec les protéines chaperonnes ainsi que l'import (NLS) et l'export (NES) nucléaire ; le domaine PAS constitué de 2 structures répétées et impliqué dans la dimérisation avec ARNT et la liaison avec le ligand ; le domaine de transactivation localisé dans la partie C-terminale nécessaire à l'interaction avec des co-activateurs pour la régulation de la transcription des gènes cibles.

D'après Larigot L., 2018 [237]

3.3.1.1. Domaine bHLH

Le domaine bHLH est une structure hélice-boucle-hélice (bHLH pour basic helix-loop-helix) localisée dans la partie N-terminale de la protéine AhR. C'est une région d'acides aminés conservés composée de deux hélices α, séparées par une boucle dont la séquence est relativement peu conservée, et d'une région adjacente d'acides aminés basiques. Ce domaine permet la dimérisation d'AhR avec son partenaire ARNT, la liaison à l'ADN et les interactions avec les chaperonnes telles que Hsp90. Ce domaine contient également des séquences pour l'import (NLS pour Nuclear Localization Signal) et l'export nucléaire (NES pour Nuclear Export Signal) [238], permettant respectivement la translocation nucléaire d'AhR après son activation par un ligand et son exportation du noyau vers le cytoplasme après la séquence des évènements nucléaires.

3.3.1.2. Domaine PAS

L'acronyme PAS est constitué de la première lettre des 3 protéines originellement identifiées qui partagent cette séquence de 275 acides aminés communs : la protéine Period (Per) impliquée dans le rythme circadien, la protéine ARNT impliquée dans la voie de signalisation AhR et la protéine Single-minded (Sim) impliquée dans le développement neurologique de la drosophile [239]. Le domaine PAS est composé de deux séquences d'environ 70 acides aminés chacune, appelées PAS-A et PAS-B. Le domaine PAS-A est impliqué dans la dimérisation avec ARNT, partageant cette fonction avec le domaine bHLH. Le domaine PAS-B permet la liaison du ligand et contient une séquence d'exportation nucléaire (NES).

3.3.1.3. Domaine de transactivation

Le domaine de transactivation, appelé TAD pour « TransActivation Domain » est localisé dans la partie C-terminale de la protéine. Ce domaine contient trois sous-domaines : un sous-domaine enrichi en résidus acides (glutamate/aspartate), un autre enrichi en glutamine (Q-rich) nécessaire à la liaison de cofacteurs pour la mise en place du complexe transcriptionnel de l'ARN polymérase II et le dernier sous-domaine enrichi en proline, sérine et thréonine (P/S/T). Les co-activateurs interagissent avec AhR via ce domaine [240] afin de permettre la régulation de la transcription des gènes cibles. Parmi les co-activateurs, il existe des protéines avec activité histone acétyltransférase (SRC-1, NcoA2, p/CIP, CBP), des protéines avec activité méthyltransférase (CARM1, PRMT1), des facteurs généraux de la transcription (Pol II, TBP, TFIIB et TFIIF), des protéines modificatrices d'histone ATPase-dépendantes (Brg-1, Brahma) et d'autres protéines telles que RIP140 et CDK8 [241].

3.3.2. Expression d'AhR

D'abondantes études *in vivo* ont montré que AhR est exprimé constitutivement dans de nombreux types cellulaires et tissus avec des variations d'expression. Chez l'Homme, ce sont les organes barrière qui expriment le plus haut niveau d'expression (placenta, poumon, rein et foie) [242].

Dans le placenta, AhR est exprimé en périphérie de la villosité choriale, dans les syncytiotrophoblastes, ainsi que dans les cellules endothéliales des vaisseaux villositaires et dans les veines et artères du cordon ombilical [243], [244]. AhR est plus exprimé dans le placenta que dans la décidue maternelle [245].

3.3.3. Voies de signalisation AhR-dépendantes

3.3.3.1. Voie génomique

3.3.3.1.1. Complexe cytoplasmique d'AhR

En absence de ligand, AhR est présent dans le cytoplasme sous forme de complexe avec d'autres protéines qui maintiennent ce récepteur dans une conformation de haute affinité pour ses ligands [246] et le protège de la dégradation par l'action du système « ubiquitine-protéasome » (Figure 20). Ce complexe multiprotéique est composé de deux protéines de choc thermique 90 (Hsp90), d'une molécule XAP 2

(hepatitis B virus X-associated protein 2) et d'une co-chaperonne p23 [247]. AhR est également lié à une protéine Src, impliquée dans la voie de signalisation non génomique de ce récepteur. Les protéines Hsp90 masquent la séquence NLS présent dans le domaine bHLH d'AhR, empêchant la translocation nucléaire du récepteur [248]. XAP2 interagit avec AhR et le dimère d'Hsp90 pour stabiliser le complexe et semble protéger AhR de l'ubiquitination et donc de la dégradation par le protéasome [247]. La co-chaperonne p23 interagit directement avec Hsp90 et joue un rôle important dans la réponse au ligand et l'activation d'AhR et protège également AhR de la dégradation par la protéasome [247].

Lorsque AhR se lie à son ligand, une protéine Hsp90 se dissocie et la séquence NLS de la partie N-terminale est exposée. Cela permet une translocation rapide d'AhR dans le noyau, toujours lié à p23 et à une autre protéine chaperonne Hsp90 en plus du ligand.

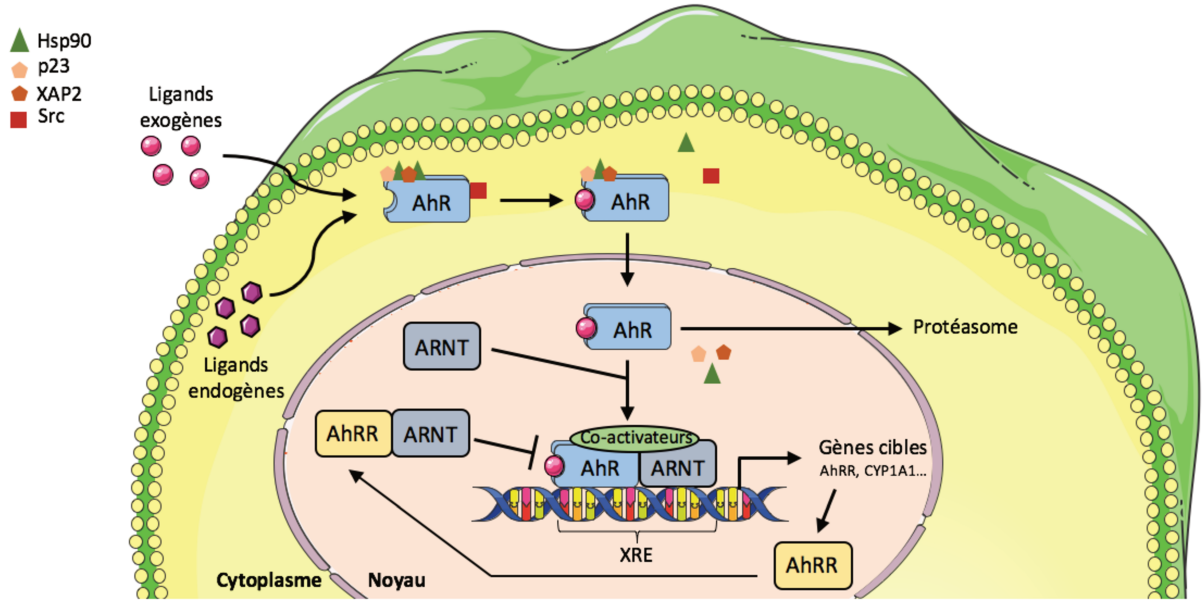


Figure 20. Voie génomique de la signalisation d'AhR

AhR est maintenu dans le cytoplasme sous forme d'un complexe avec des protéines chaperonnes, dans une conformation apte à recevoir un ligand. Lorsqu'un ligand (exogène ou endogène) se lie à AhR, le complexe ligand-AhR transloque dans le noyau et s'hétérodimérise avec son partenaire ARNT. Cet hétérodimère se lie à l'ADN sur des éléments de réponse (XRE) situés dans les promoteurs des gènes cibles pour en réguler la transcription. La signalisation d'AhR est régulée à deux niveaux : sa dégradation rapide par le protéasome lors de son export du noyau et par AhRR, capable de se lier à ARNT et entrant donc en compétition pour la liaison d'AhR à son partenaire ARNT.

Adapté d'après Larigot L., 2018 [237]

3.3.3.1.2. Complexe nucléaire

Dans le noyau, la dissociation d'AhR de son complexe chaperon se termine et AhR forme un hétérodimère avec son partenaire ARNT (AhR Nuclear Translocator, nommé aussi HIF-1β pour Hypoxia Inducible Factor 1 β) *via* l'interaction entre les domaines bHLH et PAS de ces deux protéines [249] (Figure 20). La liaison d'ARNT sur AhR permet notamment de masquer la séquence NES d'AhR. L'hétérodimère AhR/ARNT est la forme transcriptionnellement active qui se lie aux éléments de réponse aux xénobiotiques (XRE), dont la séquence consensus est 5'-TNGCGTG-3', situés dans les régions promotrices des gènes cibles. Cette liaison à l'ADN conduit au recrutement de plusieurs co-activateurs (listés dans le paragraphe 3.3.1.3) [241] qui permettent un relâchement local de la structure de la chromatine afin de faciliter le recrutement des facteurs généraux de la machinerie de transcription.

ARNT (HIF-1β) est aussi impliqué dans les voies de signalisation de l'hypoxie. En réponse à l'hypoxie, ARNT s'hétérodimérise avec HIF-1α et régule la transcription de gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse, dont le facteur VEGF.

3.3.3.1.3. Batterie de gènes cibles d'AhR

De nombreuses études ces dernières années ont révélé une liste croissante de gènes AhR/XRE dépendants, qui ne sont pas impliqués uniquement dans le métabolisme des xénobiotiques mais également dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires, notamment le développement du système immunitaire et nerveux, l'angiogenèse et le modelage des vaisseaux sanguins ainsi que le contrôle du cycle cellulaire et de la différenciation (tels que p21, p27, c-jun et Bax) [250]. Aujourd'hui le nombre de gènes répondant à l'activation d'AhR est d'environ 600 [251].

Les gènes cibles privilégiés d'AhR impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques sont les enzymes de la phase I et de la phase II. Pour les enzymes de la phase I, il s'agit de monooxygénases de la famille des CYP1 impliquées dans la détoxification (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) et d'autres monooxygénases telles que CYP2S1 (métabolisme du naphtalène), CYP2A6 (métabolisme des médicaments) et l'aromatase CYP19 (synthèse des œstrogènes). Ces monooxygénases participent à rendre ces xénobiotiques hydrophiles par l'ajout d'un groupement hydroxyle. Les enzymes de la phase II sont

entre autres NQO1, HO-1, SOD1/2, la gluthathione-S-transferase et des UDP-glucuronosyltransférases ou encore NRF2. Ces enzymes sont anti-oxydantes et permettent de greffer des radicaux moléculaires permettant d'éliminer les xénobiotiques en complétant leur caractère hydrophile. Le gène cible d'AhR le plus connu et utilisé généralement comme biomarqueur d'exposition aux ligands d'AhR est CYP1A1. Il a été montré dans un modèle de cellules cancéreuse colorectales humaines que l'expression de CYP1A1 induite par les HAP via AhR se fait de manière p53 dépendante. La transcription de CYP1A1 est régulée par la liaison de p53 sur son élément de réponse situé dans la région promotrice de ce gène, favorisant sa transcription [252].

Les gènes cibles d'AhR comportent également des régulateurs de la signalisation d'AhR tels que AhRR [253].

L'activation de la voie génomique d'AhR dans le placenta est démontrée par de nombreuses publications [254].

3.3.3.2. Voie non génomique

Des cross-talk entre AhR et d'autres voies de signalisation peuvent conduire à une action non canonique d'AhR (Figure 21). Plusieurs types de cross-talk ont été décrits résultant d'interactions entre AhR activé et d'autres protéines, par compétition pour des co-activateurs/répresseurs transcriptionnels ou par liaison directe [255]. Dans le noyau, AhR a été montré comme s'associant à la forme hypophosphorylée de pRB, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S [256] ou à STAT1 provoquant l'activité du promoteur de NF-κB [257]. De plus, des interactions entre AhR et le récepteur des œstrogènes, la β-caténine, NF-κB, Nrf2 ou encore le récepteur des glucocorticoïdes ont été mises en évidence, régulant ces voies de signalisation [237], [258], [259]. L'interaction entre les voies de signalisation d'AhR et du récepteur des œstrogènes peut conduire à une activité anti-œstrogénique d'AhR par l'up-régulation des enzymes du métabolisme des œstrogènes, une interférence dans la transcription de leur gènes cibles par compétition dans le recrutement des co-activateurs dont certains sont en commun ou encore par une liaison directe d'AhR activé et du récepteur des œstrogènes non lié à un ligand [260].

La liaison d'un ligand à AhR donne également lieu à une action non génomique par une augmentation rapide de la concentration en calcium intracellulaire [261] avec des conséquences sur d'autres voies (MAPK) ou sur des fonctions cellulaires (adhérence et migration). Les mécanismes sous-jacents à cette augmentation de calcium intracellulaire sont peu connus. L'implication de protéines tyrosines kinases, du récepteur de la ryanodine ou encore d'ATPases calciques du réticulum endoplasmique peuvent être suspectés [262].

Dans le cytoplasme, AhR peut également former un complexe avec la protéine kinase c-Src. Lors de la liaison d'un ligand à AhR, la kinase c-Src se dissocie et peut activer ses cibles par phosphorylations. Son action a été montrée dans la migration cellulaire par la modification de la structure des points d'adhérence focaux [261]. L'activation de COX2 de manière AhR-dépendante par le BaP a été montrée dans les cellules endothéliales fœto-placentaires [263], augmentant ainsi la production de métabolites de prostaglandines et pouvant affecter la vascularisation fœto-placentaire par une régulation de l'angiogenèse.

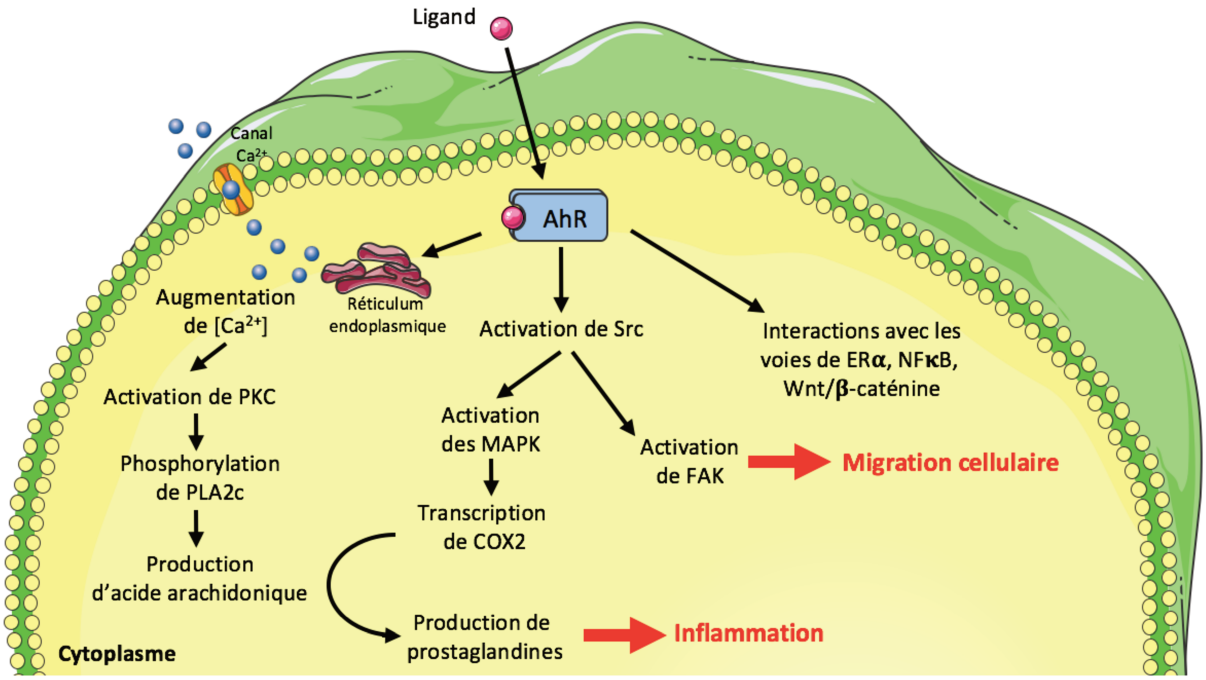


Figure 21. Voies non génomiques de la signalisation d'AhR

L'activation d'AhR peut augmenter la concentration de calcium intracellulaire ainsi que l'activité de la kinase Src, jouant un rôle dans l'inflammation. AhR activé est également capable d'interagir avec d'autres régulateurs transcriptionnels tels que le récepteur des œstrogènes α, NF-κB ou les acteurs de la voie Wnt/β-caténine.

D'après Larigot L., 2018 [237]

3.3.3.3. Ligands d'AhR

De manière générale, les ligands d'AhR peuvent être divisés en trois catégories :

- Les composés ayant une origine anthropogénique englobant des polluants environnementaux et certaines molécules pharmaceutiques

- Les composés d'origine naturelle issus de sources alimentaires, synthétisés par les plantes et animaux

- Les composés produits de manière endogène par le corps humain ou par les bactéries du microbiote

Les ligands d'AhR sont en général très lipophiles et diffusent librement à travers la membrane plasmique.

3.3.3.3.1. Ligands exogènes

Hydrocarbures aromatiques halogénés

Les hydrocarbures aromatiques halogénés comprennent les dioxines, dibenzofuranes, azo(xy)benzènes, naphtalènes. En général, ces composés entrent dans l'environnement par contamination (accidents industriels, déchets d'incinération). Le plus connu d'entre eux est le TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine), surnommée également dioxine de Seveso. Cette molécule possède une grande stabilité chimique et n'est pas métabolisée par sa liaison à AhR et l'activation de ce récepteur, d'où sa toxicité accrue.

Biphényles polychlorés (PCB)

Les PCB sont des molécules synthétiques qui se caractérisent par une grande stabilité thermique, chimique et biologique. Ils sont présents dans de nombreux produits tels que les isolants, les retardateurs de flamme et les colles [264].

Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP représentent une grande classe d'agonistes d'AhR. Ces molécules ont été largement décrites dans le paragraphe 3 de cette introduction. Ces agonistes stimulent leur propre métabolisme par induction *via* AhR de monooxoygénases et d'enzymes de conjugaison. Cette biotransformation peut conduire à la formation de composés carcinogènes. Certains HAP ont été classées par le CIRC comme carcinogènes avérés ou

potentiels, comme par exemple le BaP, le benzo(a)anthracène ou encore le chrysène. Un exemple très étudié est le diol-époxyde BPDE dérivé du benzo(a)pyrène qui a un pouvoir mutagène et génotoxique, par sa liaison de manière covalente à des macromolécules pour former des adduits à l'ADN et aux protéines.

Molécules pharmaceutiques

Certaines molécules pharmaceutiques ont été montrées comme ligands d'AhR. Il s'agit notamment d'anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que le diclofénac et le sulindac et de l'inhibiteur de la pompe à protons oméprazole, pouvant entraîner des effets secondaires par l'activation d'AhR.

Composés de l'alimentation

Il s'agit de molécules retrouvés ubiquitairement dans les fruits et légumes, parmi lesquels certains flavonoïdes (flavones, anthocyanines), des polyphénols (le resvératrol présent par exemple dans le raisin et la curcumine présent dans le curcuma), les caroténoïdes ou encore la quercétine présente dans les plantes médicinales [265]. Les indoles tel que le indole-3-carbinole (I3C), présents dans les légumes crucifères (brocoli, choux de Bruxelles), ou l'indolo[3,2-b]carbazole, produit de condensation de l'indole-3-carbinol, formé dans l'environnement acide de l'estomac sont également de bon ligands d'AhR. Ces molécules présentent des effets anti-tumorigéniques associés à une altération du métabolisme des xénobiotiques cancérigènes par l'inhibition des CYP [266].

3.3.3.3.2. Ligands endogènes

Métabolites de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est un acide gras présent dans les phospholipides constituant les membranes cellulaires. Un des ses métabolites, la lipoxanthine A2, est un ligand endogène d'AhR [267].

Métabolites de l'hème

Il est suggéré que des produits issus du catabolisme de l'hème tels que la bilirubine et la biliverdine sont des ligands d'AhR [268].

Métabolites du tryptophane

L'aromaticité du tryptophane a conduit à la spéculation que cet acide aminé ou ses métabolites peuvent être des agonistes endogènes d'AhR. Différentes études ont montré une activation d'AhR par la tryptamine et l'acide acétique indole [269]. Des études récentes ont ajouté de nouveaux acteurs tels que la kynurénine, un métabolite issu de la métabolisation du tryptophane par l'enzyme IDO1 (Indoleamine 2,3-dioxygénase 1) dans l'organisme et TDO (tryptophane 2,3-dioxygénase) dans le foie, montré comme ayant une implication importante dans le développement des cancers et notamment de tumeurs cérébrales [270].

Photoproduits UV du tryptophane

L'irradiation UV du tryptophane génère des composés qui montrent une forte affinité pour AhR et la capacité d'induire les monooxygénases CYP1 [271]. Le composé le plus étudié est le 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ). Il a été proposé que AhR jouerait un rôle dans la réponse cellulaire au stress oxydant causé par la lumière UV *via* FICZ, un agoniste endogène d'AhR [272].

3.3.3.4. Régulation de l'activité d'AhR ligand-indépendante

L'activité d'AhR peut être régulée par différentes modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, la SUMOylation ou l'ubiquitinylation. L'analyse *in silico* révèle de nombreux sites de phosphorylation potentiels dans la structure primaire d'AhR mais les preuves de phosphorylation réelle et du rôle fonctionnel de ces résidus phosphorylés sont limitées [273]. De nombreuses études ont suggéré que la phosphorylation d'AhR est une étape importante dans sa signalisation et des sites de PKA et PKC ont été identifiés [274]. Par exemple, la phosphorylation d'AhR au niveau du site NLS provoque sa rétention dans le cytoplasme même en présence d'un ligand [275]. L'ubiquitinylation d'AhR permet sa dégradation par le protéasome. La SUMOylation d'AhR dans le domaine bHLH ou le domaine de transactivation stabilise AhR en empêchant son ubiquitinylation et module son activité en pouvant supprimer son activité de transactivation [276].

Une activation ligand-indépendante d'AhR a été rapportée dans plusieurs études. Des niveaux d'AMPc élevés seraient capables d'activer AhR [277]. De plus, il est possible

que dans des cellules ayant un niveau d'AhR relativement élevé, comme c'est le cas dans des lignées de cellules tumorales, ce récepteur fait une navette nucléocytoplasmique dynamique, permettant l'hétérodimérisation d'AhR avec ARNT en absence de ligand [278]. Les forces de cisaillement (shear stress) dans les cellules endothéliales peuvent également conduire à l'activation d'AhR, via un mécanisme de mécanotransduction inconnu [279].

3.3.3.5. Régulation de la signalisation AhR

La signalisation d'AhR est régulée de deux manières : par dégradation par le protéasome de la protéine AhR ou par son répresseur AhRR qui agit en tant que rétrocontrôle négatif. Ces deux mécanismes protègent contre les conséquences d'une sur-stimulation par des agonistes et assure un contrôle temporel de la signalisation.

3.3.3.5.1. Dégradation par le protéasome

Après exposition à un ligand, le niveau protéique d'AhR a été montré comme diminuant *in vitro* et *in vivo* rapidement sans altération du niveau de son ARNm [280]. Une fois la régulation transcriptionnelle faite, AhR est exporté du noyau vers le cytosol et dégradé par le protéasome [281]. La dégradation par le protéasome d'AhR implique la liaison covalente d'ubiquitine.

3.3.3.5.2. Le répresseur AhRR

En plus de la dégradation par le protéasome d'AhR, il existe un autre mécanisme qui régule la signalisation d'AhR : AhRR. La protéine AhRR partage de fortes homologies de séquence avec la protéine AhR en ce qui concerne les domaines bHLH et PAS-A (Figure 22) et son expression est induite par AhR. De par sa similarité de structure avec AhR, en particulier le domaine N-terminal, AhRR peut se dimériser avec ARNT et se lier aux XRE [282]. Cependant, AhRR est dépourvu de domaine PAS-B donc ne peut pas lier de ligands et son domaine C-terminal ne possède pas de domaine de transactivation permettant le recrutement de co-activateurs pour l'initiation de la transcription des gènes cibles [283]. La liaison à l'ADN du complexe AhRR/ARNT provoque le recrutement de nombreux co-répresseurs, notamment des histones déacétylases qui vont compacter la chromatine localement et conduire donc à une répression transcriptionnelle. Plus précisément, AhRR est en compétition avec AhR pour la liaison à

ARNT et aux XRE et représente une boucle de rétrocontrôle négatif de la signalisation d'AhR.

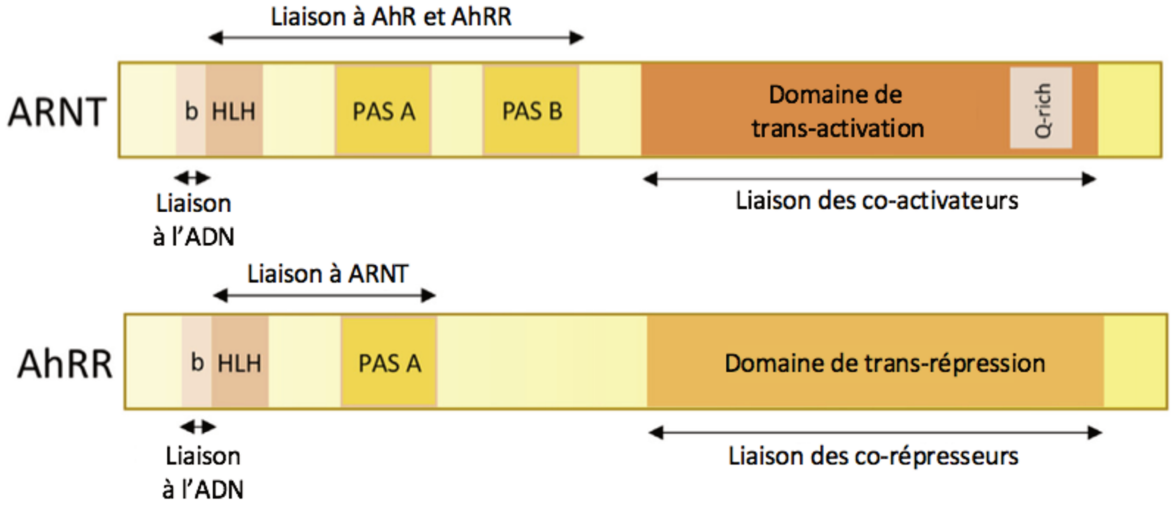


Figure 22. Structure des protéines ARNT et AhRR

La protéine ARNT possède une structure similaire à AhR. Son domaine bHLH permet sa liaison à l'ADN ainsi que sa liaison à AhR ou AhRR, le domaine PAS participant également à cette dernière liaison. Son domaine de trans-activation participe à la régulation de la transcription des gènes cibles d'AhR. La protéine AhRR contient un domaine bHLH permettant la liaison à l'ADN, un domaine PAS A permettant la liaison à ARNT et un domaine de trans-répression. L'absence de domaine PAS B l'empêche de lier des ligands.

D'après Larigot L., 2018 [237]

En plus de ce mécanisme de compétition vis-à-vis d'AhR, AhRR pourrait également agir selon un mécanisme de trans-répression. AhRR seul ou complexé à ARNT se lie au complexe AhR/ARNT au niveau des XRE, bloquant ainsi la liaison des co-activateurs [284].

3.3.4. Rôles et fonctions d'AhR

3.3.4.1. Métabolisme des xénobiotiques

Une fonction majeure d'AhR, qui a d'ailleurs conduit à sa découverte et son nom, est la régulation de l'expression des enzymes et de transporteurs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques par son action de facteur de transcription. Il s'en suit alors une cascade de réaction dépendante les unes des autres décrite dans les paragraphes 3.2.3, permettant l'élimination de ces xénobiotiques. Les enzymes induites conjointement sont celles de phase I comme par exemple les cytochromes P450 et les enzymes de phase II. Ces enzymes permettent d'augmenter la solubilité du xénobiotique dans les fluides biologiques favorisant ensuite son élimination au niveau cellulaire par

des transporteurs actifs de phase III dont le MDR (Multiple Drug Resistance) pour poursuivre par l'élimination au niveau de l'organisme, assurant une détoxification efficace [285], [286].

3.3.4.2. Rôles physiologiques

Des observations récentes suggèrent qu'AhR possède également des fonctions physiologiques. Les fonctions physiologiques régulées par AhR concerneraient le système immunitaire, l'inflammation, la migration cellulaire, la cancerogénèse, la fertilité, le développement vasculaire et hépatique ainsi que l'hématopoïèse [287]. Cette hypothèse est renforcée par le degré de conservation élevée du gène d'AhR entre les différentes espèces et son expression constitutive durant le développement et dans les tissus adultes, par l'identification de ligands endogènes et surtout par les aberrations développementales observées chez les modèles de souris KO pour AhR. En effet, ces souris possèdent des plus petits foies et une vascularisation anormale dans le foie, le rein et l'œil [288]. Une hypertrophie cardiaque, hypertension et des niveaux élevés de vasoconstricteurs ont également été observés chez ces modèles KO [289]. En ce qui concerne la cancérogenèse, AhR aurait un rôle de supresseur de tumeur (concept SAhRM pour Selective AhR Modulators). Une surexpression d'AhR diminue significativement la croissance tumorale d'un neuroblastome dans un modèle de xénogreffe chez la souris et l'activation d'AhR par la kynurénine, un ligand endogène dérivé du tryptophane, inhibe la prolifération cellulaire tumorale [290]. De plus, chez les souris KO pour ce récepteur, les tumeurs du colon progressent plus rapidement que chez les souris sauvages [291]. AhR contribuerait également à la mise en place du microbiote intestinal chez la souris [292]. Enfin, AhR aurait également un rôle dans la protection des cellules contre le stress oxydant. En effet, dans un modèle de mélanocytes, AhR est activé par le stress oxydant et protègerait ces cellules du stress oxydant en induisant la biogenèse mitochondriale [293].

Rôles d'AhR pendant la grossesse

AhR semble également jouer un rôle pendant la grossesse puisque les souris KO pour ce récepteur montrent des troubles de la fertilité, une diminution de la taille de la portée ainsi qu'une mort néonatale augmentée [294]. De plus, des ligands endogènes activant directement AhR dans les cellules immunitaires de la décidue et du sang

périphérique semblent essentiel pour le maintien de la grossesse, en permettant la tolérance immunitaire de l'organisme maternel envers l'embryon [295]. La kynurénine, produite par l'enzyme IDO1 à partir du tryptophane, entrainerait la génération AhR-dépendante de cellules Treg, participant ainsi à la tolérance fœto-maternelle [296].

L'hypothèse d'un possible rôle d'AhR dans le mécanisme de naissance prématurée spontanée a été émise [297]. En effet, l'activation d'AhR peut moduler les réponses inflammatoires via la production de cytokines pro-inflammatoires par le placenta dans les cellules endothéliales, augmentant l'expression et l'activité de COX2 dans les trophoblastes qui stimule la synthèse et le relargage de prostaglandines (PGE_2, $PGF_2\alpha$) [297]. Chez les femmes avec une forte expression d'AhR dans le placenta, l'exposition répétée à des ligands exogènes naturels et endogènes d'AhR provoque une forte activation de ce récepteur et donc un relargage plus important de prostaglandines résultant en des contractions myométriales prématurées [297]. AhR aurait également un rôle dans la survenue de fausses couches puisque l'augmentation de son expression génique et protéique est associée avec la pathogenèse des fausses couches inexpliquées [245].

L'activation d'AhR par une exposition transplacentaire aux polluants environnementaux dont les HAP peut induire un lymphome agressif chez la descendance [298]. De plus, l'activation d'AhR pendant la gestation chez la souris altère le développement mammaire avec un effet direct sur les tissus épithéliaux [299]. L'exposition à la dioxine provoque des modifications épigénétiques dans le placenta [300].

4 – Les nanomatériaux

4.1. Les nanomatériaux en général

4.1.1. Définition et classification

En octobre 2011, la Commission Européenne a publié ses recommandations relatives à la définition des nanomatériaux : « un nanomatériau est un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme

d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. » (JO CE du 20 octobre 2011 – L 275/38). Le nanomètre (nm) équivaut à 1 milliardième de mètre soit environ 1/50 000 de l'épaisseur d'un cheveu qui est d'en moyenne 50 μm. Pour les particules non sphériques, on parle généralement de diamètre aérodynamique : il s'agit du diamètre d'une sphère de masse volumique égale à 1g/cm^3 et dont la vitesse de sédimentation est égale à celle de la particule considérée.

Il existe deux grandes familles de nanomatériaux : les nano-objets et les matériaux nanostructurés.

Les nano-objets sont des matériaux dont au moins une dimension appartient à l'échelle nanométrique. On distingue trois catégories de nano-objets :

- les nanoparticules (NP) : les trois dimensions se situent à l'échelle nanométrique, par exemple les nanoparticules d'oxyde de zinc, de dioxyde de titane (TiO_2), de dioxyde de cérium (CeO_2), d'or ou d'argent.

- les nanofibres, nanotubes et nanofilaments : deux dimensions sont à l'échelle nanométrique et la troisième dimension est significativement supérieure, par exemple les nanotubes de carbone, nanofibres de polyester. Ces termes désignent des nano-objets longilignes de section compris entre 1 et quelques dizaines de nm et de longueur comprise entre 500 et 10 000 nm.

- les nano-feuillets : une dimension se situe à l'échelle nanométrique et les deux autres dimensions sont significativement supérieures, par exemple les nano-feuillets d'argile ou de séléniure de cadmium.

Les matériaux nanostructurés possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique et sont divisés en trois catégories :

- les agrégats et agglomérats de nano-objets

- les nanocomposites : composés en partie de nano-objets qui leur confèrent des propriétés améliorées ou spécifiques de la dimension nanométrique.

- les matériaux nanoporeux : possèdent des pores de taille nanométrique, par exemple les aérogels de silice.

Les nanomatériaux produits de façon intentionnelle par l'Homme sont appelés « nanomatériaux manufacturés ». Ils sont produits à des fins d'applications précises et possèdent des propriétés spécifiques. Parmi ces nanomatériaux manufacturés, certains sont produits dans des tonnages importants depuis de nombreuses années tels que le dioxyde de titane (TiO_2) et le noir de carbone par exemple. D'autres plus récents sont produits en plus faible quantité, c'est le cas des nanotubes de carbone, des quantum dots ou encore des dendrimères.

Les nanomatériaux peuvent aussi être produit de façon non intentionnelle, soit de manière anthropogénique (coproduits de procédés industriels, issus de procédés thermiques et mécaniques comme la fumée de soudage, l'émission de moteurs à combustion, les frottements des pneus sur l'asphalte, le bois de chauffage, la fumée de cigarette) ou de manière naturelle (fumées volcaniques, feux de forêt ou érosion des sols par exemple).

4.1.2. Contexte économique des nanomatériaux

Les nanomatériaux représentent un secteur en expansion et touchent de nombreux secteurs d'activité : l'automobile, l'aéronautique, la chimie, l'électronique, l'énergie mais aussi la santé. Les nanomatériaux les plus utilisés sont l'argent, le carbone (nanotubes et fullerènes), le dioxyde de titane TiO_2, le silicium et le zinc.

Des investissements économiques importants de la part des gouvernements et des industries sont réalisés chaque année pour le domaine de la nanotechnologie. Le développement des nanomatériaux a conduit à la création d'un nouveau champ dans la médecine : la nanomédecine, qui implique le développement d'outils à l'échelle nanométrique pour délivrer des médicaments, réparer les tissus endommagés ou en traitement de certaines pathologies.

4.1.3. Réglementation

La législation française en matière de nanoparticules n'est pas encore très précise. En effet, aucune réglementation spécifique ne régit actuellement la manipulation des nanomatériaux en France. Cependant, les articles L. 523-1 à L. 523-3 du Code de l'environnement et la loi Grenelle II entrée en vigueur au 1er janvier 2013

imposent que les fabricants, importateurs et distributeurs déclarent chaque année les quantités et les usages des nanoparticules qu'ils manipulent dès que le seuil dépasse 100 grammes par an et par substance. L'organisme en charge de la gestion de ces données est l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES).

De plus, la réglementation européenne oblige à un étiquetage des produits contenant des nanomatériaux pour les denrées alimentaires, les cosmétiques et les produits biocides. La présence de nanomatériaux doit être signalée par le terme [nano] entre crochets après le nom de l'ingrédient concerné depuis 2013 pour les produits cosmétiques et depuis 2014 pour l'industrie agro-alimentaire. Cependant, d'après la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF), ces réglementations d'étiquetage sont peu appliquées.

4.1.4. Procédés de fabrication

Les nanomatériaux manufacturés peuvent être fabriquées par deux approches différentes (Figure 23) :

- par approche ascendante : consiste à construire les nanomatériaux par assemblage atomes par atomes de façon précise, contrôlée et exponentielle (nanotubes de carbone, fullerènes…).

- par approche descendante : consiste à réduire par fractionnement un matériau massif pour atteindre des dimensions nanométriques (poudres de métaux ou oxydes de métaux…).

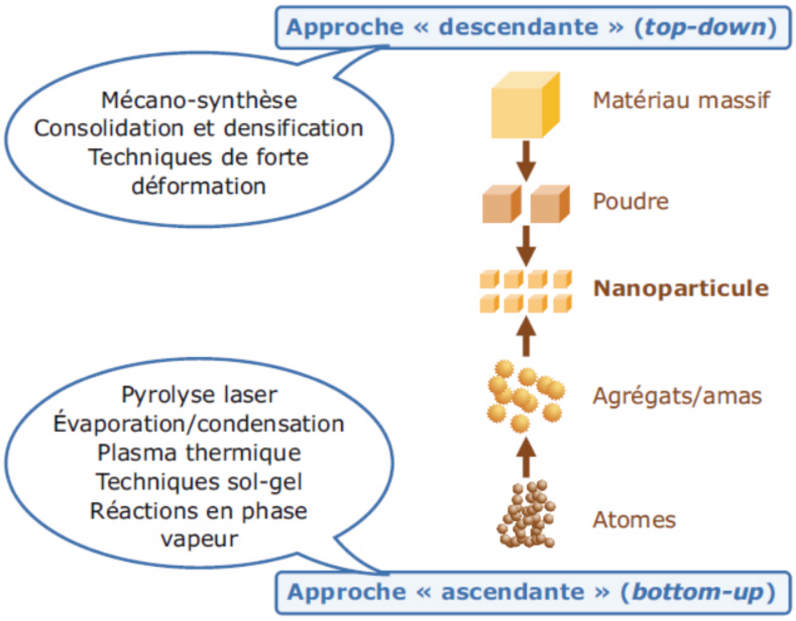


Figure 23. Procédés de fabrication des nanomatériaux

Il existe deux approches de synthèse possibles pour les nanomatériaux manufacturés : l'approche descendante qui consiste à réduire par fractionnement un matériau massif et l'approche ascendante qui consiste à assembler des atomes entre eux de façon précise, contrôlée et exponentielle.

D'après l'INRS, 2019

L'approche ascendante fait généralement appel à des procédés chimiques (évaporation/condensation, ablation laser, pyrolyse laser, irradiation ionique ou électrique entre autres) et physiques (réactions en milieu liquide par co-précipitation chimique ou hydrolyse, techniques sol-gel, réactions en milieu solide) alors que l'approche descendante se fait par l'utilisation de méthodes mécaniques (broyage à haute énergie, densification, techniques de forte déformation telles que la torsion, friction ou laminage).

Les nanomatériaux fabriqués peuvent se présenter sous forme de poudre, de suspension liquide, de gel ou intégrés dans une matrice.

4.1.5. Propriétés physico-chimiques des nanoparticules

Le passage de la matière à des dimensions nanométriques fait apparaître de nouvelles propriétés, différentes de celles des mêmes matériaux à l'échelle micro ou macroscopique, notamment en terme de résistance mécanique, de réactivité chimique, de conductivité électrique et de fluorescence. Par exemple, l'or est inactif à l'échelle micrométrique alors qu'il devient un très bon catalyseur de réactions chimiques à

l'échelle nanométrique. Il en est de même pour le dioxyde de titane TiO_2 qui est inerte à l'échelle macroscopique mais parmi les plus toxiques à l'échelle nanométrique.

Rôle de la composition chimique

La nature chimique des nanomatériaux et la présence d'autres composés adsorbés à leur surface (hydrocarbures aromatiques polycycliques, métaux de transition…) est critique pour le potentiel toxique de ces nanomatériaux. La composition chimique joue un rôle important en terme d'interactions cellulaires et de stress oxydant et il a été montré que la chimie des NP influence l'internalisation et la localisation intracellulaire ainsi que la toxicité induite [301] [302]. Certaines nanoparticules ont ainsi la capacité de produire à leur surface des espèces réactives de l'oxygène (ERO) en milieu aqueux acellulaire.

Effet de la taille nanométrique

De nombreuses études ont confirmé le plus grand potentiel toxique des NP comparé aux particules plus grandes (de l'ordre du micromètre) de même nature chimique [301] [303]. Une diminution de la taille des particules favorise leur pénétration dans les cellules, le passage des barrières biologiques donc leur migration vers divers organes ; la taille est donc un facteur déterminant dans la toxicité induite [302].

Effet de la forme

Pour une composition chimique identique, les NP peuvent avoir différentes structures cristallines et les effets toxiques peuvent être différents suivant la forme (sphérique, cuboïde, filamenteuse, fibreuse…) [302]. Notamment, il a été démontré un impact de la forme des NP de CeO_2 sur le potentiel toxique dans des études *in vitro* [304]. Les nanomatériaux dont une dimension est à l'échelle macrométrique ont une forme d'aiguille qui peuvent transpercer les membranes cellulaires, à l'instar des nanotubes de carbone.

Effet de la réactivité de surface

Une diminution de la taille des particules est synonyme d'une augmentation de leur surface spécifique et de leur réactivité chimique et biologique car le rapport

surface/volume augmente. Le pourcentage relatif d'atomes en surface est plus grand pour les NP que pour les particules de plus grande taille. Il a été montré qu'une particule de 10 nm a au moins 10% d'atomes en plus à sa surface comparé à une particule de 1 micromètre [305]. Cette fraction plus importante d'atomes en surface modifie les propriétés électroniques et physico-chimiques des nanomatériaux, notamment la charge de surface. Cette réactivité de surface favorise la pénétration dans l'organisme de substances adsorbées pouvant entrainer des effets toxiques spécifiques.

Il a été montré que les NP avec une charge de surface (potentiel zêta) positive adsorbent plus de protéines à leur surface que celles avec une charge de surface négative [306]. Cette charge de surface peut influencer l'internalisation des NP, en fonction de leur nature chimique et du type cellulaire [307] [308].

Effet de la solubilité

Le devenir des nanomatériaux dans l'organisme humain est conditionné par leur solubilité et la production d'espèces ionisées, notamment pour les nanoparticules métalliques ce qui peut certainement contribuer à leur toxicité.

Effet du *degré d'agrégation et d'agglomération*

Les nanoparticules sont rarement retrouvées sous leur forme primaire particulaire mais plutôt sous forme d'agrégats et d'agglomérats en amas de plus grande dimension (Figure 24). Cela peut modifier le dépôt des nanomatériaux dans l'organisme, leur internalisation et les effets biologiques et toxiques associés [309] [310]. L'agrégation est proportionnellement dépendante de la concentration en NP dans les milieux aqueux [311].

Le degré d'agrégation/agglomération n'augmente pas seulement la taille mais modifie également la solubilité du nanomatériau [312]. Ce facteur détermine aussi la translocation à travers les barrières cellulaires et la bio-cinétique dans l'organisme. Les propriétés physicochimiques de surface des NP telles que la charge et l'hydrophobicité ainsi que leur nature chimique déterminent le degré d'agrégation [313] mais les caractéristiques du milieu (pH, viscosité, etc.) jouent également un rôle dans ce phénomène [314]. Ce paramètre d'agrégation/agglomération propre à chaque type de NP et aux milieux environnants peut être déterminé par la technique spectroscopique de

DLS (Dynamic Light Scattering). Des NP solubilisées dans des milieux liquides ne représentent jamais une taille unique mais plutôt une dispersion (des plus petites à l'échelle individuelle jusqu'à l'échelle micrométrique par agrégation et agglomération).

Certaines NP ont également la capacité de changer leur structure cristalline en milieu aqueux. Cela a été démontré pour les NP de sulfure de zinc (ZnS), où les atomes sont réarrangés en présence d'eau pour être plus ordonnés et ressembler à la structure macroscopique du ZnS [315].

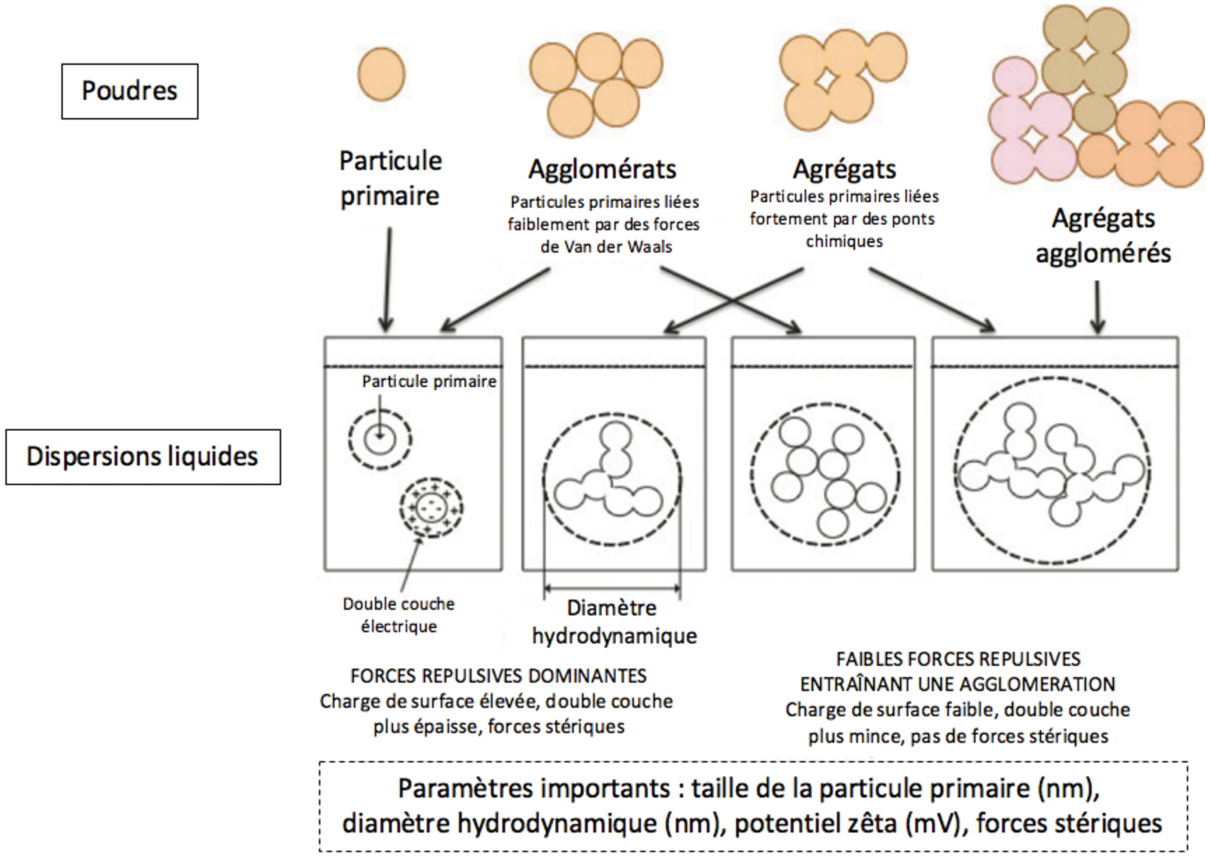


Figure 24. Agglomération et agrégation des nanoparticules à l'état de poudre et en dispersion liquide

Les nanoparticules à l'état de poudre peuvent se trouver sous forme de particule primaire, agglomérées (liées faiblement par des forces de Van der Waals), agrégées (liées fortement par des ponts chimiques) ou sous forme d'agrégats agglomérés. Lorsque ces nanoparticules sont mises en solution, elles peuvent rester sous forme particulaire primaire, se dissocier des agglomérats pour retourner à leur état unitaire ou bien rester sous forme d'agglomérats et d'agrégats. La double couche électrique formée autour des nanoparticules correspond aux ions qui l'entourent en solution : une couche d'ions adhérents dite couche dense et une couche non liée dite diffuse.

Adapté d'après Oberdörster et al., 2010 [316]

Effet du coating de surface

Les modifications de surface jouent un rôle dans la toxicité des NP, qu'elles soient intentionnelles ou non. Les modifications de surface non intentionnelles surviennent lors de l'interaction des NP avec leur environnement (air ou liquide) et sont dues à l'attachement de composés environnementaux, notamment grâce à la réactivité de surface des NP permettant l'adsorption d'autres molécules. Cela peut résulter en des changements des propriétés des NP, entrainant soit une potentialisation ou une neutralisation du potentiel toxique de la NP nude [317]–[319]. Les modifications intentionnelles permettent la fonctionnalisation des NP (ajout de groupements chimiques chargés négativement ou positivement, ou bien ajout de fluorochromes), notamment en vu de leur utilisation dans le domaine biomédical ou bien pour pouvoir les suivre dans les études d'observation par la microscopie.

Des études ont montré que les protéines des fluides biologiques peuvent également s'adsorber sur les NP pour former naturellement une corona [320]. La corona biomoléculaire typique consiste en des protéines, lipides, sucres et petites molécules. Parmi ces protéines on peut trouver l'apolipoprotéine E, le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ou la transferrine [321], ce sont des ligands pour des récepteurs cellulaires et cela peut contribuer aux effets biologiques et toxiques des NPs en facilitant leur internalisation. De plus, ces interactions peuvent également conduire à l'inactivation de protéines essentielles telles que les cytochrome P450 par adsorption sur les NP, pouvant donc interférer avec les processus de détoxification cellulaire [322]. Les NP métalliques telles que les NP de CeO_2 montrent une forte capacité d'absorption des protéines du milieu de culture [323]. La culture de cellules pulmonaires A549 et de kératinocytes avec un milieu de culture qui a été préalablement déplété de protéines par l'incubation acellulaire avec les NP induit une diminution de la viabilité et prolifération cellulaire [323]. C'est un critère à prendre en compte pour l'estimation de la cytotoxicité *in vitro*. La corona change la taille, la charge de surface et la composition de la NP, lui donnant une identité biologique différente de son identité synthétique [324].

Outre les paramètres physico-chimiques, d'autres facteurs déterminent les effets toxicologiques des nanomatériaux sur l'organisme, tels que les voies de pénétration

dans l'organisme, l'importance et la durée de l'exposition, la susceptibilité individuelle et les paramètres bio-cinétiques (déposition, distribution, migration des nanomatériaux dans l'organisme et capacité d'élimination). Chaque nanomatériau possède un profil toxicologique qui lui est propre. Cela nécessite donc de multiplier les études pour les différents types de nanomatériaux existants.

4.1.6. Nanotoxicologie

L'utilisation croissante de nanomatériaux soulève des interrogations quant à leurs impacts sur la santé et l'environnement. La nanotoxicologie se positionne donc en parallèle des nanotechnologies pour étudier leur impact et se définit comme l'étude interdisciplinaire de la toxicité induite par les nanomatériaux [325]. Le nombre de publications annuelles concernant la nanotoxicologie est en plein essor depuis les années 1990, ainsi les données sur la toxicité potentielle des nanoparticules vis-à-vis des systèmes biologiques ne cessent de s'accroitre. Cependant, la majorité des études ne concernent qu'un nombre limité de nanoparticules, notamment celles de carbone, d'argent, d'or et de dioxyde de titane, mais d'autres études s'intéressent également aux NP de dioxyde de silice (SiO_2) ou encore aux NP d'oxyde de zinc (ZnO) [326].

Les effets sur la santé humaine des nanomatériaux manufacturés restent encore peu caractérisés. Par ailleurs, la toxicité des nanomatériaux dépend de nombreux facteurs, tels que les caractéristiques physico-chimiques de chaque type de NP (la chimie des NP, la forme, l'état d'agrégation/agglomération, la charge, la surface, le revêtement de surface…) mais dépend aussi des environnements tissulaires et cellulaires (l'accessibilité, le pH, le niveau d'oxygène…). C'est la raison pour laquelle l'étude de la toxicité des NP est vaste et doit être réalisée pour chaque type de NP.

4.1.6.1. Définition du risque nano

La notion de risque associé à un composé chimique est fonction de la dangerosité de ce composé et du niveau d'exposition. Le risque peut être maitrisé en agissant sur ces deux facteurs. Dans le cas des nanoparticules, de nombreux programmes de recherche à l'échelle nationale, européenne ou internationale ont pour mission de définir la nano-toxicité de ces matériaux. L'OCDE a d'ailleurs défini en 2010 une liste de nanomatériaux requérant une évaluation urgente.

4.1.6.2. Voies d'exposition

L'inhalation constitue la principale voie de pénétration des nano-objets dans l'organisme humain. Une fois inhalés, les nanomatériaux peuvent être exhalés ou se déposer dans les différentes régions de l'arbre respiratoire : voies aériennes supérieures (fosses nasales, bouche, pharynx et larynx), arbre trachéo-bronchique (trachée, bronche et bronchioles) et alvéoles pulmonaires. Plus les nanomatériaux sont petits, plus ils pénètrent en profondeur dans l'appareil respiratoire. Ces nanomatériaux peuvent également se retrouver dans le système gastro-intestinal après avoir été ingérés ou par la clairance mucociliaire du système pulmonaire. La pénétration à travers la peau reste une minorité dans la voie d'entrée des nanomatériaux dans l'organisme.

Compte tenu de leur taille, les nanomatériaux inhalés ou ingérés seraient capables de franchir les barrières biologiques (pulmonaire, intestinale) et se retrouver ainsi dans la circulation sanguine puis rejoindre les différents organes, principalement les plus irrigués tels que le foie et notamment le placenta dans le cadre d'une exposition pendant la grossesse. Contrairement à d'autres polluants, tels que le BaP, les nanoparticules ne sont pas métabolisées au niveau cellulaire en vue de leur élimination. Cela peut donc conduire à leur accumulation dans les tissus et organes. L'élimination des NP au niveau cellulaire se fait principalement par une sécrétion active par une exocytose lysosomale [327], [328].

4.1.6.3. Caractérisation physico-chimique des NP

Il existe de nombreuses techniques permettant la caractérisation des NP en ce qui concerne leur taille, forme, composition chimique et charge de surface. Les techniques les plus courantes sont présentées ci-dessous.

4.1.6.3.1. Taille primaire, degré d'agrégation/agglomération et forme

Microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission (MET) ou balayage (MEB) est la technique de caractérisation la plus simple pour déterminer la taille primaire et apprécier le degré d'agrégation et d'agglomération des nanoparticules. Avec la MET classique en champ clair, les NP ne permettent pas la transmission des électrons et

apparaissent de manière contrastée en teintes de gris/noir par rapport au matériel biologique (tissus ou cellules). Avec la MEB, les nanoparticules apparaissent en relief et sont aisément identifiables. La MET et la MEB à très fort grossissement permettent également de déterminer la forme primaire NP.

La microscopie électronique à transmission en balayage (STEM) consiste en de la MET avec un système qui permet de balayer la surface de l'échantillon à analyser. Avec l'utilisation d'un détecteur de champ sombre annulaire à grand angle (appelé « annular dark-field »), l'image obtenue est également contrastée mais cette fois ci, les NP apparaissent plus claires que le matériel biologique qui lui est foncé. Cette technique est notamment utilisée en combinaison avec la technologie EDX, ce qui permet d'avoir une cartographie de l'élément chimique que l'on veut détecter sur l'ensemble de la coupe analysée (voir chapitre suivant 4.1.6.3.2.).

Diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scaterring)

Cette technique d'analyse spectroscopique permet de déterminer la distribution en taille de particules en suspension dans un liquide. Dans le cas des nanoparticules, leur mouvement en milieu liquide est principalement dû aux chocs continus avec les molécules du liquide, provoquant un mouvement désordonné et aléatoire (mouvement Brownien). La DLS utilise ce mouvement Brownien comme une « signature » de la taille des NP en suspension. Un laser illumine les NP en mouvement qui vont alors diffuser la lumière. Cette lumière diffusée est détectée et le signal est traité informatiquement pour corréler les mouvements aux tailles. Il en ressort alors une courbe de distribution correspondant aux tailles de la population de NP présente en solution. En comparant ces tailles par rapport à la taille unitaire des NP, on peut en déduire également la formation d'agrégats/agglomérats.

4.1.6.3.2. Composition chimique

Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (Energy-dispersive X-ray, EDX)

Cette technologie associée à la microscopie électronique permet la détermination de la composition chimique de l'échantillon analysé. Lorsque le faisceau d'électrons du microscope atteint l'échantillon, cela provoque un saut d'électrons dans les couches électroniques des atomes des éléments chimiques présents sur la coupe analysée. Lorsque ces électrons reviennent à leur couche initiale, il y a émission d'énergie sous

forme de rayons X et cette énergie est unique et spécifique à chacun des éléments du tableau périodique. En MET, il en ressort un spectre où apparaissent des pics d'intensité variable des éléments chimiques du tableau périodique présents dans l'échantillon biologique mais également dans le support de microscopie (cuivre des grilles par exemple). L'EDX peut être associée au STEM, comme décrit dans le paragraphe précédent, et l'on obtient alors une cartographie pixel par pixel de l'élément chimique d'intérêt présent dans l'échantillon analysé.

Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS)

La spectrométrie de masse est une technique permettant la séparation, l'identification et la quantification des éléments présents dans un échantillon. En partant d'échantillons biologiques tels que des tissus ou des cellules, la dissolution de la matière organique et la solubilisation des NP présentes permettent leur identification, après passage dans un plasma pour obtenir les spectres des éléments chimiques présents.

4.1.6.3.3. Charge de surface

Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une particule acquiert par le nuage d'ions qui l'entourent lorsqu'elle est en solution. Il s'agit de la charge de surface. Le potentiel zêta est affecté par le pH, la conductivité et la concentration ionique. Sa mesure doit donc être faite dans chaque milieu de dispersion des NP. Cette mesure est basée sur une électrophorèse laser Doppler. Une solution contenant les NP à analyser est introduite dans une cellule contenant deux électrodes. Un champ électrique est appliqué et les NP, ayant une propre charge électrique de surface, vont migrer vers l'électrode chargée de façon opposée à une certaine vitesse, appelée mobilité, qui est directement liée au potentiel zêta. Le potentiel zêta peut être positif ou négatif et est exprimé en mV.

4.1.6.3.4 Surface spécifique

Méthode BET

La surface spécifique représente la superficie réelle en opposition à la superficie apparente. Il s'agit donc de considérer toute la surface de chaque particule, porosité comprise, et représente la surface totale par unité de masse et est exprimée en m^2/g. La

surface spécifique est un paramètre important pour les phénomènes faisant intervenir les surfaces (adsorption et catalyse notamment). La méthode la plus connue pour déterminer la surface spécifique est celle de Brunauer, Emmett et Teller (BET). Cette méthode est basée sur l'adsorption de gaz à basse température et consiste à déterminer la quantité de gaz nécessaire (tel que l'argon ou le diazote) pour former une monocouche autour de la NP. La surface en contact étant une caractéristique propre pour chaque gaz, il est alors possible de déterminer la surface totale de la NP.

4.2. Les nanoparticules de dioxyde de cérium

4.2.1. L'élément chimique Cérium

Le cérium est un élément chimique de symbole Ce et de numéro atomique 58. C'est un métal gris argent qui appartient au groupe des terres rares et classé dans le tableau périodique des éléments dans la famille des lanthanides.

4.2.2. Synthèse des nanoparticules de dioxyde de cérium

La production mondiale des NP de CeO_2 (aussi appelées nanoceria) est estimée entre 100 et 1000 tonnes par an [329]. La méthode de synthèse des nanoparticules influence les propriétés physico-chimiques et cela résulte en une variation de taille, forme, état d'agrégation/agglomération et in fine de leurs activités biologiques. Pour les NP destinées à une application biologique ou biomédicale, la méthode de synthèse doit être rigoureusement sélectionnée puisqu'il est démontré que ces propriétés influencent grandement les interactions à l'interface nano-bio [330].

La synthèse des nanoparticules peut se faire de manière chimique ou « green » (Figure 25).

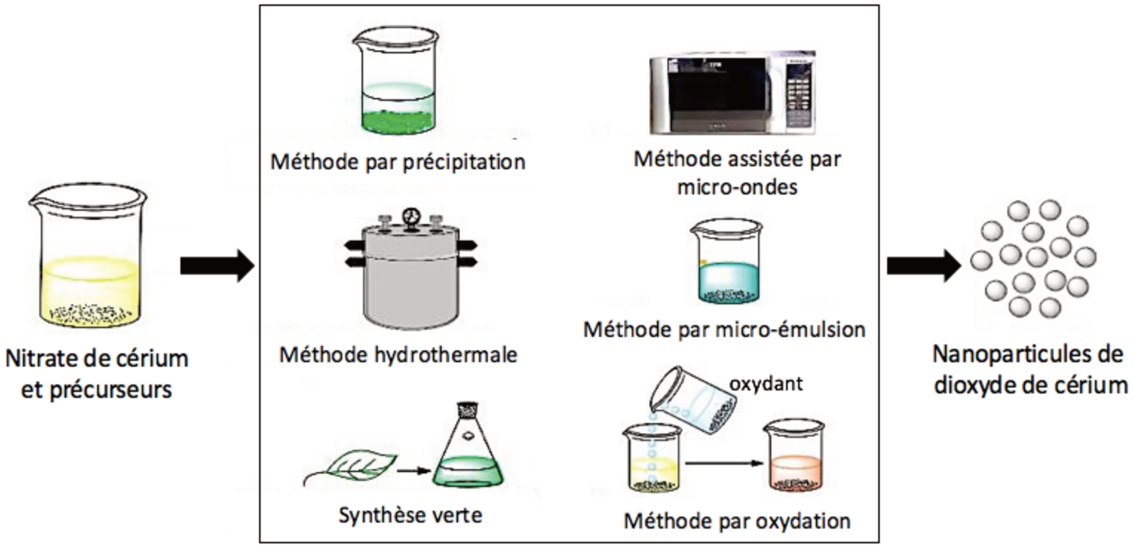


Figure 25. Méthodes de synthèse des nanoparticules de dioxyde de cérium
Adapté d'après Thakur et al., [331]

4.2.2.1. Méthodes chimiques

Plusieurs méthodes de synthèse chimique des NP de CeO_2 ont été décrites [331]. La technique la plus utilisée est par précipitation, notamment à partir de nitrate de cérium et de carbonate de potassium ou de carbonate d'acide d'ammonium. La méthode hydrothermale est la seconde méthode la plus utilisée. L'eau sert de solvant et la réaction chimique en présence de nitrate de cérium et d'acide citrique ou d'hydroxyde de sodium se fait dans un autoclave sous pression. D'autres méthodes utilisent les micro-ondes, l'oxydation simple des ions cérium ou encore la micro-émulsion.

4.2.2.2. Méthodes respectueuses de l'environnement

Récemment, les NP de CeO_2 ont été synthétisées à partir de méthodes utilisant des matrices naturelles et organiques comme agents stabilisants pour obtenir des NP bio-compatibles pour une utilisation en biomédecine. Ces méthodes évitent l'utilisation de produits chimiques toxiques et sont simples, efficaces et plus respectueuses de l'environnement. Elles ne nécessitent pas de haute température ou pression et aucune énergie n'est requise. Les principales approches utilisées sont la synthèse médiée par les plantes ou par les nutriments [331].

La synthèse verte de ces NP médiée par les plantes à été décrite par l'utilisation de nitrate/acétate de cérium et d'extrait de feuille de *Gloriosa superba L.*, en utilisant le filtrat de culture de *Curvularia lunata* et même des extraits de feuilles d'*Aloe vera*. Les

extraits de plantes contiennent des molécules (colchicine, gloriosine…) qui vont réagir avec le nitrate/acétate de cérium en solution et former un précipité qui sera calciné afin d'obtenir les nanoparticules de CeO_2. La synthèse médiée par les nutriments fait intervenir du nitrate/acétate de cérium et de l'extrait frais de blanc d'œuf

4.2.3. Propriétés redox des nanoparticules de CeO_2

L'oxyde de cérium existe sous deux différentes formes : CeO_2 (Ce^{4+}) ou Ce_2O_3 (Ce^{3+}) à l'échelle macroscopique. A l'échelle nanométrique, les deux états Ce^{3+} et Ce^{4+} peuvent coexister à la surface des nanoparticules [332]. Structurellement, l'atome de cérium dans la forme CeO_2 (Ce^{4+}) est entouré de huit anions d'oxygène, chaque atome d'oxygène occupant une place tétraédrique. La coexistence d'ions Ce^{3+} à l'échelle nanométrique génère des défauts d'oxygène intrinsèques en raison de la compensation d'une déficience de charge [333]. Ces défauts d'oxygène sont essentiels pour la capacité des NP à agir en tant que catalyseur pour des réactions d'oxydation ou de réduction selon les conditions environnantes [334]. Les défauts inhérents d'oxygène dans les NP, causés par des lacunes d'oxygène, permettent une auto-régénération continue des NP.

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des sous-produits issus principalement du métabolisme aérobique (phosphorylations oxydatives au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale). Ils agissent en tant que molécules de signalisation dans des processus physiologiques. Cependant, une augmentation des niveaux d'ERO peut mener à un stress oxydant par l'altération de la balance entre les espèces pro- et anti-oxydantes et peuvent causer la mort cellulaire [335]. Dans ce contexte, les antioxydants sont définis comme des substances qui prennent en charge les ERO en vue de leur élimination ou qui inhibent leur production.

Les NP de CeO_2 utilisent leur capacité intrinsèque à piéger les radicaux libres pour agir comme antioxydants. Ces NP ont été montrées comme ayant une activité de type superoxyde dismutase (SOD), qui réduit la production et les dommages causés par les ERO en transformant l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ en oxygène et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Figure 26). Ces NP ont également été montrées comme ayant une activité catalase, prenant en charge le H_2O_2 pour le transformer en H_2O et O_2. Comme la NP de CeO_2 est capable d'interconvertir ses états d'oxydation Ce^{3+} et Ce^{4+}, elle est capable de neutraliser à la fois l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène [336]. Par

conséquent, le dioxyde de cérium est actuellement à l'étude en biomédical pour fournir une défense cellulaire endogène contre les ERO dans plusieurs pathologies (Figure 27) [331].

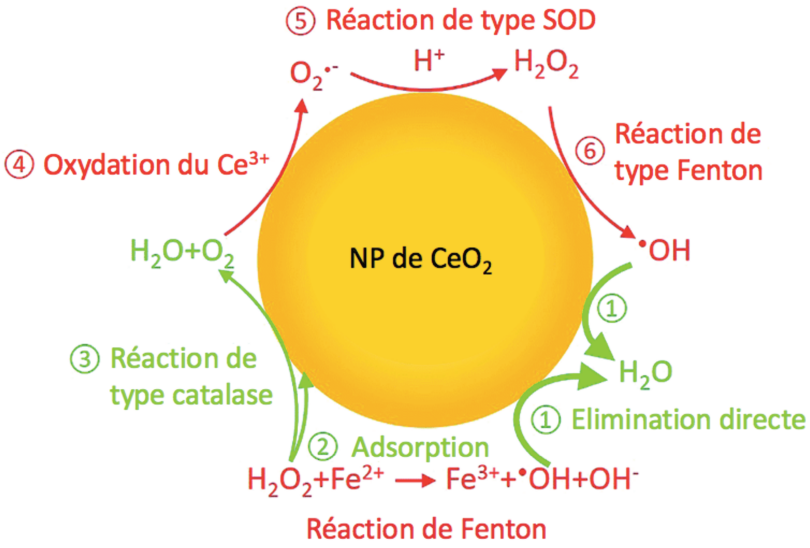


Figure 26. Activité redox des nanoparticules de dioxyde de cérium

Les nanoparticules de CeO_2 possèdent deux états d'oxydation à leur surface, Ce^{3+} et Ce^{4+}, et ont la capacité de passer d'un état d'oxydation à un autre. Cette capacité leur fournit une activité redox intrinsèque. Les NP de CeO_2 peuvent catalyser la réaction directe d'élimination du radical hydroxyde (réaction 1), des réactions de type catalase (réaction 3) et de type superoxyde dismutase (réaction 5). Mais ces NP sont également responsables de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (réactions 4, 6 et de Fenton). En rouge : formation d'espèces réactives de l'oxygène. En vert : élimination d'espèces réactives de l'oxygène.

D'après Filippi A et al., [337]

Plus il y a de Ce^{4+} en surface des nanoparticules, plus l'activité de type catalase est élevée et ceci est concomitant avec une perte de l'activité de type super oxyde dismutase (SOD) [337]. Avec la diminution de la taille des nanoparticules, le nombre de sites Ce^{3+} à la surface augmente et des atomes d'oxygène sont alors perdus, favorisant ainsi l'activité de production d'ERO par les NP.

4.2.4. Applications des nanoparticules de CeO_2

Les nanoparticules de CeO_2 ont été mises sur le marché récemment. Elles sont utilisées dans un panel d'applications industrielles, commerciales et possèdent également un large potentiel d'utilisations biomédicales. L'intérêt porté à ces NP s'est accru notamment pour leur propriétés anti-oxydantes régénératives.

4.2.4.1. Utilisation industrielle

Les NP de CeO_2 sont largement utilisées dans l'industrie pour de nombreuses applications en tant que [338] :

- agent polisseur : pour les éléments optiques et surfaces en verre afin de produire une surface transparente ainsi que les systèmes de puces électroniques ultra-modernes et les cellules solaires
- agent catalyseur : ajouté en tant qu'additif dans le carburant Diesel pour la régénération des filtres à particules, dans les cigarettes et pour l'auto-nettoyage des fours domestiques

Ces NP sont donc utilisées dans de nombreuses applications de la vie courante dont les véhicules à moteur Diesel et en industrie et susceptibles d'être rejetées en grande quantité dans l'air ambiant. L'exposition humaine aux NP de CeO_2 se fait donc principalement par inhalation depuis la pollution environnante.

L'utilisation de ces NP en tant qu'additif dans le Diesel depuis 1999 [339] a été montrée comme diminuant la taille des particules émises dans les gaz d'échappement, mais aussi avec en contrepartie une émission plus élevée de 6% de cérium dans les gaz d'échappement (passant de 0,3% à 6,5%) [340]. En se mélangeant aux suies, le dioxyde de cérium abaisse la température de combustion des particules et facilite leur oxydation, permettant la régénération des filtres à particules. Les NP de CeO_2 diminuent également l'émission de monoxyde de carbone dans les gaz d'échappement [341] mais accroit de 32% l'émission de particules ultrafines et de 35% l'émission de BaP [342]. La concentration en cérium dans l'additif est de 18 mg/L et son utilisation est recommandée à 0,5 mL/L de carburant [342], ce qui fait une concentration de 0,009 mg de cérium par litre de carburant.

A titre d'exemple, dans un environnement intérieur fumeur (résidence personnelle), la concentration moyenne de cérium mesurée dans l'air ambiant est 10 fois supérieure à celle mesurée dans un environnement non-fumeur (20,1 ng/m^3 vs 2 ng/m^3), avec des valeurs allant jusqu'à 70,6 ng/m^3 [343]. Dans les lieux publics fumeurs (bar, restaurants…), la valeur maximale mesurée atteignait même 290 ng/m^3 [343].

4.2.4.2. Applications biologiques et biomédicales

L'industrie pharmaceutique a exploité les propriétés uniques des NP, donnant naissance au concept de nanomédecine. Récemment, l'importance de NP de CeO_2 en vue d'applications biomédicales s'est accrue (Figure 27) [331]. En effet, elles présentent une protection contre les radiations, les dommages cellulaires provoqués par des substances toxiques et dans des pathologies telles que l'ischémie cérébrale ou cardiaque, les troubles neurodégénératifs. Les NP nudes ont une faible solubilité dans l'eau, ce qui entraine des complications dans les applications biologiques. De nombreuses études ont mis au point le coating des NP, améliorant ainsi leur stabilité, solubilité et biocompatibilité. Les NP de CeO_2 possèdent plusieurs activités biologiques : ayant une activité superoxyde dismutase (SOD), catalase, peroxydase, oxydase, phosphatase, et prenant en charge les radicaux hydroxyles, radicaux d'oxyde nitrique et le peroxynitrite [338]. Les différentes applications biologiques et biomédicales des NP de CeO_2 exploitent les propriétés pro- et anti-oxydantes de ces NP (détaillées dans le paragraphe 4.2.3).

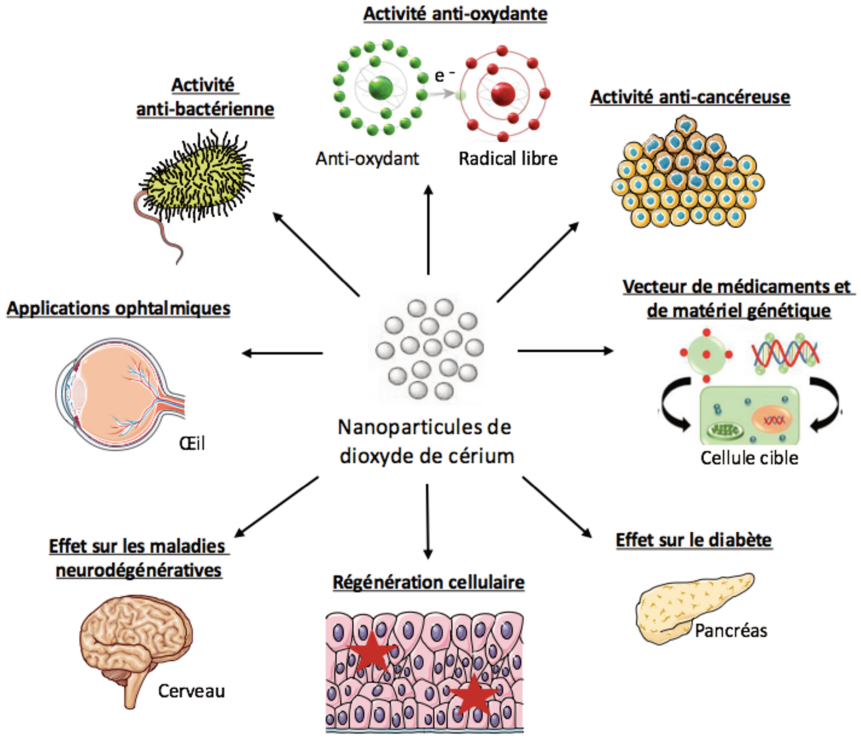


Figure 27. Applications biologiques et biomédicales des nanoparticules de dioxyde de cérium

Les NP de CeO_2 sont envisagées pour une utilisation dans des champs biologiques avec leur activité antibactérienne et anti-oxydante. De plus, ces NP sont également à l'étude dans le domaine biomédical en traitement pour plusieurs pathologies tels que le cancer, le diabète, la régénération cellulaire, les maladies neurodégénératives et ophtalmiques ainsi que comme vecteur de médicament et de matériel génétique.

La capacité des NP de CeO_2 à générer des ERO est envisagée en utilisation antibactérienne [331]. En effet, Les ERO produits par les NP endommagent la membrane bactérienne ainsi que l'ADN, l'ARN et les protéines causant ainsi la mort de la cellule. Cette activité pro-oxydante est également intéressante dans le cas du cancer [331]. Les NP de CeO_2 sont fonctionnalisées avec des ligands variés pour un adressage aux cellules cancéreuses par endocytose médiée par des récepteurs, par exemple avec de l'acide folique reconnu par les récepteurs folates [344]. Les cellules cancéreuses ont un environnement acide plus élevé que les cellules saines en raison d'un taux accru de glycolyse anaérobique et de production d'acide lactique. Ce pH acide favorise l'activité de type SOD des NP de CeO_2 mais inhibe son activité de type catalase qui se traduit par l'accumulation de H_2O_2 (ERO) dans la cellule cancéreuse et conduit à la mort cellulaire par apoptose [331]. Les NP de CeO_2 peuvent aussi être employées en tant que vecteurs anti-tumoraux par un chargement des nanoparticules avec des molécules pharmaceutiques, pour favoriser ainsi l'entrée des médicaments dans les cellules [331]. Plus récemment, les NP fonctionnalisées avec du polyéthylène glycol (PEGylation) et chargées avec un photosensibilisateur (chlorine et acide folique) ont été montrées comme efficaces pour une thérapie photodynamique ciblée en traitement de cellules cancéreuses humaines résistantes aux médicaments [345].

La capacité des NP de CeO_2 à éliminer les ERO est envisagée en utilisation en tant qu'agent antioxydant pour la protection des différents tissus et organes contre les dommages cellulaires causés par divers radicaux libres et ERO ainsi que pour la régénération tissulaire [331]. De plus, en raison de son potentiel antioxydant, les NP de CeO_2 sont de plus en plus étudiées comme thérapie potentielle contre l'hyperglycémie et les complications associées au diabète [331]. Le stress oxydant a été reconnu comme un facteur important contribuant à la pathogenèse du diabète et ses complications associées (dysfonction cardiaque et rénale, cécité ou encore lésions nerveuses). Dans le contexte de la grossesse, le diabète peut avoir une incidence sur la survenue d'anomalies congénitales, de naissances prématurées, de macrosomie fœtale, de mort infantile et d'hyperglycémie néonatale [346]. Dans un modèle murin de diabète gestationnel, les NP de CeO_2 ont montré un effet protecteur pour l'embryon par rapport au stress oxydant [347]. Les NP de CeO_2 sont également envisagées comme traitement pour les pathologies neurodégénératives de type maladie d'Alzheimer et maladie de Parkinson

[331] dont le développement est favorisé par un environnement riche en ERO. L'activité anti-oxydante des NP de CeO_2 pourrait participer au traitement des ces pathologies [348]. Actuellement, les traitements sont limités, à cause notamment de la barrière hémato-encéphalique qui est très sélective. Les nanotechnologies présentent donc un grand intérêt dû à leur petite taille qui pourrait leur permettre de passer cette barrière. Enfin, les propriétés antioxydantes des NP de CeO_2 sont envisagées pour le traitement de pathologies oculaires, notamment pour les dommages de la rétine et la dégénérescence maculaire liée à l'âge [331]. Des études menées chez les rongeurs ont montré l'effet thérapeutique bénéfique et effet protecteur de ces NP sur les pathologies de la rétine [349]. Il a également été mis en évidence l'utilité des NP de CeO_2 grâce à leur capacité de modulation de l'état rédox dans des pathologies telles que la dégénérescence maculaire [350].

4.2.5. Revue de littérature des études sur les effets des NP de CeO_2

Dû à leur utilisation relativement récente, l'impact des nanoparticules de CeO_2 sur la santé et les écosystèmes n'est pas bien connu. Il n'existe que très peu d'études épidémiologiques et les études de toxicité sur ce type de NP sont actuellement limitées aux modèles animaux et cellulaires. En 2010, l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) a placé les NP de CeO_2 sur la liste des nanomatériaux requérant une évaluation urgente de leur impact sur la santé.

4.2.5.1. Bio-distribution et effets à l'échelle de l'organe des NP de CeO_2

Des études de bio-distribution des NP de CeO_2 ont été menées chez les rongeurs. Après une exposition pulmonaire chez la souris, il a été démontré la translocation des NP du poumon au foie par la circulation sanguine et une dégradation de ces NP déterminée par la diminution de la taille des NP retrouvées au niveau hépatique [351]. La distribution systémique des NP, après inhalation, dans le foie, rein et pancréas a également été montrée chez le rat (avec des concentrations variant de 0,22 à 6,65 ng/g de tissu en fonction du temps d'exposition et du tissu après exposition à 770 $\mu g/m^3$), avec une élimination par les fèces [352]. Toujours chez le rat, il a été montré que la clairance des NP de CeO_2 inhalées et distribuées dans l'organisme (poumons, rate, foie, rein) est insignifiante 48 h à 72 h après exposition, témoin d'une biopersistance des NP

dans les organes [353], [354]. Enfin, il a été observé un faible passage de la barrière gastro-intestinale après administration orale chez le rat alors que les NP sont retrouvées dans les tissus avec une fraction majoritaire dans le foie et le pancréas après administration intra-veineuse [355].

L'utilisation d'un modèle *in vitro* de peau humaine a montré une faible absorption par la peau des NP de CeO_2 [356]. Une autre étude concernant la présence urinaire de cérium chez des travailleurs produisant des particules ultrafines et des NP contenant du cérium a déterminé une concentration de 15,32 μg de cérium/g de créatinine chez ces travailleurs et de 4,04 μg de cérium/g de créatinine chez les sujets contrôles [357].

L'inhalation chez le rat conduit a une accumulation pulmonaire du cérium, associée à une inflammation des poumons ainsi qu'un changement de ratio Ce^{3+}/Ce^{4+} dans le tissu pulmonaire [358]–[361]. Cette inflammation peut être associée avec l'activation des voies de signalisation MAPK et une apoptose cellulaire [362]. L'exposition intratrachéale chez le rat est également associée à une fibrose pulmonaire [363]. L'exposition orale chez les rats induit des dommages à l'ADN dans les cellules du foie et une distribution tissulaire dose dépendante [364]. De plus, l'exposition pulmonaire chez la souris cause un stress oxydant, une inflammation et des dommages à l'ADN dans de multiples organes [365]. La co-exposition de rongeurs à des gaz d'échappement Diesel et des NP de CeO_2 a des effets additifs sur les dommages et l'inflammation pulmonaires induits par les particules Diesel [366], [367].

4.2.5.2. Mécanismes d'internalisation cellulaire des NP de CeO_2

Les mécanismes décrits pour l'internalisation des NP sont généralement la phagocytose, l'endocytose par vésicules à clathrine, l'endocytose médiée par les cavéoles ou encore la macropinocytose [368]. Les paramètres physico-chimiques influencent cette internalisation et il a d'ailleurs été montré que les NP chargées positivement ou neutres étaient internalisées dans un plus grand nombre de types cellulaires que les NP chargées négativement [307]. Quelques études dans différents modèles cellulaires ont été réalisées pour déterminer le mécanisme d'internalisation des NP de CeO_2. L'endocytose énergie-dépendante, à clathrine et cavéoles, dès un temps court (3 heures) a été décrite pour l'internalisation de NP de CeO_2 conjuguées à de la carboxyfluorescéine (F-nanoceria) dans un modèle de kératinocyte [369]. Ces NP ont été observées dans les lysosomes, le réticulum endoplasmique et les mitochondries en plus du cytoplasme et

du noyau [369]. Cependant, la conjugaison de ces NP avec un fluorochrome peut influencer ces mécanismes. Une étude dans un autre modèle cellulaire, des cellules pulmonaires, a montré une endocytose par des vésicules de clathrine, par l'interaction entre la tranferrine de la corona des NP et le récepteur de la transferrine [370]. Dans des cellules humaines cancéreuses ovariennes et de colon, l'endocytose se fait également de manière énergie-dépendante médié par des vésicules à clathrine et cavéoles et les NP de CeO_2 sont retrouvées dans le cytoplasme et les lysosomes [371]. Une étude a montré l'exocytose des NP de CeO_2 dans des cellules endothéliales [372].

4.2.5.3. Effets cellulaires et cytotoxiques

Les NP de CeO_2 peuvent exercer leurs effets cellulaire en agissant sur le cycle cellulaire, par des effets génotoxiques ou par régulation de l'état redox cellulaire.

En ce qui concerne le cycle cellulaire, les NP de CeO_2 ont été montrées comme inhibant le vieillissement cellulaire et comme ayant la capacité d'augmenter la durée de vie de cellules de cerveau en culture [373]. Les NP de CeO_2 à faible concentration (1 mM et 1 nM) stimulent la prolifération cellulaire de fibroblastes embryonnaires murins via la réduction du niveau d'ERO intracellulaire et la modulation des enzymes antioxydantes [374]. Ces NP de CeO_2 sont capables de réduire les variations cytosoliques de calcium et les dommages mitochondriaux induits par les NP de TiO_2, freinant ainsi la progression apoptotique dans les cellules pulmonaires [375]. L'étude des effets des NP de CeO_2 sur les composés du sang *in vitro* montrent qu'elles interagissent avec l'hémoglobine et possèdent un effet anti-prolifératif des lymphocytes par l'induction de l'apoptose [376]. Au contraire, aucun effet toxique des NP de CeO_2 n'a été montré sur les cellules intestinales Caco-2 différenciées ou non [377]. Enfin, les NP de CeO_2 favorisent l'angiogenèse en modulant l'environnement intracellulaire en oxygène et en stabilisant HIF-1α [378] alors que ces NP présentent un potentiel anti-angiogénique dans le cancer ovarien [379]. Les NP de CeO_2 peuvent également interférer avec les voies de différenciation des cellules souches, comme cela a été montré pour les cellules souches neuronales avec une altération de leur différenciation [380].

Les NP de CeO_2 montrent également des effets génotoxiques. Une exposition in vitro de spermatozoïdes humains provoque des dommages à l'ADN [381] et dans un

modèle de fibroblaste, l'effet génotoxique par un mécanisme clastogène (cassure de l'ADN) est dû au stress oxydant [382]. Enfin, la génération d'ERO et la formation de cassures double brin est responsable de la diminution de la viabilité des cellules de mélanomes après exposition aux NP de CeO_2 [383].

La combinaison de ces différentes actions possibles a été montrée dans un modèle pulmonaire (cellules A549) où la cytotoxicité est due à des dommages à l'ADN conséquents à la production d'ERO, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose [384].

Une étude a été réalisée afin de déterminer l'hémocompatibilité des NP de CeO_2 en perspective d'une utilisation biomédicale [385]. Il a été montré que ces NP n'ont pas d'effet sur les processus de coagulation, d'hémolyse ou d'agrégation plaquettaire. De plus, ces NP sont internalisées dans les cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC) mais n'affectent pas la viabilité (concentrations variant de 10 à 50 μg/mL) et ont des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes.

4.2.5.4. Effets sur le stress oxydant

Les NP de CeO_2 ont été montrées comme étant à la fois anti-oxydantes et pro-oxydantes suivant le modèle. Cette double capacité est due à ses caractéristiques de surface et la présence à la fois de Ce^{3+} et Ce^{4+} à des ratios qui peuvent varier suivant l'environnement comme décrit dans le paragraphe 4.2.3.

Pour ce qui est des effets antioxydants, il a été montré un effet protecteur des NP de CeO_2 vis-à-vis des effets cytotoxiques de l'acrylamide et des dommages oxydants induits dans les cellules HepG2 [386]. De plus, ces NP protègeraient des dommages cellulaires induits par la fumée de cigarette par un mécanisme d'inhibition de la production d'ERO et par l'activation de NF-κB [387]. Il a été mis en évidence que les NP de CeO_2 auraient des effets antioxydants par une diminution des ERO intracellulaires au niveau pulmonaire [388], dans un modèle de lignée de monocytes [389] et dans des modèles humains de cellules cancéreuses du colon et de l'ovaire [371]. Les NP de CeO_2 protègent également d'un stress cellulaire induit en permettant une diminution des ERO intracellulaires dans des cellules endothéliales [390], des kératinocytes humains [391] et dans un modèle pulmonaire [392].

Cependant d'autres études mettent en évidence l'induction d'un stress oxydant et de l'apoptose par les NP de CeO_2 dans des cellules épithéliales pulmonaires [384]. Dans des cellules pulmonaires BEAS-2B, les NP de CeO_2 exerceraient leur toxicité par induction d'un stress oxydant via la production d'ERO et l'induction de HO-1 par l'activation de la voie de signalisation p38-NRF2 [393].

4.2.5.5. NP de CeO_2, grossesse et placenta

Des études de bio-distribution chez l'animal ont montré que les NP de CeO_2 peuvent franchir la barrière pulmonaire et se retrouvent dans la circulation systémique après inhalation, comme décrit dans le paragraphe 4.2.5.1. De ce fait, ces NP peuvent être en contact avec tous les organes y compris le placenta.

Il existe peu de données en ce qui concerne les concentrations de cérium chez la femme enceinte et notamment une absence de données pour le placenta. Une étude s'appuyant sur des mesures faites dans le sang et le lait maternels de femmes enceintes issues de cohortes en Allemagne et en Espagne a montré une concentration sanguine de 0,022 à 0,07 ng/mL et une concentration dans le lait variant de 0,005 à 0,065 ng/mL [394]. De plus, cette étude a corrélé la concentration de cérium mesurée avec le niveau de pollution environnementale en fonction de la localité, de la saison et du niveau de trafic automobile. Une autre étude publiée en 2020 avec une cohorte de femmes enceintes en Chine a montré des concentrations sanguines variant de 0,04 à 5,180 ng/mL de cérium avec à nouveau un effet de la localisation géographique sur la concentration mesurée [395]. Par comparaison, dans la population générale dans le Nord de l'Allemagne, il a été mesuré une concentration sanguine de cérium variant de <0,008 à 0,03 μg/L (soit jusqu'à 0,03 ng/mL) [396].

Deux études épidémiologiques récentes avec des cohortes de femmes enceintes ont rapporté la corrélation de la présence de l'élément cérium dans le sang et les urines maternels avec des effets adverses chez le fœtus. La première étude publiée en 2019 menée sur plus de 7300 femmes en Chine montre une corrélation avec la présence de cérium à une concentration moyenne urinaire de 60 ng de cérium/g de créatinine et un niveau amoindri de TSH chez le nouveau-né [397]. La deuxième étude publiée en 2020 et menée sur 600 femmes pendant leur grossesse en Chine montre une association avec la présence augmentée de cérium à une concentration sanguine moyenne de 0,274

ng/mL vs 0,161 ng/mL chez les sujets contrôles et un risque accru de 4,73 fois de défaut de formation du tube neural chez le fœtus [395].

Il existe peu de données *in vitro* sur l'effet des NP de CeO_2 pendant la période de la grossesse, utilisant des modèles animaux ou cellulaires, et aucunes données concernant l'utilisation de modèles humains (ex : perfusion placentaire, culture d'explants de villosités choriales, lignées trophoblastiques, cultures primaires de trophoblastes…). Toutefois il a été montré chez la souris qu'une exposition aux NP de CeO_2 au début de la gestation conduit à l'accumulation des NP dans le placenta à une concentration de 0,01 µg/g après une injection de 5 mg/kg et altère le déroulement de la grossesse par l'induction d'anomalies placentaires [398]. En effet, les NP altèrent la décidualisation, perturbent la sécrétion par les cellules déciduales des régulateurs de l'invasion trophoblastique et le recrutement et la différenciation des cellules uNK, créant ainsi des dysfonctions placentaires conduisant à une perte fœtale et des poids de naissance inférieurs aux contrôles [398]. Il a également été montré chez la souris gestante une accumulation placentaire des NP de CeO_2 à une concentration de 0,004 µg/g après instillation intratrachéale de 100 µg de NP, avec une diminution de l'efficacité placentaire et un ralentissement du développement de l'épithélium bronchique fœtal [399]. Une étude sur le transfert de l'élément cérium radiomarqué de la mère vers le fœtus a été réalisée chez le rat et il a été déterminé que le passage dans le fœtus se fait à 0,05% de la dose injectée [400]. Enfin, une étude a démontré que les NP de CeO_2 affectent la fécondation *in vitro* chez la souris à faible concentration (0,01 ng/L) par 3 mécanismes potentiels : génotoxicité dans les gamètes, effet mécanique qui empêche l'interaction entre les gamètes et induction de stress oxydant [401].

Parmi toutes les études sur les effets des NP de CeO_2 citées ci-dessus, seules deux ont utilisé les mêmes nanoparticules que nous avons utilisé dans notre étude, issues du Centre commun de recherche de l'Union Européenne (référence NM-212). Il s'agit des études sur les effets d'une inhalation de ces NP chez le rat [360] et celle concernant les effets des NP de CeO_2 sur les cellules intestinales humaines Caco-2 [370].

Données de la littérature concernant d'autres types de NP métalliques sur le placenta humain

Même s'il n'existe actuellement que peu de données concernant les effets des NP de CeO_2 pendant la grossesse, l'évaluation des risques d'exposition aux NP pendant cette

période chez l'humain a été caractérisée pour d'autres types de NP, notamment pour des oxydes de métaux (NP de TiO_2, d'argent et d'or) sur différents modèles d'études (perfusion placentaire et lignées cellulaires).

Grâce au modèle de perfusion placentaire nous avons des données du passage et de la rétention des NP dans le placenta humain. Il a été montré que les NP de TiO_2 et d'argent perfusées à 10 et 40 μg/mL pendant 6 h s'accumulent dans le tissu placentaire jusqu'à une concentration de 161 μg/g pour les NP de TiO_2 mais seulement les NP d'argent ont passé la barrière placentaire avec un taux de transfert allant jusqu'à 0,5% [402], [403]. La perfusion pendant 6 h de NP d'or modifiées à leur surface (PEGylation) à une concentration de 25 μg/mL a montré que ces NP modifiées s'accumulent dans le placenta (de 2 à 14 μg/g de tissu), sont capables de traverser le placenta (taux de transfert de 0,01%) et de se retrouver dans la circulation fœtale [117]. Au contraire, une autre étude également par perfusion placentaire pendant 6 h a montré que des NP d'or possédant la même modification de surface ne sont pas capable de rejoindre la circulation fœtale [404]. Ensemble, ces différentes études mettent en lumière les différences majeures en terme de rétention et de passage transplacentaire des NP selon leur nature chimique et leur revêtement.

Des études ont également été réalisées sur des modèles cellulaires avec des lignées trophoblastiques ou endothéliales. Les NP de TiO_2 sont internalisées dans les trophoblastes humains HTR-8/SVneo et induisent un stress du réticulum endoplasmique ainsi que l'autophagie [405]. L'étude du passage des NP à travers une couche cellulaire peut être faite grâce à la technique des Transwell. Une étude de translocation des NP d'or en cultures en monocouches ou co-cultures de cellules endothéliales de veines placentaires (HPEC) et de trophoblastes BeWo sur des Transwell à une concentration de 19 μg/mL a démontré que ces NP sont capable de franchir la barrière placentaire, avec un passage amoindri dans le cas des co-cultures (taux de passage de 0,6 %) [117]. Par un modèle de culture en 3D (culture en gouttes) constitué d'un centre de fibroblastes placentaires entourés d'une couche de trophoblaste BeWo, il a été montré que les NP d'oxyde de cuivre CuO diminuent la viabilité cellulaire et la sécrétion d'hCG contrairement aux NP de dioxyde de titane (TiO_2) [118]. Un autre modèle innovant de culture 2,5D de placenta humain sur puce (microfluidique) a été développé en 2018 en vue d'évaluation des NP, avec une co-culture de trophoblastes BeWo et de cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC)

séparées par de la matrice extracellulaire afin de recréer une barrière placentaire et permettant l'exposition des cellules avec un flux de chaque côté cellulaire recréant ainsi les circulations maternelle et fœtale [119]. Dans ce modèle placentaire de culture sur uce, les NP de TiO_2 induisent une augmentation de la production des ERO de manière concentration-dépendante conduisant à une diminution de la viabilité. De plus, les NPs de TiO_2 réduisent l'expression des protéines des jonctions serrées impliquées dans l'étanchéité de la barrière placentaire, perturbant ainsi l'intégrité de cette barrière [119]. Ces modèles de culture 3D permettent de se rapprocher de la structure tissulaire *in vivo* et permettent l'évaluation de la toxicité des nanoparticules de manière plus réaliste.

Enfin, il est également très intéressant de noter qu'une étude récente publiée en 2019 a démontré la présence de particules de noir de carbone dans les placentas de femmes après l'accouchement avec un nombre de particules retrouvé qui est proportionnel à la pollution environnementale [406]. Cette étude met donc en évidence la translocation de particules issus de la pollution de l'air jusque dans le placenta chez l'humain *in vivo*. Les NP de CeO_2 peuvent avoir un impact si elles sont internalisées dans le placenta *in vivo*, dû à leur haute réactivité comparé aux particules de noir de carbone inertes.

Données de la littérature concernant la co-exposition des NP et HAP

Il n'existe actuellement aucunes données sur la co-exposition aux NP de CeO_2 et au BaP, deux contaminants issus des mêmes sources de pollution. Cependant, quelques études de co-exposition avec des nanoparticules et des HAP ont été réalisées. La co-exposition de cellules endothéliales vasculaires de cordon ombilical humain (HUVECs) au BaP et NP de SiO_2 démontre une toxicité augmentée par rapport à leur exposition individuelle, avec une induction de dommages à l'ADN, un stress oxydant et une apoptose de manière synergique [407]. Une autre étude montre que la co-exposition aux NP de silice et au BaP exerce des effets synergiques et additifs sur la cytotoxicité et la génotoxicité dans un modèle de cellules pulmonaires BEAS-2B [408]. Au contraire, la co-exposition de nanoparticules d'argent et un mélange d'HAP sur une lignée d'hépatocytes (cellules HepG2) ne montre pas de modification de la toxicité par rapport aux expositions individuelles [409].

MATERIEL ET METHODES

1. Obtention du matériel tissulaire et cellulaire

1.1. Recueil placentaire

Les placentas, issus d'interruptions volontaires de grossesse entre 8 et 14 semaines d'aménorrhée ou de césariennes programmées de grossesses normales à terme, ont été récupérés dans les maternités partenaires du laboratoire : Port-Royal, l'Institut Mutualiste Montsouris, l'Hôpital Privé d'Antony, l'Hôpital Beaujon et l'Hôpital Antoine-Béclère, après information de la patiente et signature par ses soins d'un formulaire de non opposition approuvé par le comité d'éthique (CPP 2015-mai-13909). Les études ont été faites en accord avec les principes de la Déclaration de Helsinki. Les placentas sélectionnés sont issus de femmes déclarées non fumeuses. Le délai entre la délivrance du placenta et le début de la dissection n'excédait pas 45 minutes.

1.2. Isolement de villosités choriales et culture d'explants

Après avoir enlevé la membrane maternelle, les cotylédons de la face basale de ces placentas sont rincés et disséqués dans du Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, D6429) à température ambiante. Les villosités choriales obtenues sont rincées dans du Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) dépourvu de Ca^{2+} et Mg^{2+} (Gibco, 14175) à température ambiante. Une partie des villosités est stockée à -80°C après congélation dans de l'azote liquide et une autre partie est suspendue sur des aiguilles et immergées dans du milieu de culture complet selon la méthode décrite par SA Degrelle pour la culture d'explants [410].

1.3. Isolement et purification des cytotrophoblastes villeux (CTV)

Pour la culture primaire, les villosités sont centrifugées 10 minutes à 320 g pour procéder à l'isolement des CTV. Le culot de villosités choriales récupéré est pesé (15 à 20 grammes environ) et incubé avec du tampon de digestion : 500 ml d'HBSS avec 1 gramme de trypsine (Sigma-Aldrich, 27250-018), 500 µl de $CaCl_2$ 0,1M, 500 µl de $MgSO_4$ 0,1M, 250 µl de DNase type IV 50 Kunitz/ml et 20 ml de lait, pendant 30 minutes à 37°C à raison de 5 ml de cette solution par gramme de tissu. La trypsine permet la digestion du syncytium afin de libérer les cytotrophoblastes des villosités choriales. Le lait, par la présence de caséine, permet de limiter les effets de la chymotrypsine, une protéase souvent retrouvée dans la trypsine. Le $CaCl_2$ (cofacteur de la trypsine) et le $MgSO_4$ (cofacteur de la DNase) sont nécessaires à l'action de ces enzymes. Le surnageant est éliminé et les villosités choriales sont soumises à 8 digestions séquentielles de 10

minutes avec le tampon de digestion à 37°C. Après chaque digestion, un prélèvement du surnageant est observé au microscope optique pour détecter le relargage des cytotrophoblastes. Dès l'apparition des cellules d'intérêt, les surnageants sont récupérés et filtrés (pores de 40 µm) et l'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio, CVFSVF00-01, 1:10). Après ces digestions, les villosités sont rincées dans de l'HBSS jusqu'à ce que l'on n'observe plus de relargage des cytotrophoblastes et ces surnageants sont récupérés comme précédemment. Les surnageants de digestion et de rinçage sont centrifugés pendant 10 minutes à 320 g. Les culots cellulaires obtenus sont repris dans du milieu de culture sans sérum : DMEM 1 g/L de glucose (ThermoFischer Scientific 11880) additionné de Pénicilline-Streptomycine 1% et Glutamine 1%. La solution cellulaire ainsi obtenue est déposée sur un gradient de Percoll (5-70%) et centrifugée pendant 20 minutes à 1400 g. Le gradient de Percoll permet de séparer les CTV des autres types cellulaires, conjointement extraits des villosités lors des digestions, grâce à leur différence de densité. La phase située entre les gradients 35% et 55% correspondant aux CTV est prélevée et rincée avec du milieu de culture complet (DMEM 1 g/L de glucose (ThermoFischer Scientific 11880) additionné de Pénicilline-Streptomycine 1% (Gibco 15140-122), Glutamine 2mM et SVF décomplémenté 10% (Eurobio CVFSVF00-01). Après centrifugation pendant 10 minutes à 320 g, le culot de cellules est repris dans du milieu de culture complet et les cellules sont dénombrées pour ensemencement avec un compteur automatique Biorad TC20. Les cellules ont été ensemencées à 125 000 cellules par cm^2, rincées après 16 heures de culture avec le milieu sans sérum pour éliminer les cellules n'ayant pas adhéré puis remises en présence de milieu de culture complet.

1.4. Culture de la lignée trophoblastique BeWo

La lignée de choriocarcinome humain BeWo clone b30 a été cultivée dans du milieu de culture F-12K (Kaighn's Modification of Ham's F-12, Gibco) additionné de Pénicilline-Streptomycine 1% (Gibco 15140-122), Glutamine 2 mM et SVF 10%. Les cellules ont été ensemencées à 12 000 cellules par cm^2. Les cellules ont été récupérées à 24h, 48h ou 72h pour l'extraction d'ARN ou de protéines ou fixées dans du paraformaldéhyde 4% en vue d'un immuno-marquage.

1.5. Autres types cellulaires

Les cellules mésenchymateuses (MC) issues de villosités du premier trimestre ont été purifiées comme précédemment décrit [15]. Les cellules endothéliales de veine (V) et d'artère (A) ont été obtenues après dissection de cordon ombilical de premier trimestre. Le mélange hétérogène de cellules (HC), composé de choriotrophoblastes et de cellules mésenchymateuses, a été obtenu par digestion par la collagénase de type I de cordon ombilical de premier trimestre. Les cellules progénitrices endothéliales (EPC) ont été purifiées à partir de placenta à terme et données gracieusement par C. Boisson-Vidal [411].

2. Polluants et drogues utilisées

2.1. Benzo(a)pyrène

Le Benzo(a)pyrène (BaP) (Sigma-Aldrich) a été dissout dans du DMSO à 10 mM et stocké à 4°C pour une utilisation à une concentration finale variant de 0,1 à 8 µM.

2.2. Nanoparticules de dioxyde de cérium

Les NP ont été obtenus du Centre Commun de Recherche de la Commission Européenne (NM-212, IHCP, Ispra, Italie). Les NP ont été dispersées dans le milieu de culture sans sérum à une concentration de 3 mg/ml par sonication à une amplitude de 70 % pendant 2 minutes (450 W et 50/60 Hz, Branson). Des dilutions séquentielles dans le milieu de culture complet ont ensuite été réalisées juste avant utilisation à une concentration finale variant de 0,625 à 640 µg/ml.

Pour les expériences en co-exposition des NP avec le BaP, le ratio a été déterminé en fonction de la surface des nanoparticules et de la taille de la molécule de BaP, de telle sorte que le BaP ne forme qu'une monocouche à la surface des NP en cas d'adsorption. De plus, la détermination des ratios prend en compte des données environnementales collectées à Paris, en ce qui concerne l'adsorption des HAP sur les particules fines dans la pollution atmosphérique. Le ratio choisi est de 80 µg/mL de NP et 1,28 µM de BaP puis des dilutions successives au demi ont été effectuées.

2.3. Inhibiteur d'AhR

L'inhibiteur d'AhR CH223191 (Calbiochem) a été utilisé à 3 µM dans le milieu de culture complet (stock à 3 mM dans du DMSO) et l'incubation s'est faite pendant 1 heure avant l'incubation avec le BaP.

2.4. Témoins positifs d'expérience

TBHP

L'hydroperoxyde de *tert*-butyle (TBHP) est un analogue stable du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il a été utilisé pour induire la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules en tant que contrôle positif de stress oxydant. Il a été utilisé à différentes concentrations et temps d'incubation selon le niveau de stress que l'on voulait provoquer. Après des mises au point, nous avons déterminé qu'une incubation de 1h et 4h avec 100 µM induit les enzymes des mécanismes de défense anti-oxydantes. Une incubation plus prolongée (de 24h à 72h) à une dose de 250 µM induit la mort cellulaire et a servi comme contrôle positif pour le test de viabilité WST1.

Staurosporine

La staurosporine est un inhibiteur non-sélectif des protéines kinases, y compris la protéine kinase C et induit l'apoptose par un mécanisme encore mal défini. Cette molécule a été utilisée en tant que contrôle positif d'induction d'apoptose à une concentration de 0,5 µM pendant 4h.

3. Caractérisation des nanoparticules de dioxyde de cérium

Les NP de CeO_2 ont été caractérisées par DLS (Dynamic Light scattering) pour leur taille et par détermination du potentiel zeta pour leur charge. Ces deux paramètres ont été mesurés dans l'eau, le milieu de culture sans sérum et le milieu de culture complet avec un nano-zetasizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). La mesure de DLS a été faite à une concentration de 0,05 mg/ml à 37°C à une longueur d'onde de 632,8 nm par un laser He-Ne 4 mW à un angle de 173°. Chaque échantillon a été mesuré en triplicats. Le potentiel zêta a été mesuré à 37°C et chaque mesure a été faite en triplicats. Pour ces mesures de potentiel zêta, le milieu de culture avec ou sans SVF a été dilué dans l'eau (1:10).

4. Etude de l'expression protéique

4.1. Extraction protéique

4.1.1. Villosités choriales

Les villosités ont été lysées dans du tampon T-PER (ThermoFischer Scientific 78510) à raison de 50 µL pour 30 µg de tissu en présence d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Calbiochem). Les échantillons ont été soniqués pendant 20 secondes puis centrifugés pendant 10 minutes à 14 000 g afin de se débarrasser des débris cellulaires. Les surnageants constituant les extraits protéiques ont été conservés à -20°C.

4.1.2. Trophoblastes en culture

Les cellules ont été lysées dans du tampon Laemmli (0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, 10% glycérol, 2% SDS, inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Calbiochem)). Les échantillons ont été dénaturés par chauffage 10 minutes à 70°C puis soniqués pendant 20 secondes en pulse. Les extraits protéiques ont été conservés à -20°C.

4.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé avec la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA Protein Assay Kit, Pierce, 23235) conformément aux instructions du fournisseur. Cette méthode est basée sur des réactions d'oxydoréduction des ions Cu^{2+} par les protéines. Le changement d'état ionique du Cuivre est corrélé à un changement de couleur, passant du vert au violet. Une gamme étalon de 0 à 16 µg/ml a été réalisée avec de l'albumine sérique bovine (BSA) fournie par le kit et permet de déterminer la concentration protéique des extraits. L'absorbance, proportionnelle à la concentration en protéines, a été mesurée à 562 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Enspire, Perkin Elmer).

4.3. Electrophorèse monodimensionnelle, transfert sur membrane et immunodétection

Les échantillons protéiques (30 ou 40 µg) additionnés avec du tampon de charge (bleu de bromophénol 4X, Bio-Rad, 1610747) en conditions dénaturantes et réductrices (DTT 10%, SDS 2%) ont été chauffés 1 minute à 95°C et ont été déposés sur gel SDS-PAGE en gradient 4-15% (Bio-Rad, 456-1056). La migration en présence de tampon TGS (Bio-Rad, 161-0772) a été réalisée pendant 15 minutes à 50V puis pendant 1 heure à 100V. Le transfert a été réalisé sur membrane de nitrocellulose 0,2 µm grâce au système

Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) pendant 6 minutes à 7V. Ces membranes ont été saturées avec du lait demi-écrémé 5% dans du TBS Tween 1% contenant de l'azoture de sodium NaN_3 1% (bactériostatique) et incubées durant la nuit avec les anticorps primaires (Tableau 3) dans cette même solution sous agitation à 4°C. La membrane a été rincée puis incubée pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire fluorescent correspondant (Tableau 4). Les membranes ont été scannées avec un système d'imagerie Odyssey (Li-Cor Biosciences). Les révélations sont basées sur des émissions fluorescentes à 700 et 800 nm. La quantification a été réalisée grâce au logiciel Odyssey Licor 3.0.

Anticorps primaire	**Hôte**	**Concentration finale**	**Références**	**Utilisation**
Anti-AhR	Souris	2 µg/ml (WB)	Sigma-Aldrich, WH0000196M2	WB
Anti-β-Actine	Souris	2,6 µg/ml	Sigma-Aldrich, A5441	WB
Anti-IDO1	Lapin	0,8 µg/ml (WB) 1 µg/ml (IF)	Cell Signaling, 86630	WB, IF
Anti-p53	Souris	1:1000	Dakocytomation, M7001	WB
Anti-Prx-SO_3	Lapin	1:1000	Abcam, Ab16830	WB
Anti-Vinculine	Souris	1 µg/ml	Sigma-Aldrich, V9131	WB

Tableau 3. Liste des anticorps primaires utilisés pour les Western blots et l'immunofluorescence

Anticorps secondaire	**Hôte**	**Concentration finale**	**Références**	**Utilisation**
Anti-IgG souris	Chèvre	1:500	Alexa488, Thermofischer, A11001	IF
Anti-IgG lapin	Chèvre	1:500	Alexa546, Thermofischer, A11010	IF
Anti-IgG souris	Chèvre	1:20000	DyLight 700, FluoProbes, DZ407E	WB
Anti-IgG lapin	Chèvre	1:20000	DyLight 800, FluoProbes, FZ7700	WB

Tableau 4. Liste des anticorps secondaires utilisés pour les Western blots et l'immunofluorescence

5. Etude de l'expression génique

5.1. Extraction d'ARN

5.1.1. Villosités choriales

Les ARN totaux ont été extraits à partir de villosités congelées à -80°C dans le TRIzol (Tri Reagent, Sigma-Aldrich, 93289) sur colonnes avec le kit Direct-zol RNA Miniprep (ZymoResearch, R2052) conformément aux instructions du fournisseur. L'élution des ARN fixés sur les colonnes a été fait avec 13 µL de tampon d'élution auxquels a été rajouté 1 µL de RNase out (Invitrogen, 10777019). La concentration en ARN (A_{260}) et la pureté des échantillons (ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} pour déterminer les contaminations protéiques et organiques respectivement) ont été mesurées par absorbance grâce à un spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000). Les ARN ont été conservés à -80°C.

5.1.2. Trophoblastes en culture

Les ARN totaux ont été extraits à partir de culots cellulaires congelés à -80°C de cellules de culture primaire (1,5 millions de cellules) sur colonnes avec le kit Arcturus Picopure (PicoPure RNA Isolation Kit, Applied Biosystems, KIT0214) conformément aux instructions du fournisseur. L'élution des ARN fixés sur les colonnes a été fait avec 13 µL de tampon d'élution auxquels a été rajouté 1 µL de RNase out (Invitrogen, 10777019). La concentration en ARN (A_{260}) et la pureté des échantillons (ratios A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} pour déterminer les contaminations protéiques et organiques respectivement) ont été mesurées par absorbance grâce à un spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000). Les ARN ont été conservés à -80°C.

5.2. Reverse transcription

Pour la transcription inverse, 1 µg d'ARN total a été utilisé. Les ARN ont été préalablement linéarisés afin de faciliter la réaction de rétrotranscription à 65°C pendant 5 minutes en présence d'amorces aléatoires (Random Primers Invitrogen, 48190011, 0,1 µg) et de dNTP 10 mM (Invitrogen, 10297018) pour un volume réactionnel de 13 µl. La rétrotranscription repose sur l'action d'une ADN polymérase ARN-dépendante (Super Script III, Invitrogen) capable de synthétiser de l'ADNc à partir d'un brin matrice d'ARN. Le mix permettant la transcription inverse a été ajouté aux échantillons pour un volume réactionnel final de 20 µl (4 µl de 5X first Strand Buffer, 1 µl de 0,1 M DTT, 1 µl de RNase out, 1 µl de Super Script III). Cette transcription inverse a

été réalisée pendant 50 minutes à 50°C puis son inactivation et la dénaturation des acides nucléiques a été faite pendant 15 minutes à 70°C. Les ADNc ont été conservés à -20°C pour la PCR ou qPCR.

5.3. PCR classique

Les amorces désignées avec le logiciel OligoExplorer ont été validées par PCR classique. La composition du mix réactionnel est la suivante : 5 µl d'ADNc dilués au 1/5, 10 µl de tampon Taq 5X, 1 µl dNTP 10 mM, 1 µl du couple de primers 20 µM, 0,2 µl de GoTaq, qsp 50 µl d'eau stérile RNase DNase free. Les échantillons d'ADNc ont été amplifiés selon le schéma suivant : dénaturation initiale pendant 5 minutes à 94°C, 35 cycles de dénaturation pendant 30 secondes à 94°C puis hybridation pendant 30 secondes à 57°C puis élongation pendant 30 secondes à 72°C, dissociation finale pendant 7 minutes à 72°C. Les amplicons ont été chargés sur gel d'agarose 2% et BET (1:20000) et migrés à 100V. La révélation a été faite sous UV avec l'appareil Minibis.

5.4. PCR quantitative

Le protocole de qPCR est basé sur le système de détection SYBER avec le thermocycleur 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Ce système utilise les propriétés d'un intercalant de l'ADN, le SYBR Green, capable d'émettre une fluorescence lorsque l'ADN est sous forme bicaténaire. La fluorescence émise augmente à chaque cycle d'amplification d'ADN et est proportionnelle à la quantité d'ADN présente. Ainsi, le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil de détection de la fluorescence varie suivant la concentration initiale d'ADNc à amplifier. Les amorces (Tableau 5) ont été utilisées à une concentration de 10 µM. La composition du mix réactionnel pour un volume final de 20 µl est la suivante : 5 µl d'ADNc dilués au 1/5, 10 µl de qPCR MasterMix Plus for SYBR Green 1 UNG, 0,4 µl du couple de primers 10 µM, 8 µl d'eau stérile RNase/DNase free. Un contrôle négatif a été réalisé par amplification en absence d'ADNc et consiste à remplacer le volume d'ADNc par un volume identique d'eau stérile RNase DNase free. La plaque a été centrifugée 3 minutes à 220 g. Les échantillons d'ADNc ont été amplifiés selon le schéma suivant : dénaturation initiale pendant 15 minutes à 95°C, 40 cycles de dénaturation pendant 15 secondes à 95°C puis hybridation/élongation pendant 1 minute à 60°C, dissociation finale pendant 15 secondes à 95°C puis 15 secondes à 60°C suivie de 15 secondes à 95°C afin d'obtenir la courbe de fusion. Les résultats ont été analysés avec le logiciel SDS 2.4 et la

normalisation de l'expression des gènes testés est réalisée avec les gènes de référence (moyenne géométrique de minimum 4 gènes de référence).

Gènes	Séquences
18S	18S rRNA Control Kit (Eurogentec)
IDO1	Forward 5'-CATCTCACAGACCACAAGTCAC-3' Reverse 5'-GCAAGACCTTACGGACATCTC-3'
CYP1A1	Forward 5'-CCACAGCACAACAAGAGAC-3' Reverse 5'-CCATCAGGGGTGAGAAAC-3'
CYP1B1	Forward 5'-AACGTACCGGCCACTATCAC-3' Reverse 5'-CAGTGGTGGCATGAGGAATA-3'

Tableau 5. Séquences des amorces utilisées pour la PCR quantitative

6. Etude de la localisation intracellulaire protéique

6.1. Immunomarquages

6.1.1. Villosités choriales

Les villosités récupérées après dissection ont été fixées pendant 4 heures dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% puis rincées et conservées dans du PBS à 4°C. L'inclusion a été réalisée dans de l'agarose à 5% puis les blocs ont été tranchés au vibratome (Leica VT1200S) à une épaisseur de 80 µm. Toutes les étapes ont été réalisées sous agitation. Les coupes ont été perméabilisées pendant 30 minutes dans une solution de PBS-Triton X100 0,5%. Après rinçages au PBS, les coupes ont été saturées pendant 3 heures avec une solution de PBS-BSA 3%-Triton X100 0,1%. Entre les étapes suivantes, les coupes ont été rincées avec du PBS-Triton X100 0,05%. L'incubation avec les anticorps primaires (Tableau 3), ou l'IgG correspondant pour un contrôle négatif, a été réalisée sur la nuit à 4°C dans une solution de PBS-BSA 1%. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 2 heures avec les anticorps secondaires fluorescents correspondants (Tableau 4) à température ambiante dans une solution de PBS-BSA 1%. Le marquage des noyaux a été réalisé pendant 10 minutes avec un intercalant de l'ADN (DAPI, 1:12500) dans une solution de PBS. Le montage des coupes entre lames et lamelles a été réalisé avec du milieu de montage (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Les lames ont été laissées à température ambiante pendant 2 heures pour polymérisation puis conservées à 4°C.

6.1.2. Cellules trophoblastiques

Les cellules ont été cultivées dans des boites de culture de diamètre 35 mm. Les cellules ont été fixées pendant 20 minutes au PFA 4%, puis la neutralisation du PFA a été réalisée pendant 10 minutes avec du NH_4Cl 50 mM à température ambiante. Les cellules ont été perméabilisées soit au méthanol pendant 8 minutes à -20°C, soit avec du triton X100 0,1% ou 0,5% pendant 10 minutes, puis les boites ont été saturées pendant 2 heures avec une solution PBS + BSA 1% et Tween 0,1% à température ambiante. Les cellules ont ensuite été incubées soit avec l'anticorps primaire (Tableau 3), soit avec une IgG correspondant pour un contrôle négatif, dans une solution de PBS + BSA 1% et Tween 0,1 % à 4°C pendant 24 heures. Après lavages au PBS, les cellules ont été incubées 2 heures à température ambiante avec l'anticorps secondaire fluorescent correspondant (Tableau 4) dans une solution de PBS avec BSA 1%. Le marquage des noyaux a été réalisé pendant 10 minutes avec un intercalant de l'ADN (DAPI, 1:12500) dans une solution de PBS. Le montage des lamelles sur les boites de culture a été réalisé avec du milieu de montage (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Les boites ont été laissées à température ambiante pendant 2 heures pour polymérisation puis conservées à 4°C.

6.2. Microscopie à fluorescence

Les images ont été acquises avec un microscope à fluorescence à champ large couplé à une caméra (Leica) associé ou non à la technologie du confocal. Le contrôle IgG sert à identifier le marquage aspécifique de chaque anticorps et établir le bruit de fond.

7. Etude de l'internalisation des nanoparticules dans les trophoblastes

7.1. Microscopie électronique à transmission (MET)

Les cellules en culture ont été trypsinées et centrifugées 5 minutes à 1400 g. Les cellules ont été remises en suspension et rincées dans du tampon PB (0,05 M PIPES [acide pipérazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique)], 5 mM $CaCl_2$, pH 7,3) pendant 10 minutes puis centrifugées à nouveau pendant 5 minutes à 1400 g. Le culot cellulaire a été repris et fixé dans du tampon PB additionné de glutaraldéhyde 2,5% et de paraformaldéhyde 2% pendant 45 minutes à température ambiante. Après centrifugation pendant 5 minutes à 1400g, les cellules ont été rincées 2 fois pendant 10 minutes dans du tampon PB. Les échantillons ont été post-fixés pendant 45 minutes

dans du tampon PB contenant de l'osmium tetroxide 1% à 4°C puis dans une solution aqueuse d'acétate d'uranyle pendant 2 heures à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été déshydratés avec une série de solutions d'éthanol (30%, 50%, 70%, 95% et 100%, 3 fois pendant 10 minutes dans chaque solution) suivi d'une solution d'oxyde de propylène/éthanol (1 :1 vol/vol, 10 minutes) puis dans une solution pure d'oxyde de propylène (3 fois pendant 10 minutes). Chaque échantillon a été inclus dans une résine Epon epoxy. Des coupes ultrafines (80 nm d'épaisseur pour le MET et 200 nm pour l'EDX) ont été réalisées avec un microtome Leica ultracut S possédant une lame en diamant (Diatome histoknife Jumbo). Ces coupes ont été contrastées avec de l'acétate d'uranyle 2% et du citrate de plomb et transférées sur des grilles de cuivre. Le microscope utilisé était un JEM-100S (Jeol) réglé à 80 kV supplémenté d'une caméra digitale Orius SC200 (Gatan-Roper Scientific). Les acquisitions ont été faites grâce au logiciel Gatan. A partir des images obtenues, la mesure de la taille des agglomérats intracellulaire de NP a été faite avec ImageJ et le module Analyse Particles sur 50 cellules morphologiquement préservées et contenant des NP, choisies de manière aléatoire pour chaque condition. Le pourcentage de cellules contenant des NP a été déterminé par observation de 200 cellules morphologiquement préservées de manière aléatoire. Les cellules montrant des signes morphologiques de mort cellulaire ou pour lesquelles le noyau n'était pas visible ont été systématiquement exclues.

7.2. MET à balayage (STEM) et analyses EDX

Pour l'analyse en spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDX) et la microscopie électronique à transmission à balayage couplée à l'EDX (STEM-EDX), des coupes ultrafines de 200 nm ont été réalisées avec un ultramicrotome EM UC6 (Leica Microsystems) et mises sur des grilles de cuivre enduites avec un film de carbone Formvar (Agar Scientific Ltd). Les analyses EDX ont été faites avec un microscope électronique à transmission JEM-1400 (Jeol) réglé à 120 kV. Le microscope était équipé d'un détecteur SAMx EDS SD afin d'obtenir des informations sur la composition chimique des coupes de cellules. Les données des spectres ont été obtenues avec le logiciel IDEFix avec un réglage de temps d'acquisition de 60 secondes et un grossissement de 10 000. Les sections étaient orientées avec un angle de 10° vers le détecteur. Le signal du Cerium a été détecté à 4,84 KeV (Ce Lα1). Les images en STEM Dark-field ont été collectées avec un détecteur annulaire positionné à 8 cm de la caméra.

La cartographie EDX en mode STEM a été réalisée pendant 30 minutes avec le logiciel Maxview.

8. Etude de la viabilité et les fonctions du trophoblaste

8.1. Viabilité cellulaire par test WST1

La viabilité cellulaire a été évaluée sur la base de l'activité métabolique mitochondriale par l'utilisation du test WST1 (Sigma-Aldrich, 1164480700) conformément aux instructions du fournisseur. Les déshydrogénases mitochrondriales clivent le sel de tétrazolium 2-(4-idophenyl)-3-(4-nitrophenyl)5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium (WST1) en formazan, la formation de ce produit étant suivie par spectrophotométrie. Les trophoblastes ont été cultivés dans des plaques 48 puits pendant 24 à 72h en présence des polluants. A la fin du temps d'exposition, les cellules ont été rincées avec du milieu de culture et le réactif WST1 a été ajouté (1:10 dans du milieu de culture) pour une incubation pendant 3 heures à 37°C. L'absorbance a été mesurée grâce à un lecteur de microplaque (EnSpire 2300 Multilabel reader, PerkinElmer) à 440 nm, avec une correction de longueur d'onde à 600 nm. Pour éviter les interférences des NP adsorbées avec les lectures d'absorbance, la même expérience a été faite en parallèle suivie d'une addition de Triton dans chaque puits 15 minutes avant d'ajouter le réactif WST1 et les absorbances correspondantes ont été soustraites aux résultats.

8.2. Cytotoxicité par dosage de la LDH

La perméabilité des membranes cytoplasmiques a été évaluée par le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) dans les surnageants de culture. Après incubation avec les polluants, les surnageants ont été récupérés et centrifugés 3 min à 350 g pour éliminer les débris, cellules et nanoparticules. Les concentrations de LDH ont été déterminées grâce à un automate Roche/Hitachi cobas c 701/702 avec une portée de détection de 10 à 1 000 UI/L. Les imprécisions intra et inter-lecture (CV%) étaient <2,7%.

8.3. Activation des caspases par le test Apo-ONE®

L'induction de l'apoptose a été évaluée par l'estimation de l'activation des caspases 3 et 7 grâce au test Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 (Promega, G7791) selon les

instructions du fournisseur. Les trophoblastes ont été cultivés dans des plaques 96 puits et incubés avec les polluants pendant 24h. A la fin des périodes d'incubation, les réactifs ont été ajoutés directement dans le milieu de culture dans chaque puits et incubés pendant 1 heure à température ambiante. L'intensité de fluorescence a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation et d'émission à 499 et 521 nm respectivement grâce à un lecteur de microplaques (EnSpire 2300 Multilabel reader, PerkinElmer). L'interférence des nanoparticules avec la fluorescence a été déterminée par la mesure des plaques avant et juste après addition de nanoparticules dans les puits de cellules incubées avec la staurosporine. Nous avons déterminé que les particules n'interférent pas avec l'intensité de fluorescence sauf à la concentration de 320 µg/ml, avec une minoration de 30% des résultats.

8.4. Production d'espèces réactives de l'oxygène par sonde CM-H_2DCFDA

Les niveaux d'ERO ont été déterminés en mesurant l'oxidation de la sonde fluorescente 5',6'-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (CM-H_2DCFDA, Thermofisher Scientific, C6827). Les trophoblastes ont été cultivés dans des plaques 96 puits, ont été rincés avec du PBS puis incubés avec la sonde à 10 µM pendant 45 minutes à 37°C, rincés à nouveau et incubés avec les polluants pendant 4 à 72h. L'intensité de la fluorescence a été mesurée à une longueur d'onde d'excitation et d'émission à 485 et 520 nm respectivement grâce à un lecteur de microplaques (EnSpire 2300 Multilabel reader, PerkinElmer).

8.5. Différenciation trophoblastique par calcul de l'index de fusion

Les cellules ont été cultivées dans des boites de Pétri de diamètre 35 mm pendant 72 h. Les cellules ont été rincées avec du PBS, fixées et perméabilisées avec du méthanol froid pendant 8 minutes à -20°C. Les sites non spécifiques ont été saturés pendant 2 heures à température ambiante avec une solution de PBS additionnée de BSA 1% et Tween 0,1%. La solution d'anticorps primaire anti-desmoplakine (5 µg/ml, Abcam, ab71690) a été préparée dans du PBS contenant de la BSA 1% et du Tween 0,1% et l'incubation s'est faite pendant une nuit à 4°C. Après rinçage avec du PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire fluorescent correspondant, un Alexa Fluor 546 (4 µg/ml, Invitrogen, A11010) dilué dans du PBS contenant de la BSA 1% et du Tween 0,1% pendant 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le marquage

des noyaux a été réalisé pendant 5 minutes avec un intercalant de l'ADN (DAPI, 1:12 500) dans une solution de PBS. Le montage des lamelles sur les boites de culture a été réalisé avec du milieu de montage (Dako Fluorescent Mounting Medium, S3023). Les boites ont été laissées à température ambiante pendant 2 heures pour polymérisation puis conservées à l'obscurité à 4°C. Les images ont été acquises avec un microscope à épifluorescence (BX60, Olympus) équipé d'un objectif x40 à huile (Olympus 1,00), une lampe à mercure et une caméra Hamamatsu grâce au logiciel VisionStage Orca (v1,6). La différenciation des cytotrophoblastes est caractérisée par la formation de syncytiotrophoblastes par agrégation cellulaire et fusion. La formation des syncytia a été évaluée par la distribution cellulaire de la desmoplakine et des noyaux grâce à ce que l'on appelle l'index de fusion. Cet index est calculé selon la méthode déjà publiée précédemment [412], [413], en prenant 9 images non-chevauchantes par réplicat et en suivant la formule suivante : [(N − S)/T], avec N le nombre de noyau par syncytium, S le nombre de syncytium et T le nombre total de noyaux comptés.

8.6. Fonction hormonale par dosage

Les dosages d'hCG, de progestérone (P4), d'œstradiol (E2), d'hPL et de PlGF ont été déterminés à partir de surnageants de culture des trophoblastes après 72h. A la fin des incubations, les surnageants ont été centrifugés 3 minutes à 500 g pour éliminer les débris cellulaires. Les interférences des NP avec les hormones sécrétées, par l'adsorbance des hormones sur les NP qui sont potentiellement retirées de l'échantillon après centrifugation, a été déterminée par l'incubation acellulaire de surnageants après 72h de culture de cellules contrôles avec 3 doses de NP utilisées dans cette étude (2,5, 40 et 320 µg/ml) durant 4 h à 37°C suivie d'une étape de centrifugation pendant 3 minutes à 350 g. Puis tous les dosages ont été faits comme indiqué ci-dessous

hCG et P4

Les concentrations d'hCG et P4 ont été déterminées par la technique d'électrochimiluminescence (ECLIA) sur un automate (Liaison® DiaSorin[TS1]) avec un intervalle de détection de 1,5 à 10 000 UI/L et 0,7 à 190 nmol/L respectivement. Les imprécisions intra et inter séries de mesures (%CV) sont inférieures à 5% et 11% respectivement. Les limites de détection sont de 0,3 UI/L et de 0,4 nmol/L respectivement.

E2

Les concentrations d'E2 ont été déterminées par la technique d'électrochimiluminescence (ECLIA) sur un automate (Liaison® Estradiol II Gen) avec un intervalle de détection de 10 à 1 000 pg/mL. Les imprécisions intra et inter séries de mesures (%CV) sont inférieures à 3,9% et 10,7% respectivement. La limite de détection est de 16,2 pg/mL.

hPL

Les concentrations d'hPL ont été déterminées par l'utilisation d'un kit ELISA (DiaSource, KPAD1283) avec une limite de détection de 0,04 mg/L. Les surnageants de culture ont été dilués avec le diluent fourni (1:10) et dosés en duplicats. Les densités optiques ont été lues à une longueur d'onde de 450 nm grâce à un lecteur de microplaques (EnSpire 2300 Multilabel, PerkinElmer).

PlGF

Les concentrations de PlGF ont été déterminées par l'utilisation d'un kit ELISA (R&D Systems, DPG00) avec une limite de détection de 7,0 pg/ml. Les surnageants de culture ont été dilués avec le diluent RD5K (1:10) fourni et dosés en duplicats. Les densités optiques ont été lues à une longueur d'onde de 450 nm et avec une longueur de correction à 540 nm grâce à un lecteur de microplaques (EnSpire 2300 Multilabel, PerkinElmer).

8.7. Etude du stress cellulaire sur puce

Le niveau protéique des acteurs impliqués dans le stress cellulaire a été évalué grâce au kit Human stress cellular Array (R&D Systems, ARY018) conformément aux instructions du fournisseur. 60 µg d'extraits protéiques issus de 5 cultures trophoblastiques de placentas différents ont été mélangés pour obtenir une quantité finale de lysat protéique de 300 µg. Les membranes ont été saturées pendant 1h avec le tampon fourni puis incubées avec le lysat protéique supplémenté avec le cocktail de détection fourni pendant la nuit à 4°C sous agitation. Les membranes ont été rincées 3 fois pendant 10 minutes avec le tampon de lavage puis incubées pendant 30 minutes avec la streptavidine (1 :2000) pré-couplé à un fluorochrome (LI-COR Biosciences IRDye, 926-32230). Les membranes ont été rincées 3 fois pendant 10 minutes dans le tampon de lavage. Les membranes ont été scannées avec un système d'imagerie Odyssey (Li-Cor Biosciences). Les révélations sont basées sur des émissions fluorescentes à 800 nm. La quantification a été faite grâce au logiciel Odyssey Licor 3.0.

9. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été reproduites au minimum 3 fois et jusqu'à 8 fois de façon indépendante. Les résultats sont présentés avec moyenne et écart type à la moyenne (SEM) et ont été analysés statistiquement avec le logiciel GraphPad Prism 6.0 grâce à différents tests : test Mann-Whitney et/ou test de Student. La significativité entre les conditions expérimentales est acquise dès lors que le p est inférieur ou égal à 0,05.

CONTEXTE DE L'ETUDE ET OBJECTIFS

L'exposition des femmes enceintes, et indirectement du fœtus, aux polluants environnementaux est une préoccupation majeure de santé publique. Les polluants sont présents dans l'environnement et bon nombre de ces contaminants peuvent traverser les barrières épithéliales, pénétrer dans la circulation sanguine et rejoindre des organes secondaires tels que le placenta humain. Ces polluants sont susceptibles d'agir non seulement directement sur le fœtus mais également sur le placenta qui assure de nombreuses fonctions essentielles au bon déroulement de la grossesse et au développement du fœtus. Le placenta est généralement considéré comme une barrière sélective entre la mère et le fœtus contre les substances environnementales nocives qui peuvent circuler dans le sang maternel. Cependant, les fonctions placentaires peuvent être affectées par ces polluants et son dysfonctionnement joue un rôle central dans l'issue de la grossesse. Des études ont associé une exposition maternelle à la pollution ambiante avec des pathologies de la grossesse telles qu'un retard de croissance intra-utérin, une prématurité ou encore une mortalité fœtale [147], [414].

Au laboratoire, nous nous intéressons à deux polluants environnementaux répandus : le benzo(a)pyrène (BaP) et les nanoparticules de dioxyde de cérium (NP de CeO_2) vis-à-vis de leurs effets sur la barrière placentaire humaine. Le BaP, un prototype d'hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP), est une molécule classée CMR (cancérigène, mutagène et reprotoxique) et exerce ses effets cellulaires par l'intermédiaire du récepteur des hydrocarbures aromatiques polycycliques (AhR). Les NP de CeO_2 quant à elles sont assez récentes d'utilisation et ont été classées dans la liste prioritaire des nanomatériaux requérant une évaluation urgente par l'OCDE en 2010.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons abordé :

1. La caractérisation du récepteur des hydrocarbures aromatiques polycycliques (AhR) dans les villosités choriales au cours de l'ontogenèse placentaire et des modèles de trophoblastes humains en conditions physiologiques et en condition d'exposition *in vitro* au benzo(a)pyrène (Article 1)
2. L'évaluation de l'internalisation et des effets cellulaires des NP de CeO_2 sur les trophoblastes primaires humains à terme de grossesse (Article 2)

3. L'évaluation de l'effet de la co-exposition des trophoblastes primaires au BaP et aux NP de CeO_2, avec une attention particulière sur les marqueurs de stress cellulaire (Article 3)

Ces travaux participent à évaluer les conséquences biologiques de l'exposition des femmes enceintes à ces polluants seuls et en mélange sur le développement et les fonctions placentaires ainsi que les mécanismes de leurs actions, tels que l'évaluation du stress oxydant, de la signalisation AhR-dépendante et les principaux enzymes et facteurs qui régulent les fonctions placentaires.

Les investigations ont été menées sur des villosités placentaires issues du premier trimestre et de terme de grossesse, des trophoblastes primaires purifiés à partir de placentas à terme de grossesse et dans une moindre mesure sur des cellules de la lignée BeWo. Les villosités choriales ont été soit exploitées directement dès leur récupération, soit mises en culture selon les expériences. Les cytotrophoblastes (CTV) utilisés lors de ma thèse de doctorat sont issus de placentas humains à terme et mis en culture. Ces CTV gardent la capacité de se différencier en syncytiotrophoblastes : les cellules peuvent s'agréger à 24-48 h de culture puis fusionner afin de former les syncytiotrophoblastes, ces dernières étant les cellules responsables de la production d'hormones (Figure 28).

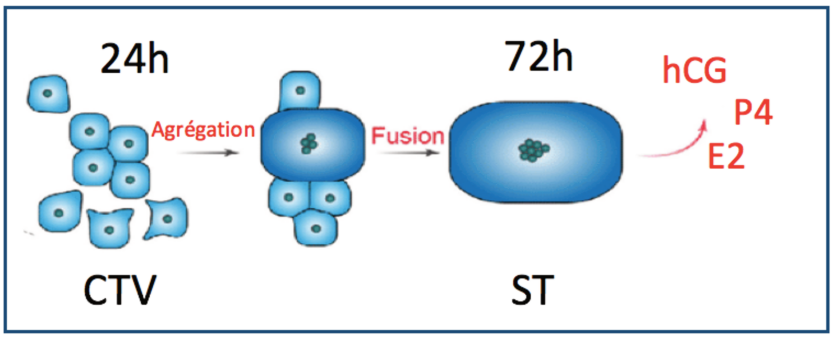


Figure 28. Agrégation et fusion des cytotrophoblastes primaires humains en culture
Les cytotrophoblastes (CTV) purifiés à partir de placenta humain ont la capacité de s'agréger en culture à 24-48 h puis fusionner à 72 h pour former le syncytiotrophoblaste (ST), responsable de la sécrétion des hormones placentaires, dont l'hCG, la progestérone (P4) et l'œstradiol (E2).

RESULTATS

PARTIE 1 :

Article 1. CARTOGRAPHIE D'AhR DANS LE PLACENTA HUMAIN.

Dans cette partie sera présenté l'article « Expression, localization and activity of the aryl hydrocarbon receptor in the human placenta » avec une description détaillée de l'expression, de la localisation et de l'activité du récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR) dans le placenta humain au niveau cellulaire et tissulaire durant différentes périodes critiques de la grossesse (au 1er trimestre et à terme). AhR est un récepteur cytosolique qui se relocalise dans le noyau après liaison d'un ligand (exogène ou endogène), il s'hétérodimérise avec son partenaire ARNT, lui permettant de se fixer sur des éléments de réponses spécifiques (XRE) dans le promoteur de ses gènes cibles afin d'en initier la transcription. Après activation, l'activité d'AhR est finement régulée par une boucle de régulation négative impliquant le répresseur d'AhR (AhRR), l'exportation d'AhR du noyau et sa dégradation par le protéasome. Ce facteur de transcription joue un rôle essentiel dans la mise en place des processus de détoxification d'une variété de xénobiotiques tels que le benzo(a)pyrène (BaP) puisqu'il permet la transcription d'enzymes de phase I et II de leur métabolisation. AhR est notamment impliqué dans la médiation des effets toxiques de certaines molécules (tel que le BaP) en participant à leur bio-activation après métabolisation mais possèderait également des rôles plus physiologiques grâce à la liaison et à son activation par des ligands issus de l'alimentation ou endogènes, comme dans la régulation des voies métaboliques, de l'immunité ou encore par l'interaction avec des récepteurs des œstrogènes (ER). Parmi les ligands endogènes, il existe les dérivés du tryptophane et notamment la kynurénine produite par l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase 1 (IDO1). L'activation d'AhR par la kynurénine a notamment été montrée comme empêchant la progression et les métastases de neuroblastome [290], modulant les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène [415] et générant la production de cellules T régulatrices de l'immunité [416], participant ainsi à la tolérance fœto-maternelle nécessaire au bon déroulement de la grossesse [296].

Jusqu'à notre publication, l'expression et le rôle d'AhR n'avaient pas été entièrement caractérisés dans le placenta humain au cours des différents stades de grossesse. Pourtant des différences d'expression de ce récepteur pourraient permettre de définir des fenêtres de sensibilité pour l'embryon en formation et/ou le fœtus. Seules

deux publications antérieures décrivent l'expression et la localisation de ce récepteur dans le placenta humain. La première publication s'est intéressée à la localisation et l'expression d'AhR dans les villosités à terme de grossesse ainsi que dans les tissus fœtaux humains [243]. Dans la deuxième publication, les auteurs ont décrit l'expression à terme de AhR et de ses partenaires ARNT et AhRR ainsi que l'activité transcriptionnelle de ce récepteur dans des trophoblastes primaires à terme, sa localisation au 1er trimestre et à terme de grossesse dans les villosités et lignées cellulaires trophoblastiques, notamment les JEG3 [244]. Cependant, l'expression d'AhR dans le placenta humain a été montrée principalement au niveau de son ARNm et de sa localisation protéique uniquement par immunohistochimie. Une description d'AhR au niveau protéique au cours de l'ontogenèse placentaire (du premier trimestre au terme de grossesse) et sa localisation spatiale dans le tissu (différents types cellulaires) manquait toujours avant notre publication.

L'objectif de ce travail était donc la mise en évidence des profils d'expression d'AhR, de ses partenaires et de ses gènes cibles dans le placenta humain au cours de la grossesse (premier trimestre et à terme) ainsi que de déterminer l'effet d'une exposition au BaP sur l'expression, l'activité et la localisation de ce récepteur. Nous avons donc réalisé une cartographie complète de l'expression génique et protéique, de la localisation et de l'activité d'AhR dans différents modèles placentaires : des explants de villosités choriales du premier trimestre et à terme de grossesse, des cultures primaires issus de placenta à terme et la lignée BeWo en fonction de l'état de confluence. L'activité d'AhR a été mesurée par l'expression de ses principaux gènes cibles de la phase I (CYP450) et de la phase II de détoxification. De plus, nous avons déterminé l'effet de l'exposition au BaP, un ligand fort d'AhR, dans le modèle BeWo au niveau de l'activité et de la localisation de ce récepteur. Nous avons montré que l'expression et l'activité d'AhR étaient augmentées à terme de grossesse et lors de la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes. Cette augmentation d'expression d'AhR au cours de la grossesse se fait en parallèle de l'expression d'IDO1, un potentiel activateur d'AhR via la production d'un métabolite qui est un ligand endogène d'AhR. De plus, nous avons mis en évidence une activation constitutive d'AhR avec une localisation uniquement nucléaire dans nos différents modèles placentaires, en absence ou en présence de BaP. Après exposition des trophoblastes au BaP, il n'a pas été observé de

modification d'expression génique ou protéique d'AhR, mais une activation d'AhR pour ses cibles transcriptionnelles de la phase I, effet inhibé par l'usage d'un antagoniste d'AhR (CH223191). De plus, le BaP a entraîné une diminution de l'expression protéique d'IDO1 dans les villosités choriales exposées sous forme d'explants. Notre étude suggère une activation constitutionnelle d'AhR, probablement par l'existence de ligands endogènes (tels que la kynurénine) dans les cellules placentaires humaines. Nos données sont renforcées par les résultats d'autres études qui dosent une présence de kynurénine plus importante dans le placenta humain à terme de grossesse [417]. Toutes ces données nous ont permis d'établir une base de connaissances solides d'AhR dans le placenta humain.

Depuis notre étude, aucunes données n'ont été publiées concernant l'expression, la localisation et l'activité d'AhR dans le placenta humain en conditions basales. Une étude a été faite sur les effets de mélanges de HAP (dont le BaP) sur les propriétés cellulaires et stéroïdogènes de deux lignées trophoblastiques : JEG-3 et BeWo [230]. Il a été montré une activation de l'expression d'AhR par ces mélanges dans les deux modèles cellulaires, avec une augmentation de l'expression de CYP1A1 et CYP1B1 dans les JEG-3 tandis que ces deux marqueurs de l'activation d'AhR étaient diminués dans les BeWo. L'exposition à ces mélanges de HAP ont eu pour résultat de stimuler la prolifération cellulaire des JEG-3, contrairement aux cellules BeWo dans lesquelles un effet inhibiteur de la prolifération a été retrouvé.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Expression, Localization, and Activity of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Human Placenta

Anaïs Wakx [1,2], Margaux Nedder [1], Céline Tomkiewicz-Raulet [2], Jessica Dalmasso [1], Audrey Chissey [1], Sonja Boland [3], Françoise Vibert [1], Séverine A. Degrelle [1,4], Thierry Fournier [1], Xavier Coumoul [2], Sophie Gil [1,†] and Ioana Ferecatu [1,*,†]

1 National Institute for Health and Medical Research, UMR-S 1139, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, F-75006 Paris, France; anais.wakx@free.fr (A.W.); margaux.nedder@outlook.fr (M.N.); jessica.dalmasso49@gmail.com (J.D.); audrey.chissey@parisdescartes.fr (A.C.); francoise.vibert@parisdescartes.fr (F.V.); severine.degrelle@inserm.fr (S.A.D.); thierry.fournier@parisdescartes.fr (T.F.); sophie.gil@parisdescartes.fr (S.G.)
2 National Institute for Health and Medical Research, UMR-S 1124, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, F-75006 Paris, France; celine.tomkiewicz-raulet@parisdescartes.fr (C.T.-R.); xavier.coumoul@parisdescartes.fr (X.C.)
3 Centre National de la Recherche Scientifique UMR 8251, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75013 Paris, France; boland@univ-paris-diderot.fr
4 Inovarion, 38 Avenue des Gobelins, Paris F-75013, France
* Correspondence: ioana.ferecatu@parisdescartes.fr; Tel.: +33-153-739-605; Fax: +33-144-073-992
† These authors contributed equally to this paper as last authors.

Received: 29 October 2018; Accepted: 23 November 2018; Published: 27 November 2018



Abstract: The human placenta is an organ between the blood of the mother and the fetus, which is essential for fetal development. It also plays a role as a selective barrier against environmental pollutants that may bypass epithelial barriers and reach the placenta, with implications for the outcome of pregnancy. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is one of the most important environmental-sensor transcription factors and mediates the metabolism of a wide variety of xenobiotics. Nevertheless, the identification of dietary and endogenous ligands of AhR suggest that it may also fulfil physiological functions with which pollutants may interfere. Placental AhR expression and activity is largely unknown. We established the cartography of AhR expression at transcript and protein levels, its cellular distribution, and its transcriptional activity toward the expression of its main target genes. We studied the profile of AhR expression and activity during different pregnancy periods, during trophoblasts differentiation in vitro, and in a trophoblast cell line. Using diverse methods, such as cell fractionation and immunofluorescence microscopy, we found a constitutive nuclear localization of AhR in every placental model, in the absence of any voluntarily-added exogenous activator. Our data suggest an intrinsic activation of AhR due to the presence of endogenous placental ligands.

Keywords: AhR; ARNT; benzo-a-pyrene; CYP1A1; CYP1B1; placenta; trophoblast; ontogeny

1. Introduction

The placental barrier is a highly complex tissue, which regulates exchanges between the maternal and fetal circulations. This function is essential for the maintenance of pregnancy and for the development and growth of the embryo and then the fetus. The placenta is composed of villous epithelial, mesenchymal, and endothelial tissues, in which fetal vessels are embedded [1]. The epithelium of the villous tree is formed by the outer syncytiotrophoblastic layer, a multinucleated

syncytium in direct contact with the maternal blood, and by the underlying mononuclear proliferative cytotrophoblasts, which constantly renew the syncytiotrophoblast layer. Because of its localization, the syncytium assures the synthesis and secretion of hormones, including steroids (progesterone, estrogens), human chorionic gonadotropin (hCG) placental growth hormone (pGH), human placental lactogen (hPL), and factors, like soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt1), involved in the regulation of blood vessel formation. The placenta also ensures the protection of the fetus against a wide variety of xenobiotics, including drugs and pollutants. However, the physiology of this placental barrier varies during ontogeny with major modifications occurring between early pregnancy and term. Although villous architecture and arborescence are organized at the end of the first month of pregnancy, they continue to branch out by sprouting in the area of basal decidua. At term, the villous surface area reaches as much as 12 to 14 m^2 [2], is highly vascularized, and the tissue barrier is greatly thinned (1–3 μm as compared to 45 μm in the first trimester of pregnancy) [3]. Furthermore, major changes occur in the trophoblastic dioxygen (O_2) environment within the first trimester, with an increase from 2–5% O_2 (before the eighth and ninth weeks of amenorrhea (WA)) to 6–8% O_2 (after 12–14 WA). All these characteristics need to be considered when investigating the impact of xenobiotics on placental functions since significant crosstalk may occur between several signaling pathways (e.g., adaptation to hypoxia and stress responses to pollutants).

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is an environmental-sensor transcription factor that mediates the metabolism of a wide variety of xenobiotics, which are present in the environment and in food, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and dioxins [4]. The high-affinity ligand-binding ability of the AhR and the downstream results of activation lead to the metabolic breakdown and elimination of many chemicals. However, the metabolic bioactivation of some chemicals contributes to adverse cellular toxicity [5]. The AhR is a cytosolic receptor located in the core of a multiprotein complex, which is composed of chaperones and kinases that protect and maintain the receptor in a conformation that can bind ligands. Upon ligand-binding, the AhR relocates to the nucleus, undergoes heterodimerization with the AhR nuclear translocator (ARNT), and binds to specific xenobiotic responsive elements (XRE) in the promoters of its target genes. This results in the initiation of gene transcription [6]. Among the target genes of the AhR are genes encoding xenobiotic metabolism enzymes (XME) of phase I, such as the microsomal cytochrome 450-dependent monooxygenases (CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1), and XME of phase II, like heme oxygenase 1 (HO1), NAD(P)H quinone dehydrogenase 1 (NQO1), superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1/2), and Glutathione S-transferase (GST) [7]. Following ligand-dependent activation, the AhR signaling pathway is tightly regulated by several negative feedback loops. AhR is constitutively exported to the cytosol and degraded by the 26S proteasome pathway [8]. On the other hand, one of its target genes, the AhR repressor (AhRR), is a competitor for the AhR-ARNT dimerization (AhRR-ARNT) and for the subsequent binding to the XRE sequence [9].

Recent data suggest that AhR is involved not only in the detoxification process, but also in other main cellular functions, for instance, regulating the immune response, cell differentiation, the cell cycle, and oncogenesis [10–12]. These additional functions of the AhR have been brought to light by the discovery of numerous dietary ligands (e.g., indoles, carotenoids, flavonoids, resveratrol), microfloral and endogenous ligands (L-tryptophan derivatives) [13,14], and from pioneer studies employing *AhR*-knockout organisms that exhibit several developmental defects [15–19]. In addition, it has been shown that *AhR*-knockout mice exhibit alterations in fertility, decreased litter size, and increased neonatal death of offspring [20], which suggests that AhR has a critical role during pregnancy. Moreover, endogenous ligands, like kynurenine (a L-tryptophan-derivate metabolite produced by two enzymes: Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 enzyme (IDO1) or tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO)), which directly activate the AhR in immune cells from the decidua and peripheral blood, have been proposed to be essential for the maintenance of pregnancy, by allowing the immunological tolerance of the embryo by the mother [21–26]. The activation of the AhR-dependent CYP1A1 pathway by environmental pollutants has been associated with profound

immunosuppression [27] and complications of pregnancy (e.g., spontaneous-abortion, intrauterine growth restriction, premature birth) [28].

Previously published results indicate that the AhR is highly expressed in human placenta, at the periphery of the chorionic villi in syncytiotrophoblasts (ST) and also in the endothelial cells of villous large-blood vessels and umbilical cord veins/arteries [29,30]. However, the expression of the AhR in the human placenta has been demonstrated mostly at the mRNA level and the localization of the protein only by immunohistochemistry. At present, a complete temporal (from early pregnancy to term) and spatial (within the tissue) description of the expression at the protein level is lacking.

In this study, we have established the cartography for protein expression, localization, and intrinsic activity of the AhR, and we have compared these data among different placental models: Explants of chorionic villi at different periods of pregnancy, cultures of primary trophoblasts that differentiate into syncytiotrophoblasts in vitro, and in the BeWo cell line in respect to its confluence state. We also assessed the AhR intrinsic activity measuring the expression of several target genes. Then, we investigated AhR localization and activity after incubation of BeWo cells with Benzo(a)Pyrene (BaP), a strong AhR ligand. This foundational study is essential for a better understanding of the AhR distribution and role—detoxification and/or physiological functions—in the placental barrier to better assess the impact of environmental pollutants at the maternal-fetal interface.

2. Results

2.1. AhR Expression in Human Placenta During Ontogeny

We determined the pattern of AhR expression in the placenta throughout pregnancy. To this end, placental villi from 8–9 WA, 12–14 WA, and 37–39 WA (term) were harvested and used for both RT-qPCR and Western blot analysis. To verify that there were no ex vivo modifications, such as tissue degradation, during dissection or RNA extraction, we first assessed the level of typical placental biomarkers, such as *β-hCG, hPL, PLGF,* and *GH2*, and enzymes, such as *CYP11A1* (P450ssc) and *CYP19* (Aromatase), responsible for the production of placental-derived progesterone and estrogens, respectively [31]. All data were normalized to the average of three housekeeping transcripts (*HPRT*, *RPL13*, and *18S*) and then normalized to the level of *KRT7 (Cytokeratin-7, CK7)* mRNA, an intermediate filament protein expressed in trophoblasts, but not in other placental cell types. The normalization to CK7 is needed to take into account the trophoblast mass variation within the placental villi during placenta development and growth, and the variability of trophoblasts' mass between the samples. As expected, we found (Figure 1A) that *β-hCG* exhibits a higher expression (the average Ct is 20) in the early first trimester of pregnancy as compared to 12–14 WA and term conditions (mean Cts of 22 and 28, respectively) [31]. We also found that the amounts of *hPL*, *PLGF*, and *GH2* as well as *CYP11A1* and *CYP19* mRNAs were increased at term. Then, we designed primers specific for the human AhR, the AhR repressor (AhRR), and their partner, ARNT, and validated them by PCR with total RNA extracted from human placental primary trophoblasts (Figure S1A). The transcripts of *AhR*, *AhRR*, and *ARNT* are expressed at a low level (mean Cts of 29, 32, and 32, respectively, Figure 1B) and remain unchanged within the first trimester of pregnancy (8–9 WA and 12–14 WA). The expression of *AhR, AhRR,* and *ARNT* are all increased in term placental villi when normalized to KRT7, as much as five-fold for both *AhR* and *AhRR* (respectively, average of 1.09 compared to 5.09; 1.06 compared to. 4.41) and more than two-fold for *ARNT* (average of 1.05 compared to. 2.34). In order to determine whether the increased amount of *AhR* mRNA is followed by an increase in the level of protein, we performed Western blots with protein extracts of placental villi from different stages of pregnancy. The amounts of AhR and ARNT protein were significantly increased at 37–39 WA (Figure 1C and right bar graph for total AhR quantification) as compared to the first trimester (8–9 WA and 12–14WA). The specificity of the two bands of AhR (at around 95 and 130 kDa) was checked using a specific blocking peptide for the antibody (Figure 1C). In eight different term placental villi extracts, we observed an interindividual variability in the level of AhR of 0.5 to 3 arbitrary units (AU) (Figure S2A). Finally, we found no major

variation in the amount of AhR and ARNT protein in different regions of term placenta after sampling villi from central (close to the umbilical cord), intermediate, and peripheral zones (Figure S2B).

Since the AhR is expressed differently during ontogeny, we next investigated whether its activity is also enhanced when its expression level is increased at 37–39 WA. We evaluated by RT-qPCR, the mRNA expression levels of several AhR target genes. Compared to the amount of mRNA in the first trimester, the expression of CYP1B1 is not modified during ontogeny (Figure 1D). In contrast, the amounts of *CYP1A1* and *CYP1A2* mRNA were four and six-fold higher (respectively, average of 1.33 compared to. 4.21; 1.58 compared to. 6.29). These results suggest that, in the absence of any voluntarily-added exogenous ligands, AhR is activated in term placenta. To further pursue this observation, we also evaluated the expression of several other XME AhR-transcriptional targets, which are involved in phase II of detoxification. The expression of these genes was compared in villi from the first trimester (8–9 WA and 12–14 WA) to villi from 37–39 WA placenta. The mRNA of all AhR anti-oxidative targets (*HO1*, *SOD1*, *SOD2*, *NQO1*, *GSTA2*, and *Catalase* mRNAs) were significantly increased at term as compared to the first trimester of pregnancy (Table 1). Taken together, these results demonstrate that the expression and the activity of the AhR is increased at term.

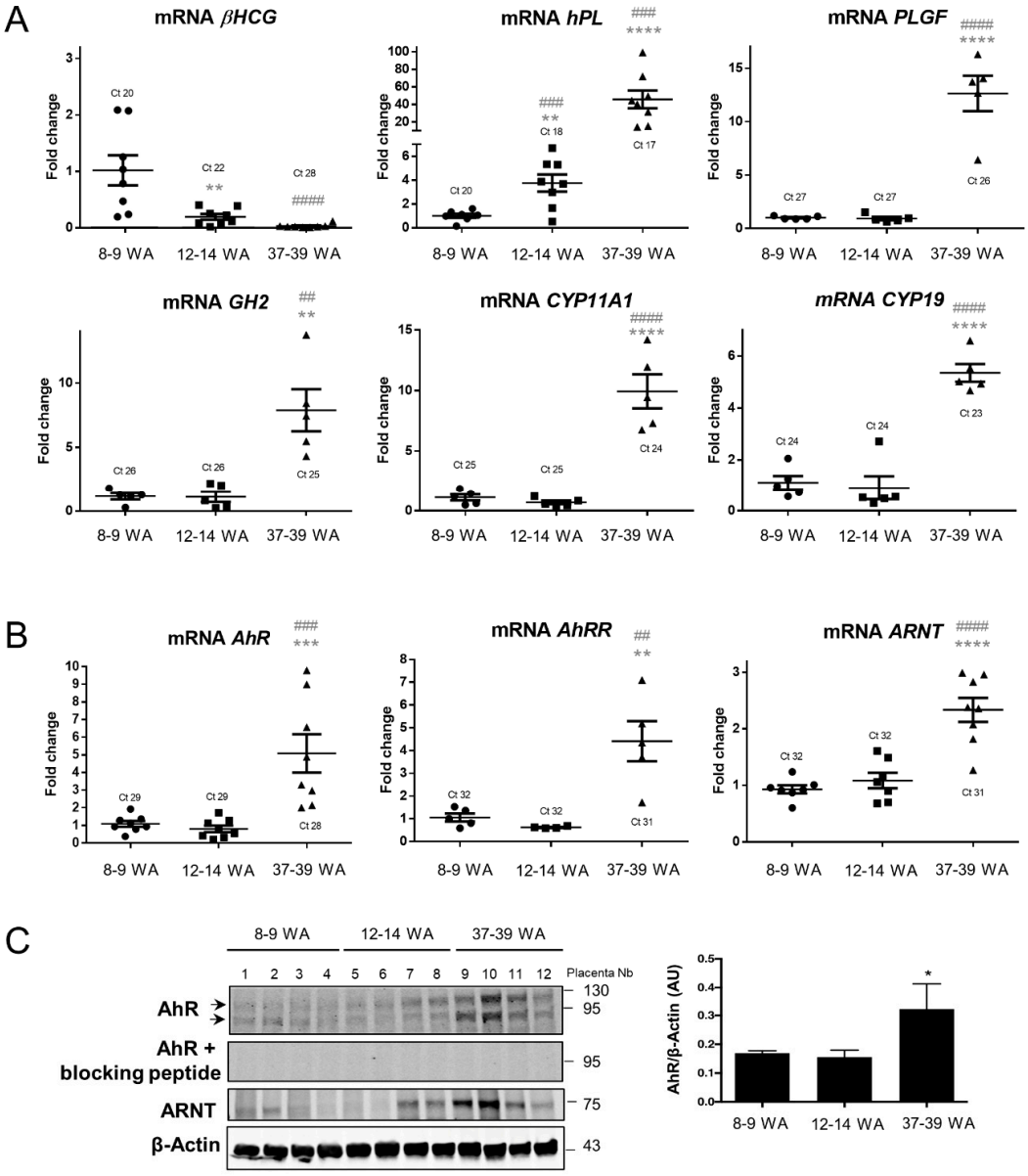


Figure 1. *Cont.*

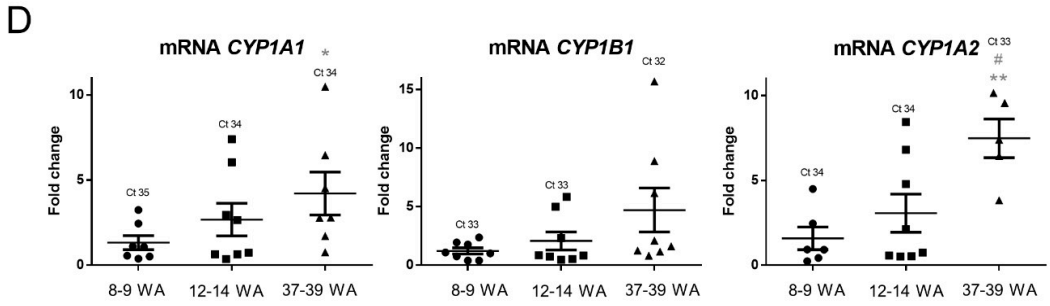


Figure 1. Placental expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and relevant biomarkers during pregnancy. Total mRNAs were extracted from chorionic villi of eight placentae at 8–9 weeks of amenorrhea (WA), at 12–14 WA and at 37–39 WA (term). (**A**) Levels of *βhCG*, *hPL*, *PLGF*, *GH2*, *CYP11A1*, and *CYP19* were determined by RT-qPCR and normalized to the geometric mean of *HPRT*, *RPL13*, and *18S* transcripts, and reported to CK7 (*KRT7*). The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of eight independent experiments are shown. ** compared to 8–9 WA $p < 0.01$; $^{\#\#}$ compared to 12–14 WA $p < 0.01$; $^{\#\#\#}$ compared to 12–14 WA $p < 0.001$; **** compared to 8–9 WA $p < 0.0001$; $^{\#\#\#\#}$ compared to 12–14 WA $p < 0.0001$. Ct is the raw value of the gene of interest without normalization to reference genes and to *KRT7*. (**B**) Levels of *AhR*, *AhRR*, and *ARNT* were determined by RT-qPCR and normalized to the geometric mean of *HPRT*, *RPL13*, and *18S* transcripts, and reported to CK7 (*KRT7*). The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of eight independent experiments are shown. ** compared to 8–9 WA $p < 0.01$; $^{\#\#}$ compared to 12–14 WA $p < 0.01$; *** compared to 8–9 WA $p < 0.001$; $^{\#\#\#}$ compared to 12–14 WA $p < 0.001$; **** compared to 8–9 WA $p < 0.0001$; $^{\#\#\#\#}$ compared to 12–14 WA $p < 0.0001$. Ct is the raw value of interest gene without normalization to reference genes and to *KRT7*. (**C**) Total protein were analyzed by immunoblotting using AhR antibody alone or pre-incubated with its blocking peptide, AhR nuclear translocator (ARNT) antibody, and β-Actin, the last used as a loading control. The graph represents the total amount of AhR protein (2 bands) relative to β-Actin levels determined by quantification of immunoblot analysis using the Odyssey System Imager. The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of four distinct placentae per stage of pregnancy are shown (* $p < 0.05$). (**D**) Levels of *CYP1A1*, *CYP1B1*, and *CYP1A2* were determined by RT-qPCR as above. The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of eight independent experiments are shown. Ct is the raw value of interest gene without normalization to reference genes and to *KRT7*. * compared to 8–9 WA $p < 0.05$; $^{\#}$ compared to 12–14 WA $p < 0.05$; ** compared to 8–9 WA $p < 0.01$.

Table 1. The expression of AhR-target genes involved in the oxidative defense system during ontogeny.

mRNA	**Pregnancy Period**	
	First Trimester (*n* = 16)	**Term (*n* = 8)**
	Fold Change Average ± Standard Deviation	
HO1	1.04 ± 0.33	2.24 ± 0.48 ***
SOD1	1.01 ± 0.16	3.99 ± 1.33 ***
SOD2	1.15 ± 0.64	3.09 ± 0.85 ****
NQO1	1.08 ± 0.51	3.53 ± 1.75 **
GSTA2	1.05 ± 0.39	2.42 ± 0.84 **
Catalase	1.06 ± 0.37	6.52 ± 2.62 ****

The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of 16 or eight independent experiments are shown. qRT-PCR data are normalized to the geometric mean of *HPRT*, *RPL13*, and *18S* transcripts, and reported to CK7 (*KRT7*) ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

2.2. AhR Localization in Human Placental Chorionic Villi During Ontogeny

Next, we examined the localization of AhR in chorionic villi of placentae from different periods of pregnancy by confocal microscopy. First, the immunostaining conditions were optimized by testing several anti-AhR antibodies (WH0000196-M2, Ab2770, A9359, HPA029722, and HPA029723) along

with a non-specific IgG negative control, under different fixation/permeabilization conditions in both villous tissues and trophoblast cultures (primary and BeWo) (Figures S3, S4, S5, and S6). Optimal staining of AhR in cells and tissue was obtained with the HPA029723 and WH0000196-M2 antibodies. Chorionic villi from 8–9 WA, 12–14 WA, and 37–39 WA were stained with the HPA029723 AhR antibody to determine AhR localization in the different types of cells of the tissue. To identify the trophoblast layer(s), an anti-cytokeratin 7 antibody was tested in parallel to the staining of nuclei with DAPI. AhR was detected in both trophoblast cells and mesenchymal cells of chorionic villi from all periods of pregnancy (Figure 2A). Staining was absent when the AhR-antibody was pre-incubated with its blocking peptide (Figure 2A) or with the IgG controls (Figure S3), which were used here to determine the specificity of the antibody. The AhR was present mainly in the nucleus of trophoblast and mesenchymal cells, as observed by the superposition with DAPI-staining. Then, we determined in which type of placental cells, other than trophoblasts, the AhR might be expressed. Immunoblotting showed the presence of the AhR in protein extracts from mesenchymal cells (MC), umbilical arteries endothelial cells (A), heterogeneous cells (choriotrophoblasts, fibroblasts, and mesenchymal cells) (HC), endothelial progenitor cells (EPC), and umbilical vein endothelial cells (V) (Figure S7). CD31 was used as marker of endothelial extracts and β-Actin as a loading control.

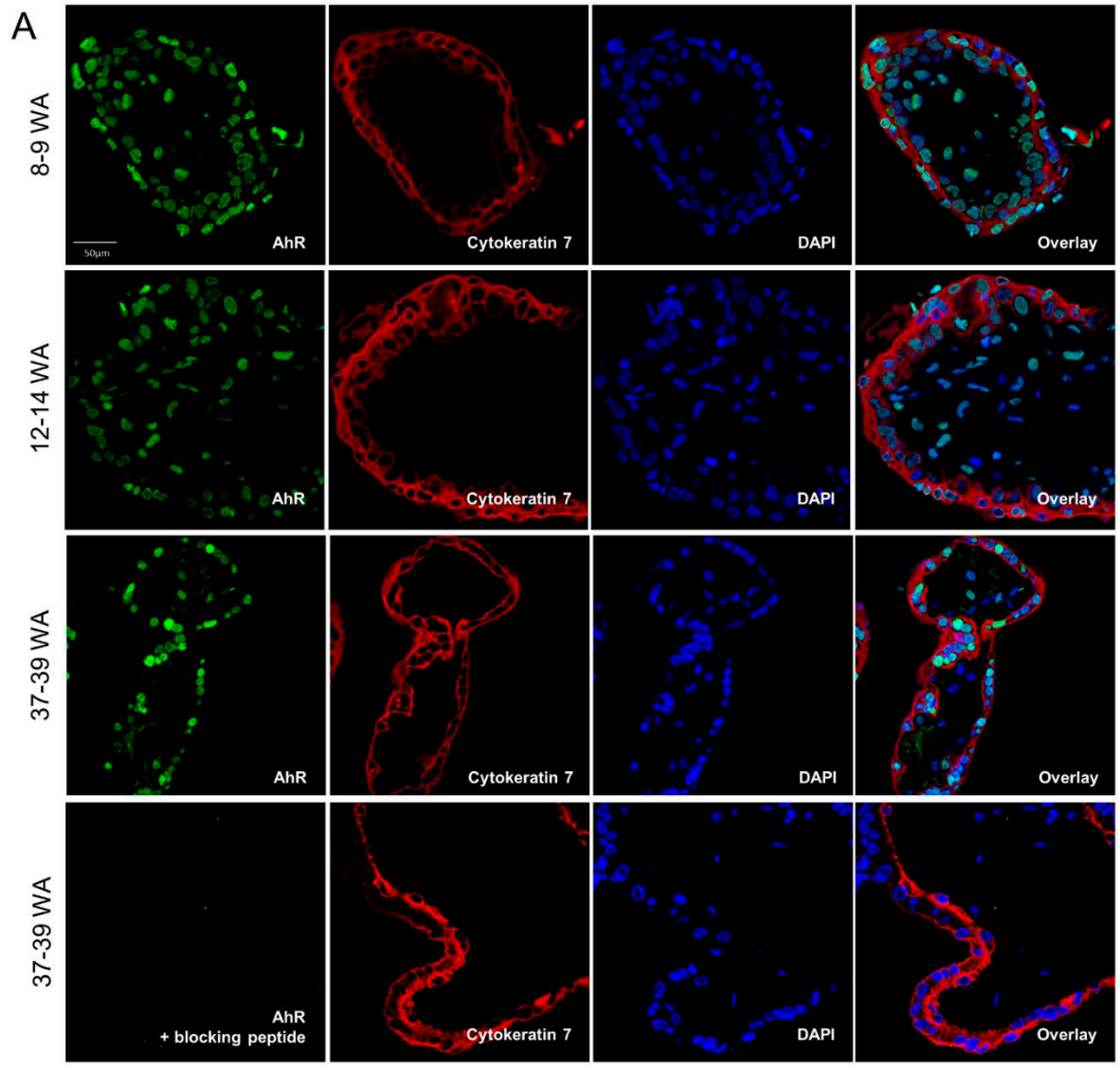


Figure 2. *Cont.*

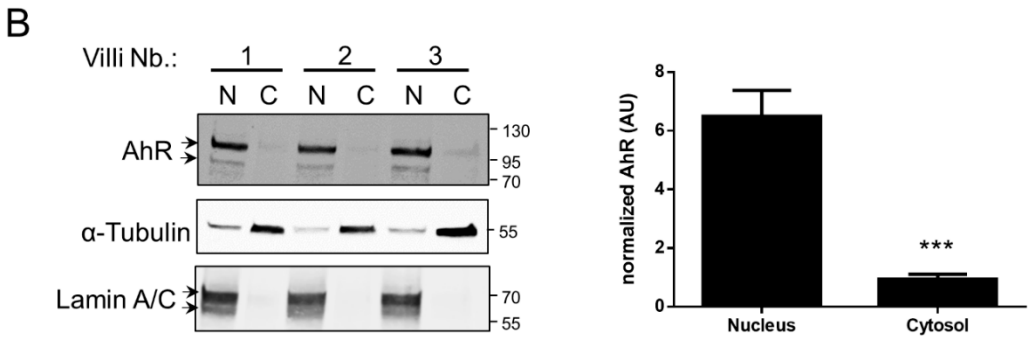


Figure 2. AhR localization in chorionic villi of placenta at different periods of pregnancy. (**A**) Chorionic villi from placentae for different periods of pregnancy (as indicated) were fixed in 4% PFA, included in agarose, and permeabilized with 0.5% Triton. Images are of confocal microscopy after immunostaining with anti-AhR antibody alone (HPA029723) (green, upper images) or anti-AhR pre-incubated with a blocking peptide (lowest image), of anti-cytokeratin 7 antibody (red, to underline the trophoblasts) and DAPI (blue, for nuclei). The overlay images are shown at right. Images are representative of four independent experiments. (**B**) Immunoblotting was carried out using anti-AhR antibody after cell fractionation of freshly harvested term chorionic villi to separate nuclear and cytosolic extracts. α-Tubulin and Lamin A/C are nuclear and cytosolic markers, respectively. N: Nucleus, C: Cytosol. The bar graph represents the total amount of AhR protein (two bands) normalized as following: Nuclear AhR level was normalized by Lamin A/C signal then nuclear contamination by cytosolic fraction (α-Tubulin/Lamin A/C ratio) was subtracted; cytosolic AhR level was normalized by α-Tubulin level then cytosolic contamination by nuclear fraction (Lamin A/C/ α-Tubulin ratio) was subtracted. Protein levels were determined by quantification of immunoblot analysis using the Odyssey System Imager. The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of three distinct villi are shown (*** $p < 0.001$).

In most of the non-pathologic tissues that have been examined previously, AhR was found to be localized to the cytosol and redistributed to the nucleus in the presence of ligands. Because our results showed a predominant nuclear localization of AhR in placental cells, without any voluntarily-added ligand of AhR, and because the AhR is present in several types of placental cells, we then examined the sub-cellular distribution of the AhR in freshly harvested chorionic villi following cell fractionation of the whole tissue. Reactivity to Lamin A/C nuclear protein and cytosolic α-Tubulin antibodies was used to assess the purity of the nuclear-enriched and cytosolic fractions (Figure 2B). Clearly, the two bands corresponding to the AhR are detected mostly in the nuclear-enriched fractions (89%) with only a very slight cytosolic presence (11%). These observations led us to consider that the AhR is activated and localized in the nucleus of chorionic villous cells in the absence of added exogenous ligand and to suspect the presence of some endogenous ligands.

Recently, kynurenine (kyn), an L-tryptophan (L-trp) derivative, was identified as a ligand and an activator of the AhR in several models, including placenta. Therefore, we determined the protein profile of two enzymes involved in the first step of L-trp metabolism, namely indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO1) and tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), in chorionic villi extracts from different periods of pregnancy. The IDO1 protein level is significantly increased in term villi, as is the AhR protein level (Figure 3). IDO1 slightly varies in different placentae at term (Figure S2A), but less so than within different areas of the placenta (Figure S2B). In contrast, the TDO enzyme was undetectable by Western blot (Figure 3), in agreement with other publications, which suggest its lack of expression in placental tissues.

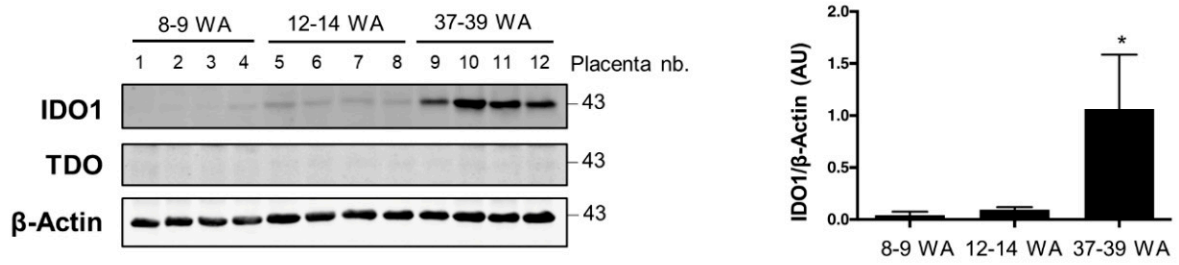


Figure 3. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 enzyme (IDO1) protein expression in placenta from different periods of pregnancy. Total protein extracts from placenta at different stages of pregnancy, as indicated, were analyzed by immunoblotting using anti-IDO1 and anti-TDO2 antibodies. β-Actin was used as a loading control. Quantification of IDO1 immunoblots relative to β-Actin was determined using the Odyssey System Imager and is shown in the bar scale graph. * compared to 8–9 WA, $p < 0.05$, $n = 4$ (lower panel).

2.3. AhR Expression, Localization, and Activity in Human Purified Trophoblasts

Human purified trophoblasts, which can be further differentiated into syncytiotrophoblasts (ST), permit investigation of the profile of AhR expression over the course of differentiation. Freshly purified human term cytotrophoblasts were immediately used (VCT_0) or cultured to ultimately form ST after 72 h of in vitro culture, with an intermediate state VCT at 24 h. The level of *AhR* mRNA was unchanged during trophoblast differentiation (VCT_0 vs ST) (Figure 4A). However, the total amount of AhR protein (the two bands of AhR) was slightly decreased in ST as compared to VCT_0 and VCT (undifferentiated VCT after 24 h of culture) (Figure 4B blot and lower left graph). However, there was an increase of the larger isoform of AhR (p130-AhR) in ST (Figure 4B blot and lower right graph), which may be due to post-translational modification in ST, slowing down protein migration in SDS-PAGE. After optimization of the fixation/permeabilization conditions in purified trophoblasts (Figure S4), we stained AhR in both VCT and ST cells together and co-stained with antibody to E-cadherin (a membrane marker) and nuclear DAPI. We observed the predominant nuclear localization of AhR (Figure 4C), similar to the chorionic villi (Figure 2A). IgG was used again as a negative control (Figure 4C lower images). This nuclear immunolocalization of AhR is not modified by cell fusion when forming the syncytium. This is visualized by the E-cadherin staining of the ST membranes containing several nuclei as highlighted with the dotted white line in the overlay (Figure 4C).

Finally, we found that the mRNAs of the AhR main's targets, *CYP1A1* and *CYP1B1*, were both increased when trophoblasts were differentiated to form the ST (about 100-fold change), although CYP1A2 mRNA decreased (Figure 4D). Altogether, our results indicate activation of AhR during differentiation.

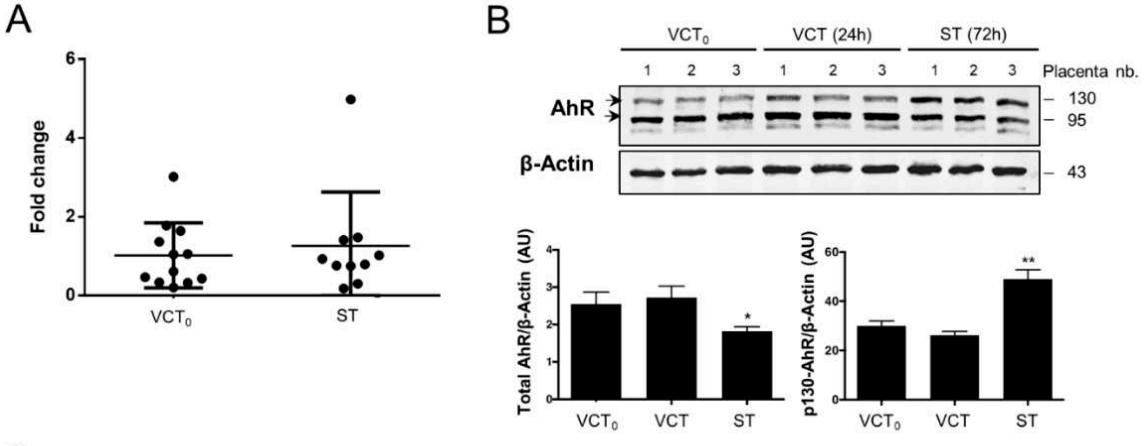


Figure 4. *Cont.*

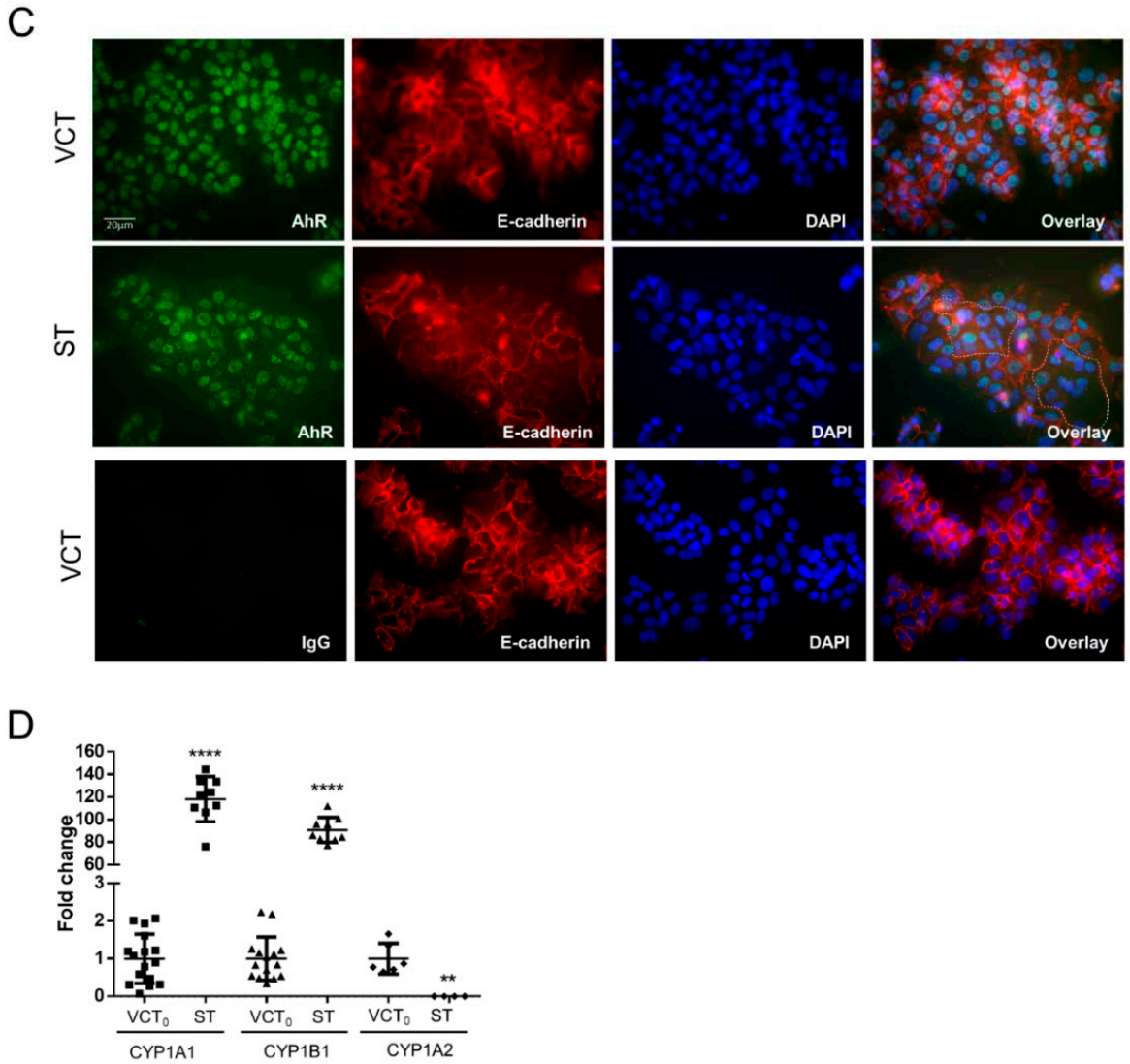


Figure 4. AhR expression and immunolocalization during CT differentiation into ST. (**A**) Total mRNA was extracted from freshly isolated trophoblasts before culture (VCT_0) and after 72 h of culture when cells are differentiated into ST. The levels of *AhR* mRNA were determined by quantitative RT-qPCR. Data were normalized to *HPRT*, *RPL0*, *SDHA*, and *18S* mRNA levels. The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of at least $n = 10$ independent experiments are presented. (**B**) Western blot with protein extracts from purified trophoblast before culture (VCT_0), after 24 h of culture (VCT), and after 72 h culture (ST). Membranes were immunoblotted with anti-AhR (WH0000196-M2 antibody) and β-Actin antibodies (loading control). Blot quantifications are shown in the bar graphs representing total AhR level (left panel) or upper 130-band (right panel) relative to β-Actin. * compared to VCT_0, $p < 0.05$; ** compared to VCT_0, $p < 0.01$. (**C**) Trophoblasts after 24 h of culture (VCT) and 72 h (ST) were fixed in 4% PFA and permeabilized with methanol. Images are of epifluorescence microscopy after immunostaining AhR (green), E-cadherin (membrane protein, in red), and nuclei (DAPI, blue). A control with non-specific IgG is shown in the lower panel and overlays in the right panel. (**D**) Freshly isolated cytotrophoblast before culture (VCT_0) and after 72 h of culture (ST) were subjected to RT-qPCR after mRNA extraction. Levels of *CYP1A1*, *CYP1A2*, and *CYP1B1* are presented as the mean ± standard deviation of at least six independent experiments and normalized to *HPRT*, *RPL0*, *SDHA*, and *18S* mRNA levels. ** compared to VCT_0, $p < 0.05$; **** compared to VCT_0, $p < 0.0001$.

2.4. AhR Expression, Localization, and Activity in the BeWo Trophoblast Model

The BeWo choriocarcinoma cell line is a model of trophoblasts that is often used in toxicological studies. We next determined whether this cell line could be used as a model to study the mechanism of the AhR pathway. To this end, and since AhR expression and activity have been demonstrated previously to vary according to the confluence level [32], we evaluated the levels of *AhR*, *AhRR*, and *ARNT* mRNAs as a function of the level of confluence of the BeWo cells. We found that the amount of the *AhR* mRNA increased (Ct 27 at 50% confluence) whereas expression decreased when the cells become subconfluent (Ct 28 at 90% confluence) (Figure 5A) and the level of AhR protein, when evaluated by Western blot, also is maximal at 50% confluence and follow the same kinetic (Figure 5B blot and right panel). In contrast, there was no significant variation in the amount of *AhRR* mRNA nor in the levels of ARNT mRNA and protein as a function of the state of confluence of BeWo cells (Figure 5A middle and right plots and Figure 5B). Following the optimization of experimental conditions using different fixation/permeabilization conditions and anti-AhR antibodies (Figures S4 and S5), we assessed the localization of AhR in BeWo cells in the absence of any treatment. IgG was used in parallel as a negative control. Similarly, to the previous experiments, the AhR (HPA029723) exhibited a solely nuclear localization in the BeWo cells (50% confluence) and AhR immunofluorescence was absent when a blocking peptide was employed (Figure 5C). BeWo cells were then fractionated to separate nuclei from cytosols and Western blotting was used to evaluate the presence of the AhR. α-Tubulin and Lamin A/C antibodies were used to assess the purity of the fractions. The two bands of AhR are detected mainly in the nuclear fractions (Figure 5D), which suggests that this localization is similar in BeWo cells and purified trophoblasts. Next, we found that the expression of *CYP1A1*, *CYP1B1*, and *CYP1A2* mRNA during BeWo proliferation diminished when cells become confluent (Figure 5E) as did the expression of AhR (Figure 5A). Moreover, the amount of *HO1*, *SOD1*/2, *NQO1*, *Catalase*, *GSTA2*, *GSS* (glutathione synthetase), and *NRF2* mRNAs, which are AhR-dependent genes and encode phase II XME, were also decreased at confluences greater than 50% (70% or 90%) (Table 2). Altogether, these results suggest that both AhR expression and activity depends on BeWo cells' density.

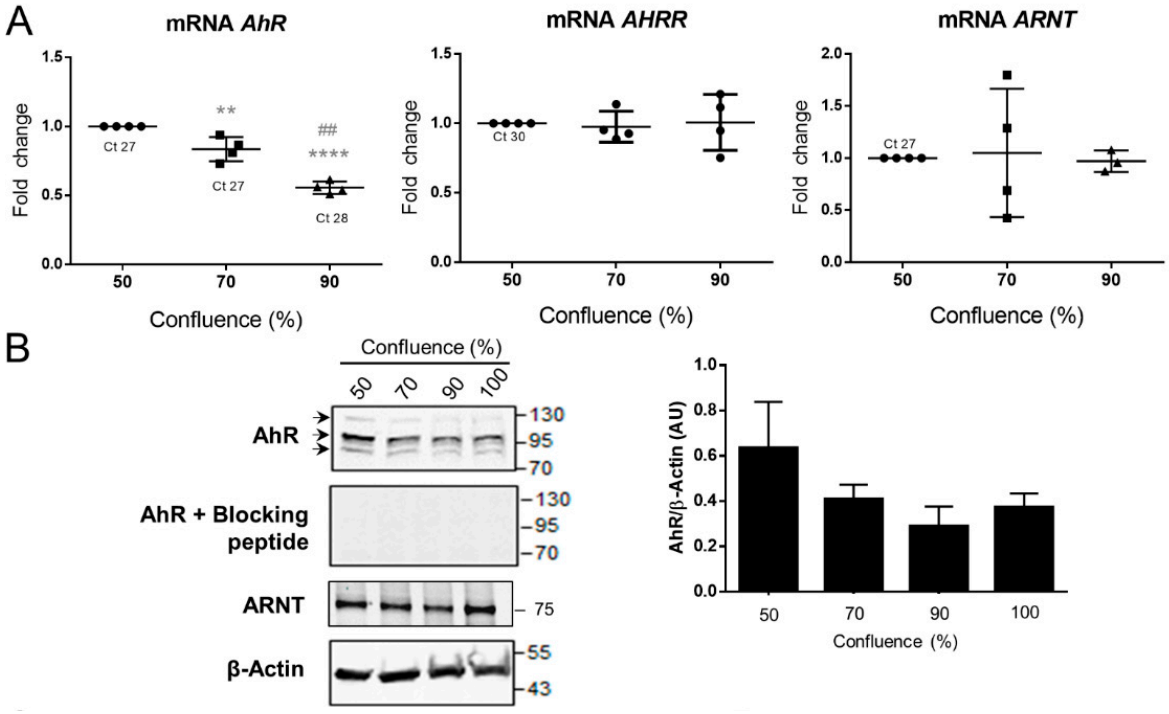


Figure 5. *Cont.*

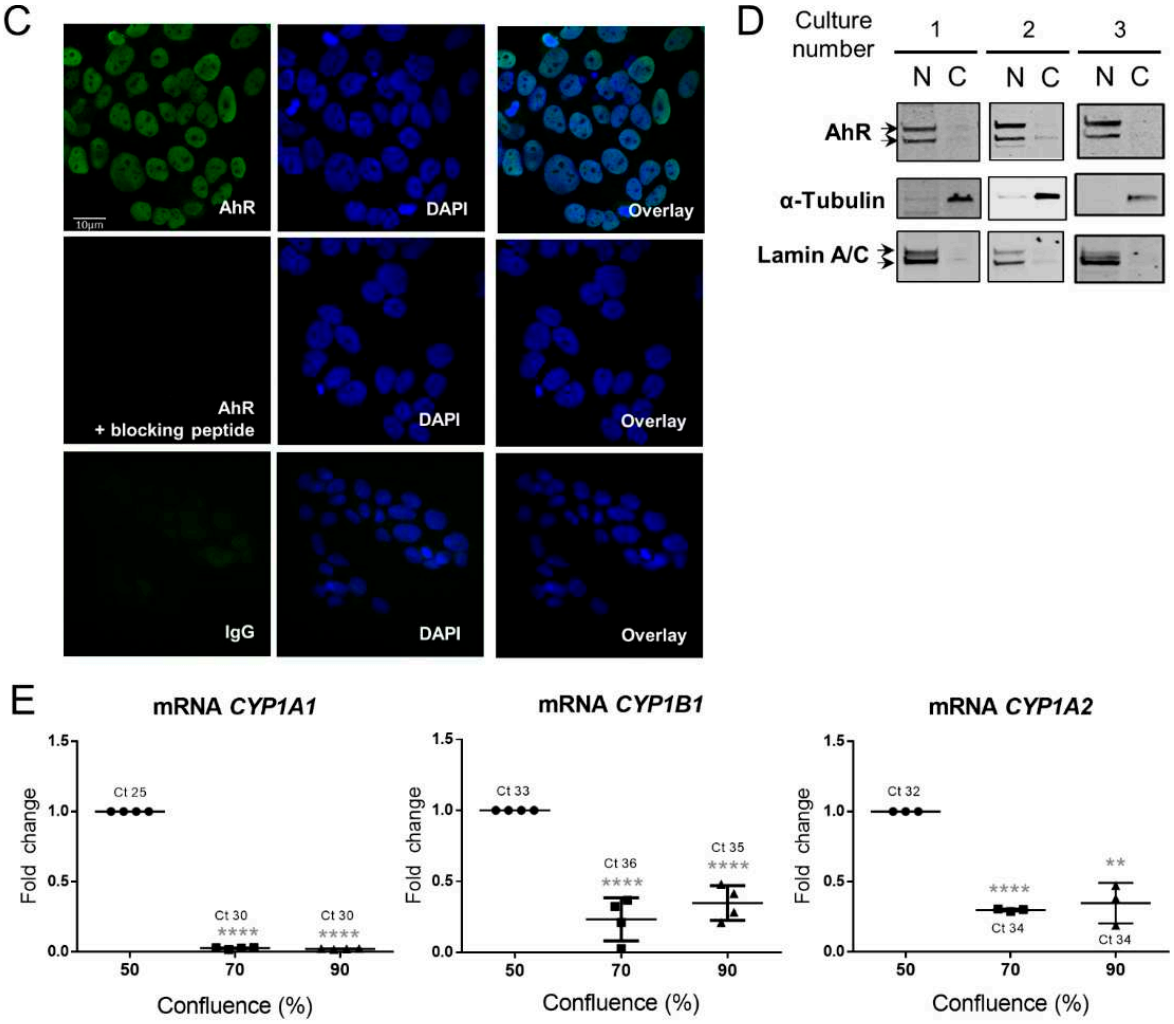


Figure 5. AhR expression, localization, and activity in the BeWo cell line. (**A**) Total mRNA were extracted from BeWo cells at various cell densities: 24 h hours after seeding cells reach about 50% of confluence; 48 h after seeding, they reached about 70% confluence, and about 90% 72 h after seeding. Levels of *AhR*, *AhRR*, and *ARNT* were determined by RT-qPCR and normalized to the geometric mean of *HPRT*, *RPL13*, and *Ubiquitin C* transcripts. The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of four independent experiments are shown. ** compared to 50% confluence $p < 0.01$; $^{\#\#}$ compared to 70% $p < 0.001$; **** compared to 50% confluence $p < 0.0001$. Ct is the raw value of gene without normalization to reference genes (**B**) Total proteins were analyzed by immunoblotting using AhR antibody alone or pre-incubated with its blocking peptide, using ARNT and β-Actin antibodies, used as a loading control (left panel). The graph represents the amount of total AhR protein relative to β-Actin level determined by quantification of the immunoblot using the Odyssey System Imager (right panel). The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of three independent experiments are shown. (**C**) BeWo cells were fixed in 4% PFA and permeabilized with 0.1% Triton. Images are of epifluorescence microscopy after staining of AhR alone (green, upper images), AhR pre-incubated with a blocking peptide (middle images), or IgG (lower images) and DAPI (blue, for nuclei). The overlay images are shown at right. Images are relative to five independent experiments. (**D**) Immunoblotting was carried out using anti-AhR antibody after cell fractionation of BeWo cells to separate the nuclear and cytosolic extracts. α-Tubulin and Lamin A/C are nuclear and cytosolic markers, respectively. N: Nucleus, C: Cytosol. (**E**) Levels of *CYP1A1*, *CYP1B1*, and *CYP1A2* were determined and normalized to the geometric mean of *HPRT*, *RPL13*, and *Ubiquitin C* transcripts. The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of at least three independent experiments are shown. ** compared to 50% confluence $p < 0.01$; **** compared to 50% confluence $p < 0.0001$. Ct is the raw value of interest gene without normalization to reference genes.

Table 2. Expression of AhR-target genes involved in the oxidative defense system under varying BeWo cell densities.

mRNA	Confluence			
	70%		90%	
HO1	0.55 ± 0.06	****	0.37 ± 0.05	****, ##
SOD1	0.93 ± 0.05	*	0.64 ± 0.07	****, ###
SOD2	0.99 ± 0.13	-	0.56 ± 0.05	****, ###
NQO1	0.78 ± 0.11	**	0.40 ± 0.07	****, ##
Catalase	1.01 ± 0.12	-	0.66 ± 0.07	****, #
GSTA2	0.92 ± 0.14	****	0.66 ± 0.10	**, #
GSS	1.06 ± 0.14	-	0.77 ± 0.12	**, #
NRF2	1.02 ± 0.42	-	0.54 ± 0.15	***

The means and standard deviations (short horizontal lines) of eight independent experiments are shown. qRT-PCR data are normalized to the geometric mean of *HPRT*, *RPL13*, and *18S* transcripts, and reported to 50% confluence. * compared to 50% confluence $p < 0.05$; # compared to 70% confluence $p < 0.05$; ** compared to 50% confluence $p < 0.01$; ## compared to 70% confluence $p < 0.01$; *** compared to 50% confluence $p < 0.001$; ### compared to 70% confluence $p < 0.001$; **** compared to 50% confluence $p < 0.0001$, - no statistical difference.

2.5. Effect of Benzo-(a)-Pyrene on AhR Activity in the BeWo Model

BeWo cells were incubated with 1 µM benzo-(a)-pyrene (B(a)P), a concentration close to the B(a)P dose found in the systemic circulation or detected in the placenta of smoking mothers [33,34]. Cells were incubated from 1h to 24 h, with or without a pre-incubation with a classical AhR-inhibitor, CH223191, a potent and specific AhR antagonist. This was used to observe if the AhR goes to the cytoplasm in the presence of an antagonist of AhR. Epifluorescence microscopy (Figure 6A) showed that 3 h incubation with B(a)P did not modify the AhR-nuclear distribution, even in the presence of the AhR inhibitor, CH223191 (3 µM), as shown in the AhR/DAPI overlay images (Figure 6A, right panel). Further, the two bands of AhR are found mostly in the nuclear fractions (lanes 1, 5, 9, and 13) following cell fractionation of BeWo cells incubated or not with B(a)P for 1h or 24 h. Again, the pre-incubation of the cells with the AhR-inhibitor, CH223191, did not change the distribution of AhR, which was still found in the nuclear fractions (lanes 3, 7, 11, and 15).

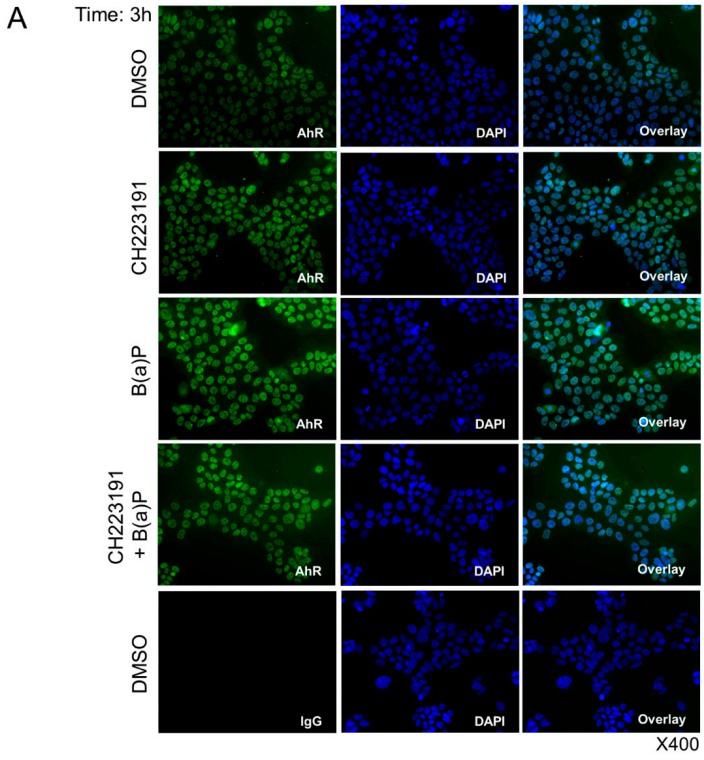


Figure 6. *Cont.*

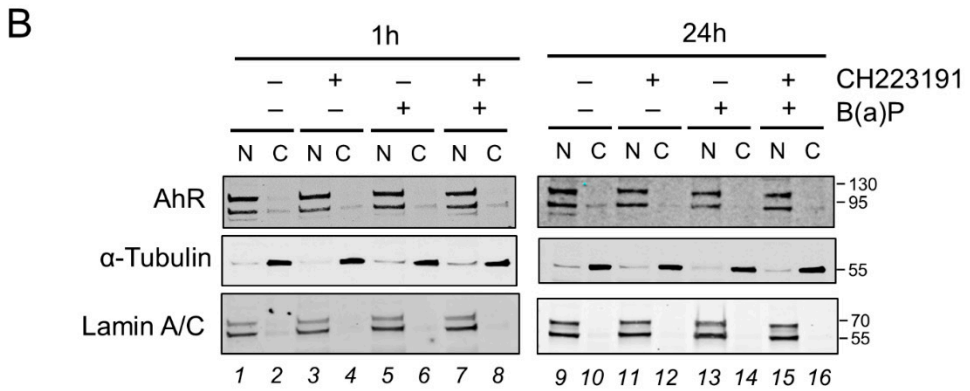


Figure 6. AhR localization in BeWo after incubation with benzo-(a)-pyrene. BeWo cells (at 70% confluence) were either used as control (solvent DMSO) or incubated with 1 µM B(a)P for the indicated times, in the presence or absence of a pre-incubation (1h before B(a)P) with 3 µM CH223191, an inhibitor of AhR, as indicated. (**A**) BeWo cells were fixed in 4% PFA and permeabilized with methanol. Images are of epifluorescence microscopy (400× magnification) after staining AhR with WH0000196-M2 antibody (green) and nuclei (DAPI). Overlays are in the right panel. (**B**) Cells were fractionated into nuclear (N) and cytosolic (C) fractions and subjected to Western blot. Immunoblotting was carried out using AhR (WH0000196-M2) antibody, and fractions purity was assessed with α-Tubulin (cytosolic) and Lamin A/C (nuclear).

We then analyzed the AhR signaling pathway of BeWo cells by RT-qPCR after incubation of the cells with 1 µM of B(a)P for 24 h. First, we found that the amounts of *AhR*, *AhRR*, and *ARNT* mRNA did not change after the incubation with B(a)P as compared to the solvent control (Co-DMSO) (Figure 7A). Then, the main target genes of the AhR were evaluated after incubation with B(a)P in the presence or absence of the AhR inhibitor. Despite the location of the AhR in the nucleus, Figure 7B shows that 1 µM of B(a)P was sufficient to induce a high level of expression of *CYP1A1* (an 80-fold change). This induction is almost, but not totally, eliminated by the pre-incubation with the AhR-antagonist (decrease from 80- to a 1.5-fold change). Similarly, *CYP1B1* and *CYP1A2* were induced by B(a)P (3-fold and 12-fold change, respectively). This induction was totally eliminated by the AhR-antagonist in the case of *CYP1A2*.

Finally, we also evaluated the amount of AhR protein in chorionic villi explants from term placentae after incubation with B(a)P for 24 and 48 h. There was no change in the amount of AhR protein even after 48 h of incubation with B(a)P (Figure 7C). There was a significant decrease in the level of IDO1 protein after incubation with B(a)P for 48 h, which has not been previously described (Figure 7C). Altogether, B(a)P exposure leads to the induction of a detoxification system and to a decrease in IDO1, and consequently impacts AhR physiologic activity in the placenta.

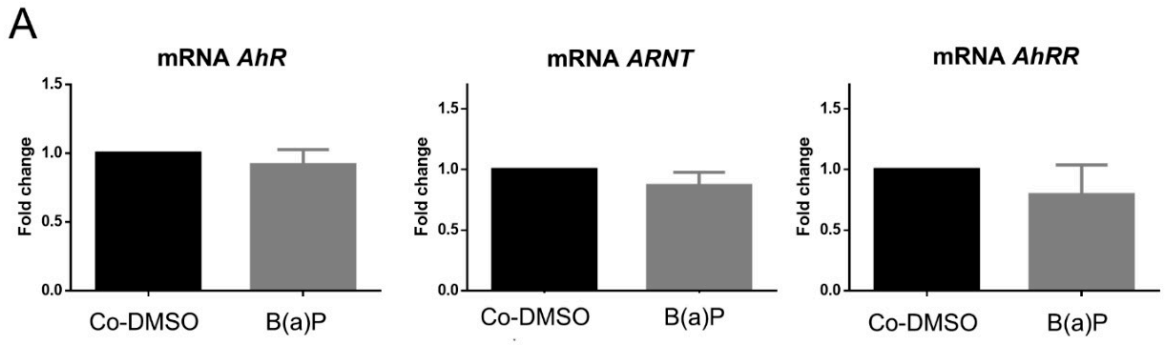


Figure 7. *Cont.*

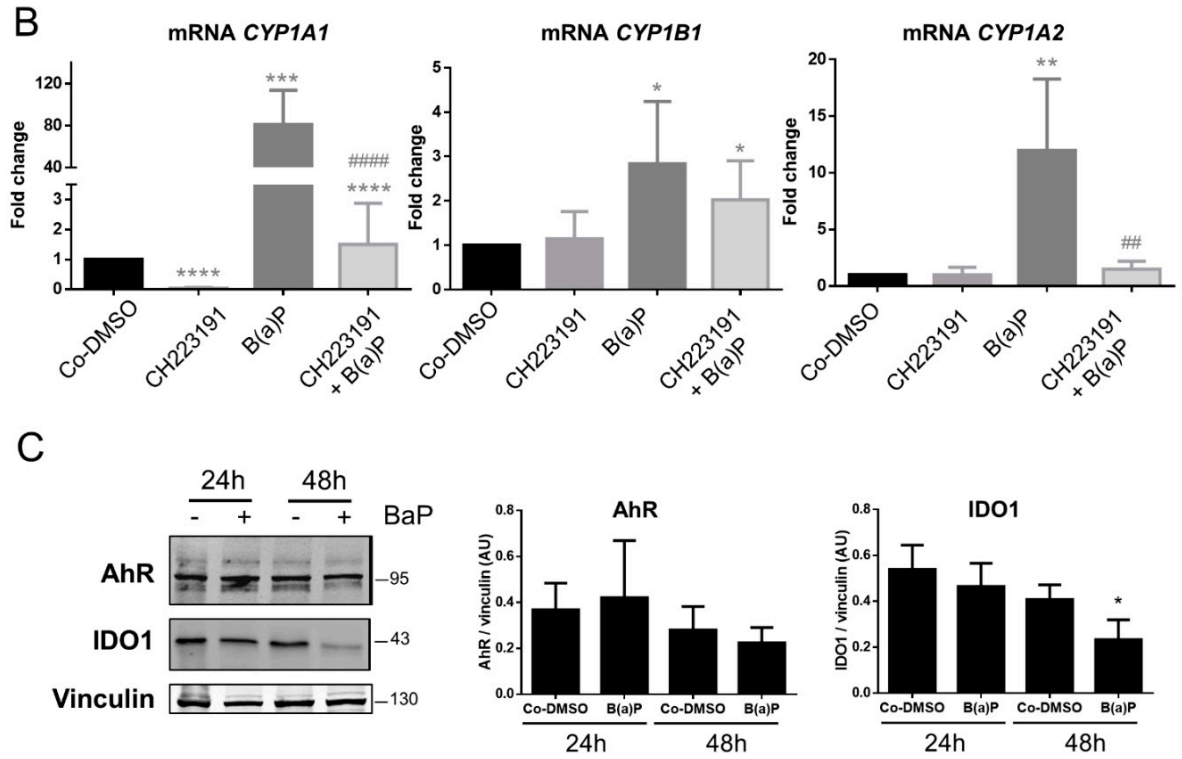


Figure 7. Impact of benzo-(a)-pyrene on AhR transcriptional activity. (**A**) Total RNA extracted from control BeWo cells (Co-DMSO) or incubated with 1 µM of B(a)P for 24 h, were analyzed by RT-qPCR using primers for *AhR*, *ARNT*, and *AhRR*. Results are normalized to three reference genes (*HPRT*, *RPL13*, and *Ubiquitin C*) and normalized to *CK7* (KRT7) and are presented as fold change. The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of three different experiments are shown. (**B**) BeWo cells (control (Co-DMSO) or cells incubated with 1 µM B(a)P for 24 h, in the presence or absence of 3 µM CH223191, a specific AhR inhibitor (1 h before B(a)P)), were subjected to RT-qPCR after total RNA extraction. Levels of *CYP1A1*, *CYP1B1*, and *CYP1A2* are presented as fold change, after normalization as above. * compared to Co-DMSO, $^{\#}$ compared to B(a)P; * $p < 0.05$; ** or $^{\#\#}$ $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** or $^{\#\#\#\#}$ $p < 0.0001$ ($n = 5$). (**C**) Total protein extracts from chorionic villi (explants) of control term placenta (Co-DMSO) or incubated with 1 µM B(a)P for 24 and 48 h, respectively, were subjected to Western blotting. Immunoblotting was carried out with anti-AhR, anti-IDO1, and anti-Vinculin (as loading control). The bar graph represents the total amount of AhR protein (two bands) or IDO1 relative to Vinculin level determined by quantification of immunoblots using the Odyssey System Imager. The means (long horizontal lines) and standard deviations (short horizontal lines) of three different placentae at term are shown. * compared to DMSO, $p < 0.05$.

3. Discussion

It is generally accepted that the AhR is activated by a variety of environmental pollutants, such as dioxins and PAHs. In addition, roles for the AhR, other than mediating the toxic effects of xenobiotics, are emerging. These new roles involve metabolism, tumor-promotion, and the regulation of immunity [35]. The identification of diverse dietary and endogenous ligands, which are activators of the AhR in pathways that govern physiological functions in the liver and the immune system, opens new and interesting perspectives for the possible implication of AhR in these pathways in the placenta. For instance, the activation of AhR by endogenous ligands seems to be involved in the proper embryologic development of mice, since AhR-knockout mice displays severe phenotypic abnormalities, including developmental defects [20]. AhR activation recently has been correlated with innate and adaptive immune system regulation of the immune cells present within the decidua [21,36]. Further, several recent publications have underlined the potential involvement of abnormal AhR activation in unexplained miscarriage [37,38].

In the current study, we investigated the expression of AhR in placenta of first trimester and term from healthy pregnancies. Insight into the second trimester is lacking here due to the inaccessibility of these healthy placentae (French legislation limits voluntary abortion to 14 WA). We present evidence that the expression of both AhR mRNA and protein (using a specific anti-AhR antibody that does not recognize AhRR or ARNT) varies markedly during the ontogeny of the placenta with an increase in expression in term placentae (up to five-fold changes) as compared to first trimester placenta. Moreover, the increase in AhR expression at term is accompanied by that of ARNT, its nuclear partner required for promoter activation. Increased AhR expression correlates indeed with an increase in transcriptional activity as manifested by the upregulation of the AhR target gene batteries of both phase I (*CYP1A1* and *CYP1A2*) and phase II (*HO1*, *SOD1*/2, *NQO1*, *GSTA2*, and *Catalase*) metabolism of xenobiotics. We also demonstrated simultaneous increase in *AhRR* mRNA expression, *AhRR* also being a target gene of the AhR signaling pathway. All the results we obtained in this study are summarized in Figure 8. One interpretation of the increased expression of AhR at term relates to the extent of the cytotrophoblast layer, underneath the ST, as compared to the thickness of the placental barrier during ontogeny and defense mechanisms [39]. It is possible that a thick VCT epithelium could act, itself, as a physical barrier during the first trimester (and even more so when trophoblasts plugs within the spiral arteries block the blood supply of the intervillous chamber). In term placentae, however, the VCT layers of chorionic villi become dramatically thinner (20x) and a different defensive mechanism will be instituted, which could include a more efficient detoxification process resulting from an increased expression of AhR.

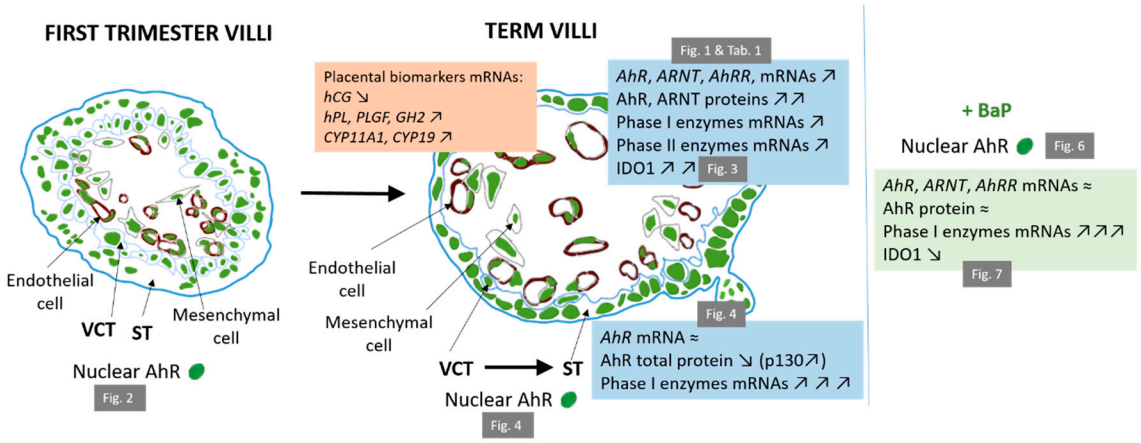


Figure 8. Summary of the results on AhR and relevant biomarkers' changes during pregnancy. First trimester villi (on the left) evolve into term villi (on the right). Changes in placental biomarkers between the first trimester and term are found in the orange box, and changes in AhR, its partner ARNT, its repressor AhRR, phase I and II enzymes, and IDO1 between first trimester and term are found in the higher blue box. Changes in AhR and phase I enzyme during VCT differentiation into ST are found in the lower blue box. On the right side, changes in AhR, ARNT, AhRR, phase I enzymes, and IDO1 after incubation of BeWo cells or villi explants with 1 µM BaP are showed. Nuclear localization of AhR in the different cell types is visualized with a green bullet. Increase in a marker is represented by ↗, decrease by ↘, and no change by ≈.

However, the increased expression of key members of the AhR signaling pathway in the placenta of humans during pregnancy is in slight discrepancy with that of AhR expression during ontogeny in rat models. In rats, it has been reported previously that both *AhR* and *ARNT* mRNAs peak between 15–18 gestational days (gd), and then diminish up to term (21 gd) [30]. These increases were correlated with the induction of *CYP1A1* mRNA at 18 gd in rat placenta, however, no other AhR-targets were evaluated in the study [30]. Our results, thus, underscore the importance of taking into account species-specificity when studying AhR expression and activity, especially during the ontogeny, since

notable structural differences within the trophoblast barrier are known to exist between humans' and rodents' placentae (the latter has three trophoblast layers).

Another important point is that, in our study, the changes in the transcriptional activity of the AhR in the chorionic villi tissue during ontogeny are rather modest (five- to seven- fold changes for *CYP1A1* and *CYP1A2*) when compared to the typical acute CYP450 induction by pollutants (around 100-fold change) [40–42]. This is in accordance with previously reported data showing that both *CYP1A2* and *CYP1B1* transcripts were expressed at low levels in human placenta at term [43,44]. The level of AhR activity after a 24 h incubation with B(a)P was found to be increased as much as 750-fold for *CYP1A1* expression in the BeWo trophoblast cell line [45]. However, in our work, the levels of AhR activity in non-pathological term placentae of non-smoking women were close to that induced by resveratrol (a natural ligand of AhR present in food [46]) in a study using human term placental trophoblasts (around five-fold changes for both *CYP1A1* and *CYP1A2* mRNAs) [30]. Again, in the rat placenta, the intrinsic activity of AhR toward CYP1A1 induction was also moderate at 18 gd [30]. These results suggest that AhR is constitutively and moderately activated by an unknown mechanism in term placenta as compared to first trimester placenta.

Although, constitutive activation of the AhR could occur when its level rises, as previously described [47]. The presence of ligands from the diverse sources to which pregnant women unavoidably are exposed could also explain the increased expression of AhR target genes. For example, pollutants may bypass other biological barriers (pulmonary, intestina), or compounds in the diet or nutritional supplements may reach systemic circulation and, thus, the placenta. However, AhR activation could also arise from changes in the levels of endogenously produced ligands arising from placental metabolic activity. We found that protein expression of IDO1 enzyme follows a similar pattern to that of AhR from the first to third trimesters (Figure 8). IDO1 is a tryptophan catabolizing cytosolic enzyme, which plays a primary role in maternal-fetal tolerance by stimulating the differentiation of T lymphocytes and, thus, allowing immunotolerance [26]. In the placenta, IDO1 catabolizes the L-tryptophan to produce kynurenine, an endogenous AhR ligand [24], which may trigger the generation of Treg cells within the decidua through the binding and direct activation of AhR. It has indeed been observed in mice cells that kynurenine induce the generation of Treg through AhR activation [48]. Recently, Walker et al. [49] demonstrated an increased kynurenine production (around 200 ng/mg of tissue) at term as compared to the first trimester (30 ng/mg of tissue) in placental explant cultures. These results are in agreement with our results concerning the levels of IDO1 protein during pregnancy. It is important to note that we have attempted to exclude technical issues that could be responsible for an artificial induction of IDO1 in term placentae during tissue dissection (from direct contact with blood that contains kynurenine). Tissue dissections are performed rapidly (under 30 min) and, after several washes in HBSS media, are frozen in liquid nitrogen. The same protocol was applied for first trimester placentae, where IDO1 was not induced (Figure 3).

We observed different levels of AhR protein expression in term placentae of different individuals even after excluding the possibility of area-dependent internal variation of AhR levels within the placental tissues (Figure S2). Inter-individual variation in AhR mRNA levels has been observed in human placentae [30]. This could be the result of exposure of the individual to environmental toxicants (from ambient pollution and/or food), to food components (cruciferous plants contain AhR ligands) [46,50], or the result of differing IDO1-expression/activity between individuals. In a recent transcriptomic study, increased expression of IDO1 mRNA (around three-fold changes) was observed in male versus female cytotrophoblasts [51], which suggests that sex-dependency also should be considered when analyzing gene expression of human placental villi. However, no sex-variation in AhR expression has been found so far. Finally, inter-individual variation could also be explained by exposure to non-AhR ligands, which, nevertheless, modify AhR levels, as previously demonstrated in the mouse brain after in utero exposure to bisphenol A [52].

Immunocytochemical studies of mouse hepatomas revealed that the AhR is predominantly a cytosolic receptor under normal conditions and that the AhR relocates to the nucleus after

exposure to xenobiotics, such as TCDD [53,54]. Cytosolic AhR is bound to a multi-protein chaperone complex in a conformation that allows ligand binding [6,13]. However, AhR has been found to shuttle between the nucleus and the cytosol in the absence of exogenous ligands. Although the binding of ligands increases the rate of nuclear import of AhR, it does not eliminate nuclear export of AhR [54]. In the present study, we found that AhR was localized to the nucleus in all of the models studied, which included purified primary trophoblasts (in the undifferentiated cytotrophoblasts and in differentiated syncytiotrophoblasts), the BeWo cell line, and placental chorionic villous cells (Figure 8). Our evidence of AhR nuclear localization is supported by the use of a series of controls, such as the testing of several commercial antibodies as well as by the optimization of experimental protocols. The localization of AhR in the nucleus is also observed in freshly harvested tissues that have been fixed and included in agarose. Thus, the influence of culture conditions, which can interfere with the localization of AhR, are excluded in this case. Since false positive staining may occur upon immunolabeling of AhR, we performed additional experiments employing cell fractionation in order to confirm the cellular localization of AhR. We also used phosphatase inhibitors in our fractionation study, as AhR-dephosphorylation could modify its localization during the experimental protocol. Evidence for the nuclear localization of AhR using immunohistochemistry (IHC), solely in the syncytiotrophoblasts of chorionic villi of both first and third trimester placenta, also was mentioned by Stejskalova et al. [30]. In order to better understand the activity of AhR in the nucleus, it would be of interest to further investigate the formation of complexes with its known partners, such as ARNT or other nuclear proteins, by performing chromatin immunoprecipitation in placental tissues and trophoblasts, in the absence of any voluntarily-added exogenous ligand.

The nuclear localization of AhR in our studies could be due to the presence of some endogenous ligands produced by placental tissue, such as kynurenine, which are present, albeit in low amounts, from the first trimester of pregnancy as has been described by Murthi et al. [49]. This is in agreement with our results of an AhR nuclear localization in other placental cell types, such as fibroblasts and endothelial cells (Figure S6). In a paper by Jiang et al. [29] using IHC, the authors concluded that AhR could also be expressed in some large vessel endothelial cells and in umbilical cord vessels. The AhR in endothelial cells could participate in the regulation of normal placental vascular functions, such as vascular remodeling, vasoconstriction, and vasodilatation, as observed in mice [55]. Interestingly, a permanent shear stress by the flow of blood through placental villi can also explain the activation of AhR as demonstrated by Conway et al. [56] in human umbilical endothelial cells (HUVEC and HAEC cell lines). These results correlate with the results that we obtained with our placental models. We have concluded that AhR is located in the nucleus of both undifferentiated cytotrophoblast and syncytiotrophoblast (Figure 4C). The nuclear localization of AhR also was observed in BeWo cells and the use of CH223191 AhR antagonist did not led to a cytosolic redistribution of AhR (Figure 6A). Taken together, the nuclear location and the constitutive activity of AhR at term suggest that AhR contributes to some physiological function in the placenta.

When we analyzed the amount of AhR protein by Western blot, we observed, mainly, the presence of two bands (p95 and p130). These bands were specific to AhR since the use of a specific blocking peptide (in excess) for the C-terminal epitope of the AhR antibody led to the absence of all bands of AhR in both chorionic villi (Figure 1C) and BeWo (Figure 5B) protein extracts. The two-band profile of AhR was also observed in extracts of nuclear-enriched fractions, after cell fractionation, and was not modified when the AhR inhibitor, CH223191, was applied to the cells (Figure 6B). The antibody (epitope between amino acids 721–821 in the C-terminus) used in our Western blots does not recognize either the AhRR or the ARNT proteins, both of which have some degree of protein homology with AhR within the *N*-terminus. The appearance of a doublet of AhR (104 and 106 kDa) on Western blots from several cell lines has been mentioned before in the literature. The bands were not modified by the use of a β-naphtoflavone or TCDD and were probably not due to proteolysis during homogenization protocols. They were attributed, potentially, to two forms of AhR in human cells [57]. However, we observed that the p130 AhR

band was increased when VCT differentiated into ST (Figures 4 and 8). This was accompanied by an increased transcriptional activity of AhR in ST as was also observed with both CYP1A1 and CYP1B1 (Figure 4D). This could be due to some post-translational modifications of AhR, which occur when cells differentiate to ST, such as phosphorylation, ubiquitination, and SUMOylation, all of which are known to affect the status and activity of AhR. Post-translational modifications of AhR have already been described in human and hamster cells: Phosphorylation/dephosphorylation of the AhR at Ser12 and/or Ser36 residues, in proximity to the nuclear localization signal (NLS) or nuclear export signals (NES), were associated with a cytosolic versus nuclear AhR distribution, respectively, and with AhR activation [32,47,58]. Whereas ubiquitination of AhR promotes its degradation by the proteasome pathway [59], the SUMOylation of K63 and K510 has been demonstrated to enhance AhR stability [60]. In our work, the difference in size between the two AhR bands (p95 vs p130), their modulation during differentiation of VCT to ST (increased p130 band) (Figure 4B), and the difference in AhR-activity (*CYP1A1* and *CYP1B1* induction) (Figure 4D) suggest that post-translational modifications may finely modulate AhR transactivation when it is localized in the nuclei of trophoblast cells. We plan to address these aspects in a future work dealing with nuclear localization, expression, and activity.

Finally, in the BeWo trophoblast model, which is often used when addressing the effects of pollutants on the placental barrier, we observed that the level of AhR and its transcriptional activity were a function of the density of the cells (Figure 5A,B,E). Cell density has previously been described to influence and regulate the intracellular localization of AhR as well as its activity after exposure to pollutants [32]. We demonstrated here that exposure of BeWo cells to a strong ligand, such as B(a)P, did not modify AhR nuclear localization, either after short term exposure or after longer exposure periods (3 h and 24 h) (Figure 6). The AhR antagonist, CH223191, neither changed this nuclear localization. The intrinsic activity of the AhR toward *CYP1A1* was inhibited significantly by CH223191 (Figure 7B) alone, which reinforce the hypothesis of an endogenous activator of AhR in BeWo cells. Nevertheless, AhR activity was strongly increased by incubation of cells with 1 µM of B(a)P as compared to the induction of CYP450 gene transcription, which were partially (*CYP1A1* and *CYP1B1*) or totally (*CYP1A2*) inhibited by incubation with an AhR inhibitor (Figure 7B). In a next work, it will be interesting to check other AhR-inhibitors, such as alpha-naphtoflavone, 1,3-dichloro-5-[(1E)-2-(4-chlorophenyl)ethenyl]-benzene, or 6,2′,4′-Trimethoxyflavone, because they have various selectivities of antagonisms.

Seven types of PAH pollutants have been detected in a cohort of 200 pregnant women who had normal outcomes. Amounts as high as 6.15 ng/g dry weight placenta of B(a)P were found [33]. PAHs have been shown to be retained in the placenta and to be implicated in complications of pregnancies [61]. We show here that incubation with B(a)P has important consequences for IDO1 protein stability (Figures 7 and 8). This could be due to the fact that IDO1, as a heme enzyme, is subject to redox control by the oxygen environment [62] and AhR-dependent metabolization of B(a)P leads to ROS generation. Thus, we hypothesize that pollutants, such as B(a)P, may interfere with some endogenous activity of AhR in the placenta. Pollutants switch the activity of AhR toward their own metabolism instead of those of endogenous compounds, such as retinol, for example. Similar reasoning has been put forward to explain how elevated levels of aromatic hydrocarbons may lead to impaired placental functioning by reducing the endocrine (gonadotropin, estrogen receptor, and hPL) and metabolic (glutathione transferase, phosphatase, and LDH) activities of the placenta [63].

4. Materials & Methods

4.1. Placentae Collection and Chorionic Villi Isolation

Placentae were collected from non-smoking, healthy women with pregnancies either delivered from elective and legally terminated pregnancies (during the first trimester between 8–9 and 12–14 weeks amenorrhea (WA)) or by Caesarean sections (between 37 and 39 weeks amenorrhea, hereafter called "term"). Placentae were obtained from the Port-Royal Maternity, the Mutualist

Institute Montsouris, the Private Hospital of Antony, the Beclere Hospital, and the Beaujon Hospital after obtaining written consents from informed patients and approval from our local ethics committee (CPP: 2015-May-13909). The study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki. Placentas were obtained with the patients' written informed consent. After collection, placental tissues were washed in Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free Hanks' Balanced Salt solution (HBSS, Gibco #14175, ThermoFisher, Illkirch, France). Then, chorionic villi were gently scraped free from vessels and connective tissue, and dissected into about 25 mg fragments and either frozen in liquid nitrogen, and then stored at −80°C for later total RNA and protein extraction; or fixed in 4% paraformaldehyde at 4 °C for 4h and then kept in PBS buffer for further immunolabelling assays. The time for placental dissection was kept under 30 min, and tissues were snap frozen with liquid nitrogen to limit tissue degradation [31].

4.2. Explants

Random harvested villi from term placentae, dissected as above, with a similar weight, were hung on needles and completely immerged in OptiMem media (Phenol Red-free, Gibco) as hanging villi, for 24 and 48 h, in 24-wells plates (Corning, Schiphol-Rijk, Netherlands) developed by SA Degrelle as previously described [64].

4.3. Cell Culture

The mononucleated villous cytotrophoblasts (VCT) were isolated, based on the methods of [65] and in a modified version of [66]. After dissection, the chorionic villi were washed in Ca^{2+}, Mg^{2+}-free HBSS, and then digested in trypsin-digestion medium (HBSS 5 mL/g containing 0.1% trypsin (Sigma-Aldrich #27250-018, Saint Quentin Fallavier, France), 0.1 M $MgSO_4$ (Merck #5886-0500), 0.1 M $CaCl_2$ (Merck #1-02820-1000, Fontenay sous Bois, France), 4% milk, and 50 Kunitz/ml DNAse type IV (Sigma-Aldrich #D5025) for 30 min at 37 °C without agitation. This was repeated eight times with 10 min incubation with the same trypsin solution. The three first trypsin digestions, containing a mix of extravillous cytotrophoblasts and VCT, were discarded after light microscopic analysis and the three last ones, containing a majority of VCT, were kept and pooled. The chorionic villi were washed finally with warm HBSS (37 °C). Each time, the supernatant containing VCT was collected after tissue sedimentation, filtered (40-µm pores), and incubated with 10% FCS (vol/vol) to stop trypsin activity. After purification by Percoll gradient, VCT were resuspended and were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Gibco 15140-122) at 120,000 cells/cm^2 cells on 35-mm or 60-mm culture dishes (Techno Plastic Products (TPP), Trasadingen, Switzerland). After 12h of culture, VCT were carefully washed to eliminate non-adherent cells. Purified VCT cultures were characterized by the ability to aggregate at 48 h of culture and to form ST at 72 h, and by following the production of hCG into the supernatant. Cells were harvested and frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C until RNA or protein extraction.

The choriocarcinoma human cell line BeWo derived clone, b30 (by Alan L. Schwartz) [67], was cultured in F-12K Medium (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium, Gibco), supplemented with 10% FCS (Eurobio #CVFSVF00-01, Les Ulis, France), 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin. Cells were seeded at 12,000 cells/cm^2 in 35-mm or 60-mm TPP culture dishes. Cells were collected at 24 h, 48 h, and 72 h for total RNA or protein extraction or fixed in 4% paraformaldehyde for further immunolabelling.

4.4. Other Cell Types

Mesenchymal cells (MC) from the first trimester villi were purified as previously described [68]. Artery (A) and veins (V) endothelial cells were obtained from first trimester umbilical cord after dissection. Heterogeneous cell mixture (HC) from first trimester umbilical cord obtained by type I collagenase composed of choriotrophoblasts and mesenchymal cells. Endothelial progenitor cells (EPC) purified from term placenta as previously described were graciously given by C. Boisson-Vidal [69].

4.5. Cell and Explant Incubation

Benzo-(a)-pyrene (B(a)P) (Sigma-Aldrich) was dissolved in DMSO at 40 mM, stored at 4 °C and used at a final concentration of 1 µM in culture medium. The final concentration of DMSO in the culture media was 0.0025%. All controls and incubated cultures contained the same amount of DMSO. CH223191 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) was used at 3 µM in culture medium (stock at 3 mM in DMSO) and was incubated with cells for 1 h prior to B(a)P incubation.

4.6. RNA Extraction, Reverse Transcription, and Quantitative Real-Time PCR

BeWo cells in 35 mm petri dishes and placenta fragments stored at −80°C were lysed in TRIzol®. Total RNAs were then extracted following the manufacturer's instructions using the Direct-zol RNA Miniprep kit (Zymo research, #R2052, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and quantified using a Nanodrop spectrophotometer. Reverse transcription was performed using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) for 1 µg RNA. Gene-specific primers used for the real-time PCR were designed using the OLIGO Explorer software (Molecular Biology Insights, Hawthorne, NY, USA) (Table 3). Quantitative real-time PCR was carried out in a 10 µL reaction volume containing 1 µg of cDNA, 45 nM of each primer, and Takyon™ MasterMix (Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue, Eurogentec, Angers, France) using an ABI Prism 7900 Sequence Detector system (Applied Biosystems). PCR cycles consisted of the following steps: Takyon activation (3 min, 95 °C), denaturation (10 s, 95 °C), and annealing and extension (1 min, 60 °C). The threshold cycle (Ct) was measured as the number of cycles at which the reporter fluorescent emission first exceeds the background. The relative amounts of mRNA were estimated using the ΔΔCt method and then expressed as fold change. Primers for *HPRT*, *RPL13*, and *ubiquitin C* were used for the normalization of the results obtained with the BeWo cell line; *HPRT*, *RPL13*, and *18S*, then *KRT7*, for the normalization of the results obtained with placental villi, and *HPRT*, *RPL0, SDHA*, and *18S* for the normalization of the results obtained with trophoblasts. The results are given as fold change and each gene was normalized to the geometric mean of at least 3 reference genes that were found to be unchanged among the different conditions used.

Table 3. Primer sequences.

AhR	forward 5′-TAACCCAGACCAGATTCCTC-3′
	reverse 5′-GCAAACAAAGCCAACTGAG-3′
AhRR	forward 5′-CGCCTCAGTGTCAGTTACC-3′
	reverse 5′-ACTCACGACCAGAGCAAAG-3′
ARNT	forward 5′-CCCCTCCTGTAACCATTC-3′
	reverse 5′-CTGCCCACACCAAACTG-3′
β-actin	forward 5′-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3′
	reverse 5′-ACAATGAGCTGCGTGTGGCT-3′
βhCG	forward 5′-GCTACTGCCCCACCATGACC-3′
	reverse 5′-ATGGACTCGAAGCGCACATC-3′
Catalase	forward 5′-TTCATCCAGAAGAAAGCGGTCAA-3′
	reverse 5′-TGGATGTGGCTCCCGTAGTCA-3′
CYP11A1	forward 5′-TTTTTGCCCCTGTTGGATGCA-3′
	reverse 5′-CCCTGGCGCTCCCCAAAAAT-3′
CYP19	forward 5′-CCTGAAGCCATGCCTGCTGC-3′
	reverse 5′-CCGATCCCCATCCACAGGAATCT-3′

Table 3. *Cont.*

CYP1A1	forward 5′-CCACAGCACAACAAGAGAC-3′
	reverse 5′-CCATCAGGGGTGAGAAAC-3′
CYP1A2	forward 5′-TGCCAAACAGCATCATCTTG-3′
	reverse 5′-ACAGCACAACAAGGGACACA-3′
CYP1B1	forward 5′-AACGTACCGGCCACTATCAC-3′
	reverse 5′-CAGTGGTGGCATGAGGAATA-3′
GH2	forward 5′-CACCTTCCAACAGGGTGAAAA-3′
	reverse 5′-GGTGGCGATAGACGTTGCT-3′
GSS	forward 5′-GGAACATCCATGTGATCCGAC-3′
	reverse 5′-GGAACATCCATGTGATCCGAC-3′
GSTA2	forward 5′-TTGGGCTCTATGGGAAGGAC-3′
	reverse 5′-GGGAGATGTATTTGCAGCGGA-3′
hPL	forward 5′-GCATGACTCCCAGACCTCCTT-3′
	reverse 5′-TGCGGAGCAGCTCTAGATTGG-3′
HO1	forward 5′-CGTTCCTGGTCAACATCC-3′
	reverse 5′-CTGTCGCCACCAGAAAG-3′
HPRT	forward 5′-GGCGTCGTGATTAGTGATG-3′
	reverse 5′-CAGAGGGCTACAATGTGATG-3′
KRT7	forward 5′-GGACATCGAGATCGCCACCT-3′
	reverse 5′-ACCGCCACTGCTACTGCCA-3′
NQO1	forward 5′-GCAGACCTTGTGATATTCCAG-3′
	reverse 5′-CCTATGAACACTCGCTCAAAC-3′
NRF2	forward 5′-TGACATACTTTGGAGGCAAG-3′
	reverse 5′-CTAAATCAACAGGGGCTACC-3′
PLGF	forward 5′-GCTCGTCAGAGGTGGAAGTGGT-3′
	reverse 5′-CTCGCTGGGGTACTCGGACA-3
RPL0	forward 5′- AACATCTCCCCCTTCTCCT-3′
	reverse 5′- ACTCGTTTGTACCCGTTGAT-3′
RPL13	forward 5′- AAGGTCGTGCGTCTGAAG-3′
	reverse 5′-GAGTCCGTGGGTCTTGAG-3′
SDHA	forward 5′- CCACCACTGCATCAAATTCATG-3′
	reverse 5′-TGGGAACAAGAGGGCATCTG-3′
SOD1	forward 5′-CTGAAGGCCTGCATGGATTC-3′
	reverse 5′-CCAAGTCTCCAACATGCCTCTC-3′
SOD2	forward 5′-GTTCAATGGTGGTGGTCATA-3′
	reverse 5′-GTAAGTGTCCCCGTTCCTT-3′
***Ubiquitin* C**	forward 5′-CACTTGGTCCTGCGCTTGA-3′
	reverse 5′-TTTTTTGGGAATGCAACAACTTT-3′
18S	forward 5′- TCCCCCAACTTCTTAGAGG-3′
	reverse 5′-CTTATGACCCGCACTTACTG-3′

4.7. RNA Extraction, Reverse Transcription and PCR

CT seeded for 24 h in 35 mm petri dishes were lysed in TRIzol®. Total RNAs were then extracted following the manufacturer's instructions using the Direct-zol RNA Miniprep kit (Zymo research, #R2052) and quantified using a Nanodrop spectrophotometer. Reverse transcription was performed using the SuperScript III First Strand Synthesis system (Invitrogen 18080044, Villebon-sur-Yvette, France) for 500 ng RNA. PCR was carried out in a 50 µL reaction volume following the manufacturer's instruction (GoTaq DNA polymerase kit, Promega M3005, Charbonnières les Bains, France) using an ABI Prism 7900 Sequence Detector system (Applied Biosystems). PCR cycles consisted of the following steps: Initial denaturation (5 min, 94 °C), denaturation (30 s, 94 °C), annealing (30 s, 57 °C), and extension (30 s, 72 °C). Amplification products were analyzed directly on 2% agarose gel and evaluated under UV light (Minibis, DNR Bio-imaging systems, Dublin, Ireland).

4.8. Cell Fractionation

Nuclear and cytoplasmic fractions, from BeWo cells or from chorionic villi, were prepared by a conventional differential centrifugation procedure using the NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction kit (Thermofisher, #78833, Villebon-sur-Yvette, France). Cells were harvested with trypsin-EDTA, centrifuged at 500× *g* for 5 min; then, pellets were collected, washed with PBS buffer, centrifuged again, and dry-pellets were then allowed to swell for 15 min in an ice-cold CER I buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Freshly harvested chorionic villi were dissected into approximatively 20–100 mg of tissue fragments, washed with PBS, and centrifuged at 500× *g* for 5 min. Dry-pellets were collected and homogenized in ice-cold CER I buffer at a volume of 200 µL for 20 mg tissue, or for 20 µL of collected cells. Cell disruption was performed by vortexing for 20 s (10 times) on the highest setting and verified under the microscope by staining the nuclei of broken cells with Trypan Blue (*v*/*v*). Then homogenates were incubated on ice for 10 min, CER II buffer added (11 µL), vortexed for 5 s, incubated on ice for another 1 min, vortexed again for 5 s, and centrifuged at 16,000× *g* for 5 min. The supernatant containing the cytoplasmic extracts were immediately transferred to a clean pre-chilled tube and stored at −80°C. Pellets containing nuclear fractions were suspended in ice-cold NER buffer (100 µL), vortexed for 15 s, placed on ice, and underwent vortexing for 15 s every 10 min, for a total of 40 min. Then homogenates were centrifuged at 16,000× *g* for 10 min and the supernatants containing nuclear extracts were stored at −80 °C for further analysis. Fraction purity was controlled by immunoblotting with α-Tubulin and Lamin A/C for the cytosolic and nuclear fractions, respectively.

4.9. Western Blot

Total protein extracts from BeWo cells or placental tissues were obtained by harvesting cells in Laemmli buffer (0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, protease inhibitors (Calbiochem), phosphatase inhibitor (Calbiochem)), heated for 1 min at 95 °C, and then sonicated. Protein concentrations were determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermofisher). Equal amounts of proteins (40 µg) were separated on 4–15% SDS-PAGE mini-PROTEAN® TGX™ precast protein gel under reducing conditions (DTT) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Trans-blot Turbo Transfer pack, 0.2 µm nitrocellulose, Bio-rad, Marnes la Coquette, France). Blots were incubated overnight with the primary antibody at 4 °C, and then for 2 h with the appropriate DyLight 680 or 800 Fluor-conjugated secondary antibody (Thermo Scientific). The primary antibodies used were: Mouse monoclonal anti-AhR at 4 µg/mL (#WH0000196-M2, Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti-ARNT (A-3, sc-17811, Santa Cruz, Heidelberg, France), mouse polyclonal anti-TDO2 (SAB1406519, Sigma-Aldrich), rabbit monoclonal anti-IDO1 (86630, Cell signaling technology, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), mouse monoclonal anti-α-Tubulin (#MS-581-P0, ThermoFisher), rabbit polyclonal anti-Lamin A/C (H-110, #sc-20681, Santa Cruz), mouse monoclonal anti β-Actin (A5441, Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti-vinculin (V9131, Sigma-Aldrich), and mouse

monoclonal anti-CD31 (M0823, Dako, Les Ulis, France). Anti-AhR antibody at 4 μg/mL was also preincubated overnight at 4 °C with the corresponding antigen at 40 μg/mL (hereafter called blocking peptide, APREST78064, Sigma-Aldrich) in order to confirm its specificity. Secondary antibodies were IRDye 800CW-conjugated anti-mouse (#926-32212, Li-COR, Bad Homburg, Germany) or DyLight 680-labeled anti-rabbit (#35568, Thermo Scientific), and blots were scanned with an Odyssey® Imaging System (Li-COR). Quantitation was performed using Li-COR Odyssey software. In some blot images, unnecessary lanes were cut off and clearly demarcated using black lines.

4.10. Tissue Immunolabelling

Placental villi fixed in 4% paraformaldehyde were included in 5% agarose, sliced in 100 μm sections using a vibratome and permeabilized in 0.5% triton X-100 in PBS for 30 min. Sections were saturated with a solution of 3% bovine serum albumin (BSA) and triton 0.1% X-100 in PBS for 4 h and then incubated overnight at 4 °C under agitation either with the primary antibody, with non-specific rabbit IgG1, or with a mixture of the anti-AhR antibody at 1 μg/mL and the corresponding antigen at 10 μg/mL (APREST78064, Sigma-Aldrich) that correspond to the sequence between 721 and 820 amino acids (C-terminus) of human AhR. Primary antibodies used were: 1 μg/mL anti-AhR antibody #WH0000196-M2, #A9359, #HPA029722, and #HPA029723 (Sigma-Aldrich), #Ab2770 (Abcam, Cambridge, United Kingdom), and 0.75 μg/mL anti-Cytokeratin 7 (#M7018, Dako, Les Ulis, France). After washing, the sections were incubated with Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibodies in 1% PBS-BSA for 2 h at room temperature. Nuclei were stained with DAPI for 5 min and Vectashield was used as mounting media for confocal microscopy images (Leica TCS SP2 confocal microscope, Leica Microsystems, Nanterre, France).

4.11. Cell Immunolabelling

At 24 h after seeding in 30 mm culture dishes (TPP), BeWo cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 10 min, saturated with a solution of 1% BSA and 0.1% Tween in PBS for 2 h, and then incubated overnight at 4 °C with anti-AhR antibody as previously (1 μg/mL) or a mixture of 1μg/mL anti-AhR antibody (#WH0000196-M2) and 10 μg/mL of the corresponding antigen, and with 1 μg/mL anti-E-cadherin antibody (#EP700Y, Abcam). The primary antibodies were diluted in PBS containing 1% BSA and 0.1% tween. After washing, the cells were incubated with Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse and/or Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody for 2 h at room temperature. Nuclei were stained with DAPI for 5 min and Dako fluorescence mounting medium was used for microscopy images. Images were taken by confocal or epifluorescence microscopy.

4.12. Statistical Analysis

The experiments were reproduced at least three times. For the ontogeny and for trophoblast differentiation, a minimum of $n = 8$ independent placentae were used. Quantified data are expressed as the means ± standard deviation. The mean values were analysed by a one-way ANOVA followed by a Mann Whitney's test (Prism) and the level of significance was fixed at $p < 0.05$.

5. Conclusions

In conclusion, we have described here a complete spatio-temporal cartography of the expression and distribution of the AhR transcription factor—a key factor with several functions (detoxification and physiological processes)—in several human placental models (Figure 8). Our data strongly suggest a constitutive nuclear localization of AhR and its intrinsic activation in human term placenta due to the presence of some endogenous ligands produced by placental metabolism. Interference with this physiological function of AhR may explain pregnancy complications observed, for instance, after exposure to pollutants that activate the AhR pathway.

Supplementary Materials: The Supplementary Materials are available online at http://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3762/s1.

Author Contributions: A.W. performed most of the experiments and drafted the manuscript; C.T.-R. helped with the qPCR design, analysis and interpretation; M.N. and J.D. performed the western blots and fractionations; A.C. helped with the confocal acquisitions and analysis; F.V. and S.A.D. performed qPCR on purified trophoblasts and analysis of data. S.B. and T.F. interpreted data and revised the manuscript. I.F. and X.C. conceived and designed the experiments, interpreted the data, wrote and revised the manuscript; S.G. interpreted data, supervised the work and revised the manuscript; S.G., X.C. and S.B. obtained the grant for this project. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This project has received funding from ANSES, a French grant (BarBaPAhR N 2015-1-113[29]) with which AW was financed. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Acknowledgments: The authors would like to thank Josette Badet for advice on the blocking peptide, antibodies and providing some precious samples; are grateful to Nathalie Ly for some placentae samples and to Catherine Boisson-Vidal for EPC cells. Special thanks to Amal Zerrad-Saadi for her critical reading and valuable advices and to Lawrence Aggerbeck for English language editing. The authors also thank the Platform of "Cellular and Molecular Imaging", INSERM UMS 025—CNRS UMS 3612, Faculty of Pharmacy of Paris, Paris Descartes University, France. The following are acknowledged for placental disposals: The Port-Royal Maternity, the Mutualist Institute Montsouris, the Private Hospital of Antony, the Beclere Hospital and the Beaujon Hospital (Paris, France).

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

References

1. Burton, G.J.; Jauniaux, E. What is the placenta? *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2015**, *213* (Suppl. 4), S6.e1–S6.e4. [CrossRef] [PubMed]
2. Burton, G.J.; Fowden, A.L. The placenta: A multifaceted, transient organ. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2015**, *370*, 20140066. [CrossRef] [PubMed]
3. Challier, J.C.; Vervelle, C.; Uzan, S. Ontogenesis of villi and fetal vessels in the human placenta. *Fetal Diagn. Ther.* **2001**, *16*, 218–226. [CrossRef] [PubMed]
4. Denison, M.S.; Nagy, S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *43*, 309–334. [CrossRef] [PubMed]
5. Juricek, L.; Bui, L.C.; Busi, F.; Pierre, S.; Guyot, E.; Lamouri, A.; Dupret, J.M.; Barouki, R.; Coumoul, X.; Rodrigues-Lima, F. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by carcinogenic aromatic amines and modulatory effects of their N-acetylated metabolites. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 2403–2412. [CrossRef] [PubMed]
6. Barouki, R.; Aggerbeck, M.; Aggerbeck, L.; Coumoul, X. The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug Metab. Drug Interact.* **2012**, *27*, 3–8. [CrossRef] [PubMed]
7. Kawajiri, K.; Fujii-Kuriyama, Y. Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *464*, 207–212. [CrossRef] [PubMed]
8. Song, Z.; Pollenz, R.S. Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 806–816. [CrossRef] [PubMed]
9. Mimura, J.; Ema, M.; Sogawa, K.; Fujii-Kuriyama, Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 20–25. [CrossRef] [PubMed]
10. Cella, M.; Colonna, M. Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity. *Semin. Immunol.* **2015**, *27*, 310–314. [CrossRef] [PubMed]
11. Julliard, W.; Fechner, J.H.; Mezrich, J.D. The aryl hydrocarbon receptor meets immunology: Friend or foe? A little of both. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 458. [PubMed]
12. Hao, N.; Whitelaw, M.L. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 561–570. [CrossRef] [PubMed]
13. Guyot, E.; Chevallier, A.; Barouki, R.; Coumoul, X. The AhR twist: Ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 479–486. [CrossRef] [PubMed]
14. Stejskalova, L.; Dvorak, Z.; Pavek, P. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: Current state of art. *Curr. Drug Metab.* **2011**, *12*, 198–212. [CrossRef] [PubMed]
15. Abbott, B.D.; Schmid, J.E.; Pitt, J.A.; Buckalew, A.R.; Wood, C.R.; Held, G.A.; Diliberto, J.J. Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, *155*, 62–70. [CrossRef] [PubMed]

16. Murray, I.A.; Patterson, A.D.; Perdew, G.H. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: Friend and foe. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 801–814. [CrossRef] [PubMed]
17. Fernandez-Salguero, P.; Pineau, T.; Hilbert, D.M.; McPhail, T.; Lee, S.S.; Kimura, S.; Nebert, D.W.; Rudikoff, S.; Ward, J.M.; Gonzalez, F.J. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* **1995**, *268*, 722–726. [CrossRef] [PubMed]
18. Barouki, R.; Coumoul, X.; Fernandez-Salguero, P.M. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3608–3615. [CrossRef] [PubMed]
19. Juricek, L.; Carcaud, J.; Pelhaitre, A.; Riday, T.T.; Chevallier, A.; Lanzini, J.; Auzeil, N.; Laprevote, O.; Dumont, F.; Jacques, S.; et al. AhR-deficiency as a cause of demyelinating disease and inflammation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9794. [CrossRef] [PubMed]
20. Baba, T.; Mimura, J.; Nakamura, N.; Harada, N.; Yamamoto, M.; Morohashi, K.; Fujii-Kuriyama, Y. Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol. Cell Biol.* **2005**, *25*, 10040–10051. [CrossRef] [PubMed]
21. Quintana, F.J.; Basso, A.S.; Iglesias, A.H.; Korn, T.; Farez, M.F.; Bettelli, E.; Caccamo, M.; Oukka, M.; Weiner, H.L. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **2008**, *453*, 65–71. [CrossRef] [PubMed]
22. Stevens, E.A.; Mezrich, J.D.; Bradfield, C.A. The aryl hydrocarbon receptor: A perspective on potential roles in the immune system. *Immunology* **2009**, *127*, 299–311. [CrossRef] [PubMed]
23. Somerset, D.A.; Zheng, Y.; Kilby, M.D.; Sansom, D.M.; Drayson, M.T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* **2004**, *112*, 38–43. [CrossRef] [PubMed]
24. Hao, K.; Zhou, Q.; Chen, W.; Jia, W.; Zheng, J.; Kang, J.; Wang, K.; Duan, T. Possible role of the 'IDO-AhR axis' in maternal-foetal tolerance. *Cell Biol. Int.* **2013**, *37*, 105–108. [CrossRef] [PubMed]
25. Sasaki, Y.; Sakai, M.; Miyazaki, S.; Higuma, S.; Shiozaki, A.; Saito, S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.* **2004**, *10*, 347–353. [CrossRef] [PubMed]
26. Sedlmayr, P. Indoleamine 2,3-dioxygenase in materno-fetal interaction. *Curr. Drug Metab.* **2007**, *8*, 205–208. [CrossRef] [PubMed]
27. Marshall, N.B.; Kerkvliet, N.I. Dioxin and immune regulation: Emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the generation of regulatory T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1183*, 25–37. [CrossRef] [PubMed]
28. Stejskalova, L.; Pavek, P. The function of cytochrome P450 1A1 enzyme (CYP1A1) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the placenta. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2011**, *12*, 715–730. [CrossRef] [PubMed]
29. Jiang, Y.Z.; Wang, K.; Fang, R.; Zheng, J. Expression of aryl hydrocarbon receptor in human placentas and fetal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **2010**, *58*, 679–685. [CrossRef] [PubMed]
30. Stejskalova, L.; Vecerova, L.; Perez, L.M.; Vrzal, R.; Dvorak, Z.; Nachtigal, P.; Pavek, P. Aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon nuclear translocator expression in human and rat placentas and transcription activity in human trophoblast cultures. *Toxicol. Sci.* **2011**, *123*, 26–36. [CrossRef] [PubMed]
31. Cocquebert, M.; Berndt, S.; Segond, N.; Guibourdenche, J.; Murthi, P.; Aldaz-Carroll, L.; Evain-Brion, D.; Fournier, T. Comparative expression of hCG beta-genes in human trophoblast from early and late first-trimester placentas. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2012**, *303*, E950–E958. [CrossRef] [PubMed]
32. Ikuta, T.; Kobayashi, Y.; Kawajiri, K. Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19209–19216. [CrossRef] [PubMed]
33. Gladen, B.C.; Zadorozhnaja, T.D.; Chislovska, N.; Hryhorczuk, D.O.; Kennicutt, M.C., 2nd; Little, R.E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta. *Hum. Exp. Toxicol.* **2000**, *19*, 597–603. [CrossRef] [PubMed]
34. Topinka, J.; Milcova, A.; Libalova, H.; Novakova, Z.; Rossner, P., Jr.; Balascak, I.; Sram, R.J. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part I: Bulky DNA adducts. *Mutat. Res.* **2009**, *669*, 13–19. [PubMed]
35. Mulero-Navarro, S.; Fernandez-Salguero, P.M. New Trends in Aryl Hydrocarbon Receptor Biology. *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, *4*, 45. [CrossRef] [PubMed]
36. Veldhoen, M.; Hirota, K.; Westendorf, A.M.; Buer, J.; Dumoutier, L.; Renauld, J.C.; Stockinger, B. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **2008**, *453*, 106–109. [CrossRef] [PubMed]

37. Wu, Y.; Chen, X.; Chang, X.; Huang, Y.J.; Bao, S.; He, Q.; Li, Y.; Zheng, J.; Duan, T.; Wang, K. Potential involvement of placental AhR in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Reprod. Toxicol.* **2016**, *59*, 45–52. [CrossRef] [PubMed]
38. Fan, H.; Su, X.; Yang, B.; Zhao, A. Aryl hydrocarbon receptor and unexplained miscarriage. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2017**, *43*, 1029–1036. [CrossRef] [PubMed]
39. Mori, M.; Ishikawa, G.; Luo, S.S.; Mishima, T.; Goto, T.; Robinson, J.M.; Matsubara, S.; Takeshita, T.; Kataoka, H.; Takizawa, T. The cytotrophoblast layer of human chorionic villi becomes thinner but maintains its structural integrity during gestation. *Biol. Reprod.* **2007**, *76*, 164–172. [CrossRef] [PubMed]
40. Nebert, D.W.; Jones, J.E. Regulation of the mammalian cytochrome P1-450 (CYP1A1) gene. *Int. J. Biochem.* **1989**, *21*, 243–252. [CrossRef]
41. Eaton, D.L.; Gallagher, E.P.; Bammler, T.K.; Kunze, K.L. Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: Implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* **1995**, *5*, 259–274. [CrossRef] [PubMed]
42. Tang, Y.M.; Wo, Y.Y.; Stewart, J.; Hawkins, A.L.; Griffin, C.A.; Sutter, T.R.; Greenlee, W.F. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28324–28330. [CrossRef] [PubMed]
43. Hakkola, J.; Pasanen, M.; Hukkanen, J.; Pelkonen, O.; Maenpaa, J.; Edwards, R.J.; Boobis, A.R.; Raunio, H. Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51*, 403–411. [CrossRef]
44. Li, Y.; Wang, K.; Zou, Q.Y.; Magness, R.R.; Zheng, J. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin differentially suppresses angiogenic responses in human placental vein and artery endothelial cells. *Toxicology* **2015**, *336*, 70–78. [CrossRef] [PubMed]
45. Le Vee, M.; Kolasa, E.; Jouan, E.; Collet, N.; Fardel, O. Differentiation of human placental BeWo cells by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *210*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
46. Mohammadi-Bardbori, A.; Bengtsson, J.; Rannug, U.; Rannug, A.; Wincent, E. Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1878–1884. [CrossRef] [PubMed]
47. Ikuta, T.; Tachibana, T.; Watanabe, J.; Yoshida, M.; Yoneda, Y.; Kawajiri, K. Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biochem.* **2000**, *127*, 503–509. [CrossRef] [PubMed]
48. Mezrich, J.D.; Fechner, J.H.; Zhang, X.; Johnson, B.P.; Burlingham, W.J.; Bradfield, C.A. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 3190–3198. [CrossRef] [PubMed]
49. Murthi, P.; Wallace, E.M.; Walker, D.W. Altered placental tryptophan metabolic pathway in human fetal growth restriction. *Placenta* **2017**, *52*, 62–70. [CrossRef] [PubMed]
50. Revel, A.; Raanani, H.; Younglai, E.; Xu, J.; Rogers, I.; Han, R.; Savouret, J.F.; Casper, R.F. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *J. Appl. Toxicol.* **2003**, *23*, 255–261. [CrossRef] [PubMed]
51. Cvitic, S.; Longtine, M.S.; Hackl, H.; Wagner, K.; Nelson, M.D.; Desoye, G.; Hiden, U. The human placental sexome differs between trophoblast epithelium and villous vessel endothelium. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79233. [CrossRef] [PubMed]
52. Nishizawa, H.; Imanishi, S.; Manabe, N. Effects of exposure in utero to bisphenol a on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. *J. Reprod. Dev.* **2005**, *51*, 593–605. [CrossRef] [PubMed]
53. Pollenz, R.S.; Sattler, C.A.; Poland, A. The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localizations in Hepa 1c1c7 cells by immunofluorescence microscopy. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 428–438. [PubMed]
54. Richter, C.A.; Tillitt, D.E.; Hannink, M. Regulation of subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *389*, 207–217. [CrossRef] [PubMed]
55. Detmar, J.; Rennie, M.Y.; Whiteley, K.J.; Qu, D.; Taniuchi, Y.; Shang, X.; Casper, R.F.; Adamson, S.L.; Sled, J.G.; Jurisicova, A. Fetal growth restriction triggered by polycyclic aromatic hydrocarbons is associated with altered placental vasculature and AhR-dependent changes in cell death. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2008**, *295*, E519–E530. [CrossRef] [PubMed]

56. Conway, D.E.; Sakurai, Y.; Weiss, D.; Vega, J.D.; Taylor, W.R.; Jo, H.; Eskin, S.G.; Marcus, C.B.; McIntire, L.V. Expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human endothelial cells: Regulation by fluid shear stress. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *81*, 669–677. [CrossRef] [PubMed]
57. Perdew, G.H.; Hollenback, C.E. Evidence for two functionally distinct forms of the human Ah receptor. *J. Biochem. Toxicol.* **1995**, *10*, 95–102. [CrossRef] [PubMed]
58. Jans, D.A.; Hubner, S. Regulation of protein transport to the nucleus: Central role of phosphorylation. *Physiol. Rev.* **1996**, *76*, 651–685. [CrossRef] [PubMed]
59. Ma, Q.; Baldwin, K.T. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activaton and DNA binding of AhR. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8432–8438. [CrossRef] [PubMed]
60. Xing, X.; Bi, H.; Chang, A.K.; Zang, M.X.; Wang, M.; Ao, X.; Li, S.; Pan, H.; Guo, Q.; Wu, H. SUMOylation of AhR modulates its activity and stability through inhibiting its ubiquitination. *J. Cell Physiol.* **2012**, *227*, 3812–3819. [CrossRef] [PubMed]
61. Dong, X.; Wang, Q.; Peng, J.; Wu, M.; Pan, B.; Xing, B. Transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons from mother to fetus in relation to pregnancy complications. *Sci. Total Environ.* **2018**, *636*, 61–68. [CrossRef] [PubMed]
62. Yeung, A.W.; Terentis, A.C.; King, N.J.; Thomas, S.R. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. *Clin. Sci.* **2015**, *129*, 601–672. [CrossRef] [PubMed]
63. Wierzba, W.; Radowicki, S.; Bojar, I.; Pinkas, J. Effects of environmental pollution with aromatic hydrocarbons on endocrine and metabolic functions of the human placenta. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2018**, *25*, 157–161. [CrossRef] [PubMed]
64. Valero, L.; Alhareth, K.; Gil, S.; Simasotchi, C.; Roques, C.; Scherman, D.; Mignet, N.; Fournier, T.; Andrieux, K. Assessment of dually labelled PEGylated liposomes transplacental passage and placental penetration using a combination of two ex-vivo human models: The dually perfused placenta and the suspended villous explants. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532*, 729–737. [CrossRef] [PubMed]
65. Kliman, H.J.; Nestler, J.E.; Sermasi, E.; Sanger, J.M.; Strauss, J.F., 3rd. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* **1986**, *118*, 1567–1582. [CrossRef] [PubMed]
66. Alsat, E.; Mirlesse, V.; Fondacci, C.; Dodeur, M.; Evain-Brion, D. Parathyroid hormone increases epidermal growth factor receptors in cultured human trophoblastic cells from early and term placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1991**, *73*, 288–295. [CrossRef] [PubMed]
67. Wice, B.; Menton, D.; Geuze, H.; Schwartz, A.L. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Exp. Cell Res.* **1990**, *186*, 306–316. [CrossRef]
68. Gerbaud, P.; Pidoux, G.; Guibourdenche, J.; Pathirage, N.; Costa, J.M.; Badet, J.; Frendo, J.L.; Murthi, P.; Evain-Brion, D. Mesenchymal activin-A overcomes defective human trisomy 21 trophoblast fusion. *Endocrinology* **2011**, *152*, 5017–5028. [CrossRef] [PubMed]
69. Bompais, H.; Chagraoui, J.; Canron, X.; Crisan, M.; Liu, X.H.; Anjo, A.; Tolla-Le Port, C.; Leboeuf, M.; Charbord, P.; Bikfalvi, A.; et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood* **2004**, *103*, 2577–2584. [CrossRef] [PubMed]



© 2018 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 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Supplementary Materials

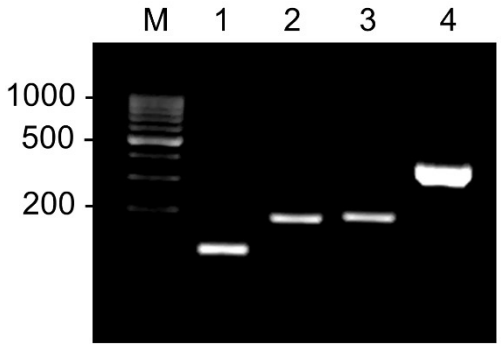


Figure S1. Test of the designed gene-specific primers. Total RNA extracted from human primary villous cytotrophoblasts was analyzed by RT-PCR using primers for *AhR* (lane 1), *AhRR* (lane 2), *ARNT* (lane 3) and *β-actin* (lane 4). DNA molecular size marker (100bp ladder) was deposed in lane M.

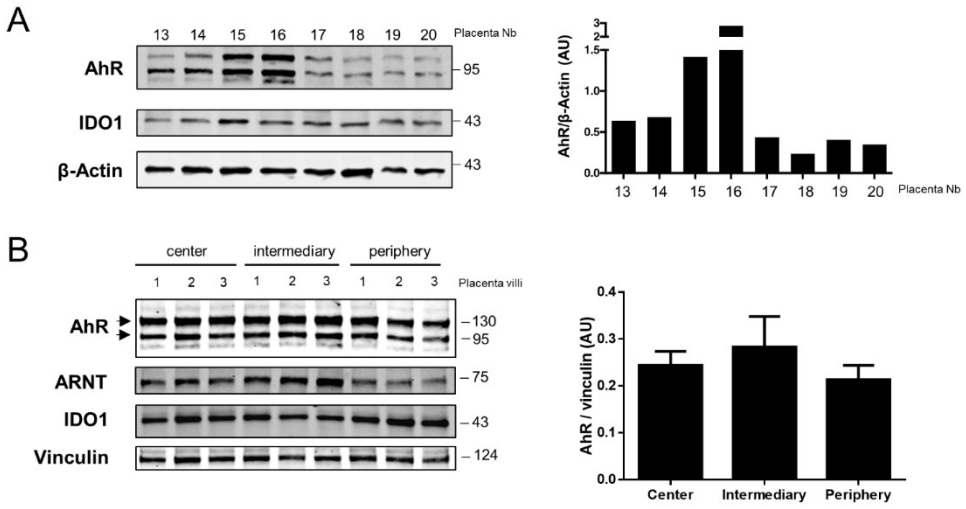


Figure S2. Expression of the AhR and IDO1 proteins in different sections of the placenta at term. (A) Immunoblotting of AhR and IDO1 in total protein extracts of villi from 8 individual placentae after migration on SDS-PAGE. β-Actin is used as loading control. The quantification of total AhR-bands (2 bands) normalized to β-Actin is shown (right plot). Placentae number 13, 15, 17 and 18 respectively correspond to placentae number 9, 10 11 and 12 on the figure 1C. **(B)** Three distinct chorionic villi have been harvested from different areas of placentae from the center (close to umbilical cord), the inner side (intermediary) and at the exterior (periphery). Total proteins were extracted and subjected to SDS-PAGE under reducing conditions, and immunobloted with anti-AhR, anti-ARNT, anti-IDO1 and anti-vinculin antibodies. The bar graph represents the total amount of AhR protein (2 bands) relative to vinculin levels determined by quantification of immunoblots using the Odyssey System Imager. The means and standard deviations of 3 villi are shown.

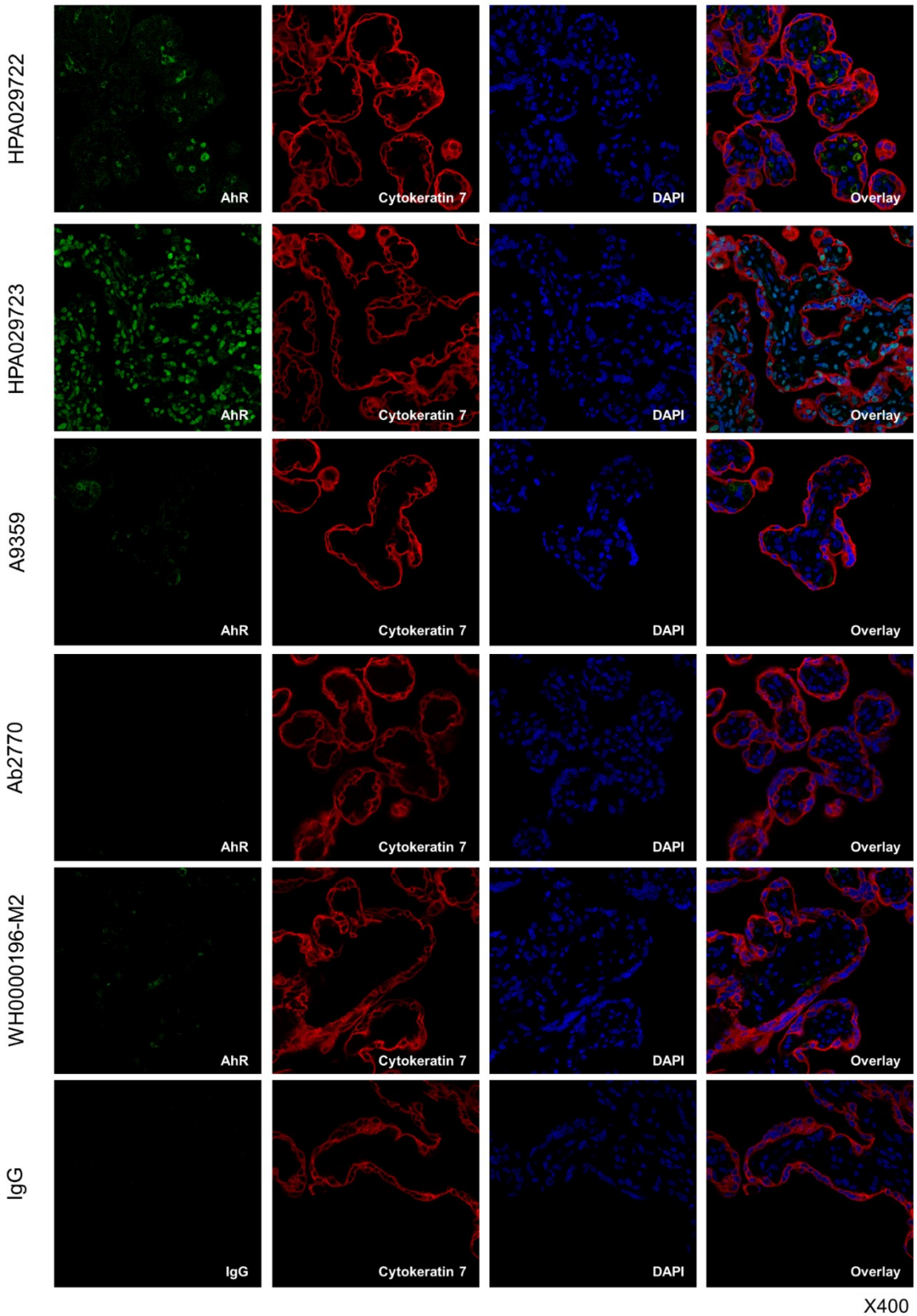


Figure S3. Test of several anti-AhR antibodies for AhR-staining on placental villi. Placental villi were fixed in 4% PFA, included in agarose, sliced and permeabilized with 0.5% Triton. Images are of confocal microscopy, AhR (green) was stained with the indicated antibody and non-specific IgG was used as a background control. Trophoblasts were stained by cytokeratin-7 (red) and nuclei were visualized in blue (DAPI staining). Overlay images are in the right panel.

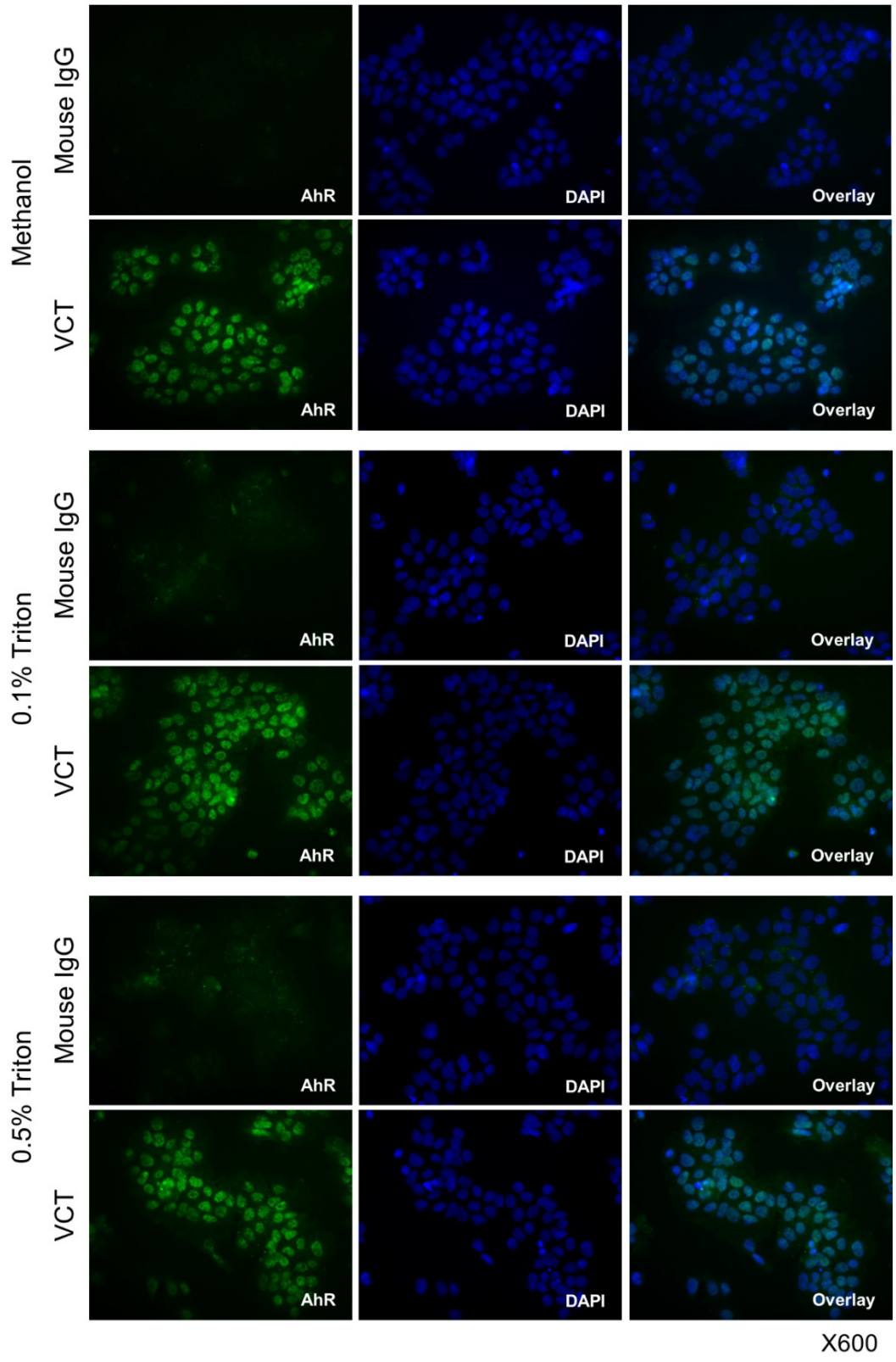


Figure S4. The optimization of the fixation/permeabilization protocol for AhR-staining in villous cytotrophoblasts (VCT) cells. Human primary cytotrophoblasts after 24h of culture were fixed either with PFA or methanol and then cell membrane were permeabilized using 0.1% Triton, 0.5% Triton or methanol (as indicated). Images are of epifluorescence microscopy, AhR was stained with the WH0000196-M2 antibody and IgG was used as background control. Nuclei are visualized in blue (DAPI staining). Overlay images are in right panel.

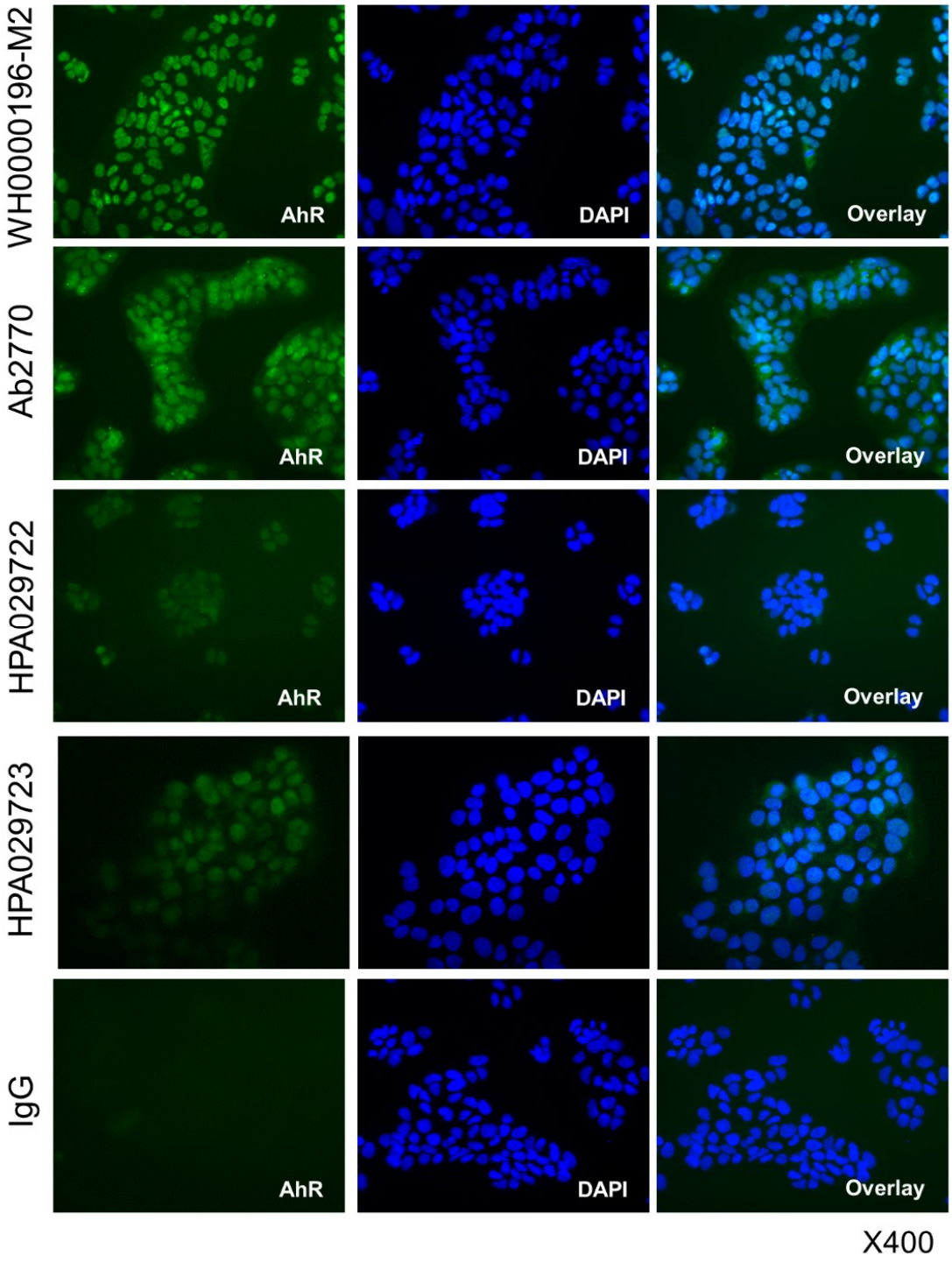


Figure S5. Test of several anti-AhR antibodies on BeWo cells. Epifluorescence microscopy of AhR (green) using the WH0000196-M2 (Sigma), Ab2770 (Abcam), HPA029722 (Sigma) and HPA029723 (Sigma) antibodies. Nuclei are shown in blue after DAPI staining and the overlay images are shown in the right panel.

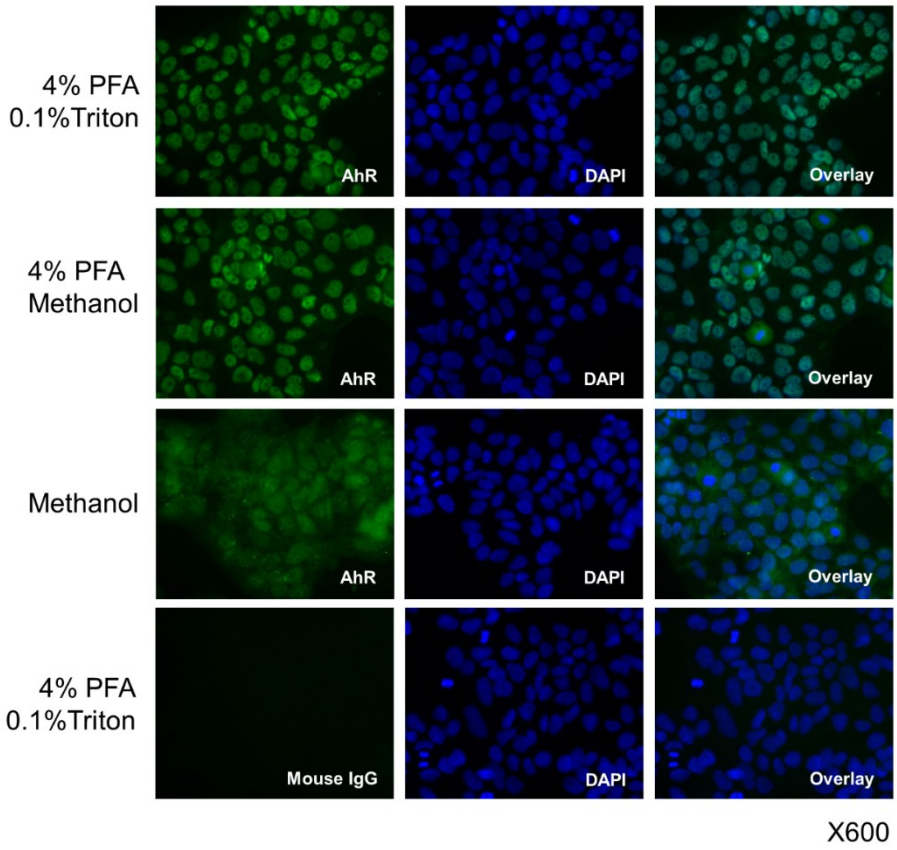


Figure S6. Optimization of the fixation/permeabilization protocol for AhR-staining in BeWo cells. BeWo cells were fixed either with PFA or methanol and then cell membrane were permeabilized using 0.1% Triton or methanol (as indicated). Images are of epifluorescence microscopy where AhR was stained with the WH0000196-M2 antibody or mouse non-specific IgG was used as a background control. Nuclei are visualized in blue (DAPI staining). Overlay images are in right panel.

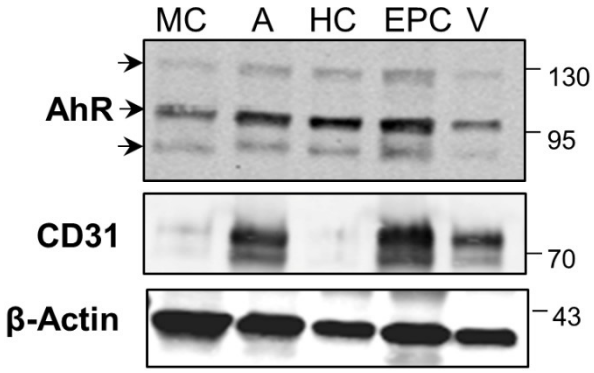


Figure S7. Detection of the AhR in placental cells. Western blotting of total protein from villous mesenchymal cells (MC), umbilical artery endothelial cells (A), collagenous extract from umbilical cord (HC) composed of choriotrophoblasts and mesenchymal cells, endothelial progenitor cells (EPC) and umbilical vein endothelial cells (V). Immunoblotting was carried out with anti-AhR antibody. Extracts were tested with anti-CD31 as an endothelial marker and β-Actin was used as loading control.

Résultats supplémentaires de la Partie 1

La localisation nucléaire d'AhR observée dans notre modèle en absence de l'ajout d'un ligand exogène pourrait être associée à l'activation constitutive de ce récepteur par une voie endogène. Nous pouvons émettre deux hypothèses à cette activation constitutive d'AhR : l'exposition de la femme enceinte aux polluants activateurs d'AhR ou la présence de ligands endogènes produits par le métabolisme placentaire ou de ligands exogènes apportés par l'alimentation. Les mécanismes responsables de cette activation constitutive d'AhR sont peu connus dans le modèle placentaire humain. La L-kynurénine (L-kyn), produite par l'enzyme IDO1 à partir du L-tryptophane, a été identifiée en tant que ligand d'AhR dans les cellules immunitaires au niveau de la décidue, participant ainsi au maintien de la tolérance fœto-maternelle [296]. De plus, en limitant la disponibilité en tryptophane, IDO1 restreint la croissance de nombreux pathogènes, jouant aussi un rôle dans la défense immunitaire. L'objectif était donc d'examiner la possibilité de l'implication d'IDO1 qui, via la production d'un ligand endogène (L-kyn), pourrait être responsable d'une activation d'AhR. Nous avons ainsi étudié en parallèle d'AhR l'expression (génique et protéique) d'IDO1 ainsi que sa localisation au niveau des villosités choriales et des trophoblastes primaires issus de placentas à terme.

1. Expression d'IDO1 dans les villosités et trophoblastes primaires humains à terme de grossesse

Etant donné la variabilité du taux d'IDO1 observée dans les villosités des quatre placentas à terme (Figure 3 de l'article 1), nous avons étendu l'étude de l'expression de cette enzyme à un plus grand nombre de villosités placentaires à terme (n=8 placentas différents) (Figure 29A). Après quantification des immunoblots et normalisation sur la β-Actine, nous avons observé une expression protéique d'IDO1 avec un certain degré de variabilité, allant du simple (0,35 UA) au presque double (0,6 UA) dans les 8 placentas différents. En absence de ligand, le récepteur AhR est ubiquitiné et entraîné vers la dégradation par la voie du protéasome [418]. Dans l'idée que le niveau d'IDO1 pourrait avoir une répercussion sur la stabilité du niveau protéique d'AhR, via son activation par un ligand endogène, nous avons ensuite fait un parallèle entre le niveau protéique d'AhR et celui d'IDO1 dans ces 8 villosités à terme (Figure 29A). Pour le placenta numéro 3, le

fort taux d'expression protéique d'IDO1 semblait être corrélé au fort taux d'expression protéique pour les deux bandes d'AhR. Pour les autres placentas, le faible taux relatif d'IDO1 semblait également être corrélé au faible taux d'AhR, sauf pour le placenta numéro 4. Cependant, ces données seules ne donnent pas d'information précise sur l'influence d'IDO1 sur AhR car le taux d'expression d'une protéine ne présage pas forcément de son activité. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression protéique d'IDO1 dans les cytotrophoblastes primaires humains purifiés à partir de placentas à terme de grossesse par Western blot (Figure 29B). Lors de cette étude, il existait dans la littérature des données contradictoires concernant la présence d'IDO1 dans ce type cellulaire placentaire. Seules des études d'immunohistochimie ou de PCR avaient été réalisées et les résultats étaient peu concluants. Le niveau protéique d'IDO1 a été comparé dans les CTV_0 (immédiatement après la purification), dans les CTV (24 h de culture) et dans les ST (72 h de culture) (Figure 29B). Etant donné que des défauts d'expression d'IDO1 ont été décrits dans des grossesses pathologiques [419], la même étude a été réalisée à partir d'un placenta à terme associé à un retard de croissance intra-utérin (RCIU). Nous avons observé un niveau d'IDO1 relativement faible dans les CTV_0 avec une diminution drastique du taux protéique d'IDO1 après la mise en culture des cellules et au cours de la différenciation des CTV en ST. Un seul placenta (numéro 10 Figure 29B) possédait une forte expression d'IDO1 mais suivait la même cinétique de disparition de la bande correspondant à IDO1 avec la différenciation cellulaire. Les données cliniques nous ont indiqué qu'il s'agissait d'un placenta *prævia*, (une anomalie de localisation de l'implantation du placenta), plus assujetti aux infections, et cela pourrait expliquer le niveau élevé d'IDO1. L'ensemble de ces résultats pourraient expliquer la non détection d'IDO1 dans les trophoblastes primaires.

Etant donné la disparition de la bande d'IDO1 en WB dès la mise en culture, nous nous sommes interrogés sur la possibilité qu'un facteur nécessaire à l'induction d'IDO1 soit épuisé dans le milieu de culture au fur et à mesure du temps de culture. Pour cela, nous avons procédé à un test de changement du milieu de culture journalier, jusqu'à 72 h de culture (Figure 29C). Nous observons le même profil de disparition d'IDO1 quelles que soient les conditions (milieu de culture changé ou non), suggérant que cette disparition d'IDO1 n'est pas due à une absence de facteurs. Nous avons ensuite supplémenté le milieu de culture en L-Trp, le substrat d'IDO1, afin de voir si la présence en abondance du substrat permettait la stabilisation d'expression de cette enzyme

(Figure 29D). Pour cela, deux concentrations différentes de L-Trp (6 mg/L et 10 mg/L) permettant d'atteindre des concentrations physiologiques et en excès ont été testées pendant 24 h, ainsi qu'un contrôle négatif avec le solvant du L-Trp (contrôle HCl 0,5N). Un contrôle positif d'induction d'IDO1 par IFN-γ à 1000 U/mL a été réalisé en parallèle, IDO1 étant connu pour être induit par l' IFN-γ. Nous n'avons pas observé d'effet de la supplémentation en L-Trp au niveau de l'expression protéique d'IDO1. En revanche, l'IFN-γ a induit l'expression d'IDO1 comme attendu. Nos tentatives de stabiliser la protéine IDO1 ont donc échoué. Toutefois, il serait intéressant de tester d'autres milieux de culture afin d'essayer d'améliorer la détection d'IDO1. De plus, IDO1 est sensible à l'environnement en oxygène [417] et nos cultures sont réalisées dans des conditions d'air ambiant (21 % d'O_2), qui ne correspondent pas à l'environnement du tissu placentaire à terme (environ 8% d'O_2). Il faudrait donc envisager la culture de ces trophoblastes dans des conditions de normoxie tissulaire.

Cette diminution de niveau d'expression protéique d'IDO1 peut être expliquée par deux hypothèses : une baisse de l'expression du gène ou une dégradation de la protéine. Nous avons évalué l'expression génique d'IDO1 par RT-qPCR dans les trophoblastes purifiés à partir de 3 placentas différents (Figure 29E). Nous avons constaté une expression moindre (moyenne des Ct à 33) de l'ARNm d'IDO1 dans les CTV_0 purifiés par rapport à l'expression dans la villosité totale (moyenne des Ct à 29) (Figure 29F). Ce résultat correspond au taux protéique d'IDO1 plus faible dans les CTV_0 (Figure 29B) que dans les villosités totales à terme de grossesse (Figure 3 de l'Article 1), avec une tendance à la baisse de l'expression des ARNm dès la mise en culture (CTV). La protéine semble avoir une demi-vie courte car une baisse d'expression du gène est corrélée à une baisse d'expression de la protéine à 24 h.

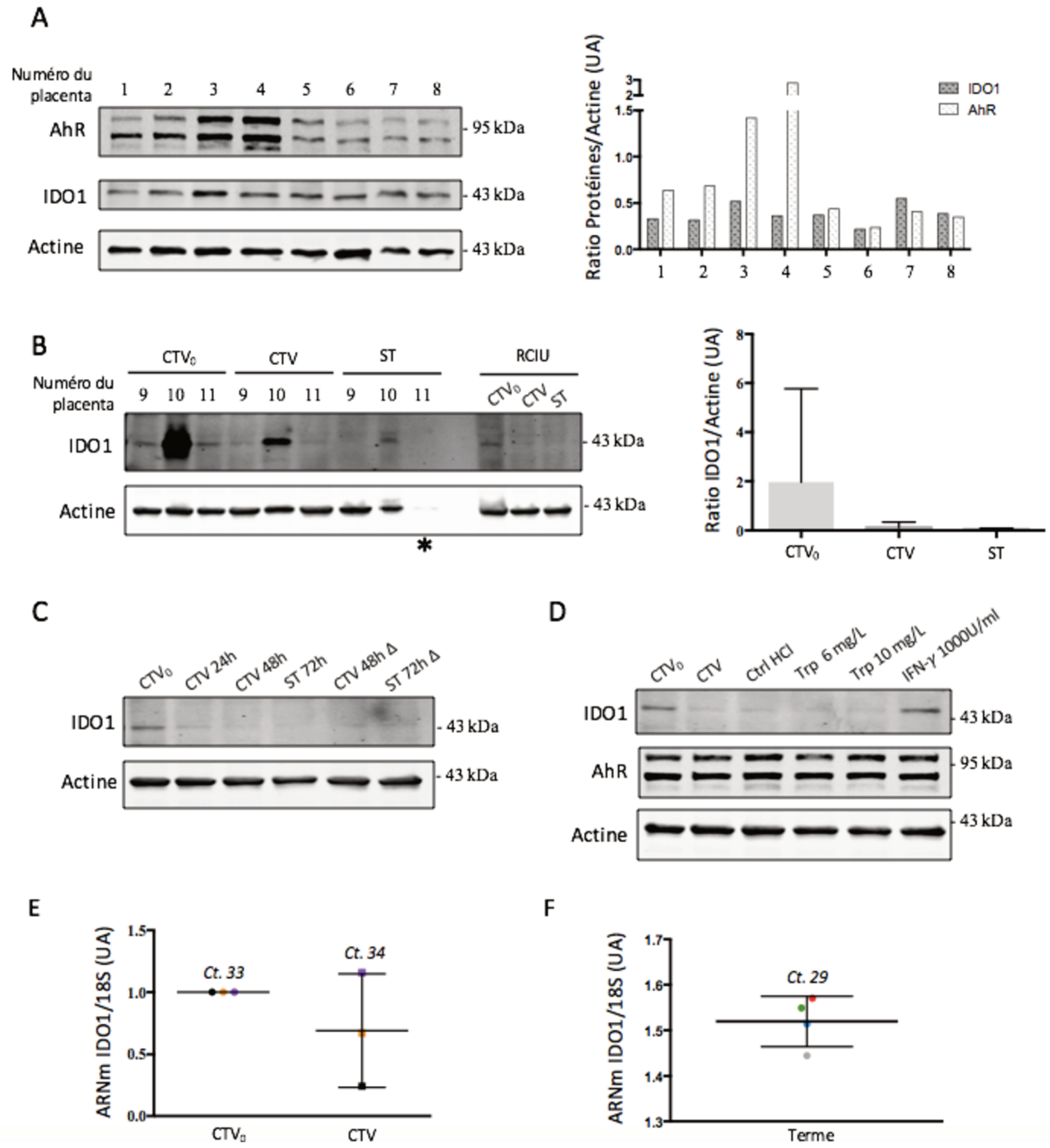


Figure 29. Profil d'expression d'IDO1 dans les villosités et trophoblastes à terme de grossesse au cours de la différenciation et en fonction des conditions de culture

Les villosités ont été utilisées directement après dissection et les cytotrophoblastes villeux purifiés à partir de placenta à terme de grossesse ont été mis en culture pendant 24 h (CTV) ou 72 h (ST). Les CTV_0 n'ont pas été mis en culture après la purification. **(A)** Les lysats totaux des villosités choriales ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices et les membranes ont été incubées avec des anticorps anti-AhR, anti-IDO1 et anti-actine (ce dernier utilisé comme témoin de charge). La quantification des bandes a été réalisée avec le logiciel Odyssey et est présentée sous forme d'histogramme rapporté sur l'actine en unités arbitraires. **(B)** Les extraits protéiques ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices et les membranes ont été incubées avec des anticorps anti-IDO1 et anti-Actine (ce dernier utilisé comme témoin de charge). La quantification des bandes a été réalisée avec le logiciel Odyssey et est présentée sous forme d'histogramme avec la moyenne rapportée sur l'actine +/- SEM en unités arbitraires (n=3). * problème de charge. **(C)** Les extraits protéiques issus de trophoblastes ayant subi chaque jour un changement de milieu de culture (Δ) ou non

ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices et les membranes ont été incubées avec des anticorps anti-IDO1 et anti-actine (le dernier utilisé comme témoin de charge). La quantification des bandes a été réalisée avec le logiciel Odyssey et est présentée sous forme d'histogramme avec la moyenne rapportée sur l'actine +/-SEM en unités arbitraires (n=1). **(D)** Les extraits protéiques issus de trophoblastes ayant été incubés ou non pendant 24 h avec du tryptophane (Trp) et de l'interféron-γ (IFN-γ) aux concentrations indiquées ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices et les membranes ont été incubées avec des anticorps anti-IDO1, anti-AhR et anti-actine (le dernier utilisé comme témoin de charge). La quantification des bandes a été réalisée avec le logiciel Odyssey et est présentée sous forme d'histogramme avec la moyenne rapportée sur l'actine +/-SEM en unités arbitraires (n=1). **(E)** Le taux d'ARNm d'IDO1 dans les trophoblastes a été déterminé par RT-PCR quantitative et normalisé au taux d'ARN ribosomique 18S en unités arbitraires (UA) (n=3). **(F)** Le taux d'ARNm d'IDO1 dans les villosités choriales à terme de grossesse a été déterminé par RT-PCR quantitative et normalisé au taux d'ARN ribosomique 18S en unités arbitraires (UA) (n=4).

2. Localisation d'IDO1 dans les villosités choriales et trophoblastes purifiés

L'expression globale d'IDO1 et son activité enzymatique dans le placenta sont bien établies, mais il existe une controverse concernant la nature des cellules du placenta exprimant IDO1. Dans la majorité des publications, uniquement des études d'immunohistochimie (IHC) avaient été réalisées pour détecter IDO au niveau des villosités placentaires. Ces marquages montrent une localisation au niveau de l'axe mésenchymateux, particulièrement dans des vaisseaux capillaires et non pas dans les trophoblastes, et plus globalement dans la décidue au niveau des artères spiralées et des CTEV [420], [421]. Au contraire, d'autres études d'IHC avaient montré la présence d'IDO dans les trophoblastes, surtout au premier trimestre de grossesse [420], [422] et à terme [423]. Au vu de ces contradictions et étant donné le faible taux d'IDO1 à terme de grossesse observé par Western blot dans les cellules trophoblastiques primaires (CTV_0) (Figure 29B) par rapport à celui observé dans les villosités placentaires (Figure 3 de l'article 1), nous avons réalisé notre propre analyse de la localisation d'IDO1 au sein des villosités par microscopie confocale à partir de 3 placentas différents (Figure 30). Pour identifier les trophoblastes, un co-marquage spécifique de la cytokératine 7 (CK7) a été réalisé en parallèle. Nous observons un marquage d'IDO1 principalement à l'intérieur des villosités, marquage qui semble correspondre à des vaisseaux capillaires. Cette localisation est à confirmer par un co-marquage d'IDO1 avec un marqueur spécifique des cellules endothéliales tel que le CD31, une protéine exprimée dans les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales. Il existe également un marquage faible d'IDO1

en bordure de villosité. IDO1 pourrait donc être beaucoup plus exprimé dans les cellules endothéliales de la villosité que dans les cytotrophoblastes.

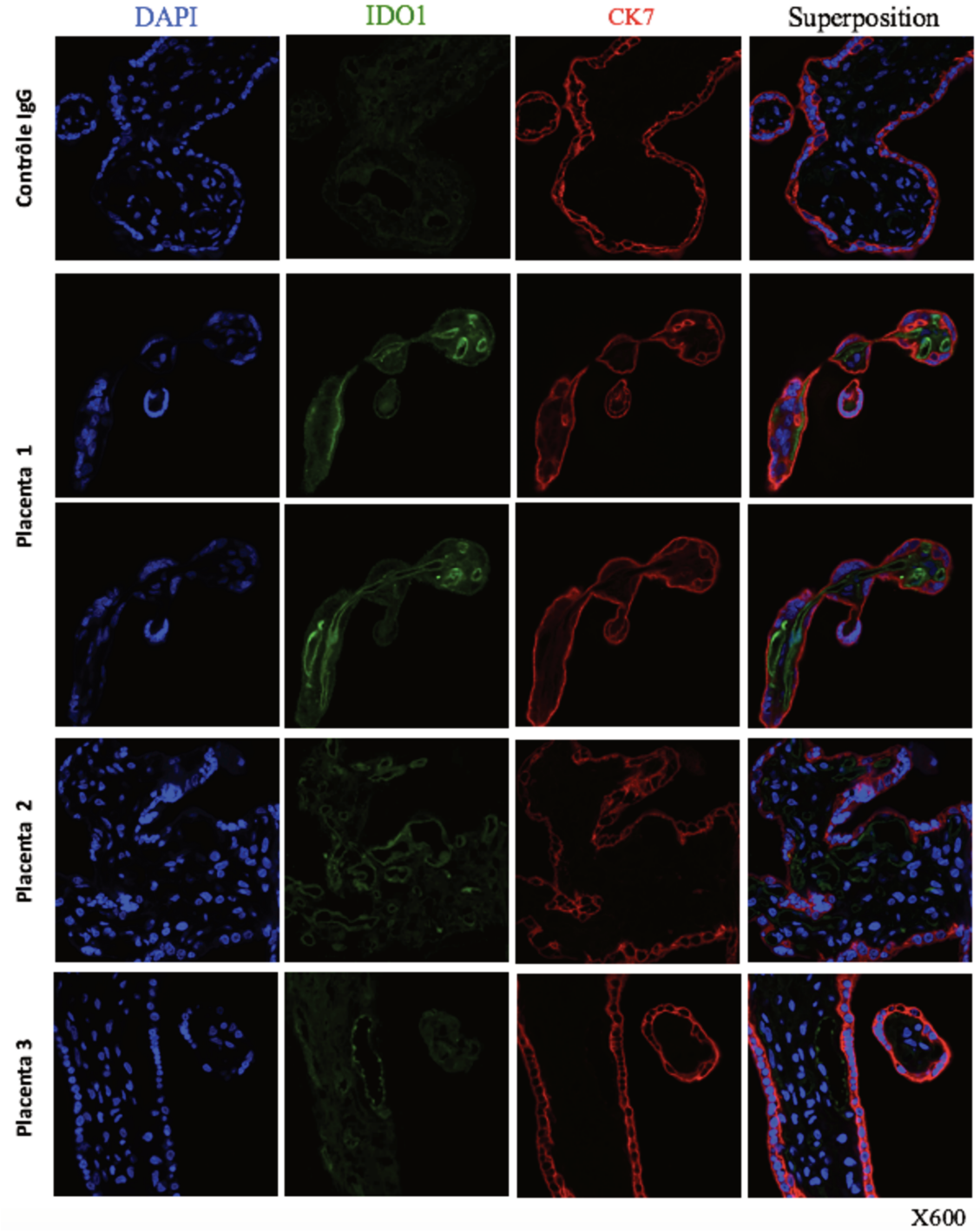


Figure 30. Immunomarquage d'IDO1 dans les villosités choriales à terme de grossesse

Les villosités issues de placentas à terme de grossesse ont été fixées avec du PFA 4% puis incluses dans de l'agarose. Les coupes ont été perméabilisées au triton 0,5%. Les villosités ont été examinées par immunofluorescence avec des anticorps anti-IDO1 (marquage vert), anti-CK7 (marquage rouge, spécifique des trophoblastes) et les noyaux sont visualisés avec du DAPI (marquage bleu) sous un microscope confocal. Le contrôle isotypique (contrôle IgG) a été réalisé pour l'anticorps anti-IDO1. La superposition des trois marquages DAPI, IDO1 et CK7 est visible à droite. Grossissement x600.

Nous avons également étudié la localisation d'IDO1 dans les trophoblastes purifiés (CTV et ST) d'un placenta à terme de grossesse (Figure 31) avec le même anticorps. Nous observons un marquage très diffus, autant dans les CTV que dans les ST, ne délimitant aucun compartiment cellulaire et qui semble peu spécifique. Il faudrait faire varier les conditions de fixation et perméabilisation afin de mettre au point le marquage d'IDO1 sur cellules et utiliser d'autres anticorps anti-IDO1 reconnaissant des épitopes différents.

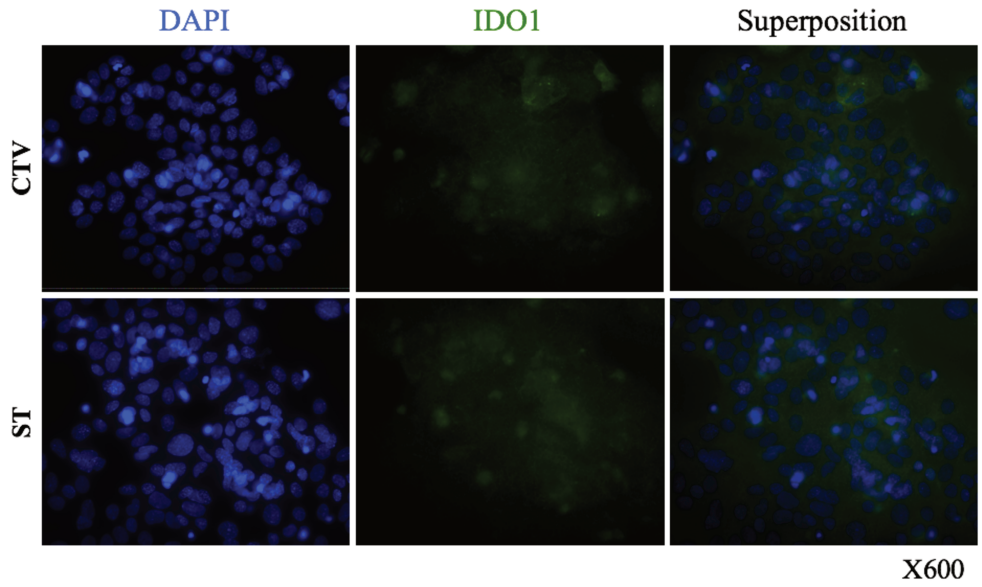


Figure 31. Immunomarquage d'IDO1 dans les cellules trophoblastiques primaires humaines au cours de la différenciation

Les cytotrophoblastes villeux purifiés à partir de placenta à terme de grossesse ont été mis en culture pendant 24 h (CTV) ou 72 h (ST). Les cellules ont été fixés avec du PFA 4% et perméabilisées au méthanol puis ont été examinées au microscope à fluorescence avec des anticorps anti-IDO1 (marquage vert) et les noyaux sont visualisés avec du DAPI (marquage bleu). La superposition des deux marquages est visible à droite. Grossissement x600.

3. Rôle d'IDO1 dans l'activation intrinsèque d'AhR

La dernière étape de ce travail était de mettre en évidence un potentiel rôle d'IDO1 dans l'activation d'AhR. Pour cela, les taux d'ARNm de deux cibles transcriptionnelles principales d'AhR, CYP1A1 et CYP1B1, ont été comparés entre les CTV_0 et CTV (Figure 32A) étant donné que le niveau d'IDO1 était fortement diminué entre ces deux conditions (Figure 32 B). Les résultats de la RT-qPCR démontrent une augmentation significative ($p<0,0001$) de l'expression de ces deux gènes dans les CTV par rapport aux CTV_0. En parallèle, le niveau protéique d'AhR ne change pas entre ces deux conditions (Figure 32B). Contrairement à nos attentes, CYP1A1 et CYP1B1 sont induits dans les conditions où IDO1 est absent (CTV), et ceci en absence de traitement

avec un ligand exogène (par exemple le BaP). Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. La première est que l'expression des CYP serait corrélée avec la disparition d'IDO1 dans les CTV lors de la culture. La présence d'IDO1 dans les CTV_0 assurerait la production d'un métabolite (tels que la kynurénine [417]) produit par IDO1 et ligand d'AhR, permettant une relocalisation nucléaire du récepteur et son activation dans des rôles autres que la détoxification, activation visible à 24 h de culture (CTV, Figure 32A). La seconde hypothèse est que la différenciation des trophoblastes (CTV_0 en ST) induit l'expression des CYP, comme nous l'avons montré dans l'Article 1. Par la suite, il faudrait s'intéresser à d'autres gènes cibles d'AhR avec des rôles physiologiques (prolifération, différenciation cellulaire, etc.) ou bien aux co-facteurs cytosoliques dissociés du complexe AhR et qui pourraient être activés. Une autre hypothèse qui pourrait expliquer l'activation de la transcription des CYPs est simplement la mise en culture (stress cellulaire), d'une manière indépendante d'IDO1.

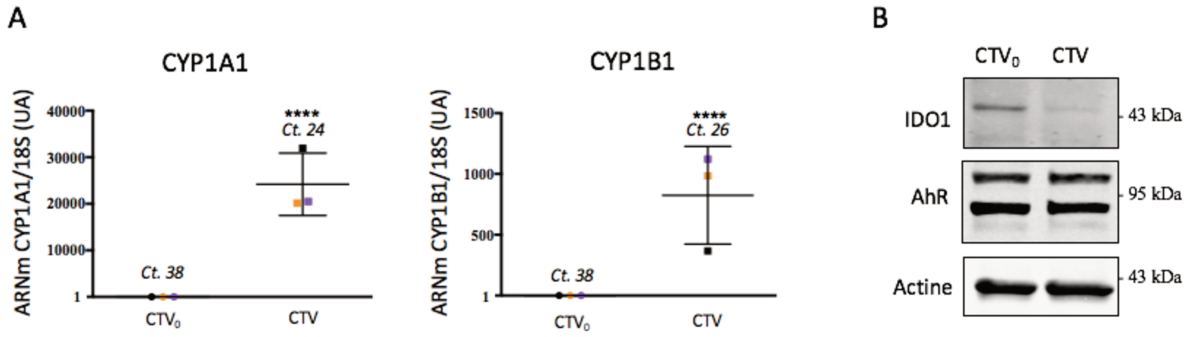


Figure 32. Expression génique de CYP1A1 et CYP1B1 dans les trophoblastes avant et après leur mise en culture

(A) Le taux d'ARNm de CYP1A1 et CYP1B1 dans des trophoblastes purifiés à partir de placenta à terme de grossesse avant (CTV_0) et après mise en culture pendant 24 h (CTV) a été déterminé par RT-PCR quantitative et normalisé au taux d'ARN ribosomique 18S (en unités arbitraires). **** $p<0,0001$. **(B)** Les extraits protéiques ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices et les membranes ont été incubées avec des anticorps anti-IDO1, anti-AhR et anti-actine (ce dernier utilisé comme témoin de charge).

Nous avons montré une expression placentaire d'IDO1 à terme de grossesse avec une localisation majoritairement dans les vaisseaux fœtaux des villosités choriales associé à une variabilité d'expression entre les différents placentas. IDO1 est exprimé dans les trophoblastes fraichement purifiés (CTV_0) mais son niveau protéique diminue au cours de la culture, lors de la différenciation des CTV en ST. De plus, nos résultats ne nous permettent pas de mettre en évidence de lien direct entre la présence d'IDO1 dans le placenta et l'activation constitutive d'AhR.

PARTIE 2 :

Article 2. INTERNALISATION ET EFFETS DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE CERIUM SUR LA DIFFERENCIATION ET LES FONCTIONS DU TROPHOBLASTE HUMAIN.

Dans cette seconde partie, également sous la forme d'un article intitulé « Uptake of cerium dioxide nanoparticles and impact on viability, differentiation and functions of primary trophoblast cells from human placenta », nous nous sommes intéressés aux nanoparticules de dioxyde de cérium (NP de CeO_2). Ces nanoparticules récemment mises sur le marché intéressent de plus en plus la communauté scientifique car elles sont utilisées dans un large panel d'applications industrielles mais également biomédicales. Les NP de CeO_2 sont notamment ajoutées comme additif dans le Diesel en tant que catalyseur de régénération des filtres à particules des moteurs, en tant qu'additif dans les cigarettes, dans les fours autonettoyants mais également comme agent de polissage du verre. De plus, ces NP sont envisagées comme senseurs d'oxygènes (piégeur de radicaux libres) et produits pharmaceutiques à la fois comme pro- et anti-oxydant en raison de leur double état Ce^{3+} et Ce^{4+}. Elles ont d'ailleurs été classées dans la liste prioritaire des nanomatériaux requérant une évaluation de risque par l'OCDE en 2010. L'exposition de la femme enceinte à ces nanoparticules se fait principalement par inhalation de l'air ambiant, dû aux gaz de pots d'échappement et à la fumée de cigarette. Par leur taille nanométrique, les nanoparticules sont capables de franchir les barrières biologiques (pulmonaire, intestinale), d'entrer dans la circulation sanguine et rejoindre les organes, dont le placenta. De plus, les NP ne sont pas métabolisées au niveau cellulaire, ce qui peut conduire à leur rétention et donc leur accumulation au niveau tissulaire. La toxicité des NP de CeO_2 est controversée puisqu'il existe des résultats contradictoires dans la littérature, en fonction du tissu, du type cellulaire étudiés et des caractéristiques physico-chimiques des NP de CeO_2 utilisées (telles que leur forme, leurs modifications de surface et potentiel redox) [424]. Les études *in vitro* disponibles actuellement ont majoritairement été réalisées sur des modèles pulmonaires, hépatiques ou des cellules du système immunitaire. Il n'existe que peu de données sur la toxicité des NP de CeO_2 pendant la grossesse et elles proviennent uniquement d'études menées sur des modèles animaux (avec une première publication en 2017), afin d'explorer la distribution et la fœto-toxicité materno-fœtale après des expositions respiratoires [398], [399]. Actuellement et à ma connaissance, aucune

donnée n'est disponible concernant les effets des NP de CeO_2 en utilisant des modèles placentaires humains (par exemple le cotylédon perfusé, les lignées trophoblastiques ou les trophoblastes primaires).

L'objectif de ce travail était de déterminer l'internalisation des NP de CeO_2 ainsi que les conséquences biologiques et fonctionnelles de l'exposition des trophoblastes humains à ce type de NP, vis-à-vis de la toxicité et du stress oxydant, de la capacité de syncytialisation ainsi que la fonction hormonale. Pour cela, des cytotrophoblastes issus de placentas humains à terme de grossesse ont été purifiés et mis en culture. L'étude a été menée sur une large gamme de concentration de NP (0,6-640 µg/mL correspondant à 0,1-101 µg/cm^2) pour des temps d'exposition allant de 4 h à 72 h. Les concentrations les plus basses testées nous ont permis d'être proches d'une situation réaliste d'exposition aux NP. Les concentrations les plus élevées nous ont permis de réaliser une étude cytotoxique complète et de déterminer l'IC_{50} des NPs de CeO_2 sur notre modèle cellulaire. De plus, cela nous permet de comparer nos résultats avec les études déjà existantes dans la littérature pour ce type de nanoparticules sur d'autres modèles, notamment pulmonaires. Après caractérisation des NP utilisées dans cette étude par les techniques de DLS et de mesure du potentiel zêta, nous avons montré une internalisation dose-dépendante (0,6-40 µg/mL, correspondant à 0,1-6,3 µg/cm^2) de ces nanoparticules, que ce soit par les cytotrophoblastes ou par les syncytiotrophoblastes. La nature chimique des agrégats de NP visibles dans les trophoblastes a été caractérisée par la technologie EDX en microscopie électronique à transmission, ainsi qu'en microscopie électronique à transmission avec un balayage de l'échantillon (STEM). Les NP de CeO_2 ont diminué l'activité métabolique des cytotrophoblastes de manière dose-dépendante, suivi par une diminution de la viabilité à forte concentration (supérieure à 320 µg/mL (50,4 µg/cm^2)) dès 24 h d'exposition. Le mécanisme de cytotoxicité implique l'activation des caspases, en absence de stress oxydant (absence de production d'espèces réactives de l'oxygène et pas de modifications des enzymes anti-oxydantes). Au contraire, les NP de CeO_2 ont agit plutôt comme antioxydants à fortes concentrations (à partir de 80 µg/mL, soit 12,6 µg/cm^2). De plus, ces NP ont diminué de 20% la capacité des cytotrophoblastes à fusionner et se différencier en syncytiotrophoblaste (syncytialisation). Cela peut compromettre le bon renouvellement du syncytium et entrainer son vieillissement prématuré. Cet effet s'est notamment accompagné d'un

déficit de différenciation fonctionnelle par la perturbation de la fonction hormonale pour les principales hormones de la grossesse (hCG, hPL, E2) ainsi que pour le facteur angiogénique PlGF, d'une façon « concentration-dépendante ». Notre étude est la première à s'intéresser à la toxicité des NP de CeO_2 sur un modèle placentaire humain, en particulier sur les trophoblastes primaires, et leur effet vis-à-vis des fonctions placentaires.

nanomaterials

MDPI

Article

Uptake of Cerium Dioxide Nanoparticles and Impact on Viability, Differentiation and Functions of Primary Trophoblast Cells from Human Placenta

Margaux Nedder [1], Sonja Boland [2], Stéphanie Devineau [2], Amal Zerrad-Saadi [1], Jasmina Rogozarski [1], René Lai-Kuen [3], Ibtissem Baya [1], Jean Guibourdenche [1,4], Francoise Vibert [1], Audrey Chissey [1], Sophie Gil [1], Xavier Coumoul [5], Thierry Fournier [1,†] and Ioana Ferecatu [1,*,†]

1 Faculté de Pharmacie de Paris, Université de Paris, INSERM UMR-S 1139, 3PHM, F-75006 Paris, France; margaux.nedder@parisdescartes.fr (M.N.); amal.zerrad-saadi@parisdescartes.fr (A.Z.-S.); jasmina.rogozarski@parisdescartes.fr (J.R.); ibtissembaya01@gmail.com (I.B.); jean.guibourdenche@cch.aphp.fr (J.G.); francoise.vibert@parisdescartes.fr (F.V.); audrey.chissey@parisdescartes.fr (A.C.); sophie.gil@parisdescartes.fr (S.G.); thierry.fournier@parisdescartes.fr (T.F.)

2 BFA, Université de Paris, UMR 8251, CNRS, F-75013 Paris, France; boland@univ-paris-diderot.fr (S.B.); stephanie.devineau@u-paris.fr (S.D.)

3 Faculté de Pharmacie de Paris, Université de Paris, INSERM UMS 025—CNRS UMS 3612, F-75006 Paris, France; rene.lai-kuen@parisdescartes.fr

4 Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Service d'hormonologie, F-75014 Paris, France

5 Université de Paris, INSERM UMR-S 1124, F-75006 Paris, France; xavier.coumoul@parisdescartes.fr

* Correspondence: ioana.ferecatu@parisdescartes.fr; Tel.: +33-1-53-73-96-05; Fax: +33-1-44-07-39-92

† These authors contributed equally to this paper as last authors.

Received: 18 June 2020; Accepted: 2 July 2020; Published: 3 July 2020



Abstract: The human placenta is at the interface between maternal and fetal circulations, and is crucial for fetal development. The nanoparticles of cerium dioxide (CeO_2 NPs) from air pollution are an unevaluated risk during pregnancy. Assessing the consequences of placenta exposure to CeO_2 NPs could contribute to a better understanding of NPs' effect on the development and functions of the placenta and pregnancy outcome. We used primary villous cytotrophoblasts purified from term human placenta, with a wide range of CeO_2 NPs concentrations (0.1–101 μg/cm^2) and exposure time (24–72 h), to assess trophoblast uptake, toxicity and impact on trophoblast differentiation and endocrine function. We have shown the capacity of both cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts to internalize CeO_2 NPs. CeO_2 NPs affected trophoblast metabolic activity in a dose and time dependency, induced caspase activation and a LDH release in the absence of oxidative stress. CeO_2 NPs decreased the fusion capacity of cytotrophoblasts to form a syncytiotrophoblast and disturbed secretion of the pregnancy hormones hCG, hPL, PlGF, P4 and E2, in accordance with NPs concentration. This is the first study on the impact of CeO_2 NPs using human primary trophoblasts that decrypts their toxicity and impact on placental formation and functions.

Keywords: nanoparticles; cerium dioxide; human placenta; cytotrophoblasts; syncytiotrophoblasts; cytotoxicity; pregnancy hormones

1. Introduction

Over the past decades, the development and utilization of engineered nanomaterials have grown exponentially and various nanoparticles (NPs) are used in an increasing number of consumer

products [1–5]. Due to their size being less than 100 nm (ISO/TS 80004:2015), NPs have a large surface-to-volume ratio and confer upon the materials they compose unique physicochemical characteristics, including higher surface reactivity, increased catalytic efficiency, and higher resistance when compared to their bulk material counterparts. Depending on their chemical composition, NPs can have different shapes, agglomeration/aggregation states, surface charges, coating and, for some of them, also distinct oxidation states. Thus, the toxicity may vary greatly between each kind of NP.

Lately, novel NPs of cerium dioxide (CeO_2 NPs or nanoceria) have attracted the attention of the scientific community because they have been used in a range of industrial, commercial and also biomedical applications [6]. These include applications as fuel additive-combustion catalyst in gasoline, as additives in cigarettes, in self-cleaning ovens, as polishing agents and in UV protection [7]. In addition to these applications, CeO_2 NPs have also been proposed as oxygen sensors (free radical scavengers) and as potential pharmaceuticals (as both anti- and pro-oxidants), due to the peculiar dual oxidative state of cerium (Ce^{3+} and Ce^{4+}) [8–10]. However, CeO_2 NPs are also byproducts of combustion processes and thus are emitted unintentionally in the air. Human exposure to CeO_2 NPs is mainly by inhalation from ambient pollution, especially because of the recent introduction of diesel fuel-additive nanoceria to increase the efficiency of soot combustion of diesel particulate filters [11]. For example, the concentration of cerium is around 9 µg/L in fuel (18 mg/L Ce in fuel-additive) [12].

The adverse human health effects of exposure to CeO_2 NPs are mostly unknown because there are few epidemiologic studies available so far. Some authors detected cerium in maternal blood samples (8–70 ng/L) [13,14] and in breast milk (5–65 ng/L) [14] in cohorts from Europe, with the highest concentrations of cerium in the maternal blood and milk recorded in the most polluted cities. Two recent articles with cohorts of 400 and 7367 pregnant women, respectively, reported the presence of the element cerium in maternal serum during pregnancy, which was associated with a 4.73-fold increase risk for fetal neural tube defects [15], and in maternal urine, which was associated with a decrease in neonatal TSH levels [16]. Besides, the Organization of Economic Cooperation and Development (OECD) has included CeO_2 NPs in the top priority list of the nanomaterials requiring urgent evaluation (OECD 2010). All the related in vitro studies are mostly focused on the evaluation of toxicity in cellular models of the lung, liver or immune system, and today the effects of CeO_2 NPs during the critical window of pregnancy exposure are mostly unexplored. There are very few data on the placental toxicity of CeO_2 NPs and they are mostly from animal models during gestation [17] exploring the maternal-versus-fetal distribution and the fetotoxicity [18]. However, to our knowledge, there are no available data about the impact of CeO_2 NPs from in vitro studies employing human models (e.g., placental models such as cotyledon perfusion, trophoblasts cell lines or primary cells). Nevertheless, data were recently published on other types of NP, including metal oxides, such as TiO_2 NPs [19,20], gold NPs [21–23] and silver NPs [24,25], and they all employed animals, the cotyledon perfusion model (to follow their passage from the maternal to fetal circulation) or trophoblast cell lines (to reveal their toxicity). However, again there is no study of the risk NPs pose to primary human trophoblasts.

The placenta is a transitory organ at the interface between the fetus and the mother and is essential for the adaptation and maintenance of pregnancy, fetal development and growth, especially by its intense endocrine function [26]. The placenta also represents a selective barrier that allows gas and nutrient exchanges between the fetus and the mother. The placenta is composed of consecutive arrangements of villous epithelial and stromal tissues in which fetal vessels are embedded [27]. The chorionic villus is covered by a trophoblast bilayer formed by the outer multinucleated syncytium layer termed the syncytiotrophoblast (ST), which is the functional and structural unit of the placenta, and by the underlying mononuclear villous cytotrophoblast (VCT), which differentiate and fuse together to constantly renew the ST. The ST is the seat of placental functions and represents the endocrine tissue of the placenta, secreting a panoply of hormones such as steroids (progesterone (P4) and estrogens like estradiol (E2)), glycoproteins such as human chorionic gonadotropin (hCG) and human placental lactogen (hPL), and factors like soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) and placental growth factor (PlGF), which is involved in angiogenesis. However, the placenta also ensures the protection of the fetus

against a wide variety of xenobiotics, including drugs and pollutants that may pass through other tissue barriers and reach the placenta through the maternal blood flow. Indeed, the ST is in direct contact with maternal blood and circulating pollutants. Due to their small size, NPs have greater potential to travel through the organism than larger particles [1]. Unlike other chemicals, NPs cannot be metabolized and eliminated by the classic cellular detoxification system and thus they could accumulate within most tissues, such as liver or, in the case of pregnancy, the placenta, certainly reaching higher concentrations than initially in the blood due to tissue retention [17,28]. NPs that accumulate within the placenta may cause toxicity and/or dysfunction of the placental barrier, which ultimately impacts the harmonic development or growth of the fetus, leading to pregnancy complications.

The toxicity of CeO_2 NPs remains controversial, because conflicting results have been reported in the scientific community, with both pro-oxidant and anti-oxidant effects in tissues. This variability depends mostly on the cell type, but also on the physical and chemical characteristics of nanoceria, like the aggregation state, the shape (nanocubes vs. nanorods), surface modifications and the oxidative status of the cerium (Ce) [29,30]. Altogether, these properties modulate the nanoceria's behavior in different environments and thus its distribution, elimination and toxicity, at both the cellular level and in the body.

In this study, we have investigated for the first time the consequences of the exposure to CeO_2 NPs of primary trophoblasts from human placenta at term. In order to compare our results with those of other publications, we used here a wide range of concentrations, from the lowest concentrations (0.6 µg/mL, corresponding to 100 ng/cm^2) that still allow their detection by classical methods, to a very high concentration (640 µg/mL or around 100 µg/cm^2) corresponding to high levels of atmospheric pollution (to compare results with those from pulmonary exposures) (Table 1). We focused our study on the uptake of CeO_2 NPs by human primary trophoblast cells, their potential cytotoxicity and mechanisms of action as regard to the induction of oxidative stress, anti-oxidant enzymes and caspase activation. We explored the impact of CeO_2 NPs on the ability of trophoblasts to differentiate and form the syncytiotrophoblast in vitro, which is in direct contact with maternal blood and represents the endocrine tissue, and evaluated the main genes that regulate this process. Last, we determined the endocrine function of placenta by measuring hormone secretion and the levels of the main genes and enzymes involved in hormone production and steroidogenesis. Altogether, our data shed new light on the hazards of ceria NPs in human placental trophoblast cells.

Table 1. Nanoparticle (NP) concentrations used in µg/mL and correspondence in µg/cm^2.

CeO_2 (µg/mL)	Corresponding CeO_2 Concentrations in µg/cm^2
0.6	0.1
2.5	0.4
5	0.8
10	1.6
20	3.2
40	6.3
80	12.6
160	25.2
320	50.4
640	101

2. Materials and Methods

2.1. Placenta Collection

Placentas were collected from non-smoking, healthy women with pregnancies delivered by Caesarean sections between 37 and 39 weeks of amenorrhea (hereafter called "term"). Placentas were obtained from the Port-Royal Maternity, the Mutualist Institute Montsouris, the Private Hospital of Antony, the Béclère Hospital, and the Beaujon Hospital after obtaining written consent from

informed patients and approval from our local ethics committee (CPP: 2015-May-13909). The study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki.

2.2. Cytotrophoblast Purification, Culture and Treatment

After collection, placental tissues were washed in Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free Hank's Balanced Salt solution (HBSS, Gibco #14175, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Then, chorionic villi were gently scraped free from vessels and connective tissue, and dissected into about 25 mg fragments. The time for placental dissection was kept under 30 min to prevent tissue degradation. The mononucleated villous cytotrophoblasts (VCT) were isolated, based on the methods of Kliman et al. [31]. After dissection, the chorionic villi were washed in Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free HBSS, and then digested in trypsin digestion medium containing HBSS 5 mL/g, 0.1% trypsin (Sigma-Aldrich #27250-018, Saint Quentin Fallavier, France), 0.1 M $MgSO_4$ (Merck #5886-0500, Fontenay sous Bois, France), 0.1 M $CaCl_2$ (Merck #1-02820-1000), 4% milk and 50 Kunitz/mL DNAse type IV (Sigma-Aldrich #D5025, Saint Quentin Fallavier, France), for 30 min at 37 °C without agitation. This was repeated eight times with 10 min incubation with the same trypsin solution. The first three trypsin digestions, containing a mixture of extravillous cytotrophoblasts (EVCT) and VCT, were discarded after light microscopic analysis, and the last three ones, containing a majority of VCT, were kept and pooled. The chorionic villi were finally washed with warm HBSS (37 °C). Each time, the supernatant-containing VCT was collected after tissue sedimentation, filtered (on 40-µm pores filters), and incubated with 10% fetal calf serum (FCS, vol/vol) to stop trypsin activity. After purification by Percoll gradient, VCT were resuspended and cultured in DMEM (containing 1 g/L glucose, pyruvate, Phenol red-free, Thermo Fisher Scientific, #11880, Illkirch, France) supplemented with 10% FCS (Eurobio #CVFSVF00-01, Les Ulis, France), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich #G7513), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco #15140-122, Thermo Fisher Scientific) at 125,000 cells/cm^2 on 35-mm or 60-mm diameter culture dishes. Trophoblast cells were seeded at a density of 125,000 cells/cm^2 in 24-, 48-, 96-wells or in 35-mm or 60 mm plates (Techno Plastic Products (TPP), Trasadingen, Switzerland). After around 16 h of culture (overnight), VCT were carefully washed to eliminate non-adherent cells. Purified VCT were characterized for each culture to ensure the homogeneity between purifications by microscopic visualization, the ability to aggregate at 48 h of culture and to form ST at 72 h, and by monitoring the production of hCG secreted into the supernatant. Cells were collected at 24 h, 48 h and 72 h, kept at −80 °C for total RNA or protein extraction, fixed in cold methanol for further immunolabeling, or fixed in 2% paraformaldehyde/2.5% glutaraldehyde for TEM analysis. Staurosporine (Stp, Sigma-Aldrich #S4400) was dissolved in DMSO at 2 mM and stored at −20 °C. Trophoblasts were incubated for 4 hours with Stp at a final concentration of 0.5 µM. Tert-butyl hydroperoxide stock solution (TBHP, Luperox TBH70X solution, Sigma-Aldrich #458139) was stored at 4 °C. Trophoblasts were incubated from 1 to 3 h with TBHP at final concentrations between 100 and 250 µM. The NP concentrations used in the study are expressed in µg/mL (aiming to allow comparison to most of the NP publications on placenta models). Taking into account the volume of culture medium according to the different areas of the culture dishes, the corresponding concentrations in µg/cm^2 are presented in Table 1.

2.3. Cerium Dioxide Nanoparticle Preparation and Characterization

CeO_2 NPs were obtained from the Joint Research Center of the European Union (NM-212, IHCP, Ispra, Italy). NPs were dispersed in DMEM cell culture media without FCS at a concentration of 3 mg/mL through sonication, with a sonifier equipped with a cup horn (450 W and 50/60 Hz, Branson, Danbury, USA) at 70% amplitude, on ice, for 2 min. NPs were then sequentially diluted in cell culture medium with FCS immediately before use, to give a final concentration range of 0.6–640 µg/mL. Dynamic light scattering and zeta-potential determinations were performed in water, in cell culture media without FCS and in cell culture media with FCS, with the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). DLS measurements were performed in triplicate with a particle concentration of 0.05 mg/mL at 37 °C, at a scattering angle of 173°. Zeta-potential measurements were performed in

triplicate at 37 °C. The zeta-potential was calculated by fitting the electrophoretic mobility with the Smoluchowski model. For these Zeta-potential measurements, culture media with or without FCS were diluted in water (1:10).

2.4. Cell Viability by WST1

Cell viability was assessed on the basis of mitochondrial metabolic activity of cells using the WST1 assay (Sigma-Aldrich #11644807001)—in which mitochondria dehydrogenase cleaves the tetrazolium salt 2-(4-idophenyl)-3-(4-nitrophenyl)5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium (WST1) into formazan—and according to the manufacturer's instructions. Trophoblast cells were cultured overnight in 48-well plates, washed with fresh medium and treated accordingly for 24 to 72 h. At the end of the exposure time, cells were rinsed with culture medium and then WST1 reagent was added (1:100) to each well and incubated for 3 h at 37 °C. Spectrometric absorbance was measured using a microplate reader (EnSpire 2300 Multilabel reader, PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France) at 440 nm, and using 600 nm as the correction wavelength (to remove the non-specific emission). To measure background noise from NPs, we performed the same experiment in parallel, followed by the addition of Triton to each well 15 min before adding WST1 reagent, and the corresponding absorbances were subtracted from the results.

2.5. Cytotoxicity by LDH Release

Cytoplasmic membrane permeability was evaluated by assaying lactate dehydrogenase (LDH) in the culture supernatants. After treatment, the culture supernatants were kept and centrifuged for 3 min at 350× *g* to eliminate cells, debris and NPs. LDH concentrations were determined using a Roche/Hitachi cobas c 701/702 analyzer with a detection range of 10–1,000 IU/L. Within-run and between-run imprecision (CV%) values were <2.7%.

2.6. Caspase Activation Assay with ApoONE®

The induction of apoptosis was assessed by the estimation of the activity of caspases 3 and 7 using the Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 assay (Promega #G7791, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's instructions. Trophoblast cells were cultured in a 96-well plate and treated accordingly. At the end of treatments, the mixture of reagents was added to each well directly in the cell media and incubated for 1 h at room temperature. Fluorescence intensity was measured at excitation/emission wavelengths of 499 nm/521 nm using a microplate reader (EnSpire 2300 Multilabel reader, PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France). Interference of NPs with the fluorescence intensity was determined by measurements of plates before and immediately after adding NPs to the wells of staurosporine-treated cells. Thus, we determined that the particles themselves did not interfere with the florescence intensity when used at concentrations of 2.5, 10 and 40 μg/mL, unlike the concentration of 320 μg/mL, which reduced fluorescence intensity by 30%.

2.7. Reactive Oxygen Species (ROS) Detection by CM-H_2DCFDA

Reactive oxygen species (ROS) levels were determined by measuring the oxidation of the fluorescent probe 5′,6′-chloromethyl-2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H_2DCFDA, Thermo Fisher Scientific #C6827). Trophoblast cells seeded in a 96-well plate were washed with PBS and incubated with 10 μM CM-H_2DCFDA for 45 min at 37 °C, washed again with PBS and then incubated with or without NPs or TBHP for 4 to 72h. Fluorescence intensity was measured at excitation/emission wavelengths of 485/520 nm using a microplate reader (EnSpire 2300 Multilabel reader, PerkinElmer).

2.8. Assays of Hormone Secretions

hCG, progesterone (P4), estradiol (E2), hPL and PlGF were assayed in the culture supernatants of ST at 72 h of culture. At the end of treatments, supernatants were centrifuged for 3 min at 350× *g* to eliminate cell debris. Total hCG and P4 concentrations were determined using ECLIA immunoassay (Liaison®, DiaSorin[TS1]) with a detection range of 1.5–10,000 IU/L and 0.7–190 nmol/L, respectively. Within-run and between-run imprecision (CV%) values were below 5% and 11%, respectively; Detection limits were 0.3 IU/L and 0.4 nmol/L, respectively. E2 concentration was determined using ECLIA immunoassay (Liaison®, Estradiol II Gen) with a detection range of 10–1000 pg/mL. Within-run and between-run imprecision (CV%) values were below 3.9% and to 10.7%, respectively. The detection limit was 16.2 pg/mL. hPL concentrations were determined using an ELISA kit (DiaSource #KPAD1283, Ottignies-Louvain-la-Neuve, Belgium) with a detection limit of 0.04 mg/L. Supernatants of primary culture were diluted with the diluent provided (1:10) and assayed in duplicate. Optical densities were read at 450 nm on a microplate reader (EnSpire 2300 Multilabel reader, PerkinElmer). PlGF concentrations were determined using an ELISA kit (R&D Systems, #DPG00) with a detection limit of 7.0 pg/mL. Supernatants of primary culture were diluted with the RD5K diluent (1:10) provided and assayed in duplicate. Optical densities were read at 450 nm and 540 nm for the corrected wavelength on a microplate reader (EnSpire 2300 Multilabel reader, PerkinElmer).

Interferences of NPs with hormones (hormones adsorbed on NPs that are potentially discarded from samples by centrifugation) was determined by acellular incubation of supernatants after 72 h of culture of control cells, with three concentrations of NPs used in this study (2.5, 40 and 320 µg/mL) for 4 h at 37 °C, followed by a centrifugation step for 3 min at 350× *g*. Then, all assays were performed as previously and the results were compared to those of the same supernatant of control cells in the absence of acellular incubation with NPs. We concluded that NP reduced the results: by 7% for hCG whatever the concentration, by 20% for LDH only at 320 µg/mL (50.4 µg/cm^2), by 15–20% for P4 whatever the concentration, and by 10% for E2 & PlGF only at 320 µg/mL (50.4 µg/cm^2).

2.9. RNA Extraction

Trophoblast cells cultured in 35-mm culture dishes were lysed in TRIzol® (Tri Reagent®, Sigma-Aldrich #T9424). Total RNAs were then extracted in accordance with the manufacturer's instructions using the Direct-zol RNA Miniprep kit (Zymo research, #R2052, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), with DNase treatment as recommended. RNA concentrations were determined with a NanoDrop (NanoDrop ONE, Thermo Fisher Scientific) spectrophotometer by measuring optical density at 260 nm. The quality of RNAs was considered suitable for use when both A260/A280 and A260/A230 ratios were between 1.8 and 2.

2.10. Reverse Transcription and Quantitative PCR (RT-qPCR)

Reverse transcription was performed using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems #4368814, Villebon sur Yvette, France) with 500 ng of RNA. RNAs were first linearized at 65 °C for 5 min and in the presence of 0.1 µg random primers (Invitrogen, #48190011) and 10 mM dNTP (Invitrogen, #10297018) in a 13 µL reaction volume. Reverse transcriptions were performed in a 20 µL final reaction volume at 50 °C for 50 min and at 70 °C for 15 min. Gene-specific primers used for real-time PCR were designed using the OLIGO Explorer software (Molecular Biology Insights, Hawthorne, NY, USA) (Table 2). Quantitative real-time PCR was carried out in a 10 µL reaction volume containing 500 ng of cDNA, 45 nM of each primer, and Takyon™ MasterMix (Takyon™ Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue, Eurogentec, Angers, France) using a CFX384 Real-Time System for the detector coupled with a C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad). PCR cycles consisted of the following steps: Takyon activation (3 min, 95 °C), denaturation (10 s, 95 °C), and annealing and extension (1 min, 60 °C). The threshold cycle (Cq) was measured as the number of cycles at which the reporter fluorescent emission first exceeds the background. Data were analyzed with the CFX Maestro

software (Bio-Rad). The relative amounts of mRNA were estimated using the regression method and then expressed as fold change. Primers for *HPRT*, *SDHA RPL13* and *RPLO* were used as reference genes for the normalization of the results. The results are given as fold change and each gene was normalized to the geometric mean of reference genes that were found to be unchanged among the different conditions used.

Table 2. Primer sequences.

ASCT2	forward 5′-GGCTTGGTAGTGTTTGCCAT-3′ reverse 5′-GGGCAAAGAGTAAACCCACA-3′
Aromatase	forward 5′-CCTGAAGCCATGCCTGCTGC-3′ reverse 5′-CCGATCCCCATCCACAGGAATCT-3′
CDH1	forward 5′-CATTGCCACATACACTCTCTTCT-3′ reverse 5′-CGGTTACCGTGATCAAAATCTC-3′
GCM1	forward 5′-CAGAAGCAGCAGCGGAAAC-3′ reverse 5′-GACCTCGGCAAGGGATGA-3′
hCG beta	forward 5′-GCTACTGCCCCACCATGACC-3′ reverse 5′-ATGGACTCGAAGCGCACATC-3′
hPL	forward 5′-GCATGACTCCCAGACCTCCTT-3′ reverse 5′-TGCGGAGCAGCTCTAGATTGG-3′
HPRT	forward 5′-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3′ reverse 5′-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3′
MFSD2	forward 5′-CTCCTGGCCATCATGCTCTC-3′ reverse 5′-GGCCACCAAGATGAGAAA-3′
P450scc	forward 5′-TTTTTGCCCCTGTTGGATGCA-3′ reverse 5′-CCCTGGCGCTCCCCAAAAAT-3′
PlGF	forward 5′-GCTCGTCAGAGGTGGAAGTGGT-3′ reverse 5′-CTCGCTGGGGTACTCGGACA-3′
RPL13	forward 5′-AAGGTCGTGCGTCTGAAG-3′ reverse 5′- GAGTCCGTGGGTCTTGAG-3′
RPLO	forward 5′-AACATCTCCCCCTTCTCCT-3′ reverse 5′-ACTCGTTTGTACCCGTTGAT-3′
sFlt1	forward 5′-ACAATCAGAGGTGAGCACTGCAA-3′ reverse 5′-TCCGAGCCTGAAAGTTAGCAA-3′
SDHA	forward 5′-TGGGAACAAGAGGGCATCTG-3′ reverse 5′-CCACCACTGCATCAAATTCATG-3′
Syncytin 1	forward 5′-CGGACATCCAAAGTGATACATCCT-3′ reverse 5′-TGATGTATCCAAGACTCCACTCCA-3′
Syncytin 2	forward 5′-GCCTGCAAATAGTCTTCTTT-3′ reverse 5′-ATAGGGGCTATTCCCATTAG-3′

2.11. Western Blot

Total protein extracts from trophoblast cells from 60-mm dish cultures were obtained by harvesting cells in Laemmli buffer (0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem Merck #539131), phosphatase inhibitors (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, Merck #524629)). Protein extracts were centrifuged for 10 min at 14,000× *g* to eliminate NPs and cell debris, heated for 10 min at 70 °C, and then sonicated. Protein concentrations were determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific #23235). Equal amounts of proteins (30 µg) were separated on 4–15% or 8–16% SDS-PAGE mini-PROTEAN® TGX™ precast protein gel (Bio-Rad #4561084 #4561103, Marnes-la-Coquette, France) under reducing conditions (DTT 10%, Sample Reducing Agent 10X, Invitrogen #NP0009) and transferred onto a nitrocellulose

membrane (Trans-blot Turbo Transfer pack, 0.2 µm nitrocellulose, Bio-Rad #1704159). Blots were incubated overnight with the primary antibody at 4 °C, and then for 1 h with the appropriate DyLight 680 or 800 Fluor-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific #35568 and #35521). The primary antibodies used were: mouse monoclonal anti-β-actin (A5441, Sigma-Aldrich, 2.6 µg/mL), rabbit polyclonal anti-aromatase (CYP19A1, 0.3 µg/mL, Abcam #ab66981), rabbit monoclonal anti-catalase (Cell Signaling Technology #12980, Leiden, The Netherlands), rabbit polyclonal anti-heme oxygenase 1 (HO1, 1 µg/mL, Enzo Life Sciences #ADI-SPA-895, Villeurbanne, France), rabbit monoclonal anti-HSD3β1 (0.18 µg/mL, Abcam #ab167417, Cambridge, UK), rabbit monoclonal anti-HSD17β1 (0.0152 µg/mL, Abcam #ab51045), rabbit polyclonal anti-MLN64 (1 µg/mL, Abcam #ab3478), mouse monoclonal anti-p53 (1:1000, Clone DO-7, DakoCytomation #M7001), rabbit polyclonal anti-P450scc (1 µg/mL, Abcam #ab75497), rabbit polyclonal anti-PARP1 (1:1000, Cell Signaling Technology #9542), rabbit polyclonal anti-Prx-SO_3 (1:1000, Abcam #ab16830), mouse monoclonal anti-SOD1 (1:1000, Cell Signaling Technology #4266), rabbit monoclonal anti-SOD2 (1:1000, Cell Signaling Technology #13141), rabbit polyclonal anti-STS (1:1000, Abcam #ab62219), mouse monoclonal anti-Vinculin (1 µg/mL, V9131, Sigma-Aldrich). Secondary antibodies were DyLight 800-labeled anti-mouse (Thermo Fisher Scientific #35521) or DyLight 680-labeled anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific #35568), and blots were scanned with an Odyssey® Imaging System (Li-COR, Bad Homburg, Germany). Quantification was performed using Li-COR Odyssey software.

2.12. Cell Immunolabeling and Fusion Index

After trophoblast culture in 35-mm culture dishes, cells were washed with PBS, fixed and permeabilized in cold methanol for 8 min, and saturated with a solution of 1% BSA and 0.1% Tween in PBS for 2 h at room temperature. The primary antibody, anti-desmoplakin (5 µg/mL, Abcam #ab71690), was prepared in PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween and incubated overnight at 4 °C. After washing, the cells were incubated with Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit antibody (4 µg/mL, Invitrogen #A11010, Illkirch, France) diluted in PBS containing 1% BSA and 0.1% Tween for 2 h at room temperature and protected from light. Nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 min at room temperature and protected from light, and then mounted on glass slides with Dako fluorescence mounting medium (Dako #S3023, Les Ulis, France) for microscopy. Images were taken by epifluorescence microscope (BX60, Olympus, Rungis, France), equipped with a 40x oil objective (Olympus 1.00), an ultrahigh-vacuum mercury lamp and a Hamamatsu camera. Pictures were taken with VisionStage Orca Software (v1.6) associated with the Hamamatsu camera. Syncytium formation was followed by monitoring the cellular distribution of desmoplakin and nuclei, termed the fusion index. The fusion index was calculated using the previously published method [32,33], from nine non-overlapping images per replicate and determined as [(N−S)/T], where N equals the number of nuclei in syncytia, S equals the number of syncytia, and T equals the total number of nuclei counted (VCT plus ST).

2.13. Transmission Electronic Microscopy (TEM)

Cells were seeded in 60-mm culture dishes and treated adequately. Cells were collected by trypsinization and centrifuged for 5 min at 1400× *g*. The cells were resuspended and washed in PB buffer (0.05 M PIPES [piperazine-N,N′-bis(2-ethanesulfonic acid)], 5 mM $CaCl_2$, pH 7.3) for 10 min, then centrifuged for 5 min at 1400× *g* and fixed in PB containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde for 45 min at room temperature. After 5 min of centrifugation at 1400× *g*, cells were washed twice for 10 min in PB. The samples were post-fixed for 45 min in PB containing 1% osmium tetroxide at 4 °C and then in 1% aqueous uranyl acetate solution for 2 h at room temperature. The samples were then dehydrated in serial graded ethanol solutions (30%, 50%, 70%, 95% and 100%, 3 times for 10 min each) followed by ethanol/propylene oxide (1/1 [vol/vol]) and propylene oxide (10 min) and finally in pure propylene oxide (3 times for 10 min). Each sample was finally embedded in Epon epoxy resin. Ultrathin sections (of 80 nm thickness for TEM and of 200 nm for EDX) were

cut with a Leica ultracut S microtome fitted with a diamond knife (Diatome histoknife Jumbo or Diatome ultrathin), stained with 2% uranyl acetate and lead citrate and transferred onto copper grids. The microscope used for the study was a Jeol electron microscope (JEM-100S, Croisy sur Seine, France) at 80 kV with an Orius SC200 digital camera (Gatan-Roper Scientific, Evry, France). Acquisitions were performed with Gatan software. From the micrographs, the sizes of intracellular NP aggregates were measured with ImageJ Software using the Analyse Particles module on 50 morphologically preserved cells containing NPs, chosen randomly in each condition. The percentage of cells containing NPs was determined by observation of 200 morphologically preserved cells. Cells displaying morphological signs of cellular death or whose nuclei were not clearly perceptible were systematically excluded.

2.14. Scanning TEM and EDX Analysis

For energy dispersive X-ray (EDX) and scanning transmission electronic microscopy (STEM)-EDX analysis, cell sections (200 nm) were cut with an ultramicrotome EM UC6 (Leica Microsystems, Nanterre, France) and, respectively, collected on glass slides or formvar carbon-coated copper grids (Agar Scientific Ltd., Stansted, Essex, UK). EDX studies were performed with a JEOL (JEM-1400) transmission electron microscope operating at 120 kV. The microscope was equipped with a SAMx EDS SD-Detector in order to obtain information on the chemical composition of the cell sections. Spectral data were acquired with IDEFix software for 60 s at 10,000 magnification, and the sections were tilted between 10° toward the detector. Cerium signal was detected at 4.84 keV (Ce Lα1). Dark-field STEM images were collected with the annular dark field detector with 8 cm camera length. EDX chemical maps in STEM mode were recorded for 30 min with Maxview software.

2.15. Statistical Analysis

All experiments were reproduced with at least three independent placentas and the results of quantitative analysis are presented as means +/− SEM. Differences between groups were evaluated with the paired Student's t-test using GraphPad Prism 6.0 software. The level of significance was fixed at a p-value < 0.05 (*), < 0.01 (**), < 0.001 (***) or < 0.0001 (****).

3. Results

3.1. NP Characterization

Before any cell culture experimentation, the behavior of CeO_2 NPs was characterized in different media. Zeta potential and hydrodynamic diameter of the suspended particles in water and in diluted DMEM cell culture media with (w/) or without (w/o) fetal calf serum (FCS) are summarized in Table 3, which also summarizes physicochemical data from the provider on primary particle size (SEM), BET (Brunauer, Emmett and Teller method) surface area and crystalline structure of the CeO_2 NPs used. The state of agglomeration of NPs, directly or 1h after sonication, was determined by dynamic light scattering (DLS) and the size distribution is shown in Figure 1. The DLS results show that NPs were monodispersed and the distribution curves show variable degrees of agglomeration of CeO_2 NPs in all the media tested, with larger agglomerates in DMEM with FCS. The average hydrodynamic diameters of CeO_2 NPs in water, in DMEM without FCS and in DMEM with FCS were 378 ± 65 nm, 441 ± 57 nm and 503 ± 55 nm, respectively, directly after sonication (Figure 1A and Table 3). We performed the same measurements 1 h after sonication and the hydrodynamic diameters were roughly the same with respective values of 441 ± 43 nm, 411 ± 51 nm and 443 ± 80 nm in the same solutions (Figure 1B and Table 3). Thus, the average hydrodynamic sizes were much larger than their primary size determined by the manufacturer (28.4 ± 10.4 nm) (Table 3), suggesting that CeO_2 NPs might easily form agglomerates and/or aggregates in suspension. This aggregation increased after 24 h but remained stable for longer incubation periods and was greater in culture media compared to suspensions in water (high NP aggregation was observed by DLS in DMEM at 24 h, 48 h and 72 h). The zeta potential analysis showed that CeO_2 NPs have a sharp negative surface charge when suspended in water with a value around −32.7 ± 0.9 mV.

Table 3. Physicochemical characteristics of cerium dioxide nanoparticles.

			Zeta Potential (mV)			Hydrodynamic Diameter (nm)			
Primary Particle Size (ø in nm) [a]	**BET Surface Area (m^2/g) [a]**	**Crystalline Structure [a]**	**Water**	**DMEM w/o FCS**	**DMEM w/FCS**	**Water**		**DMEM w/o FCS**	**DMEM w/FCS**
28.4 ± 10.4	27.2 ± 0.9	polyhedral	−32.7 ± 0.9	−21.7 ± 2.8	23.4 ± 1	Time 0:	378 ± 65	441 ± 57	503 ± 55
						Time 1h:	441 ± 43	411 ± 51	443 ± 80
						Time 24 h:	804 ± 30	aggregation	aggregation
						Time 48 h:	758 ± 47	aggregation	aggregation
						Time 72 h:	736 ± 29	aggregation	aggregation

[a] Manufacturer's data; BET: Brunauer, Emmett and Teller method; w/: with; w/o: without.

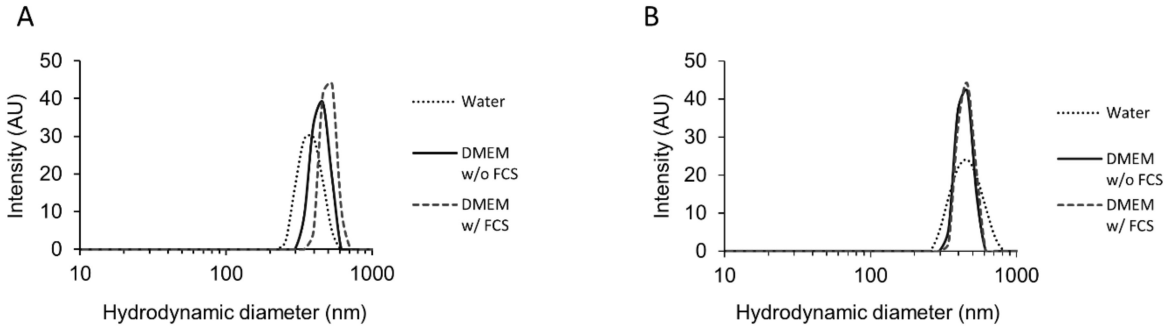


Figure 1. Size distributions of cerium dioxide nanoparticles in solution. Nanoparticles were suspended in cell culture media without fetal calf serum (FCS) (DMEM w/o FCS, 3 mg/mL), sonicated and diluted (0.05 mg/mL) in water, DMEM w/o FCS or cell culture media with FCS (DMEM w/FCS). Dynamic light scattering (DLS) analysis of cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) showing size distributions and hydrodynamic diameters of NPs immediately after sonication (**A**) or 1 h after sonication (**B**).

Due to the high content of salts, the CeO_2 charge was measured in diluted DMEM medium (1 DMEM: 10 H_2O [*v/v*]). In both DMEM physiological solutions without or with FCS, the surface charges were still negative but with lower values (−21.7 ± 2.8 and −23.4 ± 1.0 mV, respectively) (Table 3).

3.2. Internalization of Cerium Dioxide Nanoparticles in Human Trophoblasts

To determine whether human trophoblasts adsorb NPs at their cell surface or can even internalize CeO_2 NPs, we performed transmission electron microscopy (TEM) (Figure 2). To this end, human VCT were purified from placenta at term of pregnancy (37–39 weeks of amenorrhea (WA)), were left to plate overnight and were either treated as VCT, at 24 h of culture (Figure 2A), or left in culture for 3 days to spontaneously differentiate into ST before incubation with CeO_2 NPs (Figure 2B). For the concentrations of NPs, we tested a range from low to relatively high levels (0.6, 2.5, 10 and 40 µg/mL corresponding to 0.1, 0.4, 1.6 and 6.3 µg/cm^2, respectively (Table 1)) for 24 h of incubation. Figure 2A shows that NPs are internalized by VCT regardless of the concentrations tested and that intracellular NPs are assembled in the cytosol, mostly in a perinuclear zone, where they form agglomerates/aggregates. Even after deep exploration of the images from TEM micrographs, we did not detect any NPs in the cellular organelles (e.g., the nucleus, mitochondria, the Golgi apparatus or endoplasmic reticulum). However, NPs could often be visualized in vesicle-like structures within the cytosol (Figure 2A, higher magnification). After exposure to CeO_2 NPs at these concentrations, the majority of VCT cells were morphologically preserved, with an intact cytoplasmic membrane and nucleus, as visualized by toluidine staining (Figure S1). We then estimated the proportion of cells that internalized NPs as a function of the concentration used by randomly counting 200 cells for each condition (Figure 2C). As expected, the internalization of NPs is concentration-dependent and ranged from approximately 3% of the cells containing NPs at the concentration of 0.6 µg/mL (0.1 µg/cm^2) to more than half (58%) of the cells containing NPs at the concentration of 40 µg/mL (6.3 µg/cm^2). The sizes of the intracellular agglomerates of NPs were measured in 50 cells for each condition and the size distribution is shown in Figure 2D (upper bar graph). For each concentration, we found that the NPs occur mostly as individual NPs (around 40% between 140 and 1000 nm^2, corresponding to a size of 10–30 nm), even though they appear grouped in the cytosol, and that the number of agglomerates decreases with increasing size (6 to 9 % above 10^5 nm^2, corresponding to a size above 316 nm). Next, we did the same experiments on terminal differentiated trophoblasts, the ST cells, which are physiologically more relevant as they are the tissue in direct contact with the maternal blood, and thus with pollutants. The ST can be easily identified as their nuclei appear lighter under TEM and present chromatin condensation spots (because of the chromatin remodeling of these differentiated cells), and harbor several clumped nuclei (Figure S1 and Figure 2B). NPs were internalized in ST in the same way as in VCT (Figure 2B). ST uptake of NPs was also concentration-dependent and ranged from 6% of the cells containing NPs at a concentration

of 0.6 µg/mL (0.1 µg/cm^2) to more than half (56%) of the cells containing NPs at a concentration of 40 µg/mL (6.3 µg/cm^2) (Figure 2C). To compare the capacity of ST versus VCT to accumulate NPs, we evaluated the size of NPs agglomerates in ST (Figure 2D, lower bar graph). The size distribution was nearly the same as in VCT, with a higher number of individual nanoparticles (around 35% between 140 and 1000 nm^2).

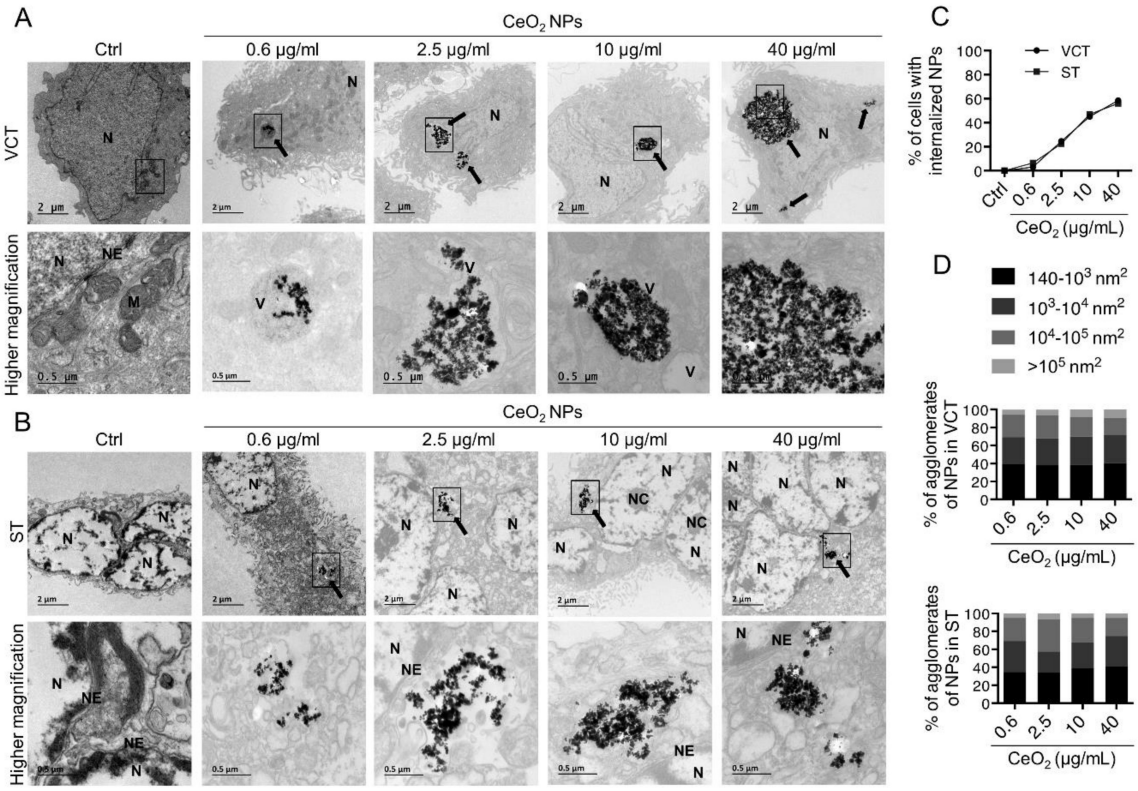


Figure 2. Cerium dioxide nanoparticles uptake by human primary cytotrophoblast and syncytiotrophoblasts. Primary cytotrophoblasts (VCT) purified from term placenta were plated overnight and cultured for 24 h to obtain VCT or for 72 h in order to form the syncytiotrophoblast (ST). VCT or ST were either untreated (Ctrl) or incubated with cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) at the indicated concentrations for 24 h. (**A**) Transmission electron microscopy (TEM) photomicrographs, with applied auto-contrast, of VCT treated as described. Bottom images are higher magnifications of the squares; images are rotated by around 90° to the right. Black arrows show the agglomerates of nanoparticles. Scale bars: 2 µm and 500 nm. (**B**) TEM photomicrographs, with applied auto-contrast, of ST treated as described. Bottom images are higher magnifications of the squares; images are rotated by around 90° to the right. Black arrows show the agglomerates of nanoparticles. Scale bars: 2 µm and 500 nm. (**C**) Percentage of VCT and ST with internalized nanoparticles from quantification of 200 cells under TEM. (**D**) Measurement of the size of nanoparticles and/or agglomerates in VCT and ST, represented as percentage of occurrence according to the surface area. M: mitochondrion; N: nucleus; NC: nucleolus; NE: nuclear envelope; V: vesicle.

Next, to confirm that the agglomerates that we visualized in trophoblasts under TEM are of CeO_2 NPs, we performed energy dispersive X-ray (EDX) analysis by TEM of cells incubated with 40 µg/mL (6.3 µg/cm^2) of CeO_2 NPs and compared them with untreated cells (Figure 3). The EDX analysis determines the chemical composition of the cell sections. In the micrographs, we found the energy peak (4.839 keV) corresponding to cerium (Ce) in cells incubated with NPs (Figure 3A, right graph and the corresponding TEM image) and their absence from control cells (Figure 3A, left graph and the corresponding TEM image). We next established the chemical mapping of control cells and of NP-treated cell sections by scanning transmission electron microscopy (STEM) dark field and EDX

analysis. The Dark field STEM images show the Z-contrast according to the scattering of electrons, and EDX gives the cartography, pixel by pixel, of the chemical element of interest present in the sample. In Figure 3B, we detected Ce in co-localization with the NP cluster visible in the STEM and dark field images (Figure 3B, right images). Although some dispersed background pixels of Ce were detected, there was no agglomerate of Ce visualized in the control cells (Figure 3B, left images). Taken together, these results demonstrate that human primary trophoblasts, both VCT and fully differentiated ST, are able to internalize CeO_2 NPs in a concentration-dependent manner.

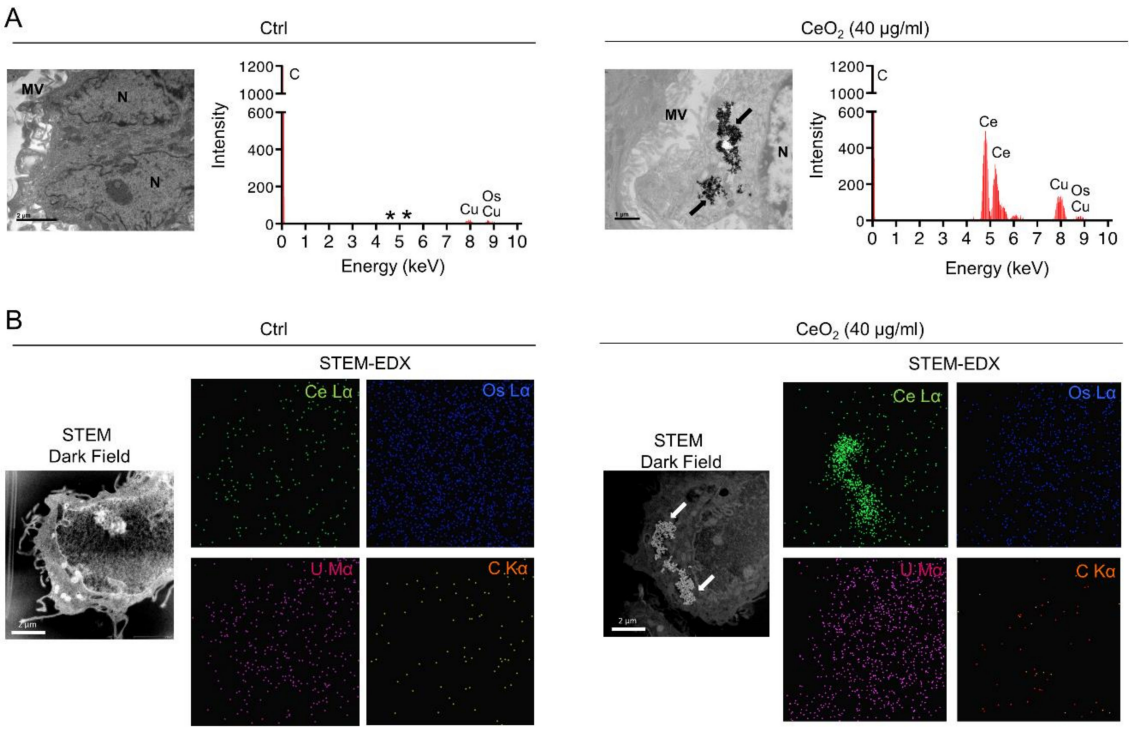


Figure 3. EDX and STEM analysis of cerium dioxide nanoparticles inside cells. VCT purified from term placenta were plated overnight in culture and then were either untreated (Ctrl, left) or incubated with 40 µg/mL of CeO_2 NPs (right) for 24 h. (**A**) Transmission electron microscopy (TEM) photomicrographs and graphs of the corresponding EDX spectra. The absorption peaks are labeled with symbols of the element detected: Carbon (C), Cerium (Ce), Copper (Cu), Osmium (Os). Stainings corresponding to Os, U and C serve as control. Black arrows show the agglomerates of nanoparticles in TEM. Scale bars: 2 µm and 1 µm. (*) mark the expected cerium energy peaks. (**B**) Images of Scanning Transmission Electronic Microscopy (STEM) analysis under darkfield z-contrast and the corresponding EDX mapping for cerium (Ce Lα), osmium (Os Lα), uranium (U Mα) and carbon (C Kα) in the scanned area. White arrows show the agglomerates of nanoparticles in STEM. Scale bars: 2 µm. MV: microvilli; N: nucleus.

3.3. Impact of Cerium Dioxide Nanoparticles on Human Primary Trophoblast Cell Viability

We next investigated the effects of NPs on cellular viability (Figure 4). To determine whether NPs have cytotoxic effects on trophoblasts, VCT were exposed to a range of concentrations of CeO_2 NPs from 2.5 to 640 µg/mL (corresponding to 0.4 to 101 µg/cm^2 (Table 1)) for 24 h to 72 h. WST1 colorimetric cell viability assays were performed after each incubation period (Figure 4A). High concentrations of CeO_2 NPs (above 80 µg/mL (12.6 µg/cm^2)) decreased trophoblast cell viability after 24 h-exposure, and from a much lower concentration (5 µg/mL (0.8 µg/cm^2)) at a longer exposure time (48 h incubation). However, WST1 is a metabolic test that takes into account changes in mitochondrial activities by pollutants. Thus, in parallel, release of LDH, an intracellular glycolytic enzyme, was quantified in supernatants of trophoblasts exposed to CeO_2 (Figure 4B). The amount of LDH release in cell media reflects cell membrane integrity loss and thus is a sensitive marker for cellular toxicity. A significant

increase of LDH release was observed only at extremely high concentrations of CeO_2 NPs (320 µg/mL (50.4 µg/cm^2)) for all incubation times.

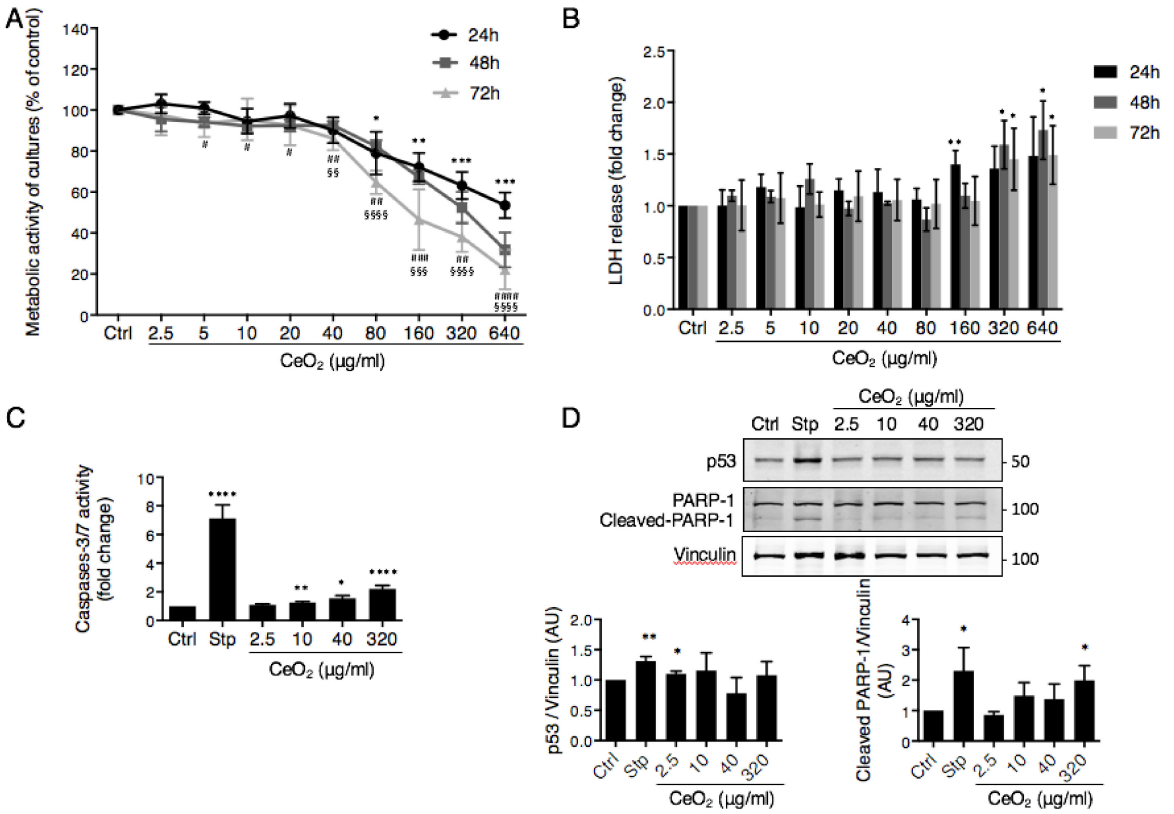


Figure 4. Effect of cerium dioxide nanoparticles on human primary trophoblast viability. VCT purified from term placenta were plated overnight in culture and were either untreated (Ctrl) or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 24 h to 72 h. (**A**) WST1 assay showing metabolic activity of VCT as means +/− SEM (n = 3) relative to control for each time of treatment. * p <0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 vs 24 h; # p <0.05; ## p <0.01; ### p < 0.001; #### p < 0.0001 vs 48h; §§ p < 0.01; §§§ p < 0.001; §§§§ p < 0.0001 vs 72 h. (**B**) LDH release in culture media showing VCT membrane permeabilization after exposure to nanoparticles. Data are represented as means +/− SEM (n = 4) relative to untreated cells (Ctrl). * p < 0.05; ** p <0.01 vs Control. (**C**) Caspase-3/7 activity of VCT evaluated by ApoONE assay. Staurosporine (Stp, 0.5 µM, 4 h of incubation) was used as positive control. Fluorescence emission was recorded and the graph represents the mean +/− SEM (n = 4) normalized to untreated cells (Ctrl). (**D**) VCT were left untreated (Ctrl), were incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 24 h or with staurosporine (Stp, 0.5 µM) for 4 h. Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-p53, anti-PARP-1 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and are shown in the bar scale graph as ratio to the vinculin as mean +/− SEM (n = 3). * p < 0.05; ** p < 0.01 vs. Control.

Moreover, we evaluated the activation of caspases 3 and 7, two apoptosis effectors, using a caspase activity test after a 24 h-exposure to four concentrations of CeO_2 NPs (2.5, 10, 40 and 320 µg/mL, corresponding to 0.4, 1.6, 6.3 and 50.4, respectively) and compared to incubation with staurosporine (Stp), a classic apoptosis inducer (Figure 4C). A very low but significant activation of these caspases was induced by the concentrations higher than 10 µg/mL (1.6 µg/cm^2) of NP (1.25 ± 0.08, 1.55 ± 0.19 and 2.21 ± 0.24 fold increase for 10, 40 and 320 µg/mL, respectively, versus 7.13 ± 0.94 for Stp) suggesting that some of the cells may enter the apoptotic process. The results were underestimated for the concentration of 320 µg/mL (50.4 µg/cm^2) of NPs, because the test of NP interference for each concentration used showed only a decrease (30%) of the fluorescence at 320 µg/mL, but this was not the

case for the lower concentrations tested. We also evaluated the level of p53 protein and of PARP-1 by Western blot (Figure 4D). The apoptosis inducer p53 is stabilized at the protein level in response to DNA damage or oxidative stress and its activation leads to either cell cycle arrest or commitment to apoptosis. PARP-1, a nuclear poly (ADP-ribose) polymerase involved in DNA repair, is a caspase-3 direct target whose cleavage (cleaved PARP-1) serves as a marker of cells undergoing apoptosis. Quantifications of Western blots do not show major variations in p53 level even at the highest concentrations of CeO_2 used, although a very low but significant stabilization of p53 was obtained with the lowest concentration of 2.5 µg/mL (0.4 µg/cm^2) of CeO_2 NPs (Figure 4D, left quantification graph). PARP-1 cleavage was only detected with high concentrations of NP (320 µg/mL (50.4 µg/cm^2)), with a significant increase of almost the same extent as in Stp-positive controls (Figure 4D, right quantification graph). Altogether, our results indicate that CeO_2 NPs are toxic for human primary trophoblasts at extremely high concentrations and that this involves caspase activation in the absence of p53 stabilization, although much lower concentrations can affect the metabolic activity of the trophoblasts after longer times of exposure.

3.4. Impact of Cerium Dioxide Nanoparticles on the Oxidative State of Human Trophoblasts

We investigated the effects of CeO_2 NPs on the cellular oxidative stress of human trophoblasts (Figure 5) by measuring the production of ROS using the CM-H_2DCFDA probe after exposure of primary trophoblasts to increased concentrations of CeO_2 NPs (from 2.5 to 320 µg/mL, corresponding to 0.4–50.4 µg/cm^2) for 4 h (Figure 5A), 24 h, 48 h or 72 h (Figure S2A). The stabilized H_2O_2 tert-butyl hydroperoxide (TBHP), described as a strong oxidative stress inducer, was used here as a positive control for each time point, and showed that the trophoblasts are sensitive to H_2O_2, as reported before [34]. As shown in Figure 2A, there was a slight increase in ROS production when VCT were incubated with CeO_2 NPs at 5 to 20 µg/mL (0.8 to 3.2 µg/cm^2) for 4 h, but this was no longer the case after 24, 48 or 72 h of incubation (Figure S2A). On the contrary, there was a decrease in ROS production at concentrations of CeO_2 NPs higher than 160 µg/mL (50.4 µg/cm^2) at 4 h of incubation. This profile was similar at a longer time of exposure (24 h, 48 h or 72 h) with a marked decrease in ROS production at concentrations of CeO_2 NPs higher than 80 µg/mL (12.6 µg/cm^2). To determine if the exposure to CeO_2 NPs triggered an adaptive antioxidant response, protein levels of the main antioxidant enzymes were evaluated by Western blot, such as: SOD1, SOD2, catalase, HO-1, and sulfinic 2-Cys peroxiredoxines (Prx-SO_3), a sensor of intracellular H_2O_2 (Figure 5B and Figure S2B). As shown with the positive control TBHP, trophoblasts were able to develop an antioxidant response (at 4 h or 24 h), confirmed by the increase of SOD1, SOD2 and Prx-SO_3 expressions. After cytotrophoblast exposure to NPs, there were no significant modifications of these antioxidant enzymes and sensors with any of the concentrations of NPs tested after 4 h or 24 h of incubation, except for SOD1 with a slight decrease at 10 and 40 µg/mL (1.6 and 6.3 µg/cm^2, respectively) (Figure 5B and Figure S2B). Together with the lack of stabilization of the p53 protein shown in Figure 4, these results show that CeO_2 NPs did not activate antioxidant response pathways at the highest concentrations used.

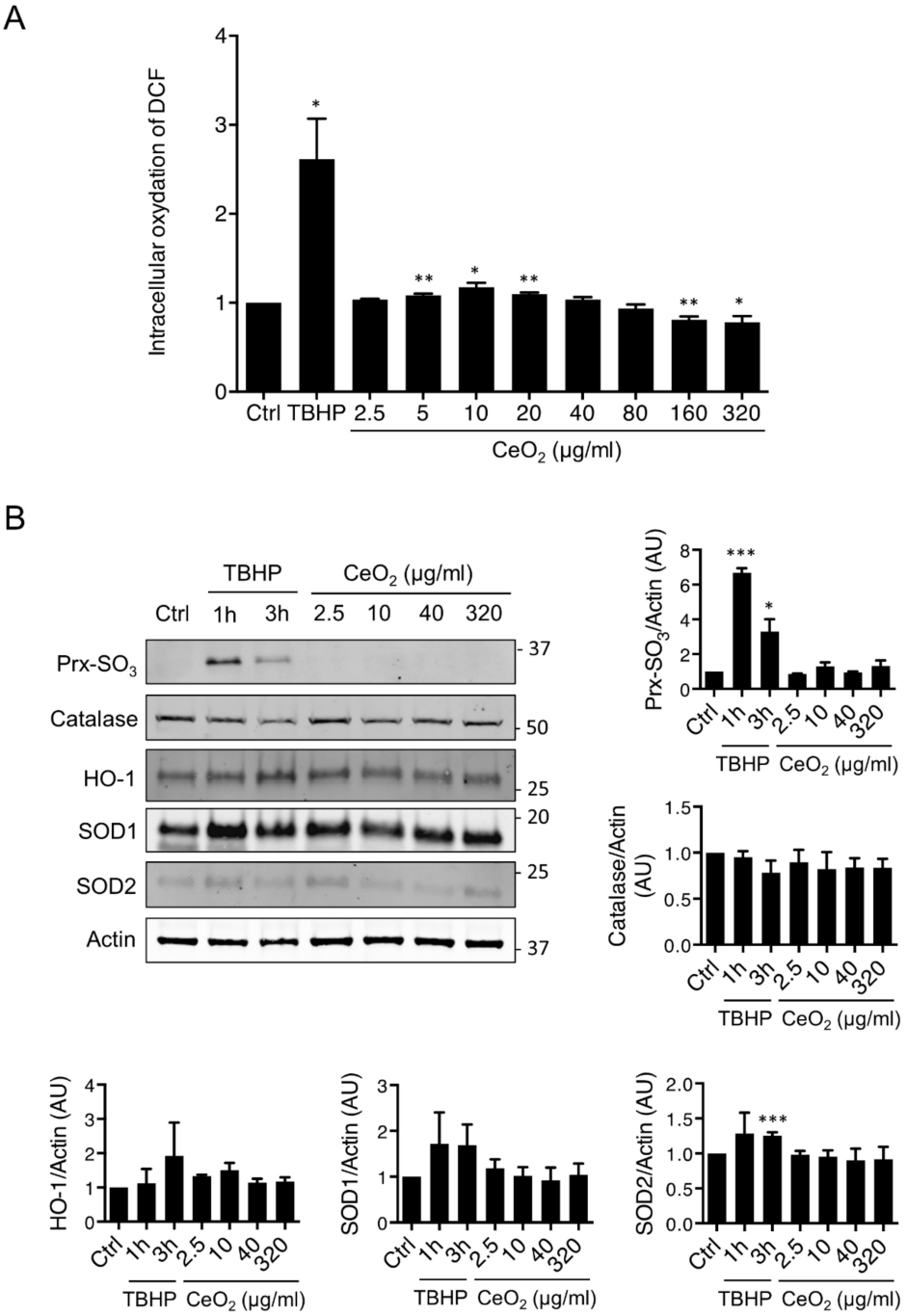


Figure 5. Intracellular oxidative stress after trophoblast exposure to cerium dioxide nanoparticles. VCT purified from term placenta were plated overnight in culture and then left untreated (Ctrl) or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 4 h. (**A**) Intracellular ROS levels of VCT were evaluated using CM-H_2DCFDA. Tert-butyl hydroperoxide (TBHP, 250 µM) was used as positive control. Experiments were performed in technical triplicate from 3 independent trophoblast cultures (n = 3). Data are expressed as means +/− SEM normalized to control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (**B**) VCT were untreated (Ctrl), treated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 4 h or with tert-Butyl hydroperoxide (TBHP, 100 µM) for 1 h or 3 h of incubation. Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-Prx-SO_3, anti-catalase, anti-HO1, anti-SOD1, anti-SOD2 and anti-actin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and are shown in the bar scale graph as the ratio to actin as mean +/− SEM (n = 3).

3.5. Effects of Cerium Dioxide Nanoparticles on Human Primary Trophoblast Differentiation

The differentiation of human primary VCT is characterized by syncytialization, their capacity in vitro to spontaneously aggregate and fuse to form the syncytiotrophoblast, concomitant with an increase in hormonal secretion by the syncytiotrophoblast. We have investigated the effect of two concentrations of CeO_2 NPs, a low concentration (2.5 µg/mL (0.4 µg/cm^2)) and a relatively high concentration (40 µg/mL (6.3 µg/cm^2)), which affect metabolic activity without LDH release, on the differentiation of human VCT into ST in vitro. The fusion index was calculated using a published method [32,33] based on the immunostaining of desmoplakin, a marker of the cellular boundaries (component of desmosome), and of nuclei staining with DAPI (Figure 6). Syncytialization leads to the formation of multinucleated cells, distinguished by several nuclei surrounded by a single plasma membrane. In comparison to untreated VCT, the graph shows a 20% decrease in syncytium formation for the two concentrations of NP tested, with a fusion index of 0.83 ± 0.02 for NPs at 2.5 µg/mL (0.4 µg/cm^2) and 0.81 ± 0.04 for NPs at 40 µg/mL (6.3 µg/cm^2) (Figure 6, right graph). When we analyzed the expression of the main actors of VCT differentiation (syncytin 1, syncytin 2, GCM1 and CDH1) and of syncytin-specific receptors (ASCT2 and MFSD2) by qPCR using mRNA extracted from untreated VCT and VCT exposed to CeO_2 for 24 h, no major changes were found whatever the concentration of NPs used (2.5, 10 and 40 µg/mL, corresponding to 0.4, 1.6 and 6.3 µg/cm^2, respectively) (Figure S3). However, because of the lack of reliable antibodies, we could not draw conclusions regarding their protein levels. Fusion index results indicate that CeO_2 NPs markedly affect the capacity of trophoblasts to form a ST, with no deregulation in expression of the master participants involved in the formation of syncytiotrophoblasts.

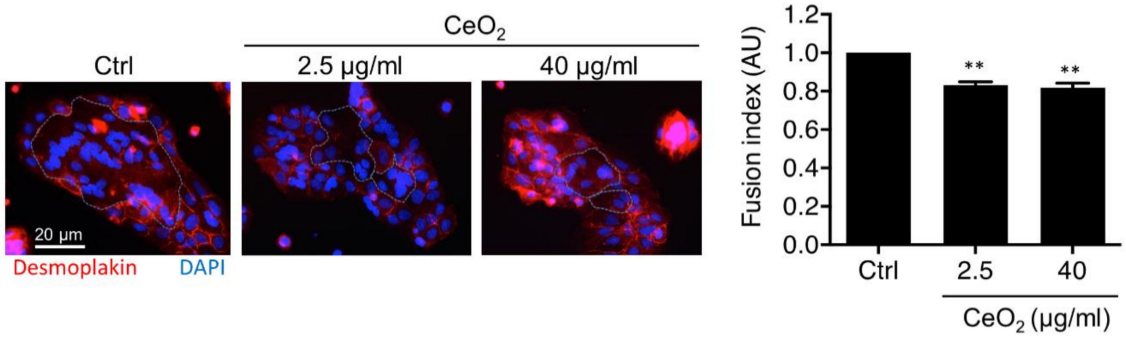


Figure 6. Impact of cerium dioxide nanoparticles on trophoblast fusion. VCT purified from term placenta were plated overnight in culture and were either untreated (Ctrl) or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 72 h. ST were then fixed and permeabilized with methanol. Epifluorescence microscopy images after desmoplakin immunostaining (membrane protein, red) and nuclei (DAPI, blue). The dotted lines delimit the syncytiotrophoblast. Scale bar: 20 µm. Nuclei were counted using ImageJ. Fusion index was calculated and values are represented as mean +/− SEM (n = 3) of control (right graph). ** $p < 0.01$.

3.6. Effects of Cerium Dioxide Nanoparticles on the Endocrine Function of the Syncytiotrophoblasts

We next investigated the impact of NPs on hormonal function of the ST. Hormones secreted by the ST include polypeptide hormones like human chorionic gonadotropin (hCG) and placental lactogen (hPL), and steroid hormones such as progesterone (P4) and estrogen (E2). The trophoblast also produces placenta growth factor (PlGF), a ligand of the VEGF receptor 1 (VEGF-R1), which promotes angiogenesis, and sFlt-1, the soluble form of VEGF-R1 with antiangiogenic properties. The fine balance of pro- and anti-angiogenic factors is often deregulated in several pregnancy disorders such as preeclampsia [35,36]. Levels of peptide hormones (hCG and hPL), PlGF angiogenic factor and steroid hormones, like progesterone (P4) and estradiol (E2), which are released in the culture media by trophoblasts after 72 h of culture, were analyzed from the same samples depicted in Figure 4A,B (Figure 7A). Interferences of NPs with hormones were determined as described in Methods. In Figure 7,

we show that at 40 μg/mL (6.3 μg/cm^2) (a concentration of NP that showed decreased metabolic activity of culture without LDH release at 72h), the CeO_2 NPs modify the secretion of hCG and hPL, although considerable inter-individual placenta variations are observed at lower concentrations, but without statistical significance for the pool of n = 9 placentas. In the case of PlGF secretion, CeO_2 NPs induced no effect at concentrations from 2.5 to 40 μg/mL (0.4 to 6.3 μg/cm^2). A marked decrease of hCG, hPL and PlGF secretions was observed with the highly toxic concentration of 320 μg/mL (50.4 μg/cm^2), and this follows the course of cell metabolic activity (blue bars showing average values of WST1 assay), thus this decrease is due to the mortality of the trophoblasts. When we evaluated gene expression of hCGβ, hPL, PlGF and sFlt1 by qPCR after 24 h of exposure to NPs (Figure S4A), we observed no significant variation at the concentrations tested (2.5, 10 and 40 μg/mL, corresponding to 0.4, 1.6 and 6.3 μg/cm^2, respectively). Among the steroids, the secretion of P4 was maintained at the level of untreated trophoblasts despite the drastic decrease in cell viability (38 ± 7% living cells) with the highly cytotoxic concentrations of CeO_2 NPs (320 μg/mL (50.4 μg/cm^2)). Moreover, lower concentrations of NPs tended to perturb P4 secretion, with a higher production of P4 relative to the metabolically active cells and in a concentration-dependent manner (with a ratio P4 secretion/cell viability of 0.83 at 2.5 μg/mL (0.4 μg/cm^2), 1.19 at 10 μg/mL (1.6 μg/cm^2), 1.14 at 40 μg/mL (6.3 μg/cm^2) and 2.32 at 320 μg/mL (50.4 μg/cm^2)). This was not the case for E2, which also followed the profile of cell viability, with a decreased secretion mainly at the concentration of NP of 320 μg/mL (50.4 μg/cm^2). We next evaluated the protein expression of all the enzymes involved in the pathways of steroidogenesis (Figure 7B). Intracellular cholesterol is carried into the mitochondria by metastatic lymph node 64 protein (MLN64, also known as StAR-related lipid transfer domain containing 3 (STARD3)), where it is cleaved by cytochrome P450 side-chain cleavage (P450ssc) to form pregnenolone, which is converted to P4 by 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD3β1). E2 is produced from dehydroepiandrosterone sulfate (SDHEA) by the steroid sulfatase (STS) into DHEA and then by two last enzymes 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 1 (HSD17β1) and aromatase (CYP19A1). Western blot analyses show that all of these enzymes are present in both VCT and ST, but their protein levels are increased during ST formation, while MLN64 does not change (Figure 7B), as already described [37]. Figure 7B shows a significant decrease in aromatase protein levels from 40 μg/mL (6.3 μg/cm^2) (0.82 ± 0.03 and 0.43 ± 0.02 AU with 320 μg/mL (50.4 μg/cm^2), respectively). Again, a decrease in the protein levels of HSD3β1 (0.80 ± 0.06 AU), HSD17β1 (0.73 ± 0.09 AU) and STS (0.64 ± 0.12 AU) was obtained with the highest concentration tested (320 μg/mL (50.4 μg/cm^2)), without returning to the initial levels of the undifferentiated VCT, except for STS. Gene expressions of aromatase and P450scc were also evaluated by qPCR (Figure S4B) and no significant variations were observed with the concentrations between 2.5 to 40 μg/mL (0.4 to 6.3 μg/cm^2), in accordance with the WB results. Altogether these results show that CeO_2 NPs decrease hCG, hPL, P4 and E2 secretion only at high and toxic concentrations, but disturb hCG and hPL at much lower concentrations (40 μg/mL (6.3 μg/cm^2)), for which the metabolic activity of the trophoblast was affected in the absence of LDH release.

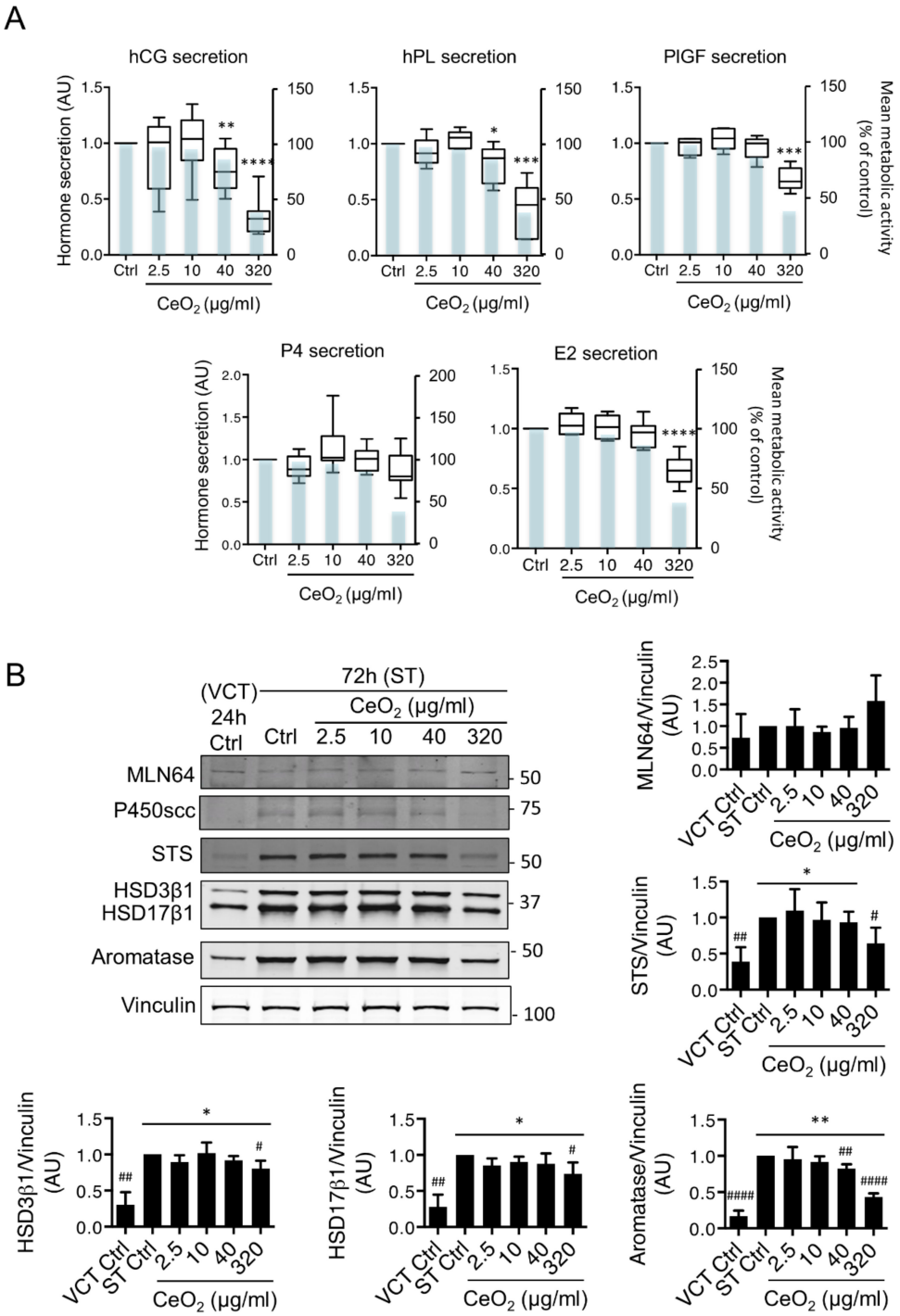


Figure 7. Effect of cerium dioxide nanoparticles on trophoblast endocrine function. VCT purified from term placenta were plated overnight in culture and then were either untreated (Ctrl) or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 72 h. (**A**) After 72 h of culture, dosage of human chorionic gonadotropin (hCG), human placental lactogen (hPL), placenta growth factor (PlGF), progesterone (P4) and estradiol (E2) were assayed in ST supernatants. Results are represented in the boxplots as medians and lower and upper quartile +/− minimum and maximum (n = 9 for hCG and P4, n = 6 for E2, n = 5 for PlGF and hPL) with respect to control. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ as compared to controls. The overlapping graphs represent the corresponding average values of trophoblast metabolic activity as determined by WST1 and shown in Figure 4A. (**B**) Total protein extracts from trophoblasts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with

anti-MLN64, anti-P450scc, anti-HSD3β1, anti-HSD17β1, anti-aromatase and anti-vinculin (as loading control) antibodies. Immunoblots with normalization to control at 72 h were quantified using an Odyssey System Imager and shown in the bar scale graphs as the ratio to vinculin as mean +/− SEM (n = 3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. VCT Ctrl; $^{\#}$ $p < 0.05$; $^{\#\#}$ $p < 0.01$; $^{\#\#\#}$ $p < 0.001$ and $^{\#\#\#\#}$ $p < 0.0001$ vs ST Ctrl.

4. Discussion

In the current study, we investigated the impact of cerium dioxide nanoparticles on human placenta by using human primary trophoblasts isolated from placentas obtained after cesarean section at term. Our study is the first to use a physiological model to investigate the effect of NP, and in particular of CeO_2 NPs, on the human placental barrier. The use of primary cells to assess the toxicity of NPs is of particular interest because these cells have not undergone any modification and better represent the in vivo state. Cytotrophoblasts isolated from placenta at term of pregnancy have the spontaneous capacity to aggregate and fuse in vitro after 24–48 h of culture to form the syncytiotrophoblast, and are thus more physiological than the BeWo trophoblast cell line, which requires the addition of forskolin, an activator of PKA, in order to fuse. Moreover, the primary villous cytotrophoblasts are non-proliferative, and exit from the cell cycle in an intermediary differentiated state, which affects the cellular responses in comparison to the proliferative trophoblasts cell lines. These cell lines are choriocarcinoma and usually more resistant to apoptosis induction and less close to physiologic reality.

A growing body of epidemiological evidence has established a causal relationship between the mother's exposure to air pollution (with concentrations of particulate matter ($PM_{2.5}$) that range from 1.8 to 22.1 μg/m^3) and the increased risk of adverse pregnancy outcomes [38,39], such as preterm birth, intrauterine growth retardation (IUGR), mortality of infants and/or fetuses. NPs are able to cross biological barriers (pulmonary and intestinal) [40], enter the systemic circulation and reach secondary organs, such as the placenta. For instance, NPs administered via different routes (e.g., intravenous injection, intratracheal instillation or oral administration) in rodents can circulate in the blood stream and reach other organs [41–43]. The placenta acts then as a second barrier for the fetus against these environmental substances. But a number of studies from animal models have already demonstrated that some NP can cross the placenta [19,44] and cause fetotoxicity [45]. However, even in the absence of passing through the placental barrier, pollutants that accumulate within the placenta can directly impact the proper functioning of this organ, and placenta dysfunction has harmful implications for fetal development and a major role in the pregnancy outcome [46]. Moreover, it is now admitted that the early life environment can also impact the risk of developing chronic diseases from childhood to adulthood, in the concept termed DOHaD (for Developmental Origins of Health and Disease). Thus, exposure to environmental chemicals, especially the novel NPs, is of particular interest for this sensitive period of pregnancy.

Today, the novel CeO_2 NPs are found in our everyday lives in several consumer products [7], but pregnant women are mainly exposed to CeO_2 from air pollution [47,48]. Thus, most of the studies on CeO_2 NP toxicity have focused on cellular models like the lung [49–53], and their effects during the narrow period of human pregnancy, and particularly on the human placenta, are poorly understood. Cerium (Ce) has been detected in blood and urine samples and breast milk of pregnant women, suggesting that the cerium could be also present in the human placenta, although it has not yet been evaluated there [14–16]. Currently, there are no data on the presence of metallic nanoparticles, including Ce, in the human placenta, but a recent study has already pointed out the presence of carbon black particles in the placentas of women exposed to particulate air pollution, suggesting the translocation of ultrafine particles from the mothers' lungs into the circulation and then to the placenta [54]. Moreover, a recent in vivo study provides the first evidence that respiratory exposure to metallic nanoparticles (e.g., CeO_2, TiO_2, and Ag) during pregnancy in mice leads to accumulation of all of these NPs in the placenta and to long-lasting lung impairment in the offspring [18]. Moreover, recent research indicates that maternal exposure to CeO_2 NPs during early pregnancy induces placental abnormalities and impairs

the pregnancy outcome in mice [17]. However, placental structure morphologically and functionally differs highly among species and data from animal models cannot always be extrapolated to humans, and human placental models are needed to explore the mechanisms. For instance, the secretion of steroids, hCG and hPL is specific to human placenta, but in rodents steroids are produced by the ovary all along the gestation and there is no placenta relay.

In the present study, CeO_2 NPs were used at a large concentration range from 0.6 to 640 µg/mL, corresponding to 0.1–101 µg/cm^2 (Table 1). The lowest values were chosen to represent a realistic situation in accordance with the data available in the literature. For example, the retention of carbon NPs in the lung is up to 50 µg/cm^2 after chronic exposure [55] and the transfer rate to the blood stream was estimated to be 0.1% [56], thus the amount that could reach the placenta is around 0.05 µg/cm^2. However, the in vivo biokinetic study (rat model) showed a half-life of 22 days for metallic NPs (ferric oxide) in the blood stream [57]. Therefore NPs could accumulate in the blood and higher levels could be reached over time in the placenta [58]. We also used higher concentrations in this study that allowed us to make a complete cytotoxicity evaluation to determine the IC50 of CeO_2 NPs, which was not reached at 24 h of exposure and was 320 µg/mL (50.4 µg/cm^2) at 48 h. These high concentrations also allow further comparison of toxicity between placental and other barriers (especially pulmonary or intestinal) and may correspond to a worst-case scenario knowing that CeO_2 NPs are now being proposed as potential medicine (with actually-tested concentrations reaching up to 250 µg/mL) [59].

Particle size and surface charge are important factors accountable for a range of biological effects of NPs, like cellular uptake and toxicity [60,61]. Thus, physicochemical characterization of the CeO_2 NPs used in our study was done prior to the cell culture experiments. Our results showed that NPs form agglomerates around 400–500 nm in all tested media (directly after sonication) (Figure 1), which are significantly larger than the individual NPs, which are about 30 nm in size (Table 3). The hydrodynamic size remains substantially identical after 1 h, indicating stability of the formed agglomerates at least in the short term. In addition, the size measured by DLS showed that the trophoblasts are mostly in contact with agglomerates of NPs. Moreover, the high surface area of NPs is important to consider because it allows adsorption of proteins, forming a corona, as already described [62,63], which plays a key role in bioprocessing of NPs: dissolution in media, uptake and biodistribution and toxicity [64]. CeO_2 NPs have a negative surface charge in solution, as determined by zeta potential measurements (Table 3), but only of around -30 mV, which is not sufficient to prevent the agglomeration of particles by repulsive forces. It has been established that the surface charge can influence the internalization of NPs and, for instance, the negative charge of TiO_2 NP has been shown to prevent their uptake by epithelial cells [65]. It was proposed that aggregation could prevent the NPs from binding to the cell surface and entering the cell, thus reducing toxicity [66]. However, when exploring the internalization capacity of NPs by both villous mononucleated cytotrophoblasts and the differentiated multinucleated syncytiotrophoblast, we showed that these cells were able to internalize NPs, no matter what the concentration of NPs tested (0.6, 2.5, 10 and 40 µg/mL, corresponding to 0.1, 0.4, 1.6 and 6.3 µg/cm^2, respectively), harboring on average 2–3 agglomerates of NPs per cell, found only in the cytoplasm in a perinuclear zone (Figures 2 and 3). No NPs were, however, detected in the nucleus despite this perinuclear localization, and we could not detect NP in the mitochondria or endoplasmic reticulum. We then measured the intracellular NP agglomerates and found a wide distribution, depending on the concentration of NPs, ranging from 10^2 to 10^6 nm^2 corresponding to a size of 10 to 1000 nm (Figure 2D). We also observed that NPs formed larger agglomerates in cells than in extracellular media (DLS measurements), suggesting that NPs accumulate within the cells. However, the majority of NPs were found individually but grouped in agglomerates without forming a compact mass (surface area ranging from 140 to 10^3 nm^2, corresponding to the primary size of NPs) (Figure 2 and Table 1). We confirmed after chemical analysis and elemental mapping by STEM and EDX spectroscopy that the agglomerates visible in the cells did indeed comprise CeO_2 NPs (Figure 3).

As we have demonstrated that CeO_2 NPs are taken up by human trophoblasts (0.6 to 40 µg/mL (0.1 to 6.3 µg/cm^2)), we explored CeO_2 NPs' toxicity on these cells using two complementary tests,

a metabolic activity (WST1) test and an evaluation of the membrane integrity (LDH release). We found that the cytotoxicity of CeO_2 NPs in primary trophoblasts is time- and concentration-dependent (Figure 4A). For short time exposure (24 h), cytotoxicity was observed only for concentrations usually tested in pulmonary models (80–640 µg/mL (12.6–101 µg/cm^2)), a tissue in direct contact with inhaled air. It is unlikely that the placenta could be exposed to such high NP concentrations from air sources, although some high concentrations of CeO_2 could be reached in medical treatments (e.g., antitumoral drugs). For longer periods of exposure (48 h), however, lower NP concentrations (from 5 µg/mL (0.8 µg/cm^2)) affect the trophoblast metabolic activity (WST1 test), suggesting that longer exposure to low concentrations could impair placental integrity and functions. Our primary trophoblasts culture model does not allow us to make longer exposure times (longer than 72 h), to investigate the effects of chronic exposure of the placenta to CeO_2 NPs. We have not found any other reports of the toxicity of CeO_2 NPs on placenta. Therefore, we will compare our observations to the effects of other metallic oxides' NPs. TiO_2 NP did not change cell viability at 10 and 100 µg/mL at both 24 h and 48 h in human trophoblast HTR-8/SVneo cells [20], while iron oxide NP decreased cell viability from 3 µg/cm^2 (which would correspond to 20 µg/mL in our study) at 24 h of exposure in the trophoblast cell line BeWo [67]. Molecular pathways activated by NPs are mainly necrosis, apoptosis or autophagy depending on the concentration and the chemical nature of the NP tested [68,69]. In our study, the toxicity of CeO_2 NPs on trophoblasts involved the activation of caspases for NP concentrations >10 µg/mL (Figure 4C,D), suggesting a commitment to apoptosis. The absence of p53 stabilization at most of the concentrations tested (10, 40 and 320 µg/mL (1.6, 6.3 and 50.4 µg/cm^2, respectively)) (Figure 4D) suggests that apoptosis occurs in a p53-independent pathway and, thus, apparently without genotoxicity.

The two oxidation states of cerium (Ce^{3+} or Ce^{4+}) enable the formation of oxygen vacancies, which are essential to its high reactivity and its ability to act as a catalyst for both oxidation and reduction reactions [70]. However, excessive ROS generation can lead to oxidative stress by altering the fine balance between pro- and anti-oxidant species and can cause cell death. Normal pregnancy is characterized by low-grade oxidative stress and sustained oxidative stress is recognized as a key factor in the pathogenesis of many pregnancy-related disorders such as intrauterine growth restriction (IUGR), pre-eclampsia and miscarriage [71]. The effects of CeO_2 NPs on oxidative stress are still controversial since both prooxidant [72,73] and antioxidant [50,74] effects have been reported, depending on the tissue models employed and NP physico-chemical characteristics. In this article, we show that CeO_2 NPs (representative test material NM-212) are antioxidant in human primary trophoblasts, especially at high concentrations and after an incubation period of 24 h to 72 h (Figure S2). Surprisingly, for a shorter exposure time (4 h) and at low concentrations (5–20 µg/mL (0.8–3.2 µg/cm^2)), NP seems to be pro-oxidant (Figure 5), but this effect is temporary, because it is no longer visible at longer exposure times (from 24 h). We then depicted the antioxidant system defenses by following the protein levels of the main enzymes, such as SOD1, SOD2 and catalase. We also explored HO-1, which is induced in response to oxidative stress, and Prx-SO_3, an oxidative stress sensor. We observed no changes in protein levels of these enzymes and sensors (Figure S2). Therefore, CeO_2 NPs do not appear to induce oxidative stress in trophoblasts when applied at low concentrations and act instead as ROS scavengers at high concentrations. Indeed, the redox balance is essential for many biological processes. Oxidative stress has been related to several disorders leading to placental dysfunctions, but recent papers suggest that an imbalance in favor of reductive stress could also contribute to deleterious effects (e.g., in cardiomyopathies) [75,76].

The integrity and renewal of the human placental barrier during pregnancy involves the fusion of the underlying VCT with the existing ST. In culture, VCT spontaneously aggregate and then fuse to form nonproliferative, multinucleated and hormonally active ST [31]. In this paper, we show a decrease of approximately 20% in the ability of VCT to fuse after in vitro exposure to CeO_2 NPs, whatever the concentration tested (2.5 and 40 µg/mL (0.4 and 6.3 µg/cm^2)) (Figure 6). Thus, CeO_2 NPs that impact trophoblast fusion and affect VCT differentiation in ST could compromise the successful renewal of the syncytium all along the pregnancy, and lead to early aging of the placenta. The effect

on the trophoblast differentiation/fusion has repercussions, especially at the beginning of pregnancy, because any impact on the formation and renewal of the syncytium in the first trimester could lead to placental abnormalities and long-term functional consequences. Moreover, disruption of the differentiation capacity of the VCT to renew the ST by a cell fusion process, or impairment of the endocrine functions exerted by the ST, have been associated with pregnancy disorders like preeclampsia (PE) or intrauterine growth restriction (IUGR) [77,78]. Some mechanisms have been reported to explain trophoblast fusion, involving in particular the syncytins 1 and 2 proteins, with fusogenic properties, and their receptors (ASCT2 and MFSD2, respectively). The effect of CeO_2 NPs on trophoblast fusion does not seem to deregulate expression of syncytins 1/2 and their receptors, at their transcript levels (Figure S3).

The gene expression of two other factors involved in the process of trophoblast differentiation has also been evaluated: GCM1 and CDH1. GCM1 has a central role in mediating the differentiation of trophoblast cells along both the villous and extravillous pathways in placental development, with its action as a transcription factor to control the expression of placenta-specific genes, in particular PlGF [79]. The CDH1 gene, which encodes cadherin-1 protein, is involved in mechanisms regulating cell–cell adhesion, mobility and proliferation of epithelial cells [80]. No change in gene expression of these two factors after trophoblast incubation with CeO_2 NPs was observed. Trophoblast fusion also involves proteins of adherent junctions like E-cadherin, tight junctions like zona occludens (ZO-1) or gap junctions like connexin-43 [81,82]. Thus, it would be interesting to follow the levels and localization of these proteins involved in the intercellular junctions after NP exposure. However, we can also suppose that heavy aggregates of NPs could mechanically prevent the trophoblast from moving, aggregating and fusing, leading to a decreased fusion index in culture.

We investigated the endocrine function of the trophoblast at three levels: peptide hormones (with hCG and hPL), angiogenic factor (with PlGF) and steroid hormones (with P4 and E2) (Figure 7). The decrease in VCT fusion observed for concentrations of 40 µg/mL (6.3 µg/cm^2) disturb the endocrine function, for hCG and hPL, the latter only produced by the ST, with a diminution of around 20% of their secretion, but not of the other hormones tested. For the concentration of 320 µg/mL (50.4 µg/cm^2), hormonal secretion followed the decrease of the metabolic activity of trophoblasts, except for P4, whose secretion was maintained, suggesting a compensatory adaptation in the production of this steroid. Hormonal disturbances are associated with some fetal complications of pregnancy, i.e., the level of hCG is decreased in IUGR while it is increased in pre-eclampsia [83]. hCG is the first placental hormone secreted by the trophoblast and plays a pleiotropic role during pregnancy (e.g., a role in the maintenance of P4 production by the corpus luteum in early pregnancy, modulation of uterine immune responses) [84]. Moreover, hCG plays an essential role in the differentiation of the trophoblast, by an autocrine mechanism, and promotes further differentiation of cytotrophoblasts into syncytiotrophoblasts [85]. P4 allows maintenance of myometrial quiescence and E2 regulates utero-placental blood flow and plays a role in contraction of the myometrium during childbirth [86]. Therefore, disturbances of these hormones, especially in early pregnancy, can affect the course of pregnancy and its outcome. For hCG, there were high inter-individual placenta variations (0.4 to 1.2 AU) at concentrations of NP below to 10 µg/mL (1.6 µg/cm^2), although the average of the results from nine placentas were insignificant, which could not be explained by the placental sex differences in their response to NPs. Even though we showed that CeO_2 NPs induce a decrease in hCG secretion in placentas from terminal pregnancy, it would be even more interesting to assess the effects of CeO_2 NP on placentas from first trimester of pregnancy.

Steroid hormones, initiated in the mitochondria (for P4) or produced in the cytosol (E2), are immediately released into the extracellular medium after their production. This process is faster than hCG production because it does not require transcription, translation and glycosylation processes. This could explain the maintenance of the secretion of P4 at the cytotoxic concentration of 320 µg/mL (50.4 µg/cm^2) (Figure 7A), unlike the observed decrease for hCG secretion at the same concentration of NPs. The maintenance of secretion of P4 is correlated with the fact that there is no major variation in

the protein expression of the enzymes required for its production (MLN64 and HSD3β1), although there is for those involved in E2 production (STS, HSD17β1 and aromatase), in agreement with the decreased E2 secretion (Figure 7A,B). This adaptive process for P4 may involve the mitochondria, as the main site of steroidogenesis. This perturbation of the main hormones of pregnancy, such as hPL and hCG with the concentrations of NPs (40 μg/mL (6.3 μg/cm^2)), and the decrease in hCG, P4, E2 and PlGF hormones with much higher concentrations of NPs (320 μg/mL (50.4 μg/cm^2)), suggests that CeO_2 NPs could impair the endocrine function after perturbed metabolic activity or due to NP toxicity. Our study also investigated some mechanisms of CeO_2 NPs' toxicity like caspase activation, ROS production and followed the main anti-oxidative enzymes. Moreover, our investigations on the actors of trophoblast fusion (syncytins in particular) and all of the enzymes of steroidogenesis also failed to reveal the mechanisms of action of CeO_2 NPs in human trophoblasts.

5. Conclusions

This study is the first to address the toxicity of CeO_2 NPs on human primary trophoblasts, the mechanisms of their toxicity (p53 and caspase activation), their effect on oxidative stress (ROS production and the main antioxidant enzymes) and their impact on placental barrier functions in its globality (trophoblast differentiation capacity, hormone secretion), together with the main genes and enzymes that assure the differentiation and endocrine function of ST. Here, using both TEM and STEM/EDX imaging, we demonstrate the ability of both cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts to internalize cerium dioxide nanoparticles in a concentration-dependent manner. CeO_2 NPs induce a time- and concentration-dependent toxicity on primary human trophoblasts, by caspases activation and in the absence of oxidative stress. Instead, CeO_2 acts as a ROS-scavenger at high concentrations. Moreover, we showed that CeO_2 NP perturbed trophoblast syncytialization and secretion of the pregnancy hormones such as hCG, hPL, PlGF P4, and E2, which altogether can lead to trophoblast dysfunction and poor prognosis in the pregnancy health outcome. With the relationships demonstrated between exposure to environmental pollution and risks for adverse pregnancy outcomes, we need to understand all aspects, such as the uptake, toxicity, mechanism of action and impact on physiologic activity in order to comprehend the biological effects of NPs on the human placenta. All these data help to assess the risk of exposure to CeO_2 NPs in pregnant women.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2079-4991/10/7/1309/s1. Figure S1: Toluidine blue staining of trophoblasts treated with cerium dioxide nanoparticles. VCT purified from term placenta were plated overnight and cultured for 24 h to obtain VCT, or for 72 h in order to spontaneously form the syncytiotrophoblast (ST), and then were either untreated or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for an additional 24 h, fixed, included in epoxy resin and stained with toluidine blue before transmission electron microscopy (TEM). Figure S2: Intracellular oxidative stress after trophoblast exposure to cerium dioxide nanoparticles. VCT purified from term placenta were plated overnight and then were either untreated (Ctrl) or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 24 to 72 h. (A) ROS levels were evaluated using CM-H_2DCFDA. Tert-butyl hydroperoxide (TBHP, 250 μM) was used as positive control. All experiments were performed in triplicate and three independent experiments (n = 3). Data are expressed as means +/− SEM normalized to the 24 h control. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (B) VCT were left untreated (Ctrl), treated with tert-butyl hydroperoxide (TBHP, 100 μM) for 1 h and 3 h or with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 24 h of incubation. Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-Prx-SO_3, anti-catalase, anti-HO1, anti-SOD1, anti-SOD2 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and are shown in the bar scale graph as the ratio to vinculin as mean +/− SEM (n = 3). Figure S3: Effect of cerium dioxide nanoparticles on gene expression of trophoblast differentiation markers. VCT purified from term placenta were plated overnight and then were either left untreated (Ctrl) or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 24 h. Total mRNA was extracted, reverse transcribed and transcript levels of syncytin-1, syncytin-2, ASCT2, MFSD2, GCM1 and CDH1 were determined by qPCR and represented as fold change means +/− SEM of n = 3. Figure S4: Effect of cerium dioxide nanoparticles on gene expression of actors involved in endocrine functions. VCT purified from term placenta were plated overnight and then were either left untreated (Ctrl) or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 24 h. Total mRNA was extracted and reverse transcribed. (A) The transcript levels of placental hormone hCGβ, hPL, sFlt1 and PlGF were determined by qPCR and represented as fold change means +/− SEM of n = 3. (B) The levels of two enzymes involved in trophoblast steroidogenesis, aromatase and P450scc, were determined by qPCR and represented as fold change means +/− SEM of n = 3.

Author Contributions: Conceptualization, M.N. and I.F.; Formal analysis, S.D.; Funding acquisition, M.N., S.B., S.G., X.C. and I.F.; Investigation, M.N., S.B., S.D., J.R., R.L.-K., I.B., J.G., F.V. and A.C.; Project administration, T.F. and I.F.; Supervision, S.B., A.Z.-S., J.G., S.G., X.C., T.F. and I.F.; Visualization, A.Z.-S.; Writing—original draft, M.N. and I.F.; Writing—review & editing, M.N., S.B., S.D., T.F. and I.F. All authors have read and agree to the published version of the manuscript.

Funding: This project received funding from ANSES, a French grant (BarBaPAhR N 2015-1-11329). MN was financed by the French Ministry. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Acknowledgments: The authors are grateful to Marie-Pierre Golinelli for providing the Prx-SO_3 antibody and to the Master 1 student Blandine Fruchet for the optimization of the detection of NPs by TEM. We were helped by Cynthia Gillet of Imagerie-Gif core facility, which is supported by l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-EQPX-0029/Morphoscope, ANR-10-INBS-04/FranceBioImaging; ANR-11-IDEX-0003-02/Saclay Plant Sciences). The following are acknowledged for providing placentas: the consenting patients and the clinical staff midwives of the Port-Royal Maternity, the Institut Mutualiste Montsouris, the Private Hospital of Antony, the Béclère Hospital and the Beaujon Hospital (Paris, France).

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

Abbreviations

Ag	silver
BET	Brunauer, Emmett and Teller
CDH1	cadherin-1
Ce	cerium
CeO_2	cerium dioxide
DLS	dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco modified Eagle's medium
DOHaD	developmental origins of health and disease
E2	estradiol
EDX	energy dispersive X-ray
FCS	fetal calf serum
GCM1	glial cells missing transcription factor 1
hCG	human chorionic gonadotropin
HO-1	heme oxygenase-1
hPL	human placental lactogen
HSD3β1	3β-hydroxysteroid dehydrogenase
HSD17β1	17β-hydroxysteroid dehydrogenase
IUGR	intrauterine growth restriction
LDH	lactate dehydrogenase
MLN64	metastatic lymph node 64
NPs	nanoparticles
OECD	Organization of Economic Cooperation and Development
P4	progesterone
P450scc	cytochrome P450 side chain cleavage
PARP-1	poly ADP-ribose polymerase 1
PE	preeclampsia
PlGF	placental growth factor
PM	particulate matter
$PrxSO_3$	peroxiredoxin-SO_3
ROS	reactive oxygen species
SDHEA	dehydroepiandrosterone sulfate
SEM	standard error of the mean
SOD1	superoxide dismutase 1
SOD2	superoxide dismutase 2
sFlt1	soluble fms-like tyrosine kinase 1

ST	syncytiotrophoblast
Stp	staurosporine
STS	steroid sulfatase
STEM	scanning transmission electron microscopy
TBHP	tert-butyl hydroperoxide
TEM	transmission electron microscopy
TiO_2	titanium dioxide
UV	ultraviolet
VCT	villous cytotrophoblast
VEGF	vascular endothelial growth factor
WA	weeks of amenorrhea
WST1	water soluble tetrazolium 1
ZO-1	zona occludens-1

References

1. Donaldson, K.; Stone, V.; Tran, C.; Kreyling, W.; Borm, P. Nanotoxicology. *Occup. Environ. Med.* **2004**, *61*, 727–728. [CrossRef] [PubMed]
2. Elsaesser, A.; Howard, C.V. Toxicology of nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 129–137. [CrossRef] [PubMed]
3. Stark, W.J.; Stoessel, P.R.; Wohlleben, W.; Hafner, A. Industrial applications of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5793–5805. [CrossRef]
4. Singh, N.A. Nanotechnology innovations, industrial applications and patents. *Environ. Chem. Lett.* **2017**, *15*, 185–191. [CrossRef]
5. Yang, L.; Zhou, Z.; Song, J.; Chen, X. Anisotropic nanomaterials for shape-dependent physicochemical and biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 5140–5176. [CrossRef] [PubMed]
6. Aghebati-Maleki, A.; Dolati, S.; Ahmadi, M.; Baghbanzhadeh, A.; Asadi, M.; Fotouhi, A.; Yousefi, M.; Aghebati-Maleki, L. Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 1962–1972. [CrossRef] [PubMed]
7. Reed, K.; Cormack, A.; Kulkarni, A.; Mayton, M.; Sayle, D.; Klaessig, F.; Stadler, B. Exploring the properties and applications of nanoceria: Is there still plenty of room at the bottom? *Environ. Sci. Nano* **2014**, *1*, 390–405. [CrossRef]
8. Dahle, J.T.; Arai, Y. Environmental Geochemistry of Cerium: Applications and Toxicology of Cerium Oxide Nanoparticles. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2015**, *12*, 1253–1278. [CrossRef]
9. Caputo, F.; De Nicola, M.; Ghibelli, L. Pharmacological potential of bioactive engineered nanomaterials. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *92*, 112–130. [CrossRef]
10. Das, S.; Dowding, J.M.; Klump, K.E.; McGinnis, J.F.; Self, W.; Seal, S. Cerium oxide nanoparticles: Applications and prospects in nanomedicine. *Nanomedicine* **2013**, *8*, 1483–1508. [CrossRef]
11. Park, B.; Donaldson, K.; Duffin, R.; Tran, L.; Kelly, F.; Mudway, I.; Morin, J.-P.; Guest, R.; Jenkinson, P.; Samaras, Z.; et al. Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive—A case study. *Inhal. Toxicol.* **2008**, *20*, 547–566. [CrossRef] [PubMed]
12. Zhang, J.; Nazarenko, Y.; Zhang, L.; Calderon, L.; Lee, K.-B.; Garfunkel, E.; Schwander, S.; Tetley, T.D.; Chung, K.F.; Porter, A.E.; et al. Impacts of a nanosized ceria additive on diesel engine emissions of particulate and gaseous pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 13077–13085. [CrossRef] [PubMed]
13. Heitland, P.; Köster, H.D. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2006**, *20*, 253–262. [CrossRef]
14. Höllriegl, V.; González-Estecha, M.; Trasobares, E.M.; Giussani, A.; Oeh, U.; Herraiz, M.A.; Michalke, B. Measurement of cerium in human breast milk and blood samples. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2010**, *24*, 193–199. [CrossRef]
15. Wei, J.; Wang, C.; Yin, S.; Pi, X.; Jin, L.; Li, Z.; Liu, J.; Wang, L.; Yin, C.; Ren, A. Concentrations of rare earth elements in maternal serum during pregnancy and risk for fetal neural tube defects. *Environ. Int.* **2020**, *137*, 105542. [CrossRef] [PubMed]

16. Liu, Y.; Wu, M.; Zhang, L.; Bi, J.; Song, L.; Wang, L.; Liu, B.; Zhou, A.; Cao, Z.; Xiong, C.; et al. Prenatal exposure of rare earth elements cerium and ytterbium and neonatal thyroid stimulating hormone levels: Findings from a birth cohort study. *Environ. Int.* **2019**, *133*, 105222. [CrossRef]
17. Zhong, H.; Geng, Y.; Chen, J.; Gao, R.; Yu, C.; Yang, Z.; Chen, X.; Mu, X.; Liu, X.; He, J. Maternal exposure to CeO2NPs during early pregnancy impairs pregnancy by inducing placental abnormalities. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *389*, 121830. [CrossRef]
18. Paul, E.; Franco-Montoya, M.-L.; Paineau, E.; Angeletti, B.; Vibhushan, S.; Ridoux, A.; Tiendrebeogo, A.; Salome, M.; Hesse, B.; Vantelon, D.; et al. Pulmonary exposure to metallic nanomaterials during pregnancy irreversibly impairs lung development of the offspring. *Nanotoxicology* **2017**, *11*, 484–495. [CrossRef]
19. Aengenheister, L.; Dugershaw, B.B.; Manser, P.; Wichser, A.; Schoenenberger, R.; Wick, P.; Hesler, M.; Kohl, Y.; Straskraba, S.; Suter, M.J.-F.; et al. Investigating the accumulation and translocation of titanium dioxide nanoparticles with different surface modifications in static and dynamic human placental transfer models. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *142*, 488–497. [CrossRef]
20. Zhang, Y.; Xu, B.; Yao, M.; Dong, T.; Mao, Z.; Hang, B.; Han, X.; Lin, Z.; Bian, Q.; Li, M.; et al. Titanium dioxide nanoparticles induce proteostasis disruption and autophagy in human trophoblast cells. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *296*, 124–133. [CrossRef]
21. Aengenheister, L.; Dietrich, D.; Sadeghpour, A.; Manser, P.; Diener, L.; Wichser, A.; Karst, U.; Wick, P.; Buerki-Thurnherr, T. Gold nanoparticle distribution in advanced in vitro and ex vivo human placental barrier models. *J. Nanobiotechnol.* **2018**, *16*, 79. [CrossRef]
22. Myllynen, P.K.; Loughran, M.J.; Howard, C.V.; Sormunen, R.; Walsh, A.A.; Vähäkangas, K.H. Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta. *Reprod. Toxicol.* **2008**, *26*, 130–137. [CrossRef] [PubMed]
23. Muoth, C.; Großgarten, M.; Karst, U.; Ruiz, J.; Astruc, D.; Moya, S.; Diener, L.; Grieder, K.; Wichser, A.; Jochum, W.; et al. Impact of particle size and surface modification on gold nanoparticle penetration into human placental microtissues. *Nanomedicine* **2017**, *12*, 1119–1133. [CrossRef] [PubMed]
24. Vidmar, J.; Loeschner, K.; Correia, M.; Larsen, E.H.; Manser, P.; Wichser, A.; Boodhia, K.; Al-Ahmady, Z.S.; Ruiz, J.; Astruc, D.; et al. Translocation of silver nanoparticles in the ex vivo human placenta perfusion model characterized by single particle ICP-MS. *Nanoscale* **2018**, *10*, 11980–11991. [CrossRef] [PubMed]
25. Campagnolo, L.; Massimiani, M.; Vecchione, L.; Piccirilli, D.; Toschi, N.; Magrini, A.; Bonanno, E.; Scimeca, M.; Castagnozzi, L.; Buonanno, G.; et al. Silver nanoparticles inhaled during pregnancy reach and affect the placenta and the foetus. *Nanotoxicology* **2017**, *11*, 687–698. [CrossRef] [PubMed]
26. Aye, I.L.M.H.; Keelan, J.A. Placental ABC transporters, cellular toxicity and stress in pregnancy. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *203*, 456–466. [CrossRef]
27. Burton, G.J.; Fowden, A.L. The placenta: A multifaceted, transient organ. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* **2015**, *370*, 20140066. [CrossRef]
28. Molina, R.M.; Konduru, N.V.; Jimenez, R.J.; Pyrgiotakis, G.; Demokritou, P.; Wohlleben, W.; Brain, J.D. Bioavailability, distribution and clearance of tracheally instilled, gavaged or injected cerium dioxide nanoparticles and ionic cerium. *Environ. Sci. Nano* **2014**, *1*, 561–573. [CrossRef]
29. Karakoti, A.S.; Munusamy, P.; Hostetler, K.; Kodali, V.; Kuchibhatla, S.; Orr, G.; Pounds, J.G.; Teeguarden, J.G.; Thrall, B.D.; Baer, D.R. Preparation and Characterization Challenges to Understanding Environmental and Biological Impacts of Nanoparticles. *Surf. Interface Anal.* **2012**, *44*, 882–889. [CrossRef]
30. Dekkers, S.; Ma-Hock, L.; Lynch, I.; Russ, M.; Miller, M.R.; Schins, R.P.F.; Keller, J.; Römer, I.; Küttler, K.; Strauss, V.; et al. Differences in the toxicity of cerium dioxide nanomaterials after inhalation can be explained by lung deposition, animal species and nanoforms. *Inhal. Toxicol.* **2018**, *30*, 273–286. [CrossRef]
31. Kliman, H.J.; Nestler, J.E.; Sermasi, E.; Sanger, J.M.; Strauss, J.F. Purification, Characterization, and in vitro Differentiation of Cytotrophoblasts from Human Term Placentae. *Endocrinology* **1986**, *118*, 1567–1582. [CrossRef]
32. Degrelle, S.A.; Fournier, T. Use of GATA3 and TWIST1 Immunofluorescence Staining to Assess In Vitro Syncytial Fusion Index. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1710*, 165–171.
33. Frendo, J.-L.; Cronier, L.; Bertin, G.; Guibourdenche, J.; Vidaud, M.; Evain-Brion, D.; Malassiné, A. Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 3413–3421. [CrossRef] [PubMed]

34. Hernandez, I.; Fournier, T.; Chissey, A.; Therond, P.; Slama, A.; Beaudeux, J.-L.; Zerrad-Saadi, A. NADPH oxidase is the major source of placental superoxide in early pregnancy: Association with MAPK pathway activation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13962. [CrossRef]
35. Burton, G.J.; Redman, C.W.; Roberts, J.M.; Moffett, A. Pre-eclampsia: Pathophysiology and clinical implications. *BMJ* **2019**, *366*, 12381. [CrossRef]
36. Lecarpentier, E.; Tsatsaris, V. Angiogenic balance (sFlt-1/PlGF) and preeclampsia. *Ann. Endocrinol.* **2016**, *77*, 97–100. [CrossRef] [PubMed]
37. Fraichard, C.; Bonnet, F.; Garnier, A.; Hébert-Schuster, M.; Bouzerara, A.; Gerbaud, P.; Ferecatu, I.; Fournier, T.; Hernandez, I.; Trabado, S.; et al. Placental production of progestins is fully effective in villous cytotrophoblasts and increases with the syncytiotrophoblast formation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *499*, 110586. [CrossRef] [PubMed]
38. Malley, C.S.; Kuylenstierna, J.C.I.; Vallack, H.W.; Henze, D.K.; Blencowe, H.; Ashmore, M.R. Preterm birth associated with maternal fine particulate matter exposure: A global, regional and national assessment. *Environ. Int.* **2017**, *101*, 173–182. [CrossRef]
39. Li, X.; Huang, S.; Jiao, A.; Yang, X.; Yun, J.; Wang, Y.; Xue, X.; Chu, Y.; Liu, F.; Liu, Y.; et al. Association between ambient fine particulate matter and preterm birth or term low birth weight: An updated systematic review and meta-analysis. *Environ. Pollut.* **2017**, *227*, 596–605. [CrossRef]
40. George, I.; Naudin, G.; Boland, S.; Mornet, S.; Contremoulins, V.; Beugnon, K.; Martinon, L.; Lambert, O.; Baeza-Squiban, A. Metallic oxide nanoparticle translocation across the human bronchial epithelial barrier. *Nanoscale* **2015**, *7*, 4529–4544. [CrossRef]
41. Lankveld, D.P.K.; Oomen, A.G.; Krystek, P.; Neigh, A.; Troost-de Jong, A.; Noorlander, C.W.; Van Eijkeren, J.C.H.; Geertsma, R.E.; De Jong, W.H. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8350–8361. [CrossRef]
42. Sadauskas, E.; Jacobsen, N.R.; Danscher, G.; Stoltenberg, M.; Vogel, U.; Larsen, A.; Kreyling, W.; Wallin, H. Biodistribution of gold nanoparticles in mouse lung following intratracheal instillation. *Chem. Cent. J.* **2009**, *3*, 16. [CrossRef] [PubMed]
43. Park, K.; Park, J.; Lee, H.; Choi, J.; Yu, W.-J.; Lee, J. Toxicity and tissue distribution of cerium oxide nanoparticles in rats by two different routes: Single intravenous injection and single oral administration. *Arch. Pharm. Res.* **2018**, *41*, 1108–1116. [CrossRef] [PubMed]
44. Buerki-Thurnherr, T.; von Mandach, U.; Wick, P. Knocking at the door of the unborn child: Engineered nanoparticles at the human placental barrier. *Swiss Med. Wkly.* **2012**, *142*, w13559. [CrossRef] [PubMed]
45. Juch, H.; Nikitina, L.; Debbage, P.; Dohr, G.; Gauster, M. Nanomaterial interference with early human placenta: Sophisticated matter meets sophisticated tissues. *Reprod. Toxicol.* **2013**, *41*, 73–79. [CrossRef] [PubMed]
46. Saenen, N.D.; Martens, D.S.; Neven, K.Y.; Alfano, R.; Bové, H.; Janssen, B.G.; Roels, H.A.; Plusquin, M.; Vrijens, K.; Nawrot, T.S. Air pollution-induced placental alterations: An interplay of oxidative stress, epigenetics, and the aging phenotype? *Clin. Epigenet.* **2019**, *11*, 124. [CrossRef]
47. Zhang, J.J.; Lee, K.-B.; He, L.; Seiffert, J.; Subramaniam, P.; Yang, L.; Chen, S.; Maguire, P.; Mainelis, G.; Schwander, S.; et al. Effects of a nanoceria fuel additive on the physicochemical properties of diesel exhaust particles. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2016**, *18*, 1333–1342. [CrossRef]
48. Cassee, F.R.; Balen, E.C.; Singh, C.; Green, D.; Muijser, H.; Weinstein, J.; Dreher, K. Exposure, Health and Ecological Effects Review of Engineered Nanoscale Cerium and Cerium Oxide Associated with its Use as a Fuel Additive. *Crit. Rev. Toxicol.* **2011**, *41*, 213–229. [CrossRef]
49. Lu, S.; Zhang, W.; Zhang, R.; Liu, P.; Wang, Q.; Shang, Y.; Wu, M.; Donaldson, K.; Wang, Q. Comparison of cellular toxicity caused by ambient ultrafine particles and engineered metal oxide nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **2015**, *12*, 5. [CrossRef]
50. Rubio, L.; Annangi, B.; Vila, L.; Hernández, A.; Marcos, R. Antioxidant and anti-genotoxic properties of cerium oxide nanoparticles in a pulmonary-like cell system. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90*, 269–278. [CrossRef]
51. Mittal, S.; Pandey, A.K. Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: Role of ROS mediated DNA damage and apoptosis. *BioMed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 891934. [CrossRef] [PubMed]
52. Zhou, X.; Wang, B.; Chen, Y.; Mao, Z.; Gao, C. Uptake of cerium oxide nanoparticles and their influences on functions of A549 cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *13*, 204–215. [CrossRef] [PubMed]

53. Park, E.-J.; Choi, J.; Park, Y.-K.; Park, K. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology* **2008**, *245*, 90–100. [CrossRef] [PubMed]
54. Bové, H.; Bongaerts, E.; Slenders, E.; Bijnens, E.M.; Saenen, N.D.; Gyselaers, W.; Van Eyken, P.; Plusquin, M.; Roeffaers, M.B.J.; Ameloot, M.; et al. Ambient black carbon particles reach the fetal side of human placenta. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3866. [CrossRef]
55. Erdely, A.; Dahm, M.M.; Schubauer-Berigan, M.K.; Chen, B.T.; Antonini, J.M.; Hoover, M.D. Bridging the gap between exposure assessment and inhalation toxicology: Some insights from the carbon nanotube experience. *J. Aerosol Sci.* **2016**, *99*, 157–162. [CrossRef]
56. Kreyling, W.G.; Holzwarth, U.; Schleh, C.; Hirn, S.; Wenk, A.; Schäffler, M.; Haberl, N.; Semmler-Behnke, M.; Gibson, N. Quantitative biokinetics over a 28 day period of freshly generated, pristine, 20 nm titanium dioxide nanoparticle aerosols in healthy adult rats after a single two-hour inhalation exposure. *Part. Fibre Toxicol.* **2019**, *16*, 1–27. [CrossRef]
57. Zhu, M.-T.; Feng, W.-Y.; Wang, Y.; Wang, B.; Wang, M.; Ouyang, H.; Zhao, Y.-L.; Chai, Z.-F. Particokinetics and Extrapulmonary Translocation of Intratracheally Instilled Ferric Oxide Nanoparticles in Rats and the Potential Health Risk Assessment. *Toxicol. Sci.* **2009**, *107*, 342–351. [CrossRef]
58. Lee, J.; Jeong, J.-S.; Kim, S.Y.; Park, M.-K.; Choi, S.-D.; Kim, U.-J.; Park, K.; Jeong, E.J.; Nam, S.-Y.; Yu, W.-J. Titanium dioxide nanoparticles oral exposure to pregnant rats and its distribution. *Part. Fibre Toxicol.* **2019**, *16*, 31. [CrossRef]
59. Nourmohammadi, E.; Khoshdel-Sarkarizi, H.; Nedaeinia, R.; Sadeghnia, H.R.; Hasanzadeh, L.; Darroudi, M.; Kazemi Oskuee, R. Evaluation of anticancer effects of cerium oxide nanoparticles on mouse fibrosarcoma cell line. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 4987–4996. [CrossRef]
60. Adjei, I.M.; Sharma, B.; Labhasetwar, V. Nanoparticles: Cellular uptake and cytotoxicity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *811*, 73–91.
61. Singh, S.; Ly, A.; Das, S.; Sakthivel, T.S.; Barkam, S.; Seal, S. Cerium oxide nanoparticles at the nano-bio interface: Size-dependent cellular uptake. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, S956–S963. [CrossRef] [PubMed]
62. Lee, Y.K.; Choi, E.-J.; Webster, T.J.; Kim, S.-H.; Khang, D. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 97–113.
63. Kreyling, W.G.; Fertsch-Gapp, S.; Schäffler, M.; Johnston, B.D.; Haberl, N.; Pfeiffer, C.; Diendorf, J.; Schleh, C.; Hirn, S.; Semmler-Behnke, M.; et al. In vitro and in vivo interactions of selected nanoparticles with rodent serum proteins and their consequences in biokinetics. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 1699–1711. [CrossRef] [PubMed]
64. Vranic, S.; Gosens, I.; Jacobsen, N.R.; Jensen, K.A.; Bokkers, B.; Kermanizadeh, A.; Stone, V.; Baeza-Squiban, A.; Cassee, F.R.; Tran, L.; et al. Impact of serum as a dispersion agent for in vitro and in vivo toxicological assessments of TiO2 nanoparticles. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 353–363. [CrossRef]
65. Vranic, S.; Boggetto, N.; Contremoulins, V.; Mornet, S.; Reinhardt, N.; Marano, F.; Baeza-Squiban, A.; Boland, S. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, 2. [CrossRef]
66. Min, Y.; Akbulut, M.; Kristiansen, K.; Golan, Y.; Israelachvili, J. The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 527–538. [CrossRef]
67. Carreira, S.C.; Walker, L.; Paul, K.; Saunders, M. The toxicity, transport and uptake of nanoparticles in the in vitro BeWo b30 placental cell barrier model used within NanoTEST. *Nanotoxicology* **2015**, *9*, 66–78. [CrossRef]
68. Hussain, S.; Thomassen, L.C.; Ferecatu, I.; Borot, M.-C.; Andreau, K.; Martens, J.A.; Fleury, J.; Baeza-Squiban, A.; Marano, F.; Boland, S. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7*, 10. [CrossRef]
69. Hussain, S.; Al-Nsour, F.; Rice, A.B.; Marshburn, J.; Yingling, B.; Ji, Z.; Zink, J.I.; Walker, N.J.; Garantziotis, S. Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human peripheral blood monocytes. *ACS Nano* **2012**, *6*, 5820–5829. [CrossRef]
70. Abdal Dayem, A.; Hossain, M.K.; Lee, S.B.; Kim, K.; Saha, S.K.; Yang, G.-M.; Choi, H.Y.; Cho, S.-G. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 120. [CrossRef]

71. Sultana, Z.; Maiti, K.; Aitken, J.; Morris, J.; Dedman, L.; Smith, R. Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2017**, *77*, e12653. [CrossRef] [PubMed]
72. Nemmar, A.; Yuvaraju, P.; Beegam, S.; Fahim, M.A.; Ali, B.H. Cerium Oxide Nanoparticles in Lung Acutely Induce Oxidative Stress, Inflammation, and DNA Damage in Various Organs of Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 9639035. [CrossRef] [PubMed]
73. Ali, D.; Alarifi, S.; Alkahtani, S.; AlKahtane, A.A.; Almalik, A. Cerium Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Skin Melanoma Cells. *Cell Biochem. Biophys.* **2015**, *71*, 1643–1651. [CrossRef] [PubMed]
74. Hashem, R.M.; Rashd, L.A.; Hashem, K.S.; Soliman, H.M. Cerium oxide nanoparticles alleviate oxidative stress and decreases Nrf-2/HO-1 in D-GALN/LPS induced hepatotoxicity. *Biomed. Pharmacother.* **2015**, *73*, 80–86. [CrossRef] [PubMed]
75. Zhang, X.; Min, X.; Li, C.; Benjamin, I.J.; Qian, B.; Zhang, X.; Ding, Z.; Gao, X.; Yao, Y.; Ma, Y.; et al. Involvement of reductive stress in the cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of heat shock protein 27. *Hypertension* **2010**, *55*, 1412–1417. [CrossRef]
76. Rajasekaran, N.S.; Connell, P.; Christians, E.S.; Yan, L.-J.; Taylor, R.P.; Orosz, A.; Zhang, X.Q.; Stevenson, T.J.; Peshock, R.M.; Leopold, J.A.; et al. Human alpha B-crystallin mutation causes oxido-reductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Cell* **2007**, *130*, 427–439. [CrossRef]
77. Roland, C.S.; Hu, J.; Ren, C.-E.; Chen, H.; Li, J.; Varvoutis, M.S.; Leaphart, L.W.; Byck, D.B.; Zhu, X.; Jiang, S.-W. Morphological changes of placental syncytium and their implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 365–376. [CrossRef]
78. Huppertz, B. The Critical Role of Abnormal Trophoblast Development in the Etiology of Preeclampsia. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2018**, *19*, 771–780. [CrossRef]
79. Chang, M.; Mukherjea, D.; Gobble, R.M.; Groesch, K.A.; Torry, R.J.; Torry, D.S. Glial cell missing 1 regulates placental growth factor (PGF) gene transcription in human trophoblast. *Biol. Reprod.* **2008**, *78*, 841–851. [CrossRef]
80. Meigs, T.E.; Fedor-Chaiken, M.; Kaplan, D.D.; Brackenbury, R.; Casey, P.J. Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24594–24600. [CrossRef]
81. Pidoux, G.; Gerbaud, P.; Gnidehou, S.; Grynberg, M.; Geneau, G.; Guibourdenche, J.; Carette, D.; Cronier, L.; Evain-Brion, D.; Malassiné, A.; et al. ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2010**, *298*, C15171-526. [CrossRef] [PubMed]
82. Gerbaud, P.; Pidoux, G. Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. *Placenta* **2015**, *36*, S35–S42. [CrossRef] [PubMed]
83. Reis, F.M.; D'Antona, D.; Petraglia, F. Predictive Value of Hormone Measurements in Maternal and Fetal Complications of Pregnancy. *Endocr. Rev.* **2002**, *23*, 230–257. [CrossRef] [PubMed]
84. Fournier, T. Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. *Ann. Endocrinol.* **2016**, *77*, 75–81. [CrossRef] [PubMed]
85. Malassiné, A.; Frendo, J.-L.; Evain-Brion, D. Trisomy 21- affected placentas highlight prerequisite factors for human trophoblast fusion and differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* **2009**, *54*, 475–482. [CrossRef]
86. Noyola-Martínez, N.; Halhali, A.; Barrera, D. Steroid hormones and pregnancy. *Gynecol. Endocrinol.* **2019**, *35*, 376–384. [CrossRef]



© 2020 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 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

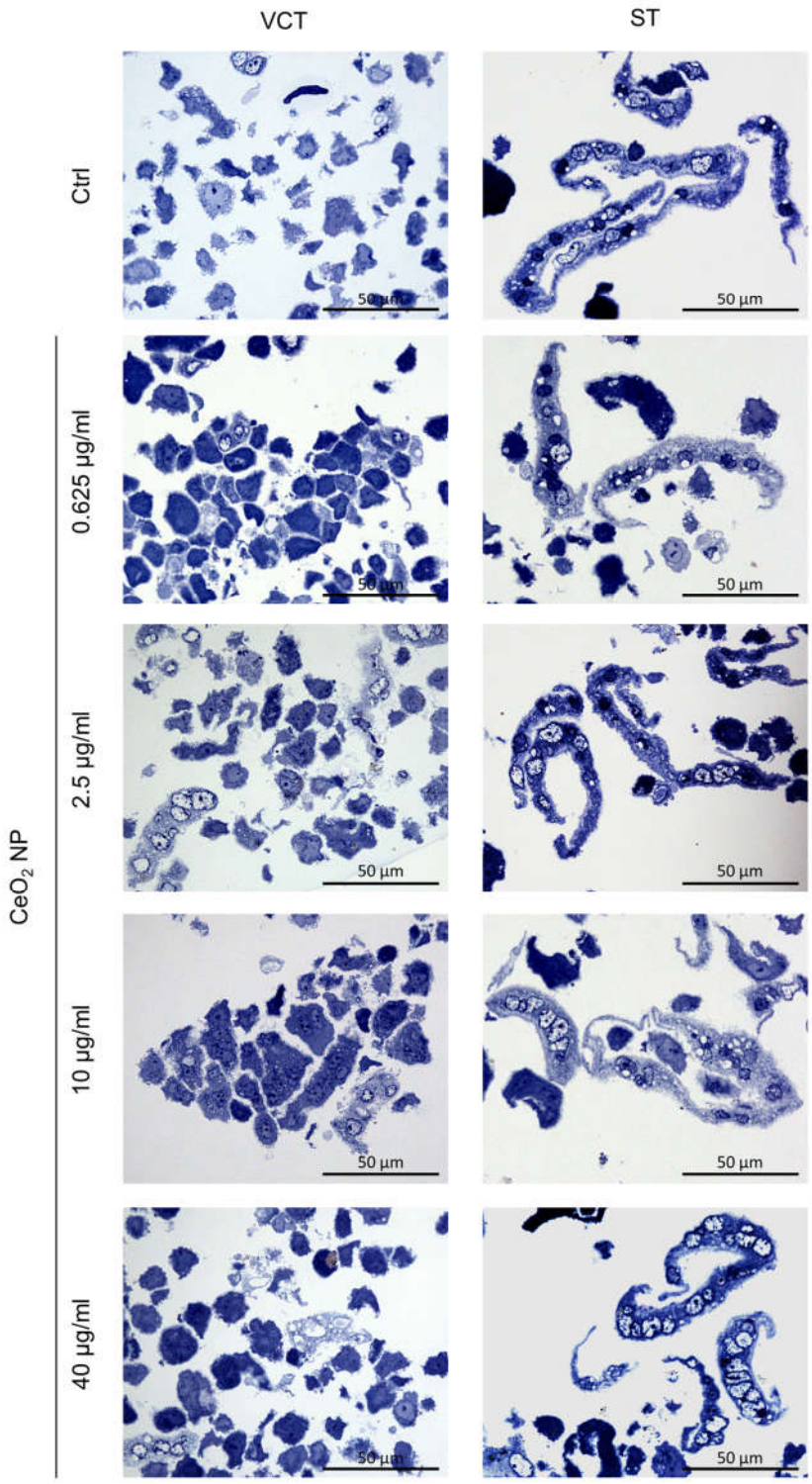


Figure S1. Toluidine blue staining of trophoblasts treated with cerium dioxide nanoparticles. VCT purified from term placenta were plated overnight and cultured for 24 h to obtain VCT or for 72 h in order to form spontaneously the syncytiotrophoblast (ST) and then were either untreated or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for an additional 24 h, fixed, included in epoxy resin and stained with toluidine blue before transmission electron microscopy (TEM).

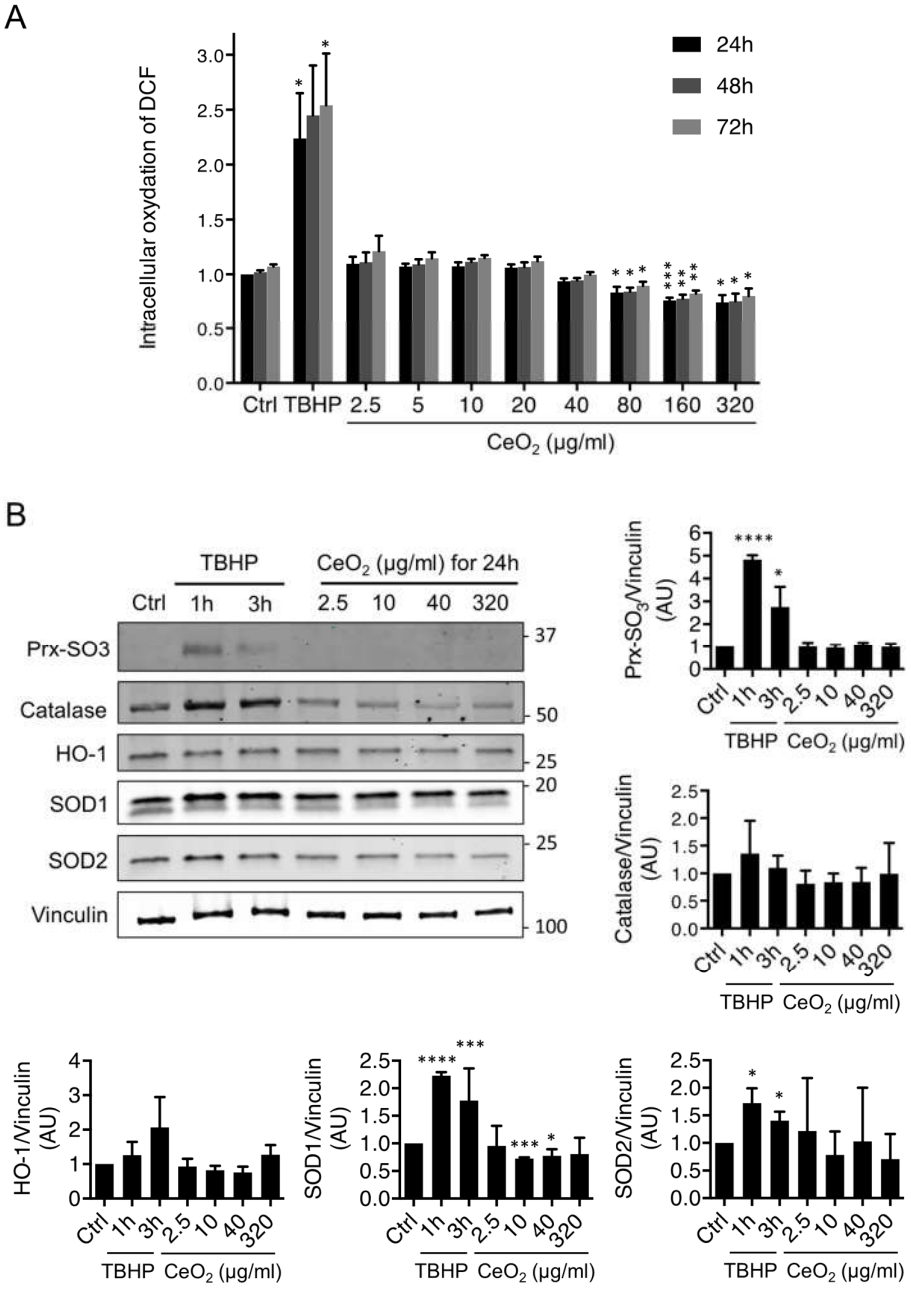


Figure S2. Intracellular oxidative stress after trophoblast exposure to cerium dioxide nanoparticles. VCT purified from term placenta were plated overnight and then were either untreated (Ctrl) or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 24 to 72 h. (**A**) ROS levels were evaluated using CM-H_2DCFDA. Tert-butyl hydroperoxide (TBHP, 250 µM) was used as positive control. All experiments were performed in triplicate and 3 independent experiments (n = 3). Data are expressed as means +/- SEM normalized to the 24 h control. *p <0.05 ; **p <0.01 ;***p <0.001. (**B**) VCT were left untreated (Ctrl), treated with tert-butyl hydroperoxide (TBHP, 100 µM) for 1 h and 3 h or with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 24 h of incubation. Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-Prx-SO_3, anti-catalase, anti-HO1, anti-SOD1, anti-SOD2 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and are shown in the bar scale graph as the ratio to vinculin as mean +/- SEM (n = 3).

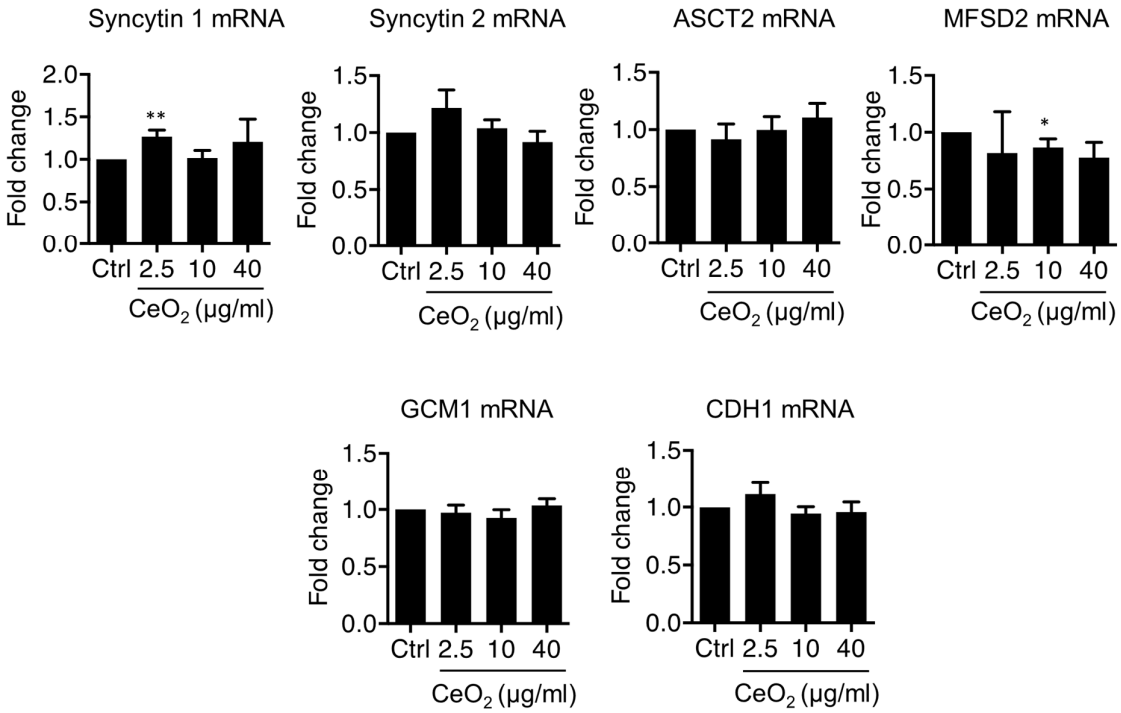


Figure S3. Effect of cerium dioxide nanoparticles on gene expression of trophoblast differentiation markers. VCT purified from term placenta were plated overnight and then were either left untreated (Ctrl) or incubated with CeO2 NPs at the indicated concentrations for 24 h. Total mRNA was extracted, reverse transcribed and transcript levels of syncytin-1, syncytin-2, ASCT2, MFSD2, GCM1 and CDH1 were determined by qPCR and represented as fold change means +/- SEM of n = 3.

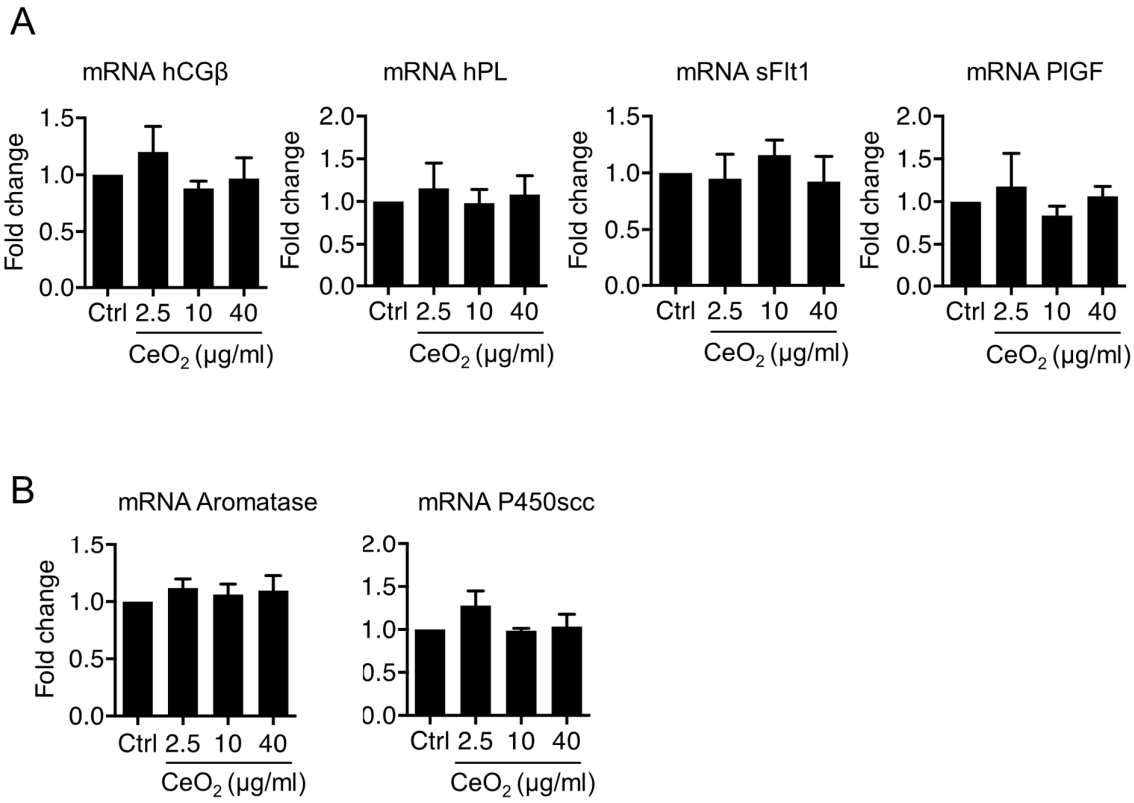


Figure S4. Effect of cerium dioxide nanoparticles on gene expression of actors involved in endocrine functions. VCT purified from term placenta were plated overnight and then were either left untreated (Ctrl) or incubated with CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 24 h. Total mRNA was extracted and reverse transcribed. (**A**) The transcript levels of placental hormone hCGβ, hPL, sFlt1 and PlGF were determined by qPCR and represented as fold change means +/- SEM of n = 3. (**B**) The levels of two enzymes involved in trophoblast steroidogenesis, aromatase and P450scc, were determined by qPCR and represented as fold change means +/- SEM of n = 3.

Résultats supplémentaires de la Partie 2

1. Exposition des syncytiotrophoblastes : étude de viabilité par le test WST1

Le syncytium étant la couche cellulaire trophoblastique qui est en contact direct avec le sang maternel, il représente la première barrière physiologique pour les polluants qui se retrouvent dans la circulation maternelle. Le syncytiotrophoblaste est une cellule en différenciation terminale qui est très différente des cytotrophoblastes : les noyaux perdent leur activité transcriptionnelle par condensation globale de la chromatine et il y a un remodelage des organites, notamment des mitochondries. C'est pour cette raison que nous avons également étudié la cytotoxicité des NPs de CeO_2 en exposition sur les syncytiotrophoblastes déjà formés (après 48 h de culture après la purification des CTV) en réalisant le même test d'activité métabolique WST1 (Figure 33) que dans l'Article 2.

Pour cela, les cytotrophoblastes purifiés de placenta à terme de grossesse ont été mis en culture pendant 48 h pour obtenir des syncytiotrophoblastes puis les cellules ont été exposées aux NPs de CeO_2 (2,5 à 640 μg/mL correspondant à 0,1-101 μg/cm^2) pendant 24 h (car la viabilité des ST au delà de 3 jours de culture décline naturellement et graduellement) avant de réaliser le test WST1 (Figure 33A). Ces données n'ont pas été incluses dans l'Article 2 car nous avons obtenu deux types de résultats différents, après multiplication des expériences. Le premier type de résultat (Figure 33B, n=3) nous indique que les NPs de CeO_2 n'impacteraient pas l'activité métabolique des syncytiotrophoblastes. Dans ce cas de figure, les syncytiotrophoblastes seraient plus résistants à l'effet des NPs que les cytotrophoblastes (Figure 4A de l'article 2). Cela pourrait s'expliquer par le fait que le syncytiotrophoblaste est dans un état de sénescence [425] avec des caractéristiques morphologiques et changements métaboliques qui lui sont propres, différents du cytotrophoblaste. Le second type de résultat (Figure 33C, n=2) montre une décroissance concentration-dépendante de l'activité métabolique à partir de 80 μg/mL et cette décroissance est même plus importante que celle observée lorsque les cytotrophoblastes sont exposés aux NPs pour le même temps d'incubation de 24 h (Figure 4A de l'article 2). Dans ce deuxième cas de figure, les NPs sembleraient plus cytotoxiques pour les syncytiotrophoblastes par rapport aux cytotrophoblastes. Cependant, les deux résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure actuellement sur l'effet des NP de CeO_2 sur les

syncytiotrophoblastes comparé à une exposition sur les cytotrophoblastes (Figure 4A de l'article 2) puisque nous ne pouvons pas trancher entre les deux cas de figure. Les surnageants des différentes cultures ont été récupérés afin de pouvoir doser l'hCG, reflet de différenciation de CTV en ST. L'obtention de deux résultats différents pour un même protocole d'expérience pourrait être dû au fait que les cellules ne se sont pas différenciées de manière identique dans les différentes cultures réalisées, c'est-à-dire que la proportion de syncytiotrophoblaste était variable en fonction des placentas. Les résultats des dosages d'hCG ne nous ont pas permis d'établir une relation entre les deux types de résultats obtenus par le test WST1 et une syncytialisation différentielle entre les différentes cultures. Une hypothèse d'amélioration du protocole serait de laisser les cytotrophoblastes se différencier pendant 72 h avant de procéder à l'incubation avec les NP, pour s'assurer d'une formation optimale de syncytiotrophoblastes, tout en sachant que les cultures primaires de trophoblastes ont une durée de vie limitée à quelques jours.

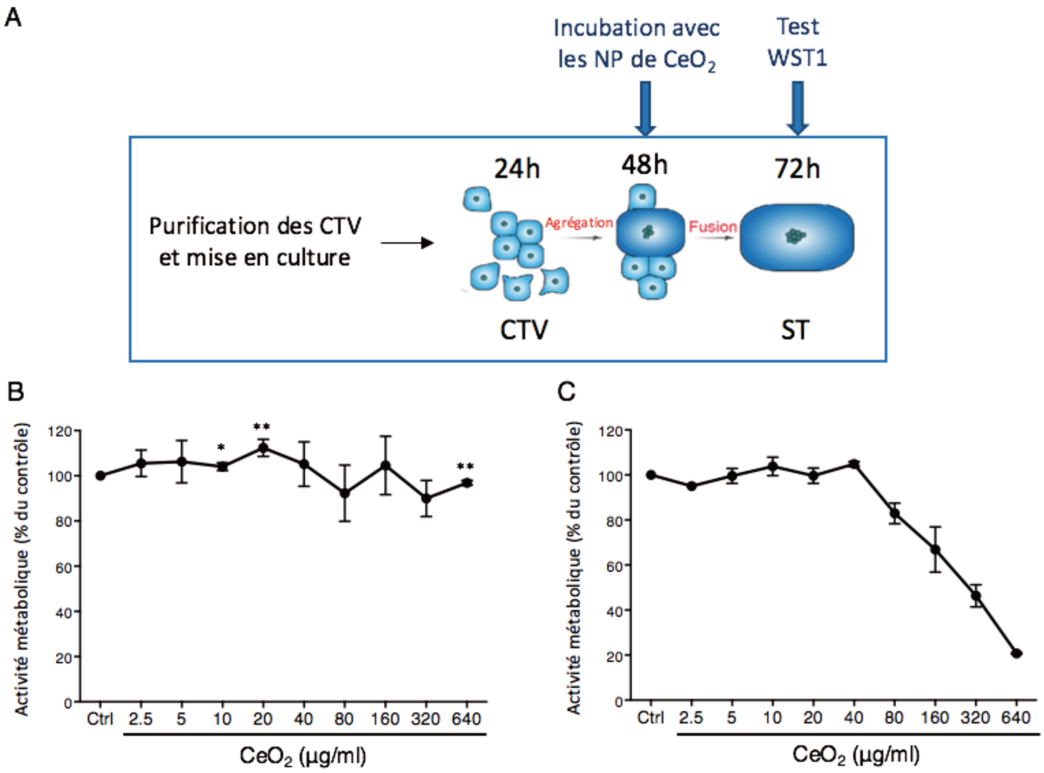


Figure 33. Test d'activité métabolique WST1 après exposition des syncytiotrophoblastes aux nanoparticules de dioxyde de cérium

(A) Les cytotrophoblastes purifiés à partir de placenta humain à terme de grossesse ont été mis en culture pendant 48 h pour obtenir des syncytiotrophoblastes. Ces cellules ont été incubés pendant 24 h avec les NPs de CeO_2 puis le test WST1 a été réalisé. **(B)** et **(C)** Les deux graphes représentent les deux types de résultats obtenus pour la même expérience. Le test d'activité métabolique WST1 est représenté sous forme de moyenne +/- SEM relatif au contrôle. **(B)** n=3. * $p<0,05$; ** $p<0,01$. **(C)** n=2, test statistique non réalisé

2. Internalisation des NP de CeO_2 au niveau tissulaire

L'étude d'internalisation des NP de CeO_2 par microscopie électronique à transmission a également été réalisée directement sur le tissu placentaire, en utilisant le modèle des explants de villosités choriales. Les villosités choriales issus de placenta à terme de grossesse ont été montés sur aiguille, mis en culture (culture d'explants) et exposés pendant 24 h ou 72 h aux NP de CeO_2 sous agitation continue à deux concentrations (10 et 40 μg/mL, correspondant à 1,6 et 6,3 μg/cm² respectivement). Les NP de CeO_2 ont été retrouvées à la fois à la surface, mais aussi à l'intérieur de l'épithélium trophoblastique (Figure 34), à la fois dans les CTV (à la concentration de 40 μg/mL) et dans les ST (aux deux concentrations testées).

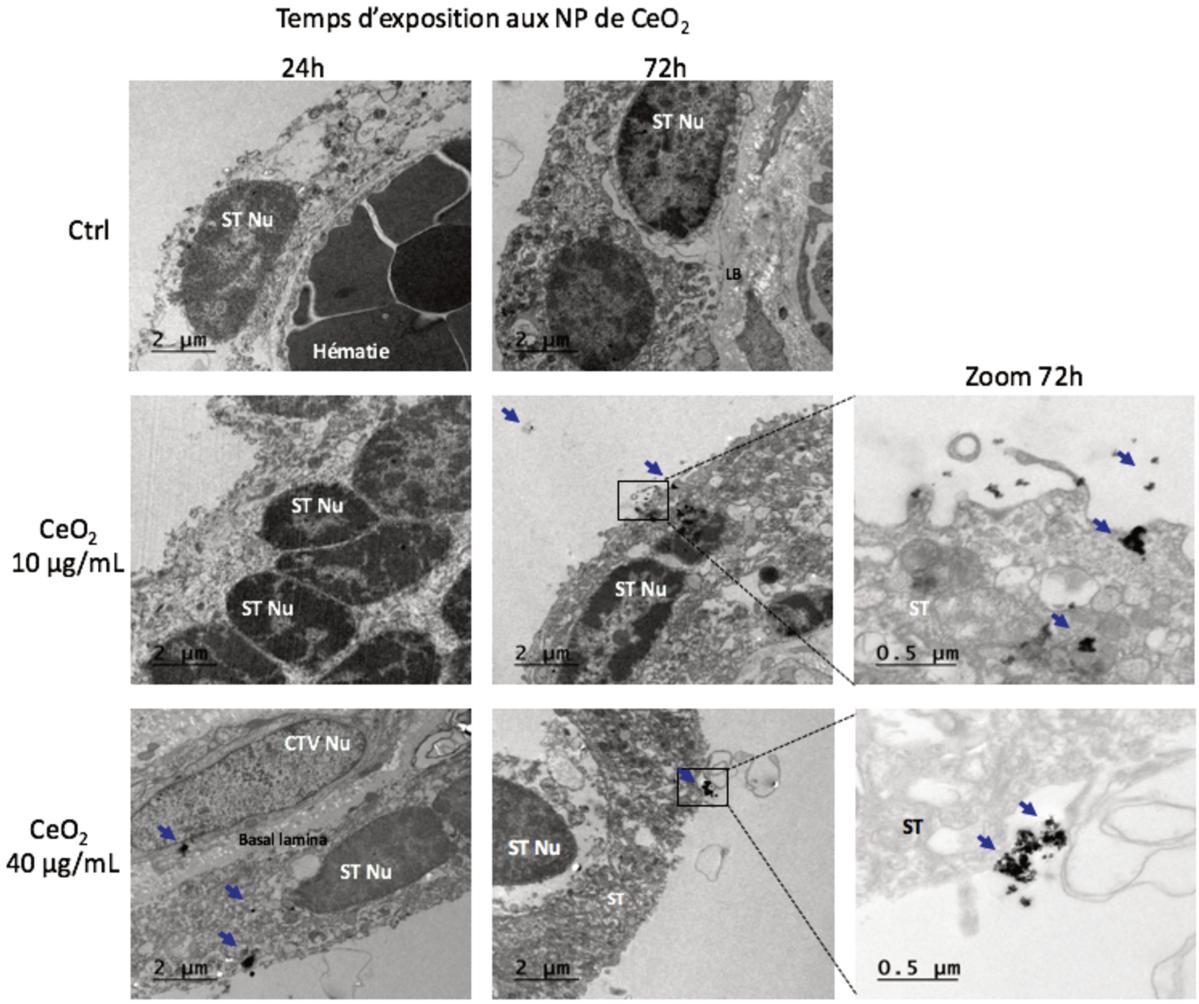


Figure 34. Internalisation des NP de CeO_2 par les villosités choriales

Photographies de microscopie électronique à transmission d'explants de villosités choriales incubées avec les NP de CeO_2 aux concentrations et temps indiqués. Les flèches bleues indiquent les agglomérats des nanoparticules. Barre d'échelle : 2 μm et 0,5 μm. CTV Nu : noyau de cytotrophoblaste ; ST : syncytiotrophoblaste ; ST Nu : noyau de syncytiotrophoblaste.

PARTIE 3 :

Article 3. EFFETS DU BENZO(A)PYRENE SEUL OU EN CO-EXPOSITION AVEC DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE CERIUM SUR LES TROPHOBLASTES HUMAINS.

Le BaP et les NP de CeO_2 possèdent des sources d'exposition commune, telles que les gaz d'échappement des véhicules à moteur Diesel et la fumée de cigarette, et se retrouvent donc en mélange dans la pollution ambiante. Ces deux polluants sont des contaminants auxquels les femmes enceintes et par conséquent le fœtus sont exposés au quotidien et pour lesquels il existe peu de données permettant d'estimer leur toxicité conjointe sur des modèles placentaires humains. Les NP ont notamment la capacité d'adsorber des molécules pouvant ainsi favoriser l'entrée de ces molécules dans l'organisme. Souvent issus des mêmes sources de pollution (Diesel, cigarettes…), le risque sanitaire de la co-exposition de NP avec des HAP (tel que le BaP) au niveau de la barrière placentaire n'a pas encore été évalué ; leurs effets en mélange pourraient être exarcébés par rapport aux expositions individuelles. De plus, une exposition préalable aux NP peut altérer les fonctions de barrière et de défense (métabolisation, défense anti-oxydante, réponse pro-inflammatoire, fonction endocrine, voies de signalisation…) qui pourrait devenir plus vulnérable à d'autres polluants chimiques émis par les mêmes sources. Dans la littérature, il existe peu d'études d'expositions conjointes de ces types de polluants (NP et HAP) et l'une d'entre elle est réalisée sur une lignée de cellules placentaires humaines. Comme décrit dans la section 4.2.5.5 de l'introduction, cette étude porte sur des cellules endothéliales vasculaires de cordon ombilical humain (HUVEC) et démontre une toxicité augmentée par la co-exposition du BaP et des NP de SiO_2 par rapport à leur exposition individuelle [407]. A ma connaissance, aucune donnée n'est disponible sur des effets combinés des NPs de type CeO_2 avec un autre polluant.

L'objectif de cet axe de ma thèse était de déterminer les effets d'une exposition conjointe au BaP et aux NPs de CeO_2 sur les trophoblastes primaires humains isolés de placentas à terme de grossesse et de comparer les effets aux expositions individuelles à ces deux polluants. L'exposition aux deux contaminants en mélange est plus pertinente par rapport à la réalité de la pollution environnementale.

Dans ce but, nous avons réalisé dans un premier temps l'étude de la cytotoxicité du BaP sur les trophoblastes primaires humains avec une large gamme de concentration (0,1 à 8 μM) et de temps d'incubation (24 h à 72 h). Dans un second temps, nous nous

sommes proposés d'identifier, grâce à une étude protéomique « Cell Stress Array », les acteurs majeurs du stress cellulaire dont le niveau est modulé lors d'une exposition en mélange au BaP et NP de CeO_2 versus leurs expositions individuelles dans les CTV de placenta à terme de grossesse.

1. Etude de l'effet du BaP sur les trophoblastes

Comme cela a été déterminé pour les nanoparticules de dioxyde de cérium dans la partie 2 du chapitre des résultats, l'étude de cytotoxicité du BaP en exposition individuelle et de son effet sur l'état redox des trophoblastes a été réalisée. Afin de déterminer si le BaP possède des effets cytotoxiques sur notre modèle cellulaire, des cytotrophoblastes purifiés à partir de placenta à terme ont été incubés avec une large gamme de concentration de BaP variant de 0,1 à 8 μM pour des temps de 24 h à 72 h et le test d'activité métabolique WST1 a été réalisé après chaque temps d'incubation (Figure 35A). Le BaP diminue l'activité métabolique après 72 h d'incubation et à des doses supérieures à 2 μM. Le test WST1 a également été réalisé après incubation du BaP sur les syncytiotrophoblastes (déjà différenciés à 3 jours de culture) pendant 24 h (Figure 35B). Le BaP induit une augmentation de l'activité métabolique à une concentration de 1 μM et une diminution à la concentrations de 8 μM (24 h). Ces variations sont très limitées (<10%) mais significatives. Il est connu que le BaP, comme d'autres HAP cancérigènes, conduisent à une stabilisation de la protéine p53, qui est un facteur de transcription stabilisé au niveau protéique en réponse à des dommages à l'ADN ou un stress oxydant et dont l'activation conduit soit à un arrêt du cycle cellulaire ou induit l'apoptose des cellules [426]. Ainsi, nous avons déterminé par Western blot le niveau protéique de p53 après exposition des CTV au BaP (0,1, 1 et 8 μM) pendant 24 h et 72 h. Dans la figure 35C, nous observons la stabilisation de p53 dès 24 h d'incubation pour des doses supérieures à 1 μM de BaP, probablement dû à des dommages à l'ADN ou un stress cellulaire. Cette stabilisation de p53 s'observe également à 72 h d'incubation avec le BaP à 8 μM.

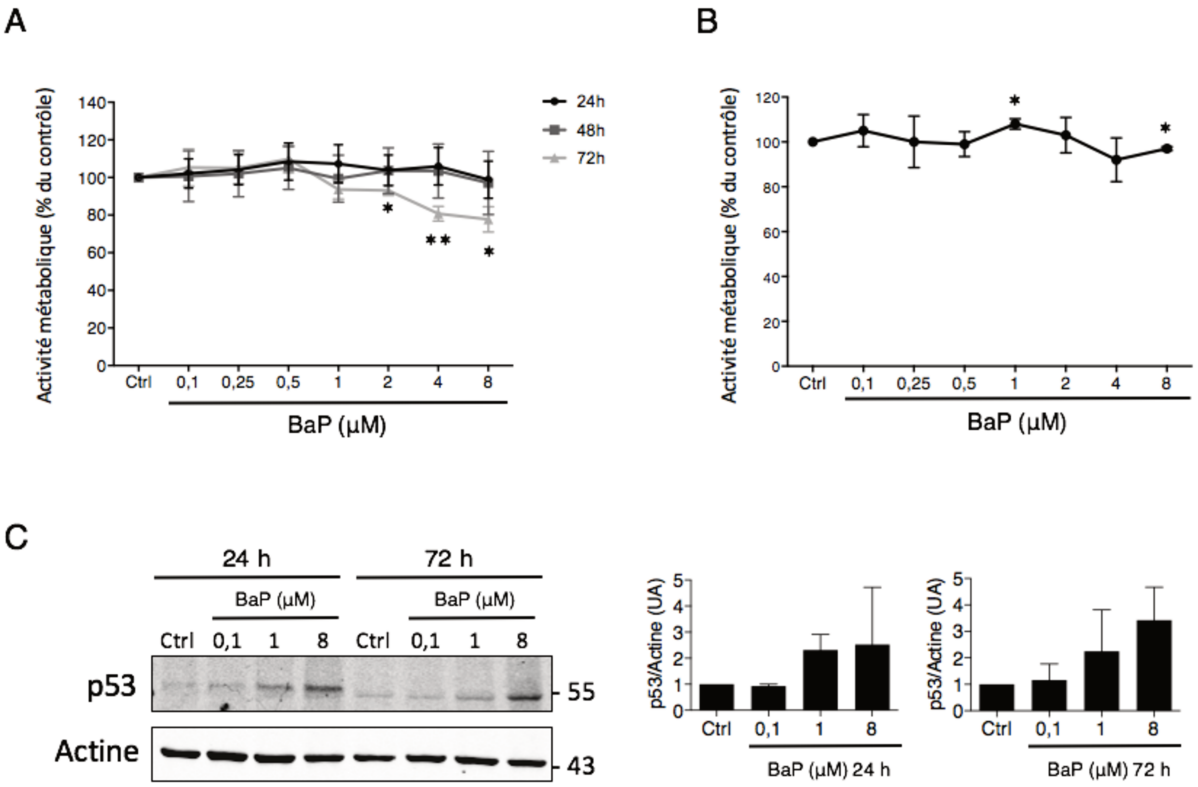


Figure 35. Effet du benzo(a)pyrène sur la viabilité des trophoblastes primaires humains

Les cytotrophoblastes villeux purifiés à partir de placenta à terme de grossesse ont été mis en culture et incubés avec du DMSO (Ctrl) ou ont été incubés avec le BaP aux concentrations indiquées de 24 h à 72 h. **(A)** Le test d'activité métabolique WST1 est représenté sous forme d'histogramme avec les moyennes +/- SEM (n=3) relatives au contrôle pour chaque temps d'incubation. * $p<0,05$ vs Ctrl 72 h, ** $p<0,01$ vs Ctrl 72 h. **(B)** Les cytotrophoblastes ont été mis en culture pendant 48 h pour obtenir des syncytiotrophoblastes qui ont été incubés pendant 24 h avec le BaP aux concentrations indiquées. Le test d'activité métabolique WST1 est représenté sous forme d'histogramme avec les moyennes +/- SEM (n=3) relatives au contrôle. * $p<0,05$ vs Ctrl. **(C)** Les extraits protéiques ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices et les membranes ont été incubées avec des anticorps anti-p53 et anti-actine (ce dernier utilisé comme témoin de charge). La quantification des bandes a été réalisée avec le logiciel Odyssey et est présentée sous forme d'histogramme avec la moyenne rapportée sur l'actine +/-SEM en unités arbitraires (n=2, test statistique non réalisé).

Nous avons poursuivi par l'étude de l'effet du BaP sur l'état redox des trophoblastes. La capacité du BaP à induire un stress oxydant cellulaire a été évaluée par l'utilisation de la sonde CM-H_2DCFDA (Figure 36A). Cette sonde intracellulaire émet une fluorescence lorsqu'elle est clivée par les espèces réactives de l'oxygène (détection du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et d'autres espèces telles que HO°, NO_2°, ROO° de manière indirecte [427]. L'hydroperoxide de tert-butyle (TBHP) est un analogue stable de H_2O_2 et est utilisé comme contrôle positif d'induction de stress oxydant dans notre modèle cellulaire. Nous observons une légère augmentation mais significative du stress oxydant

principalement à partir de 0,5 à 1 µM de BaP, de façon croissante avec la concentration et le temps. Cela a notamment été confirmé en Western blot par la détection du niveau de suroxydation d'un senseur de stress oxydant, la peroxyredoxine (Prx) (Figure 36B). Cette protéine est suroxydée par la présence de peroxyde d'hydrogène (H_20_2). Nous observons une augmentation de la forme suroxydée de cette protéine avec les doses croissantes de BaP, témoin d'un stress oxydant.

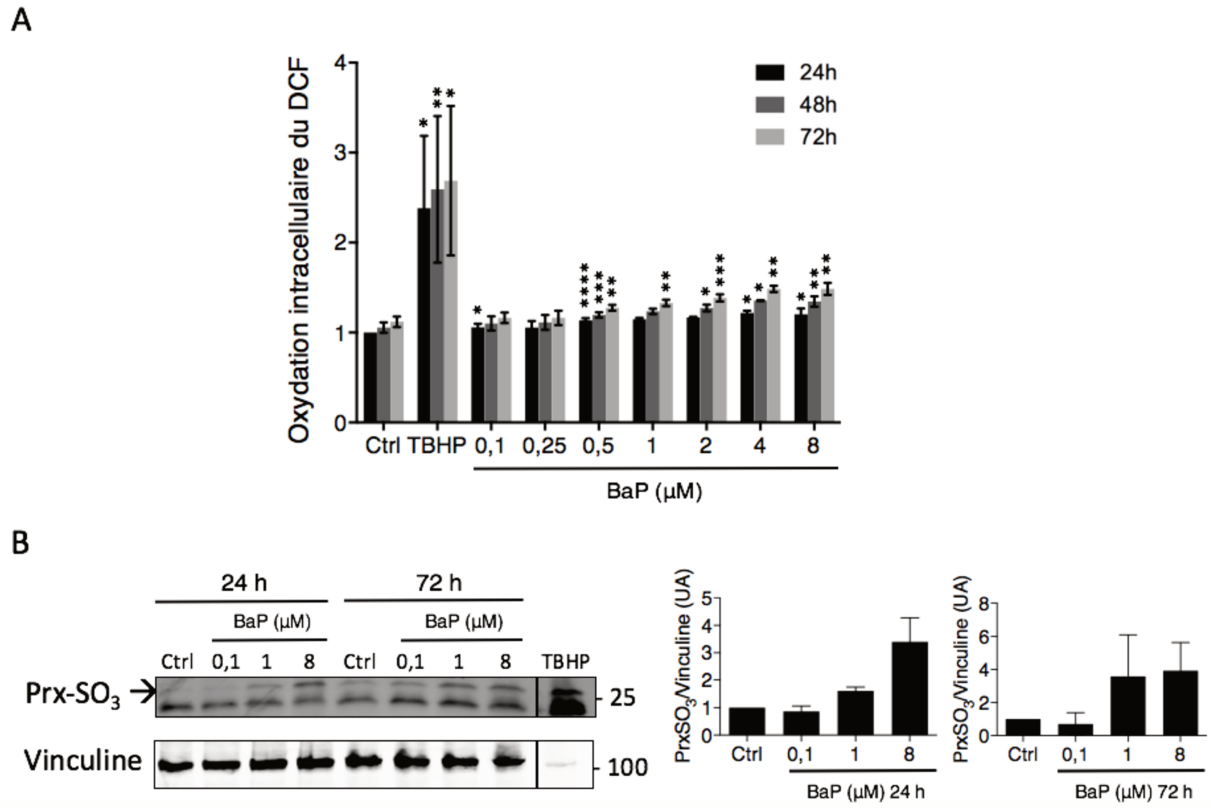


Figure 36. Effet du benzo(a)pyrène sur l'état redox des trophoblastes primaires humains

Les cytotrophoblastes villeux purifiés à partir de placenta à terme de grossesse ont été mis en culture et incubés avec du DMSO (Ctrl) ou avec le BaP aux concentrations indiquées de 24 h à 72 h. **(A)** Le niveau d'ERO intracellulaire a été évalué par la sonde CM-H_2DCFDA. L'hydroperoxyde de tert-butyle (TBHP, 250 µM) a été utilisé en tant que contrôle positif. Les expériences ont été faites en triplicats techniques à partir de trois cultures indépendantes de trophoblastes (n=3). Les données sont exprimées en moyennes +/- SEM avec une normalisation par le contrôle 24 h. * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001 ; **** p<0,0001. **(B)** Les extraits protéiques totaux ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices et les membranes ont été incubées avec des anticorps anti-Prx-SO_3 et anti-actine (ce dernier utilisé comme témoin de charge). L'hydroperoxyde de tert-butyle (TBHP, 250 µM, 24 h) a été utilisé en tant que contrôle positif. La quantification des bandes a été réalisée avec le logiciel Odyssey et est présentée sous forme d'histogramme avec la moyenne rapportée sur l'actine +/- SEM (n=2, test statistique non réalisé).

2. Etude de l'effet de la co-exposition au BaP et aux NP de CeO_2 sur les trophoblastes

Le BaP et les NP de CeO_2 ne se retrouvant pas isolés dans la pollution mais en mélange puisque issus des mêmes sources, l'étude de cytotoxicité a également été réalisée avec l'exposition conjointe des trophoblastes aux deux polluants, à des ratios ayant été choisis par rapport à ce qui est retrouvé dans l'air ambiant à Paris en terme de ratios HAP/$PM_{0,1}$ (1,6 mg HAP par gramme de $PM_{0,1}$) [428] (Figure 37). Pour l'exposition aux NP de CeO_2, nous avons choisi une dose d'exposition élevée pour notre modèle pour obtenir une cytotoxicité, comme cela a été déterminé dans la partie 2 de ce manuscrit, et pour le BaP la dose correspondante au ratio atmosphérique. En conservant donc ce rapport, nous nous sommes placés à 80 μg/ml (soit 12,6 μg/cm^2) de NP de CeO_2 pour 1,28 μM de BaP comme point de départ des séries de dilution séquentielles au demi jusqu'à 2,5 μg/mL (0,4 μg/cm^2) de NP de CeO_2 pour 0,04 μM de BaP. Cette gamme de concentrations nous permet de nous rapprocher des concentrations de BaP retrouvées dans le placenta, étant donné que nous n'avons pas d'informations sur celles des NP. A 72 h d'incubation, le BaP n'ayant pas d'effet sur la viabilité des trophoblastes aux doses testées ici en co-exposition (Figure 35A), nous avons comparé l'effet de la double exposition à celui de l'exposition aux nanoparticules seules aux mêmes concentrations. Il y a une tendance à la diminution de la viabilité cellulaire par l'exposition combinée par rapport à l'exposition individuelle mais cela reste non significatif.

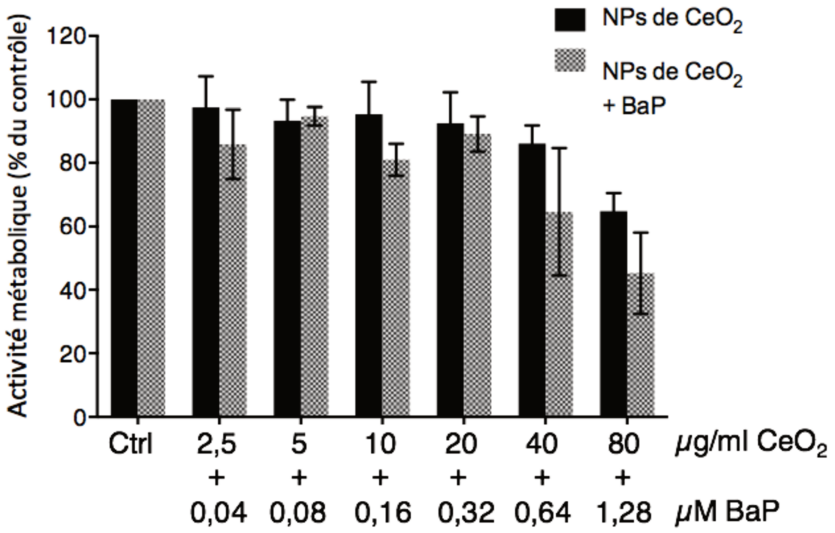


Figure 37. Effet de la co-exposition du benzo(a)pyrène et des nanoparticules de dioxyde de cérium sur la viabilité des trophoblastes primaires humains

Les cytotrophoblastes villeux purifiés à partir de placenta à terme de grossesse ont été mis en culture et laissés sans traitement (Ctrl) ou ont été incubés en co-exposition avec le BaP et les NPs de CeO_2 aux concentrations indiquées pendant 72h. Le test d'activité métabolique WST1 est représenté sous forme d'histogramme avec les moyennes +/- SEM (n=3) relatives au contrôle pour chaque temps d'incubation.

Comme vu précédemment, la différenciation des cytotrophoblastes primaires humains est caractérisée par la syncytialisation. Nous avons comparé les effets d'une co-exposition au BaP et aux NPs de CeO_2 par rapport aux expositions individuelles sur la capacité de fusion des trophoblastes par le calcul de l'index de fusion (comme décrit dans l'Article 2 et dans la partie Matériels et méthodes (section 7.5). Les concentrations testées sont de 2,5 µg/mL (0,4 µg/cm^2) pour les NPs et le ratio atmosphérique correspondant de 0,04 µM pour le BaP pour une exposition de 72 h (temps nécessaire à la différenciation des CTV). La concentration en NP de 2,5 µg/mL (0,4 µg/cm^2) choisie est une concentration non-cytotoxique (Figure 4A de l'Article 2) mais qui avait conduit à une diminution de l'index de fusion de 20% après exposition individuelle (Figure 6 de l'Article 2). Nous retrouvons l'effet inhibiteur d'environ 20 % de la fusion à la concentration de 2,5 µg/mL de NPs de CeO_2 (Figure 38), déjà observé précédemment (Figure 6 de l'article 2). Au contraire, le BaP en exposition individuelle augmente légèrement mais significativement la capacité de fusion des trophoblastes. En co-exposition (NP de CeO_2 et BaP), l'effet inhibiteur des NP sur la fusion est compensé par l'effet stimulateur du BaP, avec une absence de variabilité vis-à-vis du contrôle (DMSO). Il y a donc un effet différent de la co-exposition par rapport à l'exposition individuelle de

ces deux polluants majeurs sur la fusion des cytotrophoblastes et donc leur capacité à se différencier en syncytiotrophoblastes.

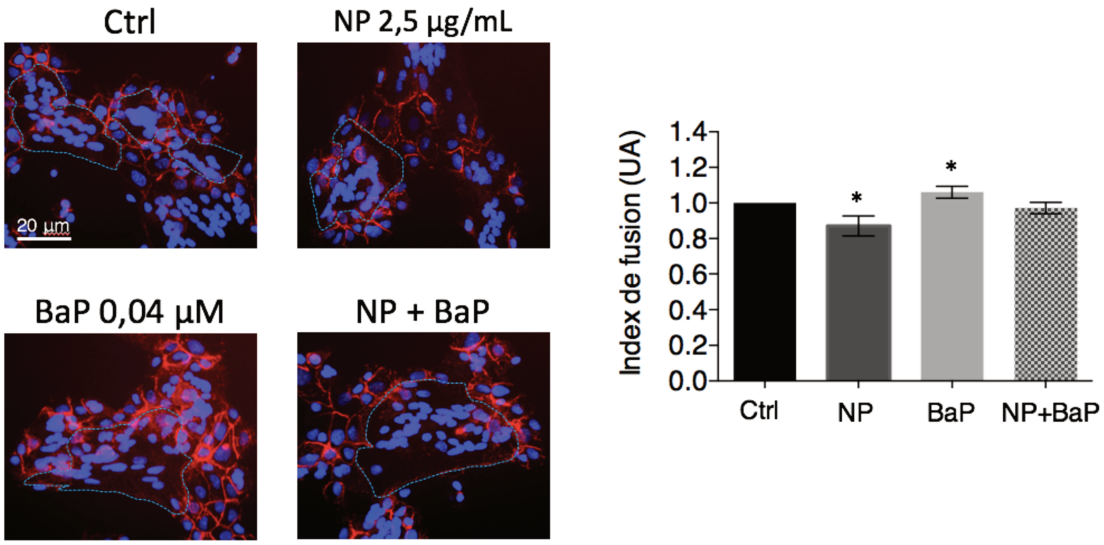


Figure 38. Effet des nanoparticules de dioxyde de cérium et du benzo(a)pyrène en exposition individuelle ou combinée sur la fusion des cytotrophoblastes

Les cytotrophoblastes villeux purifiés à partir de placenta à terme de grossesse ont été mis en culture et incubés avec du DMSO (Ctrl), incubés avec du BaP à 0,04 µM et/ou des NPs de CeO_2 à 2,5 µg/mL pendant 72 h. Les cellules ont ensuite été fixées et perméabilisées avec du méthanol. Les images d'immunofluorescence montrent le marquage desmoplakine (protéine membranaire, en rouge) et les noyaux (DAPI, en bleu). Barre d'échelle : 20 µm. Les noyaux ont été comptés grâce à ImageJ et l'index de fusion a été calculé et représenté avec les moyennes +/- SEM relatives au contrôle (n=3). * $p<0,05$ vs Ctrl.

Nous avons ensuite entrepris d'évaluer l'effet de ces deux polluants, BaP et NP de CeO_2, sur les trophoblastes en exposition individuelle et combinée pendant 24 h en ce qui concerne le stress cellulaire. Nous avons réalisé une analyse globale sur puce (Cell Stress Array) afin de déterminer les acteurs majeurs des voies de signalisation induites par le stress cellulaire qui pourraient être modulés par ces deux polluants. Ces résultats sont présentés sous forme d'un article de journal, qui est actuellement en préparation pour une soumission (présenté ci-après : Article 3, intitulé « Effects of benzo(a)pyrene and cerium dioxide nanoparticles in co-exposure on human trophoblast cell stress »).

Afin d'avoir une réponse représentative, nous avons utilisé un mélange d'extraits protéiques totaux issus de 5 cultures placentaires (n=5) en s'assurant au préalable de l'homogénéité de la réponse des placentas au BaP grâce à deux marqueurs : l'induction du CYP1A1, une cible transcriptionnelle d'AhR et la stabilisation de p53, un marqueur de stress cellulaire et/ou de dommages à l'ADN. Les données ont été présentées sous forme

de heatmap. Les facteurs majeurs (intervenant dans le stress oxydant, l'apoptose et l'hypoxie) modulés par ces polluants dans l'analyse sur puce ont ensuite été validés en western blot à partir des mêmes extraits protéiques déposés séparément pour chaque placenta.

Dans l'Article 3, nous avons montré que le BaP en exposition individuelle induit une stabilisation de p53 sans induire d'apoptose dans les trophoblastes. De plus le BaP ne module pas l'expression protéique des défenses antioxydantes. Au contraire, les NP de CeO_2 apparaissent comme étant antioxydantes. Le BaP et les NP de CeO_2 en exposition individuelle diminuent le niveau protéique d'HIF-1α et HIF-2α avec une plus forte diminution de HIF-2α en co-exposition, ce qui suggère un effet synergique. Globalement, le Cell Stress Array met en évidence un plus grand nombre d'acteurs qui voient leurs taux protéiques être modulés en co-exposition par rapport aux expositions seules.

Effects of benzo(a)pyrene and cerium dioxide nanoparticles in co-exposure on human trophoblast cell stress

Authors

Margaux Nedder[1], Thierry Fournier[1], Sonja Boland[2], Stacy Colzin[1], Christelle Laguillier-Morizot[1], Audrey Chissey[1], Xavier Coumoul[3], Amal Zerrad-Saadi[1], Ioana Ferecatu[1#]

[1] Université de Paris, INSERM UMR-S 1139, 3PHM, F-75006 Paris, France

[2] Université de Paris, BFA, UMR 8251, CNRS, F-75013 Paris, France

[3] Université de Paris, INSERM UMR-S 1124, F-75006 Paris, France

Author to whom correspondence should be addressed: Ioana Ferecatu, INSERM UMR-S 1139, Faculté de Pharmacie de Paris, Université de Paris, 4 Avenue de l'Observatoire 75006 Paris, France, Tel: +(33) 1 53 73 96 05, Fax: +(33) 1 44 07 39 92; E-mail: ioana.ferecatu@parisdescartes.fr.

Running title: Benzo(a)pyrene and nanoceria on human placenta

Abstract

The placenta is a multifunctional organ at the interface between maternal and fetal blood circulation. The placenta regulates gas exchanges, nutrient uptake, waste elimination and hormone synthesis, which are essential for fetal growth and pregnancy outcome. This transitory organ represents also a barrier to protect the fetus from exposure to xenobiotics. Benzo(a)pyrene (BaP) and cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) have the same sources of exposure such as diesel exhaust gases of diesel and cigarette smoke and are subsequently found in ambient air pollution. The aim of our study was to determine by Cell Stress Array the major signaling pathways modulated under a single or co-exposure of villous cytotrophoblasts isolated from human term placenta to BaP and CeO_2 NPs during 24 h. Based on the atmospheric ratio of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)/ultrafine particles (UFP), we have tested a ratio of 6.3 $\mu g/cm^2$ of CeO_2 NPs for 0.6 μM of BaP which correspond to high but non cytotoxic concentration for the placenta. We showed that BaP activates AhR signaling pathway, stabilizes p53 without overoxidation of peroxiredoxins $PrxSO_3$ (H_2O_2 sensor) nor changes in antioxidant enzymes levels,

suggesting a mutagenic effect of BaP. On the contrary, CeO_2 NPs have an antioxidant effect leading to a decrease in the expression of Prx-SO_3 and factors such as HIF-1α, HIF-2α, p38 and NF-κB, as well as a decrease in the activation of their signaling pathways. This effect is potentiated after co-exposure to both pollutants, suggesting synergetic signaling.

Keywords

Human placenta, cytotrophoblasts, cell stress array, AhR, p53, antioxidants

Introduction

The placenta is a transitory organ at the interface between maternal and fetal circulation. This organ ensures essential functions for the maintenance of pregnancy as well as for fetal development (1). The placenta provides nutritive and gaseous transport, elimination of waste products from metabolism and an endocrine and immune role. The placenta is also a selective barrier that assures protection of the fetus against many xenobiotics to which the mother is exposed, although many substances can cross the placenta *via* different mechanisms and consequently reaching the fetus. The placenta is composed of chorionic villi that represent the structural and functional units of the human placenta and it consists of a mesenchymal core embedding the fetal vessels and bordered by an epithelium. This epithelium is formed by the outer syncytiotrophoblast (ST) layer, a multinucleated syncytium, and of the underlying mononuclear villous cytotrophoblasts (VCT), which constantly differentiate and fuse to renew the syncytium. From 10 gestational weeks, the villi bath freely in maternal blood in the intervillous space and are in direct contact with circulating xenobiotics. VCT can be purified from human placenta obtained at the first trimester or at term of pregnancy. These cells retain the ability to aggregate and fuse in vitro after 24-48 h to form the ST and are therefore more representative of physiological conditions than cell line, such as the Bewo choriocarcinoma trophoblast.

Nowadays, air pollution is a major public health concern. Environmental pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and cerium dioxide nanoparticles (CeO_2 NPs) are widespread contaminants. One of the most represented PAH is the benzo(a)pyrene (BaP), a five-ring benzene that have been classified by International Agency for Research

on Cancer in group I (CMR agent for humans) but is also an endocrine disruptor (2). BaP is formed by incomplete combustion of organic compounds and is found in cigarette smoke, industrial waste but also in food after cooking. The novel-market cerium dioxide nanoparticles gained the attention of scientific community because they are used for numerous applications, as additives in diesel fuels and in cigarettes, as polishing agent (glass, ceramic), for oxygen sensing and recently proposed as potential medicines (e.g. antitumor drugs) (3,4). The Organization of Economic Cooperation and Development (OECD) has included CeO_2 NPs in the top priority list of the nanomaterials requiring urgent evaluation in 2010. However, human exposure to CeO_2 NPs is rarely alone because due to their high surface-to-volume ratio and high reactivity, CeO_2 NPs can interact with other pollutants from common sources during combustion. A prior exposure to NP can alter the barrier and defense functions of trophoblasts (metabolism, endocrine function, antioxidant defense, pro-inflammatory response, signaling pathways…) which could become more vulnerable to other chemical pollutants (such as BaP). Hence CeO_2 NPs and BaP are encountered in combination (from common combustion processes like diesel exhaust, cigarettes smokes…) and the exposure of humans to both contaminants in mixture is the more realistic scenario. Human exposure at these two pollutants is mainly through the respiratory tract. Lipophilic BaP as well as NPs, including CeO_2 NPs, are able to cross biological barriers, enter the systemic circulation and reach blood-irrigated organs, such as the placenta (5,6). Moreover, pollutants that accumulates within the placenta may directly impact its proper functioning, and placenta dysfunction plays a major role in the pregnancy outcome (7). Recent publications show that cerium element was detected in mother's samples of blood, urine and breast milk (8,9) and its increased concentration in blood and maternal urine was associated to risk for fetal neural tube defects and a reduced level of TSH (thyroid-stimulating hormone) in the newborn (8,10). BaP retained by the placenta have been shown to be associated to pregnancy complications (11) and CeO_2 NPs have been shown to have adverse effects on human primary trophoblasts, affecting viability and differentiation (12).

Unlike other chemicals, NPs cannot be metabolized and eliminated by the classic cellular detoxification system (13,14). In contrast, the cellular target of BaP is the ligand-activated transcription factor AhR, involved in xenobiotic detoxification. AhR is a cytosolic receptor that upon ligand-binding relocates to the nucleus, undergoes heterodimerization with the

AhR nuclear translocator (ARNT) and binds specific xenobiotic responsive elements (XRE) in the promoter of its target genes of phase I (CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1) and of phase II enzymes (NQO1, HO-1, SOD1/2, GST, NRF2) of xenobiotic metabolism. The activation of AhR contributes to adverse cellular toxicity of BaP via its metabolic bioactivation, leading to the formation of reactive metabolites such as benzo(a)pyrene-diol epoxides (BPDE) that forms adduct with the DNA and generates ROS production. In placenta, AhR is involved in the biological response to PAH, including BaP. During pregnancy, exposure to BaP contributes to infertility and increases the risk of missed abortion in early pregnancy of smoking women. In women that smoked during pregnancy, BaP is detected in both placenta and in umbilical cord blood, together with BaP-DNA adducts (15,16). Moreover there is an association between exposure to BaP during pregnancy and low birth weight (17) and levels of DNA adducts due to BaP metabolism in umbilical cord blood and placenta have also been associated with impaired fetal growth, reduced birth weight, height and head circumference of newborns (18).

In this study, we have investigated the consequences of a co-exposure to BaP and CeO_2 NPs on the major actors of cellular stress of primary trophoblast from human placenta at term of the pregnancy. The ratio of pollutants tested mimics the airborne levels of HAP found on the atmospheric ultrafine particles (UFP) at Paris (the ratio corresponding to 0.1 μM HAP per 1 $\mu g/cm^2$ UFP, that we have converted to 0.6 μM BaP per 6.3 $\mu g/cm^2$ CeO_2 NPs). We showed that BaP activate AhR signaling pathway with stabilization of p53 and without any activations of the antioxidant system defense, suggesting a mutagenic effect of BaP. On the contrary, CeO_2 NPs have rather an anti-oxidant effect and affects the actors of HIF1-α, HIF-2α, p38 and NF-κB pathways with a potentiated effect during the co-exposure, suggesting interaction between the signaling pathways.

Methods

1. Placenta collection

Placentas were collected from non-smoking, healthy women with pregnancies delivered by Caesarean sections between 37 and 39 weeks of amenorrhea (hereafter called ”term”). Placentas were obtained from the Port-Royal Maternity, the Mutualist Institute Montsouris, the Private Hospital of Antony, the Béclère Hospital, and the Beaujon Hospital after obtaining written consent from informed patients and approval from our local ethic

committee (CPP: 2015-May-13909). The study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki.

2. Cytotrophoblast purification and culture

After collection, placental tissues were washed in Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free Hank's Balanced Salt solution (HBSS, Gibco #14175, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Then, chorionic villi were gently scraped free from vessels and connective tissue, and dissected into about 25 mg fragments. The time for placental dissection was kept under 30 min to prevent tissue degradation. The mononucleated villous cytotrophoblasts (VCT) were isolated, based on the methods of Kliman et *al.* (19). After dissection, the chorionic villi were washed in Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free HBSS, and then digested in trypsin digestion medium containing HBSS 5 mL/g, 0.1% trypsin (Sigma-Aldrich #27250-018, Saint Quentin Fallavier, France), 0.1 M $MgSO_4$ (Merck #5886-0500, Fontenay sous Bois, France), 0.1 M $CaCl_2$ (Merck #1-02820-1000), 4% milk and 50 Kunitz/mL DNAse type IV (Sigma-Aldrich #D5025, Saint Quentin Fallavier, France), for 30 min at 37 °C without agitation. This was repeated eight times with 10 min incubation with the same trypsin solution. The first three trypsin digestions containing a mixture of extravillous cytotrophoblasts (EVCT) and VCT were discarded, after light microscopic analysis, and the last three ones, containing a majority of VCT, were kept and pooled. The chorionic villi were finally washed with warm HBSS (37 °C). Each time, the supernatant containing VCT was collected after tissue sedimentation, filtered (on 40-µm pores filters), and incubated with 10% fetal calf serum (FCS, vol/vol) to stop trypsin activity. After purification by Percoll gradient, VCT were resuspended and cultured in DMEM (containing 1 g/L glucose, pyruvate, Phenol red-free, Thermo Fisher Scientific, #11880, Illkirch, France) supplemented with 10% FCS (Eurobio #CVFSVF00-01, Les Ulis, France), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich #G7513), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco #15140-122, Thermo Fisher Scientific) at 125,000 cells/cm^2 on 60-mm diameter culture dishes. After around 16 h of culture (overnight), VCT were carefully washed to eliminate non-adherent cells. Purified VCT were characterized for each culture to ensure the homogeneity between purifications by microscopic visualization, the ability to aggregate at 48 h of culture and to form ST at 72 h, and by monitoring the production of hCG secreted into the supernatant. Cells were collected after pollutant incubation and kept at -80°C for protein extraction.

3. Treatments

Benzo(a)pyren (Sigma-Aldrich #B1760) was dissolved in DMSO at 10 mM and stored at 4°C. Trophoblasts were incubated with BaP for 30 min, 4 h or 24 h at a final concentration of 0.1, 0.6 or 1 µM. CeO_2 NPs were obtained from the Joint Research Center of European Union (NM-212, IHCP, Ispra, Italy). CeO_2 NPs physico-chemical characterization has been done previously (12). NPs were dispersed in DMEM cell culture media without FCS at a concentration of 3 mg/mL through sonication with a sonifier equipped with a cup horn (450 W and 50/60 Hz, Branson, Danbury, USA) at 70% amplitude, on ice, for 2 min. NPs were then sequentially diluted in cell culture medium with FCS immediately before use, to give a final concentration of 6.3 µg/cm^2 (corresponding to 40 µg/mL). Trophoblasts were incubated with CeO_2 NPs for 30 min, 4 h or 24 h. The AhR antagonist CH223191 (Calbiochem) was used at 3 µM in culture medium (stock at 3 mM in DMSO) and was incubated with cells for 1 h prior to BaP incubation.

4. Cell viability by WST1

Cell viability was assessed on the basis of mitochondrial metabolic activity of cells using the WST1 assay (Sigma-Aldrich #11644807001) — in which mitochondria dehydrogenase cleaves the tetrazolium salt 2-(4-idophenyl)-3-(4-nitrophenyl)5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium (WST1) into formazan — and according to the manufacturer's instructions. Trophoblast cells were cultured overnight in 48-well plates, washed with fresh medium and treated accordingly for 24 to 72h. At the end of the exposure time, cells were rinsed with culture medium and then WST1 reagent was added (1: 100) to each well and incubated for 3 h at 37°C. Spectrometric absorbance was measured using a microplate reader (EnSpire 2300 Multilabel reader, PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France) at 440 nm, and using 600 nm as correction wavelength (to remove the non-specific emission).

5. Western blot

Total protein extracts from trophoblast cells from 60-mm dish cultures were obtained by harvesting cells in lysis buffer (Human Cell Stress Array kit, R&D systems #ARY018), added with protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem Merck #539131). Protein extracts were centrifuged for 5 min at 14,000 g and stored at -80°C. Protein concentrations were determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit

(Thermo Fisher Scientific #23235). Equal amounts of proteins (30 µg) were separated on 7.5%, 4–15% or 8-16% SDS-PAGE mini-PROTEAN® TGX™ precast protein gel (Bio-Rad #4561085 #4561084 #4561103, Marnes-la-Coquette, France) under reducing conditions (DTT 10%, Sample Reducing Agent 10X, Invitrogen #NP0009) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Trans-blot Turbo Transfer pack, 0.2 µm nitrocellulose, Bio-Rad #1704159). Blots were incubated overnight with the primary antibody at 4 °C, and then for 1 h with the appropriate DyLight 680 or 800 Fluor-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific #35568 and #35521). The primary antibodies used were: mouse anti-AhR (1:500, Sigma-Aldrich #WH0000196-M2), mouse anti-β-actin (1:10000, A5441, Sigma-Aldrich), rabbit anti-CYP1A1 (1:1000, Proteintech #3241-1-AP), mouse anti-Bcl2 (1:1000, DakoCytomation #M0887), rabbit anti-HIF2α (1:1000, Novusbio #NB100-122), rabbit anti-HO-1 (1:1000, Enzo Life Sciences #ADI-SPA-895D), rabbit anti-NF-κB (1:2000, Abcam #ab16502), mouse anti-p53 (1:2000, DakoCytomation #M700101-2), rabbit anti-PARP-1 (1:1000, Cell Signaling #9542), rabbit anti-Prx-SO_3 (1:500, Abcam #ab16830), rabbit anti-SOD2 (1:1000, Cell Signaling #13141), mouse anti-vinculin (1:1000, Sigma-Aldrich 1V9131). Secondary antibodies were DyLight 800-labeled anti-mouse (Thermo Fisher Scientific #35521) or DyLight 680-labeled anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific #35568), and blots were scanned with an Odyssey® Imaging System (Li-COR, Bad Homburg, Germany). Quantification was performed using Li-COR Odyssey software.

6. Cell Stress Array

The effects of BaP and CeO_2 NPs on signaling involved in cellular stress were evaluated using the Human Cell Stress Array kit (R&D systems #ARY018) in accordance with the manufacturer's instructions. Total protein extracts obtained as described for Western blot were incubated for 30 min on a rocking platform shaker at 4°C. Equal amounts of each total protein extracts (n=5) for each condition were pooled to obtain 300 µg of a representative sample for each condition. Membranes were saturated for 1 h with the buffer provided then incubated with the protein extracts and the detection antibody cocktail overnight at 4°C. Membranes were washed three times for 10 min and incubated with Streptavidine coupled with a fluorochrome (1:2000, LI-COR Biosciences IRDye #926-32230). Blots were scanned with an Odyssey® Imaging System (Li-COR, Bad Homburg, Germany). Quantification was performed using Li-COR Odyssey software.

7. Statistical analysis

The results of quantitative analysis are presented as means +/- SEM. Differences between groups were evaluated with the paired Student's t-test using GraphPad Prism 6.0 software. The level of significance was fixed at a p-value < 0.05 (*), < 0.01 (**), < 0.001 (***) or < 0.0001 (****).

Results

1. Determination of the concentration of BaP for the Cell Stress Array

In order to study the effects of co-exposure to BaP and CeO_2 NPs, we first determine the effect of BaP on the viability of primary cytotrophoblasts (VCT), as already done in a previous study for CeO_2 NPs (12). For this, VCT were exposed to a range of BaP concentrations from 0.1 to 8 μM for 24 h to 72 h. WST1 colorimetric cell viability assays were performed after each incubation period (Figure 1A). High concentration of BaP (above 2 μM) decreased trophoblast metabolic activity only after 72 h-exposure and there was no statistically difference at shorter periods (24 h or 48 h). Then, we determine the adequate concentration and incubation time of the trophoblasts with BaP for the Cell Stress Array. In our previous published study using BeWo (20), we showed that BaP activates AhR at 1 μM, resulting in increased CYP1A1 expression. To respect the chosen ratio of the two pollutants for the co-exposure, we checked if we reproduced the activation of the AhR pathway at 0.6 μM of BaP. To confirm the absence of BaP cytotoxicity at these concentrations, we analyzed by Western blot protein levels of apoptotic markers: p53 and PARP-1 (a caspases' target) (Figure 1B). The apoptosis inducer p53 is stabilized at the protein level in response to oxidative stress and/or DNA damage and its activation leads to either cell cycle arrest or commitment to apoptosis. PARP-1, a nuclear poly (ADP-ribose) polymerase involved in DNA repair, is a caspase-3 direct target whose cleavage (cleaved PARP-1) serves as a marker of cells undergoing apoptosis. The staurosporine (STS) positive control, a classic apoptosis-inducer, clearly showed a stabilization of p53 (2.6 times the level of the control at 2 h) (Figure 1B quantification). Moreover, the cleavage of PARP-1 (cleaved PARP-1, 89 kDa) is also detected from 2 h of exposure (25 AU at 2 h and 97 AU at 6 h) (Figure 1B, quantification). The VCT treated with BaP showed an increase in p53 protein levels from 24 h in a concentration-dependent manner,

increasing from 1.25 at 0.1 µM to 3.25-fold change at 1 µM, higher than STS control. These effects were not observed after 30 min of exposure. The decrease in the level of vinculin and only the detection of the cleaved form of PARP-1 is due to a significant cytotoxic effect of staurosporine at 0.5 µM at 6 h of incubation. However, the exposure to increasing concentrations of BaP does not induce cleavage of PARP-1 for none of the exposure times (30 min and/or 24 h). We verified the activation of the BaP metabolism system according to the different concentrations (0.1, 0.6 and 1 µM) and incubation times (30 min and 24 h) in VCT (Figure 1C) by Western blot following the protein levels of AhR and its main transcriptional target CYP1A1. The protein level of the 95 kDa band corresponding to AhR transitorily increased by 3-fold compared to the controls after 30 min of incubation and then returned to the control level after 24 h of incubation. In parallel, the level of CYP1A1 increases in a time-shifted manner (after 24 h) and in a concentration-dependent manner, increasing from 3- to 9-times the level of control (Figure 1C, quantification). BaP does not appear cytotoxic for VCT despite the observed stabilization of p53. In addition, BaP is able to activate the AhR pathway at 0.6 µM, reproducing the cellular effects previously obtained at 1µM BaP. Moreover, the metabolism of BaP at this concentration would produce reactive metabolite because p53 is stabilized, without inducing VCT cytotoxicity and mortality (WST1 and PARP-1).

2. Determination of exposure time

Next, we determined the most appropriate exposure time for the Cell Stress Array in order to be able to detect the factors modified by the incubation of trophoblast to these pollutants. For this, we carried out a kinetic study (30 min, 4h and 24h) for both pollutants (BaP and CeO_2 NPs) in an individual exposure. The tested concentrations correspond to those that will be used in the Cell Stress Array (e.g. 0.6 µM of BaP and 6.3 µg/cm^2 of CeO_2 NPs). We followed the protein-level profile by Western blot of AhR and its target CYP1A1, as well as p53 and PARP-1 (Figure 2) because they were modified previously by the treatment with BaP. The protein levels of CYP1A1 increased in a time-dependent manner after exposure to BaP, going from 0.5 at 30 min to 6-fold change at 24 h (Figure 2A). On the contrary, the protein level of AhR transitorily halved at 30 min and 4 h of exposure to BaP compared to the control (Figure 2A). For CeO_2 NPs, there was no variation in the rate of CYP1A1, with the exception of a transient increase of 2-fold change at 4 h (Figure 2A). Similarly, there is a stabilization of p53 as a function of the exposure time with BaP, to

1.4-times the control level at 24 h, as high as the STS control (Figure 2B). For CeO_2 NPs, a slight transient stabilization of p53 was observed at 4 h. The STS treatment led to the cleavage of PARP-1, but again this was not the case after exposure to either BaP or CeO_2 NPs (Figure 2B). Thus, we chose an exposure time of 24 hours for the Cell Stress Array. We also determined the cytotoxicity of BaP and CeO_2 NPs co-exposure on human primary trophoblasts. To do so, VCT were exposed for 72 h to a range of concentrations of BaP and CeO_2 NPs starting from 12.6 μg/cm² CeO_2 NPs and 1.28 μM BaP (respecting the chosen ratio of the two pollutants) and making serial two-fold dilutions till 0.4 μg/cm² CeO_2 NPs and 0.04 μM BaP. WST1 colorimetric cell viability assays were performed at the end of the incubation period (Figure 2C). Since BaP is not cytotoxic at the concentrations tested for a 72h-incubation time (Figure 1A), we compared co-exposure to exposure to CeO_2 NPs alone. Although there was a tendency to a decrease of the metabolic activity of VCT by the co-exposure compared to exposure to CeO_2 NPs alone, this was however not significant.

3. Uniformity of trophoblast response to BaP and CeO_2 NPs

VCT from 5 independent experiments (5 placentas) were incubated with BaP and/or CeO_2 NPs at the concentration and time determined before (0.6 μM BaP and 6.3 μg/cm² CeO_2 NPs in individual exposure or co-exposure for 24 h). Then we mixed some total protein extract of these VCT in order to test a representative sample for the Cell Stress Array study. Before making the Cell Stress Array, we wanted to make sure that the VCT response from these 5 placentas was consistent. Again, we chose to evaluate protein level of CYP1A1 and p53 by Western blot as two cellular markers for the bioactivation of BaP (Figure 3 for the mean of n=5 and Supplementary figure 1 for the five independent experiments). Statistical analysis shows a significant increase in the level of CYP1A1 (7-fold the control level) and of p53 (1.7-fold the control level) after BaP alone or in co-exposure with CeO_2 NPs. The use of an AhR antagonist, CH22319, leads to a decrease by 50% of CYP1A1 protein level and by 10% of p53 after BaP-treatment (Supplementary figure 2). Trophoblast cultures from different placentas therefore responded in the same way to incubation with these pollutants and the mixture of placental samples could be use as representative for the Cell Stress Array.

4. Analysis of activated signaling pathways by BaP and CeO_2 NPs

In order to determine the major players in cellular stress whose protein expression is modulated during exposure to the pollutants BaP and CeO_2 NPs alone or in combination, we carried out a Cell Stress Array. For each spot, the signal intensity has been normalized with respect to the DMSO control condition (Supplementary figure 3). The data has been represented as a heatmap with a color gradient for a difference of 10% (Figure 4). After individual exposure to BaP, few factors were increased. Among these factors we noted an increase of phospho-p53 Ser 46 (15%), its transcriptional target p21 (41%) and the metalloproteinase ADAMTS1 (10%). Among the decreased level, we noted a major one of hypoxia factor HIF-2α (-30%). After exposure to CeO_2 NPs alone, we found that more proteins had their levels decreased as compared to BaP alone, and none was increased. Indeed, we note the decrease in chaperones like HSP70 (-29%), phospho-HSP27 and phospho-p38 (-25% and -21% respectively). As for the BaP, there was a decrease in the levels of HIF-2α (-27%), but also of HIF-1α (-14%). After exposure to CeO_2 NPs we could not observe the phosphorylation of p53 and there was a decrease of its target p21 (-11%) and Bcl2 (-11%), an anti-apoptotic protein. After co-exposures to BaP and CeO_2 NPs, overall, there was an accentuation of decrease observed in individual exposure. Indeed, 8 major stress actors were reduced at the protein level by the co-exposure of the two pollutants, among which we found NF-κB (-21%), SIRT2 (-27%), DKK4 (-20%), HIF-2α (-48%), HIF-1α (-29%) and CA9 (-22%) (a transcriptional target of HIF-1α). Solly the p21 protein increases compared to the control (30%), but is decreased compared to the exposure to BaP (-10%). Interestingly, 3 new proteins were reduced only by co-exposure (Mn SOD2 (-24%), PON3 (-19%) and p27 (-13%)) and that were not modified by each pollutant alone.

5. Oxidative status of villous cytotrophoblast

We validated by Western blot the main factors whose levels varied in the Cell Stress Array. We used the individual protein extracts from the 5 different placentas that were treated with BaP and/or CeO_2 as before and part of which was mixed for the Cell Stress Array. We evaluated the protein levels of HIF-2α, NF-κB, p53, Bcl-2, SOD2 and completed the study with other antibodies linked to cellular stress such as Prx-SO_3 and HO-1 (Figure 5, representative of n=5). The stabilized H_2O_2 tert-butyl hydroperoxide (TBHP), described as a strong oxidative stress inducer, was used here as a positive control, and showed that the trophoblasts are sensitive to H_2O_2, as reported before (12,21). The staurosporine, a

classic apoptosis-inducer, was used here again as positive control for the p53 pathway. For HIF-2α, the staining was too weak and did not allow quantitative analysis (Supplementary figure 4). Moreover, the signal of SOD2 was not analyzable but our kinetic study shows an absence of variation of the protein level of SOD (Supplementary figure 4). As shown in the graph, the suroxidation of the peroxyredoxin ($Prx\text{-}SO_3$) decreased significantly with CeO_2 NPs alone or after co-exposure with BaP. As observed before, there was a stabilization of p53 with BaP and after co-exposure, and a tendency to decrease the rate of NF-κB after co-exposure. Regarding cell survival, the protein levels of Bcl-2 did not vary, contrary to what has been observed in the Cell Stress Array. Our results obtained by Western blot are in agreement with the Cell Stress Array for p53 and NF-κB.

Discussion

In this study, we aimed to determine the major players in cellular stress whose expression are modulated after the exposure of primary human villous cytotrophoblast to two major environmental pollutants: the benzo(a)pyrene and the cerium dioxide nanoparticles individually or in combination. Few data addressed the adverse consequences of women's exposure to nanoceria on the sensitive window of human pregnancy, even less about the effects of their co-exposures with other pollutants, such as BaP. Exploring the toxicological consequences of placental barrier exposure to mixture of pollutants representative of the environmental reality and deciphering the cell signaling pathways impaired should provide answers concerning placental toxicology with potent implications in the pregnancy outcome. We used primary VCT purified from human placenta because they are closer to physiology than trophoblast cell line due to their capacity to spontaneously aggregate and fuse in vitro at 24-48 h of culture to form the ST. In contrast, the BeWo trophoblastic choriocarcinoma cells, one of the most used trophoblastic cell line, requires the addition of forskolin (an activator of PKA) in order to fuse. The primary VCT are non-proliferative, exit from the cell cycle and in intermediary differentiated state. The concentrations chosen for the co-exposure (0.6 μM BaP per 6.3 $\mu g/cm^2$ CeO_2 NPs) were determined in relation to the ratio of the airborne levels of HAP found on the atmospheric ultrafine particles (UFP) at Paris (the ratio corresponding to 0.1 μM HAP per 1 $\mu g/cm^2$ UFP). We have shown in our previous study that this

concentration of NP is the highest concentration that does not affect the metabolic activity of VCT at the exposure time chosen for the Cell Stress Array (24 h) (12).

We show here that BaP affects metabolic activity of primary trophoblasts only at concentrations higher than 2 µM and long time exposure (72 h) (Figure 1A). It is known that exposure to BaP leads to activation of the AhR pathway and increase in the expression of CYP1A1 and CYP1B1, involved in the bioactivation of BaP. We have demonstrated the metabolism of BaP in trophoblasts by AhR via the increase in protein expression of CYP1A1 in a dose-dependent manner (0.1 to 1 µM) after 24 h of exposure (Figure 1C). The protein level of AhR was also transiently increased at 30 min of exposure to BaP. Generally, AhR is not modulated at the protein level and its genomic activity is linked to its nuclear translocation after binding of its ligand and the induction of CYP450 genes from phase I of detoxification. However, we have previously demonstrated a constitutive nuclear localization of AhR in human primary cytotrophoblasts, in the absence or presence of BaP (20). Then we confirmed that 0.6 µM of BaP had similar cellular effects than BaP 1 µM. Our results for AhR and CYP1A1 converge towards activation of the detoxification pathway after exposure to BaP. This is emphasize by the use of AhR antagonist, CH223191, which partially inhibited the induction of CYP1A1 after BaP incubation (Supplementary Figure 2).

The absence of cleavage of PARP-1, a target of caspase 3, highlights that BaP does not induce apoptosis at the concentration and time tested (0.6 µM for 30 min, 4 h and 24 h) (Figure 2B). However, BaP treatment leads to significant protein stabilization of the transcription factor p53 at 24 h of incubation. The increase in the protein level of p53 does not seem to be linked to an induction of apoptosis in trophoblasts incubated with BaP. In the absence of cellular stress, p53 is localized in the cytoplasm and maintained at low level of expression by a negative feedback loop mediated by E3 ubiquitin ligase as Mdm2, leading to degradation by the proteasome. The p53 protein is stabilized under conditions of cellular stress, such as oxidative stress, DNA damage and hypoxia (22). The phosphorylation of p53 at multiple sites (such as serine 15 or serine 46) lead to its stabilization and its nuclear translocation for the activation of target genes which lead to different cellular commitments (cell cycle arrest, quiescence, senescence or apoptosis). However, our attempt to study the phosphorylated form of p53 (Ser 15) with a specific

antibody failed (data not shown). Nevertheless, the study by Cell Stress Array revealed an increase in the phosphorylation of p53 on serine 46 by BaP at 0.6 μM (Figure 4).

In parallel, we observed a 41% increase in the p21 protein level, a transcriptional target of p53 and a senescence-related protein, after exposure to BaP and a 30% increase after co-exposure to BaP and CeO_2 NPs compared to the control. Co-exposure to BaP and CeO_2 NPs therefore causes less activation of the p53/p21 pathway compared to that observed during exposure to BaP alone. These observations are in agreement with those reported in the literature in trophoblastic cell lines. For example, in the JEG-3 choriocarcinoma cell line, exposure to BaP leads to DNA damage with phosphorylation of p53 on serine 15 and the induction of expression of p21, responsible of the cycle cell arrest in G2/M phase without leading to cell apoptosis (23). However, it is important to highlight that, unlike trophoblastic cell lines, primary cytotrophoblasts are differentiated non-proliferative cells, which have exit the cell cycle. Thus, in primary VCT, the increase in p21 level observed cannot be correlated with a cell cycle arrest. The increase in protein levels of p53 therefore is rather linked to the genotoxic (mutagenic) and/or pro-oxidative effect of BaP. As pregnancy progress, inner VCT fuses with the outer ST of chorionic villi. This phenomenon is considered to indicate the terminal stage of CT differentiation and may be mediated by cellular senescence (24). The multinucleated syncytiotrophoblast layer of the placenta exhibits features characteristics of senescent cells (including expression of senescence markers p53 and the CDK inhibitor p21 with the lack of proliferation). These senescence pathways are downregulated in the human placenta during intra uterine growth retardation (25), a pregnancy complication associated with abnormalities in placental growth, structure and function. The functional significance of senescence in ST for the human placenta is not understood. One hypothesis is that the resistance of senescent cells to apoptosis maintains ST viability throughout pregnancy, also involving upregulation of anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 protein family, known to maintain senescent cell viability in other cell types (26). The decrease of Bcl-2 observed in Cell Stress Array could affect the viability of the syncytium and lead to premature aging of the placenta.

Moreover, stabilization of p53 by BaP could lead to disturbances in placental endocrine functions such as the secretion of hCG, the main placental hormone. Indeed, it has been

460 demonstrated that p53 selectively induces the expression of hCG-β7 gene in the first
461 trimester because it harbors a consensus sequence for p53 in its promoter (27).
462
463 Regarding the prooxidant effect of BaP, the exposure to 0.6 µM of BaP for 24 h does not
464 induce an increase in the protein level of the superoxidized form of peroxyredoxins (Prx-
465 SO_3) by Western blot (Figure 5). Peroxiredoxins are proteins with intracellular H_2O_2
466 sensor thiol groups. Their super-oxidized form (Prx-SO_3) (excessive oxidation) indicates
467 an abundance of hydrogen peroxide. The second line of defense against oxidative stress
468 has been studied by analyzing protein levels of heme oxygenase-1 (HO-1) and
469 mitochondrial superoxide dismutase (Mn-SOD2) by Western blot and in Cell Stress Array.
470 We did not observe an increase in Mn-SOD2 expression levels over time (Supplementary
471 figure 4) or those of heme oxygenase-1 (HO-1) after 24 hours of exposure to BaP (Figure
472 5). If we make the parallel with the stabilization of p53, we can assume that BaP
473 preferentially induces genotoxicity with absence of major oxidative stress at this
474 concentration of 0.6 µM of BaP. Concerning the CeO_2 NPs, we found a significant decrease
475 of Prx-SO_3 compared to the control after 24 hours of exposure in the 5 placentas exposed
476 to this pollutant. At the same time, analysis of the results of Cell Stress Array also shows a
477 decrease in Mn-SOD2 with the co-exposure of CeO_2 NPs and BaP. Our observations for
478 these NPs are in agreement with our previous reports (12) and with other data from the
479 literature (28) and confirm its antioxidant effect probably by acting as ROS-scavenger,
480 and its mimetic activity of catalase. Consequently, in the Cell Stress Array study, CeO_2 NPs
481 notably induces a reduction in the proteins involved in the protection pathways of ROS
482 such as the p38/HSP27 pathway (-21% and -25% respectively) and those involving
483 HSP70 (-29%). The protein p38, of the MAPK family (Mitogen-Activated Protein Kinase),
484 is involved in different signaling pathways including the cell cycle, differentiation, cell
485 stress and cell death. After phosphorylation under oxidative stress, p38 activates a
486 MAPKAP-K2 (protein kinase-2 activated by MAP kinase 2) involved in the change of
487 conformation by phosphorylation of the heat shock protein HSP27. Phosphorylated
488 Hsp27 is involved in particular in the remodeling of the actin network (29). This effect
489 can be correlated with results obtained previously by the laboratory showing the
490 decrease in the fusion of VCT into the ST after exposure to CeO_2 NPs at the same
491 concentration (12). The protein expression of HSP70 can be modulated by different
492 mechanisms under conditions of oxidative stress. We must remain cautious in our

interpretations because the results of the Cell Stress Array are obtained at a single exposure time. It would therefore be interesting to study the p38 pathway at very early times (15 min, 30 min and 1 h) of exposure to the CeO_2 NPs alone in order to discover the pathways whose phosphorylation level varies.

NF-κB is a transcription factor activated by oxidative stress. Under cellular stress, NF-κB is translocated in the nucleus and participates in the process of cytokine secretion, angiogenesis and inhibition of apoptosis. However, the Cell Stress Array analysis shows a decrease in NF-κB levels when exposed to CeO_2 NPs alone or in co-exposure with BaP. However, we know that the regulation of the activity of NF-κB is mainly done at the level of its nuclear localization. We therefore hypothesize that the decrease in NF-κB at 24 h could be due to a regulation of the transcriptional level of its subunits. In summary, BaP does not modulate the protein expression of antioxidant defenses and CeO_2 NPs have an antioxidant potential in individual exposure or in co-exposure with BaP.

The study by Cell Stress Array also revealed that exposures to BaP and CeO_2 NPs leads to a decrease in the protein level of HIF-1α and HIF-2α with a greater decrease in HIF-2α in co-exposure with the two pollutants, which suggests a synergistic effect. This was associated with a decrease of CA9, a transcriptional target of HIF-1α, in the same proportion as for HIF-1α. Unlike HIF-2α, the HIF-1α protein level decreases only in the presence of CeO_2 NPs alone or in co-exposure with BaP and CeO_2 NPs. This suggests a difference in the stability of these proteins in the presence of these two pollutants. The first stages of placental development in the first trimester take place in a low O_2 environment (1-2%). HIF are stabilized during this critical period and play essential roles in placental morphogenesis, trophoblast proliferation and angiogenesis (30). These roles have been described using mouse models of gene invalidation. The HIF-1α $^{-/-}$ and HIF-2α $^{-/-}$ embryos present vascularization abnormalities (31). However, in the term placenta the oxygen environment increases up to about 8% and the factors HIF are degraded by the proteasome by hydroxylases. High levels of HIF-1α in the term placentas are associated with placental pathologies such as preeclampsia and intrauterine growth retardation (32). A large number of studies show that HIF-1α and HIF-2α do not have the same expression profile during hypoxia. HIF-1α is activated early but for a limited time while HIF-2α is activated later but longer. Recent transcriptome studies have shown different target gene

525 panels depending on whether HIF-1α of HIF-2α is activated by hypoxia (33). HIF targets
526 include VEGF, sFlt-1, angiotensin 2 with roles in angiogenesis (33). Contrary to our
527 expectations, we found a decrease in the protein levels of HIF factors. The Western blot
528 validation attempt was unsuccessful because we did not have quantifiable HIF bands. It
529 has been demonstrated that the HIF-1α/ARNT dimers compete for the ARNT bond (34).
530 However, we noted a temporary increase in AhR after exposure to BaP for 30 min. AhR
531 could therefore compete with HIF-1α.
532
533 Overall, the Cell Stress Array highlights a greater number of actors who see their protein
534 levels decrease in co-exposure compared to individual exposures. Indeed, there is an
535 increase in p21 and a decrease in HIF-2α as well as several actors (p38, NF-κB). This
536 therefore suggests that other routes could be modulated in relation to individual
537 expositions. However, the overall decreases observed after incubation with CeO_2 NPs
538 could be due to their capacity to adsorb proteins on their surface (35) and forming a
539 corona. In the cytoplasm, NPs aggregates could thus sequestrate intracellular proteins.
540 During co-exposure to BaP and CeO_2 NPs, BaP could be adsorbed on NP. BaP, being
541 lipohilic and crossing plasmatic membranes freely, could facilitate the cellular
542 internalization of NPs. Additional studies remain to be carried out to verify these
543 hypotheses.
544
545 **Conclusion**
546
547 In conclusion, we highlighted here after VCT incubation with CeO_2 NPs and BaP
548 individually and in combination, the variation of cellular actors playing major roles in
549 xenobiotic detoxification (AhR, CYP1A1), cell stress and genotoxicity (p53, p21),
550 inflammatory response (NF-κB), hypoxia repsonse (HIF) and oxidative stress response
551 (Prx-SO_3, HO-1, SOD2). This results open up new perspectives to study the mechanisms
552 by which these two very common air pollutants impair placental development and
553 function in pregnant women.
554
555 **Legends**
556

Figure 1. Effect of increasing concentrations of benzo(a)pyrene on the AhR pathway and apoptotic markers in human primary trophoblasts

VCT purified from term placenta were plated overnight and were either untreated (Ctrl), incubated with DMSO, BaP or CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 30 min, 24 h, 48 h or 72 h. **(A)** WST1 assay showing metabolic activity of VCT as means +/- SEM (n=3) relative to control for each time of treatment. * $p<0.05$ vs 72 h. **(B)** Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-AhR, anti-CYP1A1 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odysser System Imager and are shown in the bar scale graph normalized to the vinculin (n=1). **(C)** VCT were also incubated with staurosporine (STS, 0.5 μM) for 2 h or 6 h. Total proteins extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-p53, anti-PARP-1 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and are represented in the bar scale graph after normalization to the vinculin (n=1).

Figure 2. Effect of benzo(a)pyrene on the AhR pathway and apoptotic markers according to the incubation time in human primary trophoblasts

VCT purified from term placenta were plated overnight and were either incubated with DMSO, BaP and/or CeO_2 NPs at the indicated concentrations for 30 min, 4 h, 24 h or 72 h. **(A)** Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-AhR, anti-CYP1A1 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and are represented in the bar scale graph after normalization to the vinculin (n=1). **(B)** VCT were also incubated with staurosporine (STS, 0.5 μM) for 4 h. Total proteins extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-p53, anti-PARP-1 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and are represented in the bar scale graph after normalization to the vinculin (n=1). (C) WST1 assay showing metabolic activity of VCT as means +/- SEM (n=3) relative to control after 72 h of treatment. **(C)** WST1 assay showing metabolic activity of VCT as means +/- SEM (n=3) relative to control for 72 h of incubation.

Figure 3. Homogeneity of the cellular response to benzo(a)pyrene and cerium dioxide nanoparticles in human primary trophoblast

VCT purified from term placenta were plated overnight in culture and were either incubated with DMSO, BaP (0.6 μM) or CeO_2 NPs (6.3 μg/cm²) and in co-exposure for 24 h. Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-CYP1A1, anti-p53 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and results in the bar scale graph represent the mean +/- SEM after normalization to vinculin (n=5). *p< 0.05 ***p<0.001 vs DMSO

Figure 4. Cell Stress Array heatmap of the relative variation of protein expression due to benzo(a)pyrene and cerium dioxide nanoparticles exposure of human primary trophoblast

VCT purified from term placenta were plated overnight and were either untreated, incubated with BaP (0.6 μM) or CeO_2 NPs (6.3 μg/cm²) and in co-exposure for 24 h. Total protein extracts were pooled (n=5) and protein expressions were carried out by Cell Stress Array. Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and results are shown in the heatmap as relative variation to the DMSO treated cells.

Figure 5. Intracellular oxidative stress after trophoblast exposure to benzo(a)pyrene or/and cerium dioxide nanoparticles

VCT purified from term placenta were plated overnight and were either untreated (Ctrl), incubated with DMSO, BaP (0.6 μM) or CeO_2 NPs (6.3 μg/cm²) and in co-exposure for 24 h. Tert-butyl hydroperoxide (TBHP, 100 μM, 4 h) and staurosporine (STS, 0.5 μM, 3 h) were used as positive controls. Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-Prx-SO_3, anti-NF-κB, anti-HO-1, anti-p53, anti-Bcl2 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and results represent the mean +/- SEM after normalization to vinculin (n=5). *p< 0.05 vs DMSO

Supplementary figure 1. Homogeneity of the cellular response of the different placentas

VCT purified from term placenta were plated overnight and were either untreated (Ctrl), incubated with DMSO, BaP (0.6 μM) or CeO_2 NPs (6.3 μg/cm^2) and in co-exposure for 24 h. Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-CYP1A1, anti-p53 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control) (n=5).

Supplementary figure 2. Effect of AhR inhibitor on CYP1A1 induction and p53 stabilization

VCT purified from term placenta were plated overnight and were incubated for 1 h with AhR antagonist (CH223191) then either untreated, incubated with BaP (0.6 μM) or CeO_2 NPs (6.3 μg/cm^2) and in co-exposure for 24 h. Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-CYP1A1, anti-p53 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control). Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager and results are shown in the bar scale graph as ratio to the vinculin (n=1).

Supplementary figure 3. Immunoblots of Cell Stress Array experiments

VCT purified from term placenta were plated overnight and were either incubated with DMSO, BaP (0.6 μM) or CeO_2 NPs (6.3 μg/cm^2) and in co-exposure for 24 h for Cell Stress Array. Immunoblots were quantified with an Odyssey System Imager (n=5). Numbers in the table represent quantification of duplicate samples for each protein as ratio to the DMSO control (arbitrary units). ADAMTS1, a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1; Bcl-2, B cell lymphoma-2; CA9, carbonic anhydrase 9; Cited-2, Cbp/p300-interacting transactivator; COX-2, cyclooxygenase-2; Cyt c, cytochrome C; Dkk-4, dickkopf-4; FABP-1, fatty acid binding protein-1; HIF-1α, hypoxia inducible factor 1 alpha; HIF-2α, hypoxia inducible factor 2 alpha; pHSP27, phospho heat shock protein-27; HSP-60, heat shock protein-60; HSP70, heat shock protein-70; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; pJNK, phospho c-Jun n-terminal kinase; NFκB1, nuclear factor kappa B1; p21, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; p27, cyclin-dependent kinase inhibitor 1B; pp38α, phospho-p38 alpha; pp53, phospho-p53; PON1, paraoxonase 1; PON2, ; PON3, paraoxonase 3; Thio-1, thioredoxin-1; SIRT2, sirtuin 2; SOD2, superoxide dismutase 2; Neg Ctrl, negative control.

Supplementary figure 4. Immunoblots of HIF-2α and SOD2

VCT purified from term placenta were plated overnight and were either untreated (Ctrl), incubated with DMSO, BaP and/or CeO_2 NPs at the indicated concentrations. **(A)** Total protein extracts obtained after 24 h of incubation were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-HIF-2α and anti-vinculin antibodies (n=4). **(B)** Total protein extracts were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and membranes were immunoblotted with anti-SOD2 and anti-vinculin antibodies (the latter used as loading control) (n=1).

Acknowledgments: The following are acknowledged for providing placentas: the consenting patients and the clinical staff midwives of the Port-Royal Maternity, the Institut Mutualiste Montsouris, the Private Hospital of Antony, the Béclère Hospital and the Beaujon Hospital (Paris, France).

Author contributions: M.N. performed trophoblast purification and cell treatment, wrote the first draft and revised the manuscript. T.F. provided expertise in placenta pathophysiology, supervised the work and helped improve the manuscript. S.B. provided expertise on nanotoxicology. S.C. performed Cell Stress Array and Western blots and interpreted data. C.L.M. provided some advices on oxidative stress. A.C. provided expertise on culture trophoblast. X.C. obtained the grant. A.Z.S. guided considerations regarding Cell Stress Array and oxidative stress and helped to design the corresponding experiments. I.F. conceived and designed the experiments, supervised the work, interpreted data, wrote and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethical approval and consent to participate: The study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki after obtaining written consent from informed patients and approval from our local ethics committee (CPP: 2015-May-13909).

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

Funding: This project received funding from ANSES, a French grant (BarBaPAhR N 2015-1-11329). MN was financed by the French Ministry. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

References

1. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci [Internet]. 2015 Mar 5 [cited 2017 Apr 11];370(1663). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4305167/
2. Wierzba W, Radowicki S, Bojar I, Pinkas J. Effects of environmental pollution with aromatic hydrocarbons on endocrine and metabolic functions of the human placenta. Ann Agric Environ Med. 2018 Mar 14;25(1):157–61.
3. Dahle JT, Arai Y. Environmental Geochemistry of Cerium: Applications and Toxicology of Cerium Oxide Nanoparticles. Int J Environ Res Public Health. 2015 Feb;12(2):1253–78.
4. Aghebati-Maleki A, Dolati S, Ahmadi M, Baghbanzhadeh A, Asadi M, Fotouhi A, et al. Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. J Cell Physiol. 2020 Mar;235(3):1962–72.
5. Drwal E, Rak A, Gregoraszczuk EL. Review: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—Action on placental function and health risks in future life of newborns. Toxicology. 2019 Jan 1;411:133–42.
6. Li D, Morishita M, Wagner JG, Fatouraie M, Wooldridge M, Eagle WE, et al. In vivo biodistribution and physiologically based pharmacokinetic modeling of inhaled fresh and aged cerium oxide nanoparticles in rats. Part Fibre Toxicol. 2016 20;13(1):45.
7. Saenen ND, Martens DS, Neven KY, Alfano R, Bové H, Janssen BG, et al. Air pollution-induced placental alterations: an interplay of oxidative stress, epigenetics, and the aging phenotype? Clinical Epigenetics. 2019 Sep 17;11(1):124.
8. Liu Y, Wu M, Zhang L, Bi J, Song L, Wang L, et al. Prenatal exposure of rare earth elements cerium and ytterbium and neonatal thyroid stimulating hormone levels: Findings from a birth cohort study. Environ Int. 2019;133(Pt B):105222.
9. Höllriegl V, González-Estecha M, Trasobares EM, Giussani A, Oeh U, Herraiz MA, et al. Measurement of cerium in human breast milk and blood samples. J Trace Elem Med Biol. 2010 Jul;24(3):193–9.
10. Wei J, Wang C, Yin S, Pi X, Jin L, Li Z, et al. Concentrations of rare earth elements in maternal serum during pregnancy and risk for fetal neural tube defects. Environ Int. 2020 Feb 11;137:105542.
11. Dong X, Wang Q, Peng J, Wu M, Pan B, Xing B. Transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons from mother to fetus in relation to pregnancy complications. Sci Total Environ. 2018 Sep 15;636:61–8.
12. Nedder M, Boland S, Devineau S, Zerrad-Saadi A, Rogozarski J, Lai-Kuen R, et al. Uptake of Cerium Dioxide Nanoparticles and Impact on Viability, Differentiation and Functions of Primary Trophoblast Cells from Human Placenta. Nanomaterials (Basel). 2020 Jul 3;10(7).
13. Zhong H, Geng Y, Chen J, Gao R, Yu C, Yang Z, et al. Maternal exposure to CeO2NPs during early pregnancy impairs pregnancy by inducing placental abnormalities. Journal of Hazardous Materials. 2019 Dec 4;121830.
14. Konduru NV, Murdaugh KM, Sotiriou GA, Donaghey TC, Demokritou P, Brain JD, et al. Bioavailability, distribution and clearance of tracheally-instilled and gavaged uncoated or

731 silica-coated zinc oxide nanoparticles. Part Fibre Toxicol. 2014 Sep 3;11:44.
732 15. Topinka J, Milcova A, Libalova H, Novakova Z, Rossner P, Balascak I, et al. Biomarkers of
733 exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their
734 transplacental transfer to the foetus. Part I: bulky DNA adducts. Mutat Res. 2009 Oct
735 2;669(1–2):13–9.
736 16. Al-Saleh I, Alsabbahen A, Shinwari N, Billedo G, Mashhour A, Al-Sarraj Y, et al. Polycyclic
737 aromatic hydrocarbons (PAHs) as determinants of various anthropometric measures of
738 birth outcome. Science of The Total Environment. 2013 Feb 1;444:565–78.
739 17. Duarte-Salles T, Mendez MA, Meltzer HM, Alexander J, Haugen M. Dietary
740 benzo(a)pyrene intake during pregnancy and birth weight: associations modified by
741 vitamin C intakes in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). Environ Int.
742 2013 Oct;60:217–23.
743 18. Perera FP, Rauh V, Whyatt RM, Tang D, Tsai WY, Bernert JT, et al. A Summary of Recent
744 Findings on Birth Outcomes and Developmental Effects of Prenatal ETS, PAH, and
745 Pesticide Exposures. NeuroToxicology. 2005 Aug 1;26(4):573–87.
746 19. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF. Purification, Characterization, and
747 in vitro Differentiation of Cytotrophoblasts from Human Term Placentae. Endocrinology.
748 1986 Apr 1;118(4):1567–82.
749 20. Wakx A, Nedder M, Tomkiewicz-Raulet C, Dalmasso J, Chissey A, Boland S, et al.
750 Expression, Localization, and Activity of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Human
751 Placenta. Int J Mol Sci. 2018 Nov 27;19(12).
752 21. Hernandez I, Fournier T, Chissey A, Therond P, Slama A, Beaudeux J-L, et al. NADPH
753 oxidase is the major source of placental superoxide in early pregnancy: association with
754 MAPK pathway activation. Sci Rep. 2019 Sep 27;9(1):13962.
755 22. Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour
756 suppression. Nat Rev Cancer. 2014;14(5):359–70.
757 23. Drukteinis JS, Medrano T, Ablordeppey EA, Kitzman JM, Shiverick KT. Benzo[a]pyrene, but
758 not 2,3,7,8-TCDD, induces G2/M cell cycle arrest, p21CIP1 and p53 phosphorylation in
759 human choriocarcinoma JEG-3 cells: a distinct signaling pathway. Placenta. 2005 Apr;26
760 Suppl A:S87-95.
761 24. Chuprin A, Gal H, Biron-Shental T, Biran A, Amiel A, Rozenblatt S, et al. Cell fusion induced
762 by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. Genes Dev. 2013 Nov
763 1;27(21):2356–66.
764 25. Gal H, Lysenko M, Stroganov S, Vadai E, Youssef SA, Tzadikevitch-Geffen K, et al.
765 Molecular pathways of senescence regulate placental structure and function. EMBO J.
766 2019 16;38(18):e100849.
767 26. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination
768 of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. Nat Commun. 2016 Apr 6;7:11190.
769 27. Sohr S, Engeland K. The tumor suppressor p53 induces expression of the pregnancy-
770 supporting human chorionic gonadotropin (hCG) CGB7 gene. Cell Cycle. 2011 Nov
771 1;10(21):3758–67.
772 28. Das S, Dowding JM, Klump KE, McGinnis JF, Self W, Seal S. Cerium oxide nanoparticles:
773 applications and prospects in nanomedicine. Nanomedicine. 2013 Aug 29;8(9):1483–508.
774 29. Pichon S, Bryckaert M, Berrou E. Control of actin dynamics by p38 MAP kinase - Hsp27
775 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells. J Cell Sci. 2004 May 15;117(Pt
776 12):2569–77.
777 30. Masoud GN, Li W. HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy.

Acta Pharm Sin B. 2015 Sep;5(5):378–89.
31. Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, Compernolle V, Maltepe E, Adelman DM, et al. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulate trophoblast differentiation. Mol Cell Biol. 2005 Dec;25(23):10479–91.
32. Albers RE, Kaufman MR, Natale BV, Keoni C, Kulkarni-Datar K, Min S, et al. Trophoblast-Specific Expression of Hif-1α Results in Preeclampsia-Like Symptoms and Fetal Growth Restriction. Sci Rep. 2019 26;9(1):2742.
33. Downes NL, Laham-Karam N, Kaikkonen MU, Ylä-Herttuala S. Differential but Complementary HIF1α and HIF2α Transcriptional Regulation. Mol Ther. 2018 05;26(7):1735–45.
34. Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, Tohyama C. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. Biochem Pharmacol. 2009 Feb 15;77(4):660–9.
35. Sanchez-Guzman D, Giraudon-Colas G, Marichal L, Boulard Y, Wien F, Degrouard J, et al. In Situ Analysis of Weakly Bound Proteins Reveals Molecular Basis of Soft Corona Formation. ACS Nano. 2020 Jul 7;

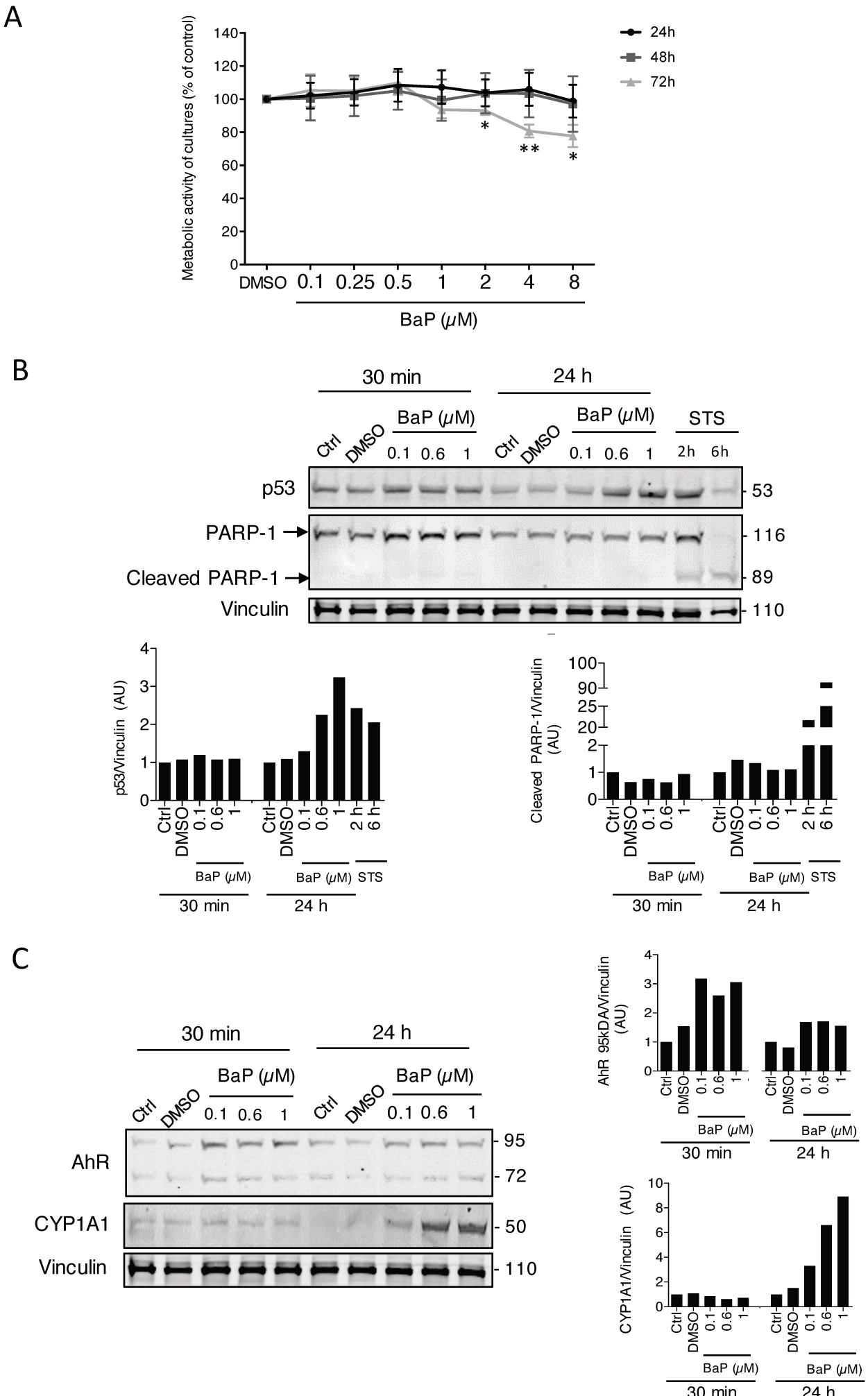
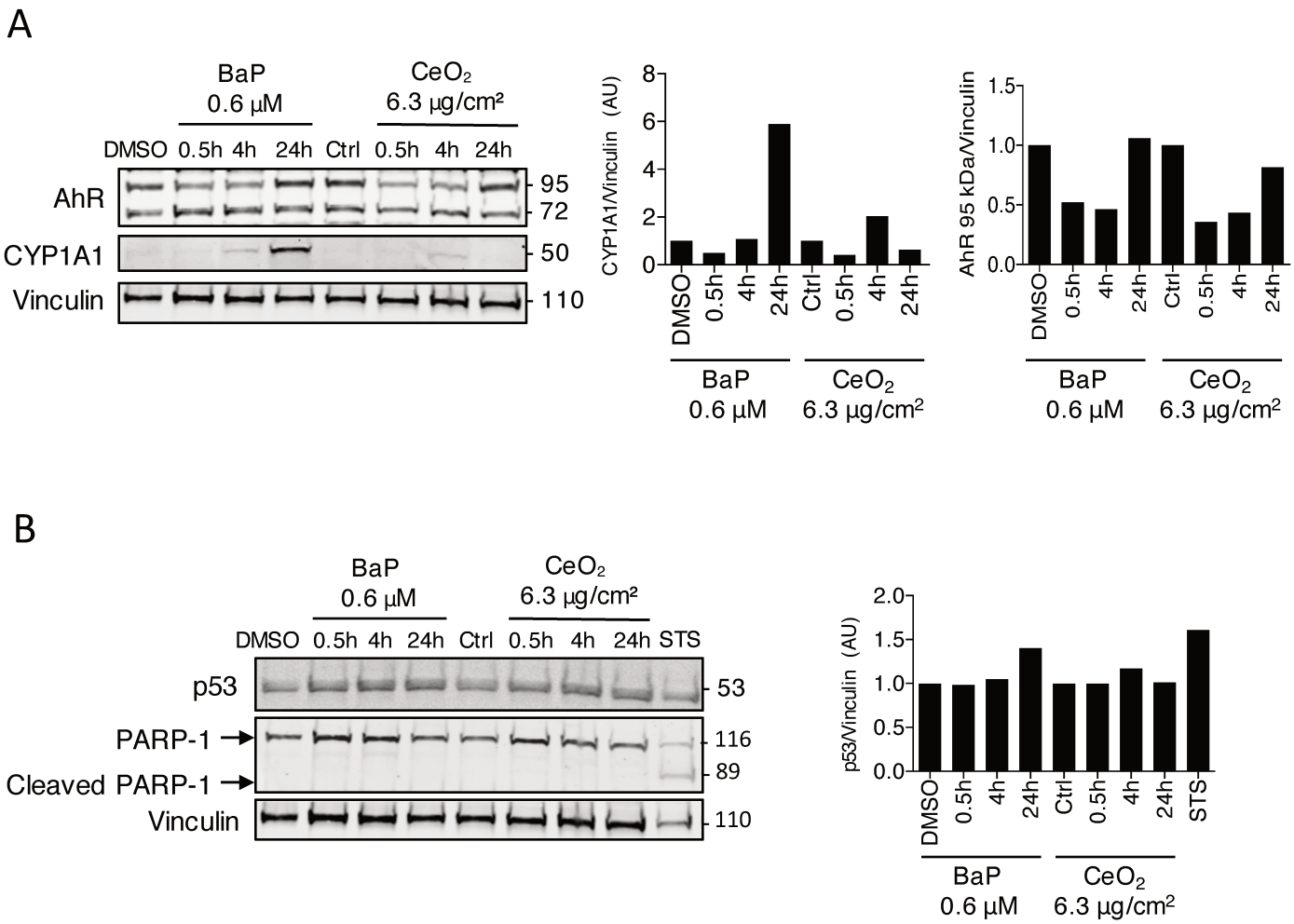

A
Metabolic activity of cultures (% of control)
24h
48h
72h
DMSO 0.1 0.25 0.5 1 2 4 8
BaP (μM)
B
30 min
24 h
Ctrl
DMSO
BaP (μM)
STS
p53
PARP-1
Cleaved PARP-1
Vinculin
53
116
89
110
p53/Vinculin (AU)
Cleaved PARP-1/Vinculin (AU)
C
AhR
CYP1A1
Vinculin
95
72
50
110
AhR 95kDA/Vinculin (AU)
CYP1A1/Vinculin (AU)

Figure 1


A
BaP
0.6 µM
CeO2
6.3 µg/cm²
DMSO 0.5h 4h 24h Ctrl 0.5h 4h 24h
AhR
CYP1A1
Vinculin
95
72
50
110
CYP1A1/Vinculin (AU)
AhR 95 kDa/Vinculin
DMSO 0.5h 4h 24h Ctrl 0.5h 4h 24h
BaP 0.6 µM
CeO2 6.3 µg/cm²

B
BaP
0.6 µM
CeO2
6.3 µg/cm²
DMSO 0.5h 4h 24h Ctrl 0.5h 4h 24h STS
p53
PARP-1
Cleaved PARP-1
Vinculin
53
116
89
110
p53/Vinculin (AU)
DMSO 0.5h 4h 24h Ctrl 0.5h 4h 24h STS
BaP 0.6 µM
CeO2 6.3 µg/cm²

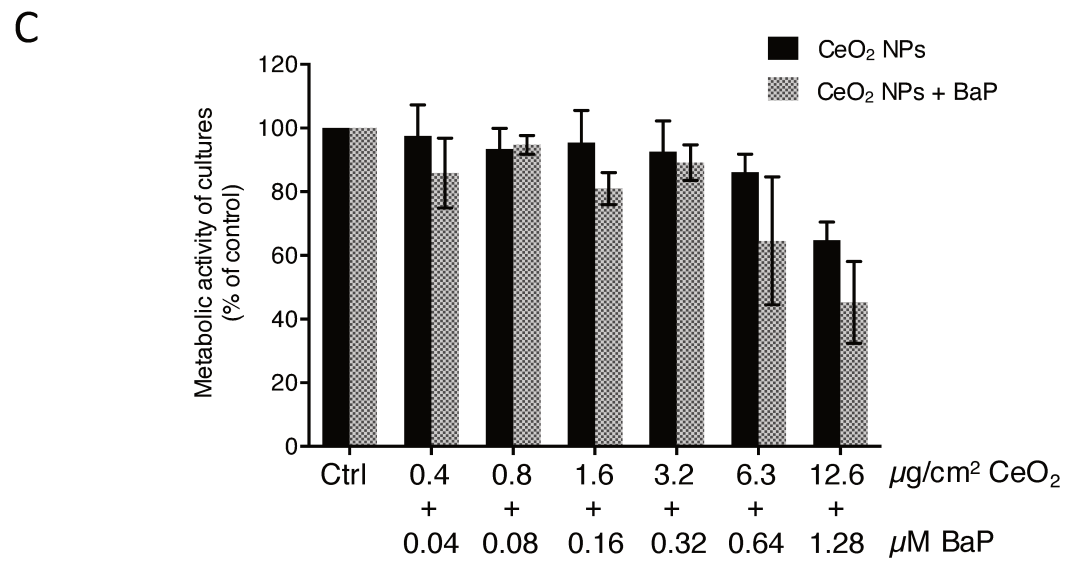
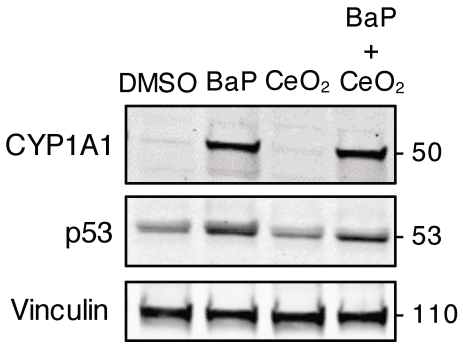
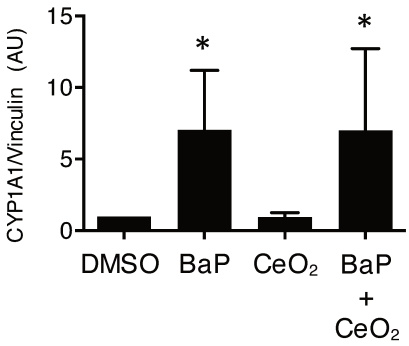

C
CeO2 NPs
CeO2 NPs + BaP
Metabolic activity of cultures (% of control)
Ctrl
0.4 + 0.04
0.8 + 0.08
1.6 + 0.16
3.2 + 0.32
6.3 + 0.64
12.6 + 1.28
µg/cm² CeO2
µM BaP

Figure 2


DMSO
BaP
CeO2
BaP + CeO2
CYP1A1
p53
Vinculin
50
53
110


CYP1A1/Vinculin (AU)
15
10
5
0
*
*
DMSO
BaP
CeO2
BaP + CeO2

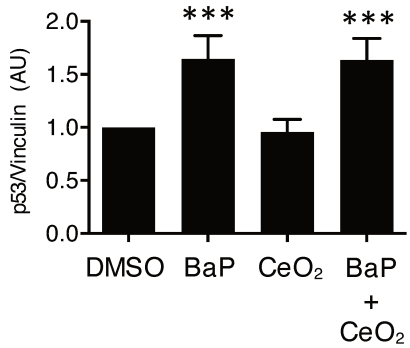

p53/Vinculin (AU)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
DMSO
BaP
CeO2
BaP + CeO2

Figure 3

Proteins	BaP	CeO_2 NPs	BaP + CeO_2 NPs	Phosphorylation sites
ADAMTS1				
Bcl-2				
CA9				
Cited-2				
COX-2				
Cyt c				
Dkk-4				
FABP-1				
HIF-1a				
HIF-2a				
phospho-HSP27				S78/S82
HSP60				
HSP70				
IDO				
phospho-JNK Pan				T183/Y185
NFkB1				
p21				
p27				
phospho p38				T180/Y182
phospho p53				S46
PON1				
PON2				
PON3				
Thioredoxin-1				
SIRT2				
Mn SOD2				

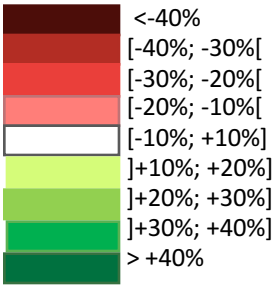
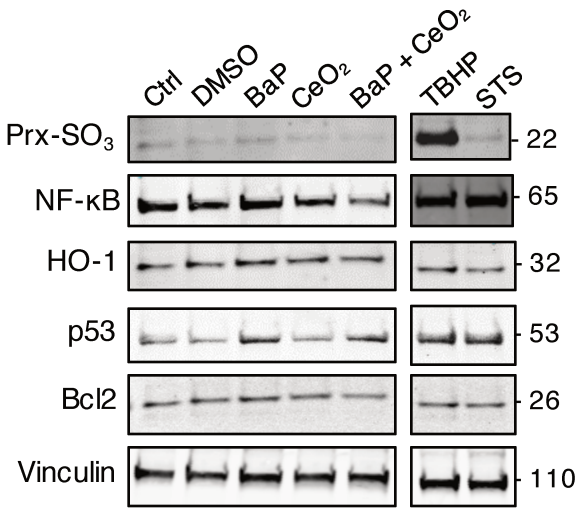


Figure 4


Ctrl
DMSO
BaP
CeO2
BaP + CeO2
TBHP
STS
Prx-SO3
NF-κB
HO-1
p53
Bcl2
Vinculin
22
65
32
53
26
110

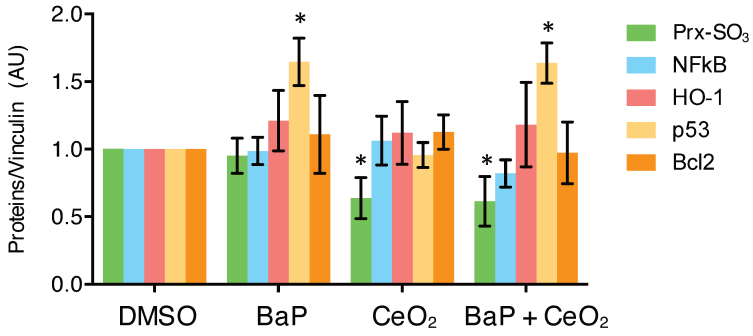
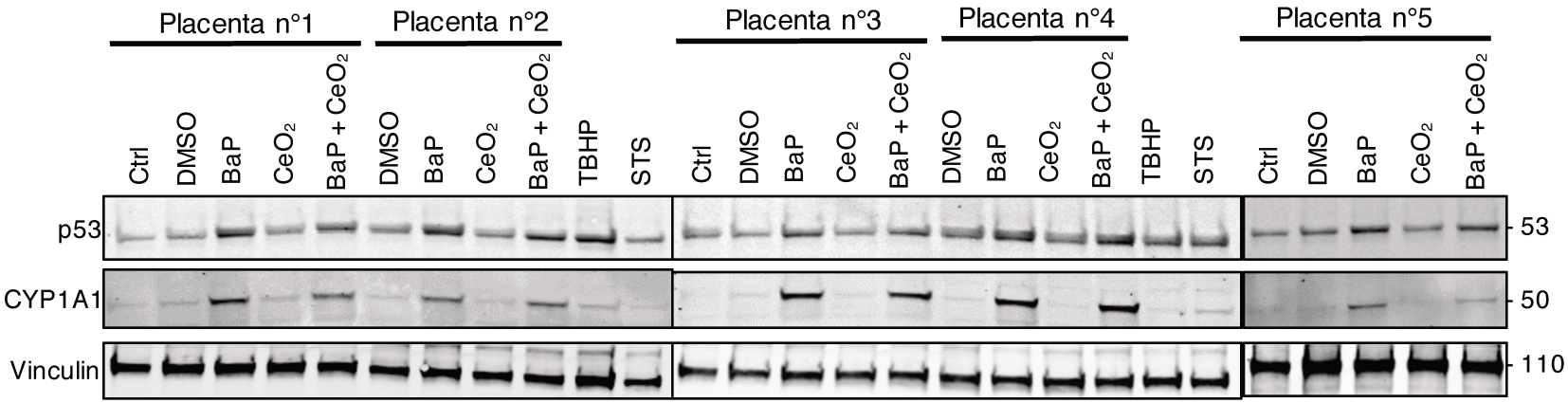
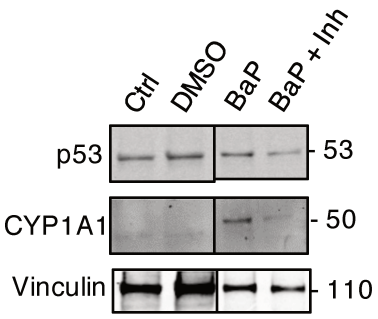
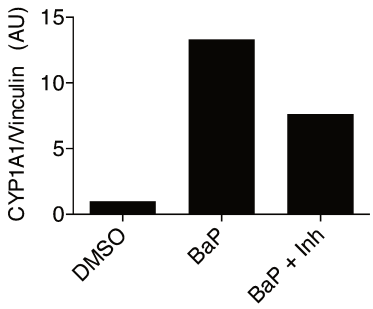

Proteins/Vinculin (AU)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
DMSO
BaP
CeO2
BaP + CeO2
Prx-SO3
NFkB
HO-1
p53
Bcl2

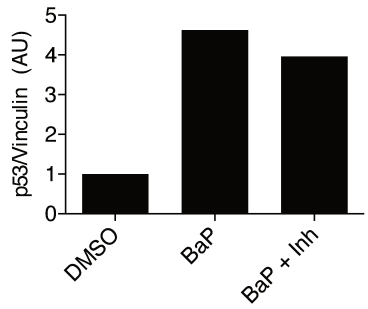
Figure 5



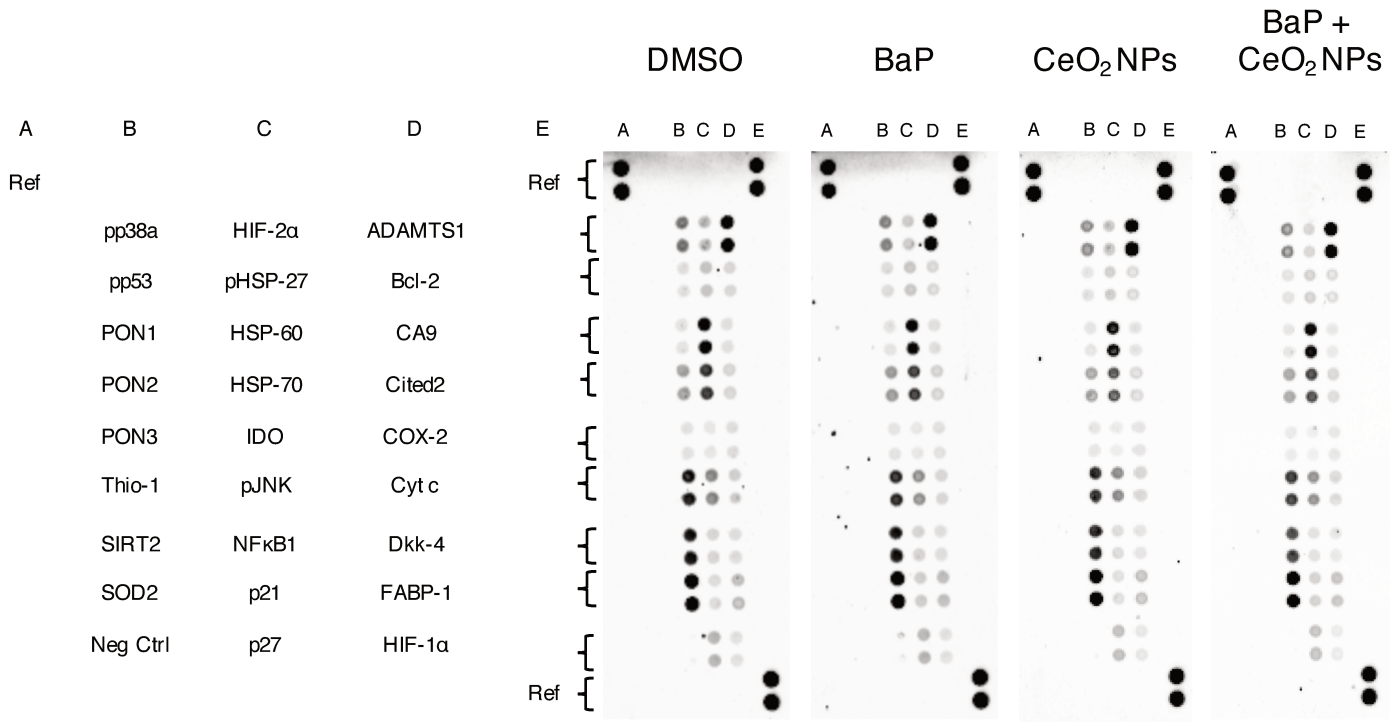
Supplementary figure 1







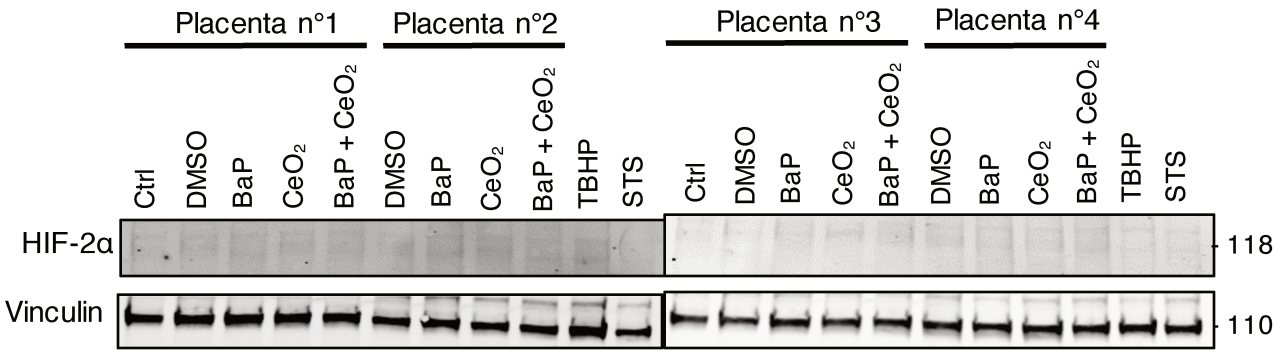
Supplementary figure 2



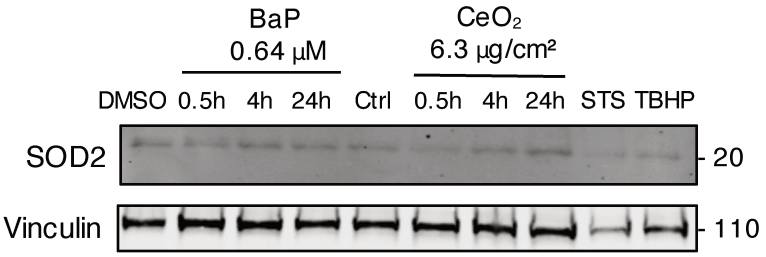
Proteins	BaP	CeO_2 NPs	BaP + CeO_2 NPs	Phosphorylation sites
ADAMTS1	1,102	0,953	0,990	
Bcl-2	1,000	0,888	0,920	
CA9	1,019	0,874	0,780	
Cited-2	1,060	0,841	0,942	
COX-2	0,902	0,870	0,812	
Cyt c	0,994	1,092	0,978	
Dkk-4	0,987	0,809	0,795	
FABP-1	0,982	0,898	0,881	
HIF-1a	0,929	0,859	0,712	
HIF-2a	0,695	0,733	0,521	
phospho-HSP27	0,931	0,749	0,752	S78/S82
HSP60	0,802	0,804	0,804	
HSP70	0,903	0,711	0,822	
IDO	0,937	0,848	0,843	
phospho-JNK Pan	0,857	0,897	0,837	T183/Y185
NFkB1	1,083	0,850	0,708	
p21	1,414	0,889	1,303	
p27	1,047	0,920	0,870	
phospho p38	0,897	0,790	0,823	T180/Y182
phospho p53	1,156	0,917	0,985	S46
PON1	0,896	0,905	0,852	
PON2	1,029	0,872	0,898	
PON3	0,953	0,941	0,811	
Thioredoxin-1	0,880	0,846	0,829	
SIRT2	0,969	0,899	0,726	
Mn SOD2	1,016	0,916	0,863	

Supplementary figure 3

A



B



Supplementary figure 4

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les polluants sont omniprésents dans l'environnement et la pollution atmosphérique représente actuellement un problème de santé majeure. Un bon nombre de ces contaminants peuvent traverser les barrières épithéliales, pénétrer dans la circulation sanguine et atteindre des organes secondaires tels que le placenta humain. Ces molécules sont susceptibles d'agir directement sur le fœtus si elles traversent la barrière placentaire mais peuvent également affecter indirectement le fœtus en causant des dommages au placenta.

Les travaux réalisés dans le cadre de ma thèse s'inscrivent dans une approche visant à évaluer les effets de deux polluants, le benzo(a)pyrène et les nanoparticules de dioxyde de cérium, sur la barrière placentaire humaine. Nous avons d'une part établi une cartographie spatiale et temporelle de l'expression et de l'activité du récepteur des hydrocarbures aromatiques polycycliques AhR, le récepteur intracellulaire du BaP, dans le placenta humain et d'autre part étudié les conséquences cellulaires d'une exposition au BaP et aux NP de CeO_2 en exposition individuelle ou combinée sur les trophoblastes primaires humains.

I. Cartographie de l'expression, de la localisation et de l'activité d'AhR dans le placenta humain

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression et de l'activité d'AhR au cours de l'ontogenèse placentaire associé à une localisation nucléaire constitutive de ce récepteur (Article 1). Ces observations ouvrent des perspectives intéressantes quant à la caractérisation des fonctions d'AhR dans le placenta humain.

1. L'expression et l'activité d'AhR dans le placenta sont augmentées à terme de grossesse

Nous avons montré que l'expression à la fois génique et protéique d'AhR augmente au cours de l'ontogenèse placentaire, avec une expression cinq fois supérieure dans les villosités choriales de placenta à terme de grossesse par rapport au premier trimestre (Article 1, Figure 1B et 1C). Cette augmentation d'expression d'AhR s'accompagne également de celle d'ARNT, son partenaire nucléaire nécessaire à la transcription des gènes cibles d'AhR, et d'AhRR, son répresseur. AhR est plus exprimé à terme de grossesse mais également plus actif car nous avons mis en évidence l'augmentation de

l'expression génique des gènes cibles d'AhR de la phase I (CYP1A1 et CYP1A2) et de la phase II (HO-1, SOD1/2, NQO1, GSTA2 et Catalase) de métabolisation des xénobiotiques au cours de l'ontogenèse placentaire (Article 1, Figure 1D et Tableau 1). L'expression augmentée d'AhR dans les villosités choriales au cours de la grossesse pourrait s'expliquer à la fois par les changements morphologiques et fonctionnels radicaux dus au développement de l'épithélium trophoblastique entre le premier trimestre et le terme de grossesse et à la fois par l'amincissement de la barrière trophoblastique qui en résulte. En effet, au premier trimestre de grossesse, la barrière trophoblastique a une épaisseur de 50 μm avec une couche continue de CTV au-dessus desquels se situe le syncytium. A terme, la barrière n'est plus que de 5 μm mais la surface atteint 12 à 14 m^2 avec une couche discontinue de CTV [48]. Il est possible que l'épithélium trophoblastique au premier trimestre agisse comme une barrière physique et qu'à terme un mécanisme de défense différent se mette en place, qui pourrait inclure un processus de détoxification plus efficace résultant en l'expression accrue d'AhR.

Toutefois, nous avons observé des différences d'expression inter-individuelle d'AhR dans les placentas à terme de grossesse. Nous avons exclu que cette différence d'expression soit due au lieu de prélèvement des tissus au sein du placenta (centre, milieu, périphérie) puisqu'au sein d'un même placenta, nous avons montré qu'AhR est exprimé de manière uniforme dans tout le tissu placentaire. Des variations inter-individuelles d'AhR au niveau de son expression génique (ARNm) ont déjà été observées dans le placenta humain [244]. Ces variations peuvent être dues aux niveaux d'expositions différents de la mère pendant la grossesse aux polluants environnants ou à des composés alimentaires contenant naturellement des ligands d'AhR. Ces variations peuvent également s'expliquer par une exposition à des molécules qui ne sont pas des ligands d'AhR mais qui modifient tout de même le niveau d'expression de ce récepteur, comme démontré dans une étude sur le cerveau de souris après une exposition *in utero* au bisphénol A [429].

Les changements de l'activité transcriptionnelle d'AhR dans les villosités choriales observés entre le premier trimestre et le terme de la grossesse sont plutôt modestes (augmentation d'un facteur 5 à 7 pour CYP1A1 et CYP1A2) (Article 1, Figure 1D). Ces résultats sont en accord avec les données présentes dans la littérature, indiquant que les transcrits de CYP1A1 et CYP1B1 sont peu exprimés dans le placenta humain à terme [194]. Dans une étude sur des trophoblastes humains à terme, le niveau

d'activité d'AhR dans des placentas non pathologiques et issus de femmes non fumeuses, est proche du niveau d'activité induit par le resvératrol, un ligand d'AhR naturellement présent dans l'alimentation [244]. Pour comparaison, le niveau d'activité d'AhR après une incubation de 24 h au BaP a été montrée comme augmentant d'un facteur 750 l'expression de CYP1A1 dans le modèle de BeWo [233]. L'induction des CYP450 par les polluants est typiquement d'un facteur 100 [430], [431].

Le modèle de lignée trophoblastique BeWo est souvent utilisé pour évaluer les effets des polluants sur la barrière placentaire. Nous avons montré que le niveau protéique d'AhR et son activité transcriptionnelle est dépendante de la densité cellulaire en culture (Article 1, Figure 5). Il a déjà été décrit que la densité cellulaire influence et régule la localisation intracellulaire et l'activité d'AhR [432]. L'induction modérée de CYP1A1 dans les cellules BeWo est inhibée de manière significative par l'antagoniste CH223191 (Article 1, Figure 7B), ce qui renforce l'hypothèse d'un activateur endogène d'AhR dans ces cellules.

Dans notre étude, la détection d'AhR au niveau protéique par Western blot montre un profil avec plusieurs bandes, celle de 96 kDa qui correspond à la masse moléculaire d'AhR et une bande à 130 kDa qui s'accumule lors de la différenciation des CTV en ST et qui pourrait correspondre à des modifications post-traductionnelles d'AhR (Article 1). AhR peut subir plusieurs types de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, méthylation, ubiquitination) qui sont impliquées dans sa localisation (cytosolique *vs* nucléaire) et/ou son activité transcriptionnelle. Dans la littérature, il a été montré que des modifications d'AhR via l'ajout des groupements de type SUMO1 correspondent à un déplacement de la masse moléculaire en SDS-PAGE vers 130 kDa [276]. Les auteurs de cette publication indiquent que la SUMOylation d'AhR sur les lysines K63 et K510 serait responsable d'une répression transcriptionnelle de ses gènes cibles impliqués dans la détoxification et empêcherait également sa dégradation par la voie du protéasome. Il est bien établi que la différenciation des CTV en ST implique notamment une répression globale des gènes *via* une condensation générale de la chromatine [433]. La SUMOylation d'AhR dans les ST pourrait donc assurer sa stabilité protéique tout en maintenant un faible niveau d'activité. Afin de déterminer si la bande à 130 kDa correspond à la SUMOylation d'AhR, nous pourrions réaliser

l'immunoprécipitation d'AhR suivie d'une immunodétection par WB avec un anticorps anti-SUMO1.

2. AhR a une localisation nucléaire constitutive dans les trophoblastes

Au cours de cette étude, nous avons démontré une localisation nucléaire d'AhR dans les trophoblastes quelque soit le modèle étudié (villosité choriale, lignée BeWo et trophoblastes primaires humains (cytotrophoblastes et syncytiotrophoblastes)) (Article 1, Figures 2, 4 et 5). Cette localisation nucléaire d'AhR a été également observée dans les cellules mésenchymateuses des villosités choriales (Article 1, Figure 2). Le niveau d'activité d'AhR et sa localisation nucléaire suggèrent qu'AhR est activé de manière constitutive dans le placenta humain à terme, par un mécanisme pour le moment inconnu. Des preuves de la localisation nucléaire d'AhR par immunohistochimie, uniquement dans les syncytiotrophoblastes des villosités choriales de placenta du premier et troisième trimestre, ont également été mentionnées par Stejskalova et al. [244]. Dans notre étude, l'utilisation de l'antagoniste d'AhR CH223191 n'a pas conduit à une redistribution cytosolique d'AhR (Figure 6). Cet antagoniste d'AhR a été montré comme étant ligand-spécifique et antagoniste du BaP [434]. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le CH223191 a une action restreinte et n'interfère pas avec les ligands naturels (endogènes) responsables de l'activation constitutive d'AhR. Jiang et al. ont montré par immunohistochimie qu'AhR peut également être exprimé dans certaines cellules endothéliales des gros vaisseaux placentaires et dans les vaisseaux du cordon ombilical. Dans les cellules endothéliales, AhR pourrait participer à la régulation des fonctions vasculaires placentaires, telles que le remodelage vasculaire, la vasoconstriction et la vasodilatation, comme montré dans le modèle murin [435]. De manière intéressante, une force de cisaillement par l'écoulement du sang à travers les villosités placentaires peut également expliquer l'activation d'AhR comme démontré par Conway et al dans des modèles de lignées de cellules endothéliales ombilicales [279].

L'activation constitutive d'AhR peut survenir quand son niveau d'expression augmente, comme décrit précédemment [278]. De plus, la présence de ligands provenant de diverses sources auxquelles les femmes enceintes sont inévitablement exposées pourrait également expliquer l'augmentation de l'expression des gènes cibles d'AhR. Ces ligands peuvent être les polluants passant les barrières biologiques

(pulmonaire et intestinale) ou bien des composés de l'alimentation se retrouvant dans la circulation sanguine maternelle et rejoignant ainsi le placenta. L'activation d'AhR pourrait également résulter de variations dans les niveaux des ligands produits de manière endogène résultant de l'activité métabolique placentaire. Pour la lignée BeWo, cette activation constitutive d'AhR peut être dû au caractère tumoral de la lignée cellulaire. En effet, une large variété de tumeurs montrent un niveau d'expression d'AhR élevé et une activation constitutive de ce récepteur [287]. Pour les trophoblastes primaires humains, nous pouvons émettre l'hypothèse de l'existence d'un ligand endogène d'AhR, capable d'activer ce récepteur pour des fonctions physiologiques spécifiques des trophoblastes. Afin de mieux caractériser l'activité d'AhR dans le noyau, il serait intéressant d'approfondir l'étude de la formation de complexes avec ses partenaires communs, tels qu'ARNT ou d'autres protéines nucléaires, en effectuant une immunoprécipitation de la chromatine dans les tissus placentaires et les trophoblastes, en absence d'ajout volontaire de tout ligand exogène.

Cette localisation nucléaire constitutive suppose la présence d'un ligand endogène capable de déstabiliser AhR de son complexe cytosolique et d'induire sa translocation dans le noyau. Nous avions émis l'hypothèse qu'IDO1 pourrait être impliqué dans l'activation constitutive d'AhR par la production de kynurénine, un ligand endogène connu d'AhR, à partir du tryptophane. IDO1 joue un rôle dans la tolérance fœto-maternelle en stimulant la différenciation des lymphocytes T [436]. Dans le placenta, la kynurénine produite par IDO1 peut favoriser la génération de cellules Treg dans la décidue par sa liaison directe à AhR, permettant ainsi l'immunotolérance [296]. Nous avons montré que l'expression protéique d'IDO1 suit la même augmentation que celle d'AhR au cours de l'ontogenèse placentaire (Article 1, Figure 3). Ce résultat est en accord avec l'augmentation de la production de kynérunine (environ 200 ng/g de tissu) à terme comparé au premier trimestre (30 ng/mg de tissu) montrée dans des cultures d'explants villositaires [417]. Comme c'était le cas pour AhR, nous avons montré une variation inter-individuelle d'IDO1 dans les placentas à terme de grossesse (Résultats supplémentaires de l'Article 1, Fig S2). Dans une étude transcriptomique, une expression accrue de l'ARNm d'IDO1 (environ 3 fois plus) a été observée dans les villosités issues de placenta mâles par rapport à celles issues de placentas femelles [437], suggérant que le sexe du placenta doit également être pris en compte lors de

l'analyse de l'expression génique dans les villosités placentaires humaines. Une autre hypothèse serait que cette variabilité pourrait être due à des facteurs environnementaux (comme les infections, le stress oxydant) car des séquences consensus pour l'IFN-γ sont présents dans le promoteur d'IDO1. Concernant la localisation d'IDO1 dans la villosité choriale, nous avons démontré une localisation principalement dans d'autres types cellulaires de la villosité choriale plutôt que dans les trophoblastes, notamment dans les cellules endothéliales des capillaires fœtaux. Notre hypothèse est que de nouveaux ligands d'AhR tels que la L-kyn produits par IDO1 dans les trophoblastes placentaires humains pouvaient activer AhR dans ces mêmes cellules. Les résultats supplémentaires présentés (Figure 30 de ce manuscrit) indiquent que la réalité pourrait être plus complexe, car IDO1 semble être localisé majoritairement dans d'autres types cellulaires de la villosité placentaire plutôt que dans les trophoblastes. Cela suggère que les métabolites activateurs d'AhR de type kynurénine pourraient être produits par des cellules placentaires non trophoblastiques et activer AhR de façon paracrine dans les trophoblastes. Ce type de régulation a déjà été décrit dans la littérature, par exemple la kynurénine produite par IDO1 dans les astrocytes est capable d'activer AhR dans les neurones [438].

Etant donné les nouveaux rôles attribués à AhR dans la littérature, sa localisation constitutivement nucléaire et son activité à terme de grossesse suggèrent qu'AhR contribuerait à une certaine fonction physiologique dans le placenta. Des données expérimentales supplémentaires sont nécessaires pour caractériser l'activité et le rôle de ce récepteur dans les trophoblastes et dans le placenta. Depuis notre étude, aucunes données supplémentaires concernant la relation entre AhR et IDO1 ne sont parues dans la littérature.

II. Effet du benzo(a)pyrène en exposition individuelle sur la barrière placentaire humaine

Nos travaux ont permis de montrer que le benzo(a)pyrène impacte peu la viabilité cellulaire des trophoblastes primaires humains mais est responsable d'un stress oxydant associé à une stabilisation de p53, signe de dommages à l'ADN et/ou d'un stress cellulaire. Le BaP active AhR et diminue la stabilité protéique d'IDO1.

1. Etude des effets du BaP sur la cytotoxicité et le stress oxydant des cytotrophoblastes primaires humains

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du BaP sur le placenta humain. Le test d'activité métabolique WST1 a déterminé que le BaP diminue la viabilité des cytotrophoblastes qu'à partir de la concentration de 2 μM pour un temps d'incubation de 72 h (Article 3, Figure 1). Notre modèle de culture primaire ne nous permet pas de réaliser des temps d'exposition plus longs afin de regarder les effets d'une exposition chronique au BaP sur les trophoblastes. Ce résultat est en accord avec les études réalisées sur des cellules placentaires, où il n'a pas été mis en évidence de cytotoxicité aux concentrations que nous avons testé dans un modèle de cellules HTR-8/SVneo [227]. Tandis qu'une autre étude a montré une cytotoxicité faible mais cependant significative du BaP dans une lignée de kératinocytes aux mêmes concentrations que notre étude [439]. Nous avions également réalisé ce test de viabilité après exposition des syncytiotrophoblastes pendant 24 h au BaP. Le BaP a induit une augmentation de l'activité métabolique à 1 μM et une diminution aux concentrations de 8 et 16 μM. Ces variations étaient très limitées (<10%) mais significatives. Le syncytiotrophoblaste pourrait donc être plus sensible au BaP que les cytotrophoblastes. Bien que le BaP n'affecte pas la viabilité des cytotrophoblastes à 24 h d'incubation, nous avons observé la stabilisation de p53 dès la dose de 1 μM pour ce temps d'exposition. Cette stabilisation de p53 peut être due à l'effet mutagène et/ou aux dommages oxydants induits par le BaP. Il a déjà été montré que p53 était stabilisé par le benzo(a)pyrène dans le modèle de cellules trophoblastiques BeWo [233]. Dans les CTV, la stabilisation de p53 par le BaP ne semble pas liée à une induction d'apoptose dans les trophoblastes puisque nous n'avons pas observé de clivage de PARP-1, une cible de la caspase 3 (Article 3, Figure 1). La phosphorylation de p53 à de multiples sites (ex : serine 15, serine 46…) conduit à sa stabilisation et sa translocation nucléaire pour son action en tant que facteur de transcription qui mène à différents destins cellulaires (arrêt du cycle cellulaire, quiescence, sénescence ou apoptose). L'étude que nous avons entreprise par Cell Stress Array a mis en évidence une augmentation de la forme phosphorylée de p53 et de sa cible transcriptionnelle p21 suite à l'exposition au BaP (Article 3, Figure 4). Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature, où l'exposition au BaP de cellules de choriocarcinome JEG-3 induit une phosphorylation de p53 sur la sérine 15 et l'induction de p21, responsable d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M sans

apoptose [228]. Pourtant, les trophoblastes primaires (CTV) sont des cellules différenciées, non-prolifératives car sorties du cycle cellulaire. L'augmentation observée de p21 dans les trophoblastes primaires ne peut donc pas être corrélé avec un arrêt du cycle des CTV. p21 est également un marqueur de sénescence et son expression a été démontrée comme augmentée dans les ST, considéré comme l'étape de différenciation terminale des CTV [440]. L'augmentation de l'expression de p21 par le BaP que nous avons mis en évidence dans les CTV primaires non-prolifératifs pourrait être responsable d'un état de sénescence prématuré des trophoblastes pouvant conduire à un vieillissement placentaire précoce. L'état de sénescence s'accompagne généralement d'un remodelage de la chromatine, telle que la phosphorylation du variant d'histone H2AX (γH2AX), permettant une répression globale de la transcription [441]. Nous pourrions réaliser la détection par WB de γH2AX dans les CTV après exposition au BaP afin de confirmer si ces cellules sont entrées dans un état de sénescence prématuré. Nous pourrions compléter ces études par la mesure de l'activité β-galactosidase (spécifique des cellules sénescentes) et de l'expression d'autres marqueurs de la sénescence tels que $p16^{INK4a}$ et la phosphoryation de pRB (protéine du rétinoblastome). De plus, l'état de sénescence est associé à un phénotype inflammatoire particulier, incluant des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissances et des protéases [442]. L'étude de ce profil pro-inflammatoire par cytométrie en flux pourrait nous permettre de caractériser l'état de sénescence des trophoblastes. La stabilisation de p53 peut également avoir des répercussions sur les fonctions placentaires et notamment la fonction endocrine, puisqu'il a été montré la présence de séquences consensus pour p53 dans le gène hCG-β7 et l'induction sélective de l'expression de ce gène par p53 au premier trimestre de grossesse [443].

Il est démontré que le métabolisme cellulaire du BaP conduit à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) [196]. Une production excessive d'ERO peut conduire à un stress oxydant par altération de la balance intracellulaire entre les espèces pro- et anti-oxydantes et provoquer la mort cellulaire. De plus, le stress oxydant est reconnu comme facteur de certaines pathologies de grossesse telles qu'un retard de croissance intra-utérin, la pré-éclampsie ou encore un risque de fausse couche [444]. Nous avons montré que le BaP induit la production d'ERO à partir de 0,5 à 1 μM quelque soit le temps d'incubation (24 h à 72 h) (Résultats supplémentaires de l'Article 3, Figure

36 de ce manuscrit). Cette production d'ERO s'est accompagné d'une suroxydation du senseur de stress oxydant Prx-SO_3, signe d'un stress oxydant induit par le BaP (Résultats supplémentaires de l'Article 3, Figure 36 de ce manuscrit). Cependant, il n'a pas été observé de variation d'expression d'enzymes impliquées dans la défense contre le stress oxydant, tels que HO-1 et SOD2 (Article 3, Figure 5) pour une concentration de 0,6 μM. Le BaP induit également une diminution du niveau protéique de HIF-2α, un facteur de transcription stabilisé dans des conditions d'environnement hypoxique. La stabilisation de p53 par le BaP à cette concentration serait donc préférentiellement due à des dommages à l'ADN plutôt qu'à un stress oxydant. La réalisation d'un test des comètes (identification des cassures de l'ADN) et un marquage 8-oxo-dG (dommages oxydants de l'ADN) nous permettrait d'évaluer les dommages à l'ADN induits dans les trophoblastes par le BaP aux concentrations testées.

2. Le BaP active la voie de signalisation d'AhR et impacte la stabilité d'IDO1

Nous avons évalué les effets sur AhR d'une exposition au BaP à 1 μM, une concentration qui se rapproche de celle retrouvée dans la circulation sanguine ou le placenta de femmes fumeuses [181], [221], sur les villosités choriales et la lignée cellulaire BeWo. Les HAP ont été montrés comme étant retenus dans le placenta et impliqués dans des complications de grossesse [445]. Nous avons montré que l'exposition des cellules BeWo au BaP à 1 μM ne modifie pas la localisation nucléaire d'AhR, peu importe le temps d'exposition (1 h, 3 h ou 24 h) (Article 1, Figure 6). L'utilisation de l'antagoniste d'AhR CH223191 n'a pas non plus modifié cette localisation nucléaire. L'activité d'AhR a été fortement augmentée par l'incubation des cellules avec 1 μM de BaP comme démontré par l'induction de la transcription des CYP450. Cette induction a été partiellement (CYP1A1 et CYP1B1) ou totalement (CYP1A2) inhibée par l'antagoniste d'AhR. Il serait intéressant de tester d'autres inhibiteurs d'AhR tels que l'α-naphtoflavone, le 1,3-dichloro-5-[(1E)-2-(4-chlorophenyl)ethenyl]-benzene ou encore le 6,2',4'-Trimethoxyflavone, car ils présentent tous des antagonismes sélectifs. Nous avons également montré que le BaP conduit à l'activation d'AhR de manière concentration-dépendante dans les trophoblastes humains issus de placenta à terme de grossesse (Article 3, Figure 1).

Nous avons montré que l'incubation des villosités avec le BaP à 1 μM a des conséquences importantes pour la stabilité de la protéine IDO1, conduisant à la diminution de son expression protéique. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'IDO1, en tant qu'enzyme à hème, est sensible à l'état redox cellulaire et à l'environnement en oxygène [446] et la métabolisation AhR-dépendante du BaP conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ce résultat est très intéressant et nécessite plus d'exploration car des défauts d'IDO1 sont associés à des pathologies de la grossesse comme la pré-éclampsie [447]. L'étude de l'activité enzymatique d'IDO1 *in vitro* nous permettrait de vérifier si la diminution du niveau protéique d'IDO1 observé dans ces trophoblastes pourrait être compensé par une augmentation de son activité. Nous pouvons penser que des polluants, tels que le BaP, peuvent interférer avec l'activité endogène d'AhR dans le placenta, en dirigeant l'activité d'AhR vers leur propre métabolisme plutôt que ceux de composés endogènes. Depuis notre étude, de nouvelles données sont parues dans la littérature concernant les effets du BaP sur la grossesse et le placenta. Une étude a confirmé l'association entre un niveau élevé de BaP et d'adduits à l'ADN dans le placenta et le risque de naissance prématurée [448]. Il a été montré que le BaP altère la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses placentaires *via* la voie de signalisation AhR [449]. L'effet perturbateur endocrinien a été montré à nouveau dans les lignées trophoblastiques BeWo et JEG-3 [230], [450].

III. Effet des NP de CeO_2 en exposition individuelle sur la barrière placentaire humaine

1. Caractérisation des NP de CeO_2 utilisées

Comme expliqué dans l'introduction, les caractéristiques physico-chimiques des NP varient selon leur nature chimique. La taille et la charge de surface sont notamment des paramètres à prendre en compte car ils influencent les effets biologiques des NP, tels que l'internalisation et la toxicité [451], [452]. Nous avions donc procédé à la caractérisation de nos NP avant toute étude (Article 2, Figure 1 et Tableau 3). Par des mesures de DLS, nous avions mis en évidence que les NP forment des agglomérats en milieu liquide d'une taille d'environ 400 à 500 nm. Cette taille est bien supérieure à la taille individuelle de ces NP qui est de 30 nm. La distribution en taille des NP dans ces

milieux restait sensiblement la même lors des mesures 1 h après sonication. Mais, pour des temps plus longs (24 h à 72 h), les mesures de DLS n'étaient plus possibles car les agglomérats étaient trop importants (Article 2, Tableau 3). Les cellules seraient donc en majorité en contact avec des agglomérats plutôt qu'avec des particules individuelles. Il a été proposé que l'agglomération des NP pourrait limiter leur internalisation et de ce fait réduire leur toxicité [453]. Le deuxième paramètre à prendre en compte est la charge de surface, déterminé par la mesure du potentiel zêta. Les NP de CeO_2 possèdent une charge de surface négative de -30 mV, ce qui n'est pas suffisant pour empêcher l'agglomération des NP par des forces répulsives. Il a été montré que la charge de surface peut influencer l'internalisation [307], [308] et, par exemple, la charge négative des NP de TiO_2 réduit leur internalisation dans des cellules pulmonaires [454].

2. Les NP de CeO_2 sont internalisées dans les trophoblastes

Nous avons montré une internalisation des NP de CeO_2 de manière concentration-dépendante à la fois dans les cytotrophoblastes et dans les syncytiotrophoblastes (Article 2, Figure 2). Les NP sont retrouvées dans le cytoplasme avec une localisation péri-nucléaire, formant des agglomérats. Aucune NP n'avait été observé dans les organites ni dans le noyau. Nous avions mesuré la taille des ces agglomérats intracellulaires et leur taille était plus grande que les agglomérats formés en milieu liquide lors des mesures par DLS, suggérant que les NP peuvent s'accumuler dans les cellules. La nature chimique de ces agglomérats visibles en microscopie électronique à transmission a été confirmée par la technologie EDX, il s'agissait bien de NP de Ce. Une question se pose sur l'internalisation de ces NP : sont-elles internalisées sous forme de grands agglomérats ou alors ce sont des petits agglomérats et/ou des NP individuelles qui sont endocytés puis regroupés dans la cellule. Du fait que la cinétique et les mécanismes d'internalisation des NP peuvent varier entre différents types tissulaires et cellulaires [368], [455], il serait intéressant de déterminer le mécanismes d'endocytose des NP de CeO_2 dans les trophoblastes primaires (CTV et ST). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou d'ARN interférents (siRNA) de chacune des voies d'endocytose pourrait nous permettre de déterminer le ou les mécanisme(s) impliqué(s) pour l'endocytose des NP de CeO_2 dans les trophoblastes. Des études s'intéressant à l'internalisation des NP de CeO_2 dans d'autres types tissulaires ont montré une endocytose médiée par la clathrine (dans des cellules pulmonaires) [370],

une endocytose médiée par les cavéoles (dans un modèle de kératinocyte) [369] ou encore une macropinocytose (dans des macrophages murins) [456]. Il aurait été également intéressant de réaliser une cinétique de l'internalisation des NP de CeO_2 dans notre modèle cellulaire, en incubant les trophoblastes à des temps plus courts que ceux que l'on a testés, par exemple 1 h ou 4 h.

Nous avions également évalué l'internalisation des NP de CeO_2 dans les villosités choriales. Les NP avaient été observées à la fois à la surface mais aussi à l'intérieur de l'épithélium trophoblastique, dans le ST au deux concentrations testées (10 et 40 μg/mL, correspondant à 1,6 et 6,3 $\mu g/cm^2$ respectivement) et dans les CTV à la concentration la plus forte (40 μg/mL correspondant à 6,3 $\mu g/cm^2$) à 24 h et 72 h d'incubation. Il pourrait donc y avoir un effet de la concentration des NP sur la pénétration en profondeur dans les tissus. Toutefois, l'étude sur des explants est délicate car le syncytium subit dans les premiers jours de culture une dégradation puis un renouvellement naturel [120]. Il faut donc s'assurer du bon renouvellement du syncytium avant toute exposition aux nanoparticules par des mesures quotidiennes de LDH et d'hCG dans le surnageant de culture. La mesure de LDH permet d'avoir une estimation de la lyse cellulaire et la mesure d'hCG permet de suivre le bon renouvellement du syncytium, puisque c'est la couche cellulaire responsable de la sécrétion des hormones placentaires. Il faudrait préalablement réaliser une cinétique, par un dosage d'hCG et de LDH journalier, qui nous permettrait de déterminer le temps de renouvellement du syncytium sur nos explants en culture. Nous pourrions par la suite refaire les expérimentations en tenant compte de ces nouvelles données. De plus, il est difficile de visualiser les NP de CeO_2 à l'intérieur des tissus car elles s'entourent de protéines et autres composants tissulaires ainsi que par le contraste qui est moins prononcé qu'avec des coupes de cellules. Cette problématique pourrait être résolue grâce à l'optimisation de la visualisation des NP de Ce que nous avons réalisé dans les trophoblastes primaires par l'utilisation de la technologie EDX mais cette fois ci sur les coupes des explants précédemment exposées à ces NP. Cette étude préliminaire sur les explants de villosité choriale est une piste très intéressante à approfondir ultérieurement, car ce modèle se rapproche le plus de la réalité d'une exposition environnante et présente notamment les différents types cellulaires le constituant.

3. Effet des NP de CeO_2 sur la cytotoxicité, le stress oxydant et la différenciation des cytotrophoblastes primaires humains

Nous avons réalisé dans ce manuscrit une étude complète de la cytotoxicité induite par ces NP de CeO_2 dans les trophoblastes primaires humains (Article 2), par différents tests d'activité métabolique (WST1), d'évaluation de l'intégrité des membranes cellulaires (dosage du relargage de la LDH) et d'activation des caspases (ApoONE et WB). Nous avons montré une cytotoxicité concentration et temps-dépendante des NP de CeO_2 dès 24 h d'incubation, avec un IC_{50} non atteint à 24 h, de 320 μg/ml (50,4 μg/cm²) à 48 h et de 160 μg/ml (25,2 μg/cm²) à 72 h (Article 2, Figure 4). Il n'existe pas de données actuellement dans la littérature sur la toxicité des NP de CeO_2 dans des modèles placentaires humains ou des lignées cellulaires placentaires. Nous avons donc comparé nos résultats avec ceux d'autres nanoparticules d'oxydes de métaux. Par exemple, les NP de TiO_2 n'affectent pas la viabilité des cellules trophoblastiques HTR8/SVneo à 10 et 100 μg/ml lors d'une incubation pendant 24 h et 48 h [405]. Au contraire, les NP d'oxyde de fer diminuent la viabilité des trophoblastes BeWo à partir de 3 μg/cm² (ce qui correspondrait à 20 μg/ml dans notre étude) à 24 h d'exposition. Les mécanismes responsables de la cytotoxicité des NP sont principalement la nécrose, l'apoptose ou l'autophagie, en fonction de la nature chimique des NP et de leur concentration [457], [458]. Nous avions également réalisé l'étude de la cytotoxicité par le test WST1 en exposition sur les syncytiotrophoblastes pendant 24 h avec les NP de CeO_2. Nous avions obtenu deux types de résultats différents en répétant les expérimentations (Résultats supplémentaires de l'Article 2, Figure 33 de ce manuscrit). Le premier résultat nous indiquait que les NP de CeO_2 n'auraient pas d'impact sur la viabilité cellulaire des ST alors que le deuxième montrait une baisse de la viabilité plus importante que l'exposition sur les cytotrophoblastes. Les deux types de résultats obtenus peuvent être dus au fait que les cellules ne se sont pas différenciées de la même manière selon les cultures cellulaires, avec une proportion en syncytiotrophoblastes probablement variable. Nous avons montré que la toxicité des NP de CeO_2 dans notre modèle cellulaire fait intervenir l'activation des caspases pour des concentrations supérieures à 10 μg/ml (1,6 μg/cm²) (Article 2, Figures 4C et 4D), supposant donc un engagement vers la voie de l'apoptose. Nous avions envisagé de pouvoir confirmer cet engagement vers l'apoptose par la cytométrie en flux avec les marqueurs appropriés, tels que l'Annexine V pour l'exposition des phosphatidylsérines

sur le feuillet extérieur de la membrane plasmique ainsi que l'iodure de propidium pour l'analyse de la condensation de la chromatine, deux phénomènes caractéristiques de l'apoptose. Cependant, cette technique n'est applicable que pour les cytototrophoblastes car ce sont des cellules mononuclées et le syncytium a une taille cellulaire trop importante pour passer dans les canaux d'analyse du cytomètre. De plus, comme décrit dans l'introduction à la fin de la section 1.2.2.1.1., le CTV engagé dans le processus de fusion présente la relocalisation de phosphatidylsérine sans être engagée dans un processus d'apoptose et le syncytium a une condensation de sa chromatine, rendant l'analyse par cytométrie compliquée. L'absence de stabilisation de p53 quelque soit la concentration de NP (10, 40 et 320 μg/ml (correspondant à 1,6, 6,3 et 50,4 μg/cm^2 respectivement) suggère une absence de dommages à l'ADN et que l'apoptose induite serait indépendante de la voie p53. Le Cell Stress Array a notamment confirmé l'absence d'activation de la voie p53 puisqu'il n'a pas été observé de phosphorylation de p53 par l'incubation des trophoblastes avec les NP de CeO_2 à la concentration de 40 μg/ml (6,3 μg/cm^2) et même une légère diminution de sa cible transcriptionnelle p21 à cette même concentration (Article 3, Figure 4). D'autres NP d'oxydes de métaux, tels que les NP de TiO_2, ont été montrées comme stabilisant p53 au niveau protéique et induisant sa phosphorylation de manière inversement proportionnelle à la taille des NP [459].

Comme expliqué dans l'introduction, les NP de CeO_2 possèdent deux états d'oxydation à leur surface (Ce^{3+} et Ce^{4+}), leur permettant d'agir comme catalyseur à la fois des réactions d'oxydation et de réduction. L'effet de ces NP sur le stress oxydant est controversé puisque selon le modèle cellulaire employé et les caractéristiques physico-chimiques des NP, il a été montré que les NP de CeO_2 peuvent être à la fois pro-oxydantes [365], [383] et antioxydantes [392], [460]. La balance redox est essentielle pour de nombreux processus biologiques. Le stress oxydant a d'ailleurs été relié à des dysfonctions placentaires. Nous avons montré que les NP de CeO_2 que nous avons utilisé ont un effet antioxydant, particulièrement à de fortes concentrations (supérieures à 80 μg/mL, soit 12,6 μg/cm^2) et pour des temps d'incubation allant de 24 h à 72 h (Article 2, Figure S2). Pour un temps d'incubation inférieur (4 h), les NP semblent au contraire avoir un effet pro-oxydant pour les faibles concentrations testées (5 à 20 μg/ml, correspondant à 0,8 à 3,2 μg/cm^2) (Article 2, Figure 5). Cet effet est transitoire puisqu'il n'est pas retrouvé aux temps d'incubation plus long. Nous nous sommes également

intéressés aux enzymes majeures du système cellulaire de défense antioxydant, telles que la catalase, SOD1, SOD2, HO-1 et Prx qui permettent d'assurer une élimination des ERO. Nous n'avons observé aucune variation de ces protéines par l'incubation avec les NP de CeO_2. Nous avons donc conclu que les NP de CeO_2 n'induisent pas de stress oxydant dans les trophoblastes et apparaissent d'ailleurs plutôt comme anti-oxydantes à forte concentration.

Les résultats du Cell Stress Array nous indiquent que les NP de CeO_2 réduisent de manière significative des protéines impliqués dans la défense antioxydante telles que la voie p38/HSP27 et celles impliquant HSP70 après une exposition à 40 μg/mL (6,3 $\mu g/cm^2$) (Article 3, Figure 4). Cette concentration avait été montré comme n'ayant pas d'effet sur le niveau d'ERO par l'utilisation de la sonde H_2DCFDA (Article 2, Figure S2). La protéine p38 est une MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) impliquée dans différentes voies de signalisation telles que le cycle cellulaire, la différenciation et la mort cellulaire. Après phosphorylation dans un contexte de stress oxydant, p38 active une protéine kinase impliquée dans le changement de conformation par phosphorylation de la protéine HSP27. HSP27 phosphorylé est impliqué en particulier dans le remodelage du réseau d'actine [461]. Ces résultats peuvent être corrélés avec la diminution de fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes par les NP de CeO_2 (Article 2, Figure 6), décrit dans le paragraphe suivant, à la même concentration (40 μg/mL soit 6,3 $\mu g/cm^2$). Ces données ayant été obtenues avec un seul temps d'exposition (24 h) et les phénomènes de phosphorylation pouvant être rapides et transitoires, il serait intéressant d'étudier ces voies de signalisation à des temps plus courts d'exposition. Le Cell Stress Array a également montré une diminution du niveau protéique de NF-κB ainsi que des facteurs HIF-1α et HIF-2α par l'exposition aux NP (Article 3, Figure 4). NF-κB est un facteur de transcription activé par le stress oxydant qui provoque sa translocation nucléaire et est impliqué dans les processus de sécrétion de cytokine, d'angiogenèse et d'inhibition de l'apoptose. Les facteurs HIF sont des facteurs de transcription stabilisés en conditions d'hypoxie et très instables en conditions de normoxie. Ils sont stabilisés pendant le premier trimestre de grossesse, lorsque l'environnement placentaire en oxygène est faible (1-2%) et jouent un rôle dans la morphogenèse placentaire, la différenciation des trophoblastes et l'angiogenèse [462]. Dans le placenta à terme, l'environnement est plus riche en oxygène (8%) et les facteurs HIF sont dégradés par la voie du protéasome. Des hauts niveaux de HIF-1α dans les

placentas à terme sont souvent associés avec des pathologies obstétricales d'origine placentaire tels que la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin où hypoperfusion et hypoxie placentaire sont observées [463].

Tout au long de la grossesse, le syncytium à la surface des villosités choriales est continuellement renouvelé par fusion des cytotrophoblastes sous-jacents. Ce renouvellement permet le bon fonctionnement du syncytium, responsable de la production des hormones. Nous avons montré par un calcul de l'index de fusion que les NP diminuaient de 20% la capacité des cytotrophoblastes à fusionner aux deux concentrations testées (2,5 et 40 µg/mL (0,4 et 6,3 µg/cm^2)) (Article 2, Figure 6). La concentration de 2,5 µg/mL n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire à 72 h tandis qu'à 40 µg/mL, la viabilité n'est diminuée que de 10% environ. Cet effet sur la fusion et donc sur la différenciation trophoblastique pourrait conduire à un vieillissement prématuré du placenta. Une exposition aux NP de CeO_2 lors du premier trimestre de grossesse pourrait être délétère pour la bonne mise en place des villosités choriales et leur développement, conduisant ainsi à des conséquences fonctionnelles à long terme. Plusieurs mécanismes, détaillés dans l'introduction, sont décrits pour expliquer la fusion trophoblastique, impliquant notamment les syncytines 1 et 2 et leurs récepteurs (ASCT2 et MFSD2 respectivement). Nous n'avons pas observé de variation de l'expression génique de ces syncytines ainsi que de leurs récepteurs par les NP de CeO_2. Il a été montré qu'une diminution du niveau d'expression des syncytines est associé à des défauts de fusion trophoblastique [42]. Cependant, une autre étude a montré que la diminution de la fusion peut être dû à une activité altérée des syncytines sans variation de leur expression protéique [22]. Le mécanisme responsable de la diminution observée de la fusion par les NP de CeO_2 reste donc à élucider. Nous pourrions nous intéresser à la localisation et l'expression d'autres protéines de jonctions cellulaires impliquées dans la fusion des trophoblastes telles que la E-cadhérine, la zonula occludens 1 (ZO-1) ou encore la connexine 43. Une autre hypothèse peut être émise pour expliquer ce résultat : les agglomérats formés par les NP dans nos milieux pourraient empêcher de façon mécanique le déplacement, l'agrégation et la fusion des trophoblastes, conduisant ainsi à une diminution de l'index de fusion. Enfin, il est bien connu que les NP ont une surface réactive et s'entourent d'autres molécules, formant une corona [320]. Les NP de CeO_2 étant très réactives, nous ne pouvons pas exclure que les facteurs sécrétés intervenant

de manière paracrine dans le processus de fusion trophoblastique, comme détaillé dans l'introduction au paragraphe 1.2.2.1.1., seraient adsorbés à la surface des NP et donc ne pourraient pas agir au niveau de la fusion cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions récupérer les NP de CeO_2 par centrifugation des extraits cellulaires après culture et procéder à l'analyse de la corona. Plusieurs méthodes ont été décrites pour l'identification des protéines de la corona, telles que le SDS-PAGE après une étape de solubilisation des protéines avec des détergents et généralement associée avec de la spectrométrie de masse pour une analyse par digestion par la trypsine et analyse des peptides séparés sur gel [464].

La perturbation de la capacité de différenciation des CTV en ST peut altérer les fonctions endocrines exercées par le ST. Nous nous sommes donc intéressés à la fonction endocrine des trophoblastes à trois niveaux : les hormones peptidiques (hCG et hPL), le facteur angiogénique PlGF et les hormones stéroïdes (P4 et E2). La fonction endocrine est nécessaire au bon déroulement de la grossesse, comme détaillé dans l'introduction de ce manuscrit. Des perturbations hormonales sont associées avec des complications de grossesse (retard de croissance intra-utérin et pré-éclampsie notamment) [465]. La diminution de la fusion des CTV observée à la concentration de 40 µg/mL est associée à une perturbation de la sécrétion d'hCG et d'hPL avec une diminution d'environ 20% (Article 2, Figure 7). A la concentration de 320 µg/mL, la diminution de la sécrétion observée suit la diminution de l'activité métabolique des trophoblastes, excepté pour la progestérone dont la sécrétion est maintenue, suggérant ainsi une adaptation compensatoire de la production de ce stéroïde. De plus, la production des hormones stéroïdes ne fait pas intervenir de machinerie de transcription/traduction comme pour l'hCG, ce qui peut expliquer le maintien de la sécrétion de P4 comparé à la diminution de l'hCG à la plus forte concentration testée. Les hormones stéroïdes font intervenir plusieurs enzymes pour leur production, dont certaines sont localisées dans la mitochondrie. Nous avons évalué le niveau protéique de ces enzymes après incubation avec les NP. Le maintien de la sécrétion de P4 est corrélé au fait qu'il n'y a pas de variation majeure dans l'expression protéique des enzymes nécessaires à sa production (MLN64 et HSD3-β1), alors que des variations ont été mises en évidence pour l'expression des enzymes impliquées dans la production d'E2 (STS,

HSD17-β1 et aromatase), en accord avec la diminution de la sécrétion d'E2 observée. Les NP de CeO_2 peuvent donc impacter la fonction endocrine du ST.

IV. Effet du benzo(a)pyrène et des NP de CeO_2 en co-exposition sur la barrière placentaire humaine

Nous avons montré qu'une exposition conjointe des trophoblastes primaires humains au BaP et aux NP de CeO_2 n'avait pas d'effet supplémentaire sur l'activité métabolique par rapport à l'exposition aux NP de CeO_2 seules. Cependant l'exposition conjointe compense l'effet inhibiteur des NP de CeO_2 seules et l'effet stimulateur du BaP seul sur la fusion des trophoblastes. L'étude globale sur puce du stress cellulaire induit par ces polluants met en évidence un plus grand nombre d'acteurs qui voient leurs taux protéiques modulés en co-exposition par rapport aux expositions individuelles.

1. Effet de la co-exposition sur l'activité métabolique des cytotrophoblastes primaires humains

Nous avions montré que le BaP n'affectait pas l'activité métabolique des trophoblastes pour une concentration inférieure à 2 μM et à un temps d'incubation de 72 h (Article 3, Figure 1) tandis que les NP de CeO_2 avaient un effet sur l'activité métabolique pour des concentrations supérieures à 40 μg/mL à 72 h d'incubation (Article 2, Figure 4). Le test de viabilité WST1 réalisé lors de la co-exposition pour des gammes de concentrations allant de 2,5 à 80 μg/mL de NP de CeO_2 et de 0,04 à 1,28 μM de BaP n'a pas montré d'effet supplémentaire de la co-exposition par rapport à l'exposition au NP de CeO_2 seules (Article 3, Figure 2C). Malgré l'absence de données sur une co-exposition au BaP et aux NP de CeO_2, des études concernant une co-exposition avec du BaP et d'autres types de NP ont montré un effet synergique du BaP et des NP de Silice sur la diminution de la viabilité cellulaire de cellules humaines endothéliales de veine ombilicale [407] et de cellules pulmonaires [408].

2. Effet de la co-exposition sur la fusion des cytotrophoblastes primaires humains

Nous avions montré que les NP de CeO_2 en exposition individuelle diminuaient de 20% la fusion des CTV aux concentrations de 2,5 et 40 μg/ml (Article 2, Figure 6). Nous avions réalisé l'exposition combinée des CTV à la concentration de 2,5 μg/ml de NP de

CeO_2 et la concentration correspondante de BaP (0,04 μM) afin de respecter le ratio de ces deux types de polluants dans l'environnement (Résultats supplémentaires de l'Article 3, Figure 38 de ce manuscrit). Il s'est avéré que l'exposition conjointe à ces deux polluants annulait l'effet inhibiteur des NP de CeO_2 seules et l'effet stimulateur du BaP seul sur la fusion trophoblastique. Il y a donc un effet compensatoire de l'exposition conjointe à ces deux polluants sur la fusion trophoblastique comparé à leurs effets en exposition individuelle. A nouveau, nous pouvons émettre l'hypothèse de l'implication de la surface réactive des NP dans les résultats obtenus. Les NP de CeO_2 pourraient adsorber le BaP en milieu liquide lors de la co-exposition, limitant ainsi la bio-disponibilité du BaP et ses effets cellulaires. De plus, le BaP qui s'adsorberait sur les NP de CeO_2 pourrait le faire à la place d'autres facteurs présents dans le milieu de culture et nécessaire à la communication paracrine pour la fusion trophoblastique, laissant ainsi ces facteurs disponibles pour les mécanismes de fusion cellulaire. Comme indiqué dans la section précédente de cette discussion, l'identification des protéines formant la corona des NP est possible et une comparaison des coronas formées lors de l'exposition individuelle aux NP de CeO_2 et lors de la co-exposition nous permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

3. Effet de la co-exposition sur le stress cellulaire des cytotrophoblastes primaires humains

Nous avons voulu déterminer les acteurs majeurs du stress cellulaire dont l'expression est modulée par l'exposition individuelle ou conjointe au BaP et aux NP de CeO_2 dans les trophoblastes primaires humains.

Le BaP a été montré comme induisant la production d'ERO, augmentant la suroxydation du senseur de stress oxydant Prx-SO_3 sans induire de variations des enzymes impliquées dans la défense oxydative (Résultats supplémentaires de l'Article 3, Figure 35 de ce manuscrit). Au contraire, les NP de CeO_2 ont été montrées comme ayant plutôt un effet anti-oxydant à fortes concentrations (Article 2) et cela a été confirmé par la diminution de la suroxydation du senseur de stress oxydant Prx-SO_3 (Article 3, Figure 5), également retrouvée lors de la co-exposition des trophoblastes aux NP de CeO_2 et au BaP (Article 3, Figure 5). Dans le même temps, le Cell Stress Array a montré que la co-exposition à 6,3 μg/cm^2 (40 μg/mL) de NP de CeO_2 et à 0,6 μM de BaP diminue l'expression protéique de SOD2, une enzyme anti-oxydante (Article 3, Figure 4). Cette

observation est en accord avec les données de la littérature montrant un effet anti-oxydant de ces NP avec une activité de type catalase [332] et cet effet anti-oxydant persiste lors de la co-exposition. Les NP de CeO_2 en co-exposition avec le BaP pourraient avoir un effet protecteur vis-à-vis des ERO produits par le BaP et limiter les dommages oxydants induits par le BaP. Il serait intéressant de déterminer dans un premier temps les effets de la co-exposition au BaP et aux NP de CeO_2 sur le niveau d'ERO par l'utilisation de la sonde CM-H_2DCFDA, comme utilisée en exposition individuelle dans nos expérimentations. Ensuite, afin d'évaluer l'effet protecteur potentiel des NP de CeO_2 sur les dommages aux macromolécules induits par le BaP, nous identifier les dommages oxydants à l'ADN par le 8-oxo-dG et utiliser une sonde Bodipy pour évaluer les dommages aux lipides (peroxydation lipidique) en conditions d'exposition individuelle et de co-exposition. Des études de co-exposition au BaP et d'autres types de NP ont montré un effet synergique du BaP et des NP de silice sur la production d'ERO et sur les dommages oxydants induits par ces polluants dans des cellules humaines endothéliales de veine ombilicale [407]. Au contraire, le BaP et les NP de silice en co-exposition sur des cellules pulmonaires n'ont pas d'effet sur le niveau cellulaire d'ERO mais induisent de manière additive des dommages oxydants, notamment à l'ADN [408].

Le Cell Stress Array a montré un nombre plus important de facteurs voyant leur niveau protéique diminuer par la co-exposition par rapport aux expositions individuelles (Article 3, Figure 4). Cela suggère que d'autres voies pourraient être modulées par rapport aux expositions individuelles. De plus, la co-exposition atténue les effets du BaP seul, à savoir la phosphorylation de p53 et l'induction de sa cible transcriptionnelle p21. La co-exposition induit également une diminution plus importante des facteurs hypoxiques (HIF-2α) et d'autres acteurs de l'inflammation (p38, NF-κB), suggérant un effet synergique de ces deux polluants envers ces voies de signalisation cellulaire.

Cependant, les diminutions observées avec les NP de CeO_2 pourraient être dues à leur capacité intrinsèque à adsorber les protéines à leur surface par la formation d'une corona. Les NP de CeO_2 s'agrégeant dans le cytoplasme peuvent dépléter le cytoplasme des protéines qui s'y trouvent. Cette hypothèse peut être testée grâce à la méthode décrite dans le paragraphe précédent de la discussion, à savoir l'isolement des NP de

CeO_2 par centrifugation, solubilisation des protéines accolées, électrophorèse en conditions dénaturantes puis analyse en spectrométrie de masse pour l'identification des protéines de la corona des NP ainsi isolées. De plus, le BaP étant lipophile, il peut faciliter l'internalisation des NP s'il est adsorbé à leur surface. L'étude d'internalisation des NP de CeO_2 lors d'une co-exposition avec le BaP pourrait être réalisée comme cela a été fait dans l'Article 2 pour les NP de CeO_2 en exposition individuelle. L'utilisation de la microscopie électronique à transmission nous permettrait d'avoir une visualisation de l'internalisation des NP de CeO_2 et déterminer si le BaP modifie ce taux d'internalisation, et l'utilisation de la microscopie confocale en parallèle nous permettrait de vérifier la présence de BaP (autofluorescent) sur les NP internalisées. De plus, le calcul de la taille des agrégats nous permettrait de déterminer si le BaP modifie l'état d'agglomération/agrégation des NP, pouvant avoir un impact sur la toxicité induite par ces polluants.

Les études concernant la co-exposition pourraient également être réalisées de manière plus intéressante avec des NP de CeO_2 coatées de manière stable avec du BaP, situation se rapprochant le plus de la réalité de la pollution environnementale. La présence stable de BaP sur les NP de CeO_2 pourrait modifier l'internalisation des NP et par conséquent leurs effets cellulaire que nous avons décrit dans l'Article 2. De plus, il serait intéressant d'évaluer l'effet du coating sur la voie de signalisation AhR impliquée dans la détoxification du BaP (expression génique et protéique d'AhR, de son répresseur AhRR et de son partenaire ARNT ainsi que des cibles transcriptionnelles d'AhR), comparé à une exposition au BaP seul et à une co-exposition simple au BaP et aux NP de CeO_2. Enfin, le BaP est un prototype de HAP largement utilisé pour décrire les effets de cette classe de polluants. Il serait intéressant d'évaluer les effets d'autres HAP considérés comme polluants prioritaires (décrits dans la Figure 14 de ce manuscrit), chaque molécule individuellement ou un mélange de ces différents HAP en co-exposition avec les NP de CeO_2, afin de mimer de manière encore plus réaliste la pollution environnante.

CONCLUSION

L'objectif de ma thèse était d'évaluer les conséquences de l'exposition aux NP de CeO_2 seules ou en association avec le BaP sur l'intégrité et les fonctions de la barrière placentaire humaine. La cartographie de l'expression et de l'activité du récepteur des hydrocarbures aromatiques AhR au cours de l'ontogenèse placentaire que nous avons réalisée préliminairement aux études de ces polluants a montré l'augmentation de l'expression et de l'activité de ce récepteur au cours de la grossesse ainsi que son activation constitutive, signe de l'existence de potentiels ligands endogènes activateurs. Nous nous étions intéressés à l'enzyme IDO1, responsable du catabolisme du tryptophane en kynurénine, un ligand reconnu d'AhR. Bien qu'IDO1 possède le même profil d'expression qu'AhR, nos résultats ne nous ont pas permis de mettre en évidence de lien entre IDO1 et l'activation constitutive d'AhR. Nous avions ensuite réalisé la première étude de l'impact des NP de CeO_2 sur les trophoblastes primaires humains. Nous avons ainsi montré par de la microscopie électronique à transmission associée à la technologie EDX que les NP de CeO_2 étaient internalisées à la fois par les cytotrophoblastes et par les syncytiotrophoblastes Ces NP induisent une toxicité sur les trophoblastes primaires humains de manière temps et concentration-dépendante par l'activation des caspases et agissent plutôt comme antioxydants à haute concentration. De plus, nous avons montré que les NP de CeO_2 perturbaient la syncytialisation des trophoblastes et la sécrétion des principales hormones de la grossesse (hCG, hPL, PlGF, P4 et E2), pouvant conduire à une dysfonction trophoblastique. Nous avons également montré que le BaP est peu cytotoxique pour les trophoblastes primaires humains mais induit la production d'espèces réactives de l'oxygène, pouvant conduire à un stress oxydant, et stabilise le facteur de transcription p53, qui témoigne de dommages à l'ADN. Nous avons enfin montré que la co-exposition des trophoblastes à ces deux polluants n'induit pas d'effet supplémentaire sur la viabilité cellulaire mais module l'expression de nombreux acteurs majeurs du stress cellulaire (p53, p21, NF-κB, HIF-1α, HIF-1β). Etant donné les relations démontrées entre l'exposition à la pollution environnementale et les risques d'issues défavorables de la grossesse, nous devons élucider les aspects tels que le mode d'internalisation, les mécanismes de toxicité, les voies de signalisation activées et l'impact de ces deux polluants sur le développement et les fonctions du placenta humain afin de mieux appréhender et prévenir les risques d'exposition pendant la grossesse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] G. J. Burton and A. L. Fowden, “The placenta: a multifaceted, transient organ,” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 370, no. 1663, Mar. 2015, doi: 10.1098/rstb.2014.0066.
[2] R. Leiser and P. Kaufmann, “Placental structure: in a comparative aspect,” *Exp. Clin. Endocrinol.*, vol. 102, no. 3, pp. 122–134, 1994, doi: 10.1055/s-0029-1211275.
[3] F. Gaccioli, S. Lager, T. L. Powell, and T. Jansson, “Placental transport in response to altered maternal nutrition,” *J Dev Orig Health Dis*, vol. 4, no. 2, pp. 101–115, Apr. 2013, doi: 10.1017/S2040174412000529.
[4] M. Y. Turco and A. Moffett, “Development of the human placenta,” *Development*, vol. 146, no. 22, Nov. 2019, doi: 10.1242/dev.163428.
[5] J. D. Boyd and W. J. Hamilton, *The Human Placenta*. Heffer, 1970.
[6] J. D. Aplin and P. T. Ruane, “Embryo–epithelium interactions during implantation at a glance,” *J Cell Sci*, vol. 130, no. 1, pp. 15–22, Jan. 2017, doi: 10.1242/jcs.175943.
[7] R. A. Simpson, T. M. Mayhew, and P. R. Barnes, “From 13 weeks to term, the trophoblast of human placenta grows by the continuous recruitment of new proliferative units: A study of nuclear number using the disector,” *Placenta*, vol. 13, no. 5, pp. 501–512, Sep. 1992, doi: 10.1016/0143-4004(92)90055-X.
[8] N. M. Gude, C. T. Roberts, B. Kalionis, and R. G. King, “Growth and function of the normal human placenta,” *Thromb. Res.*, vol. 114, no. 5–6, pp. 397–407, 2004, doi: 10.1016/j.thromres.2004.06.038.
[9] D. Evain-Brion and A. Malassiné, *Le placenta humain*. Ed. Médicales Internationales, 2010.
[10] F. Teasdale and G. Jean-Jacques, “Morphometric evaluation of the microvillous surface enlargement factor in the human placenta from mid-gestation to term,” *Placenta*, vol. 6, no. 5, pp. 375–381, Sep. 1985, doi: 10.1016/S0143-4004(85)80014-X.
[11] N. M. E. Fogarty, T. M. Mayhew, A. C. Ferguson-Smith, and G. J. Burton, “A quantitative analysis of transcriptionally active syncytiotrophoblast nuclei across human gestation,” *J. Anat.*, vol. 219, no. 5, pp. 601–610, Nov. 2011, doi: 10.1111/j.1469-7580.2011.01417.x.
[12] F. Martinez, S. Olvera-Sanchez, M. Esparza-Perusquia, E. Gomez-Chang, and O. Flores-Herrera, “Multiple functions of syncytiotrophoblast mitochondria,” *Steroids*, vol. 103, pp. 11–22, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.steroids.2015.09.006.
[13] G. J. Burton and C. J. P. Jones, “Syncytial Knots, Sprouts, Apoptosis, and Trophoblast Deportation from the Human Placenta,” *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 48, no. 1, pp. 28–37, Mar. 2009, doi: 10.1016/S1028-4559(09)60032-2.
[14] A. E. P. Heazell, S. J. Moll, C. J. P. Jones, P. N. Baker, and I. P. Crocker, “Formation of syncytial knots is increased by hyperoxia, hypoxia and reactive oxygen species,” *Placenta*, vol. 28 Suppl A, pp. S33-40, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.placenta.2006.10.007.
[15] P. Gerbaud *et al.*, “Mesenchymal activin-A overcomes defective human trisomy 21 trophoblast fusion,” *Endocrinology*, vol. 152, no. 12, pp. 5017–5028, Dec. 2011, doi: 10.1210/en.2011-1193.
[16] D. Baczyk, S. Drewlo, L. Proctor, C. Dunk, S. Lye, and J. Kingdom, “Glial cell missing-1 transcription factor is required for the differentiation of the human trophoblast,” *Cell Death Differ.*, vol. 16, no. 5, pp. 719–727, May 2009, doi: 10.1038/cdd.2009.1.
[17] X. Lu, Y. He, C. Zhu, H. Wang, S. Chen, and H.-Y. Lin, “Twist1 is involved in trophoblast syncytialization by regulating GCM1,” *Placenta*, vol. 39, pp. 45–54, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.placenta.2016.01.008.
[18] S. Muralimanoharan, Y.-T. Kwak, and C. R. Mendelson, “Redox-Sensitive Transcription

Factor NRF2 Enhances Trophoblast Differentiation via Induction of miR-1246 and Aromatase," *Endocrinology*, vol. 159, no. 5, pp. 2022–2033, 01 2018, doi: 10.1210/en.2017-03024.

[19] T. Fournier *et al.*, "PPARγ and human trophoblast differentiation," *J. Reprod. Immunol.*, vol. 90, no. 1, pp. 41–49, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.jri.2011.05.003.

[20] V. H. Shore, T. H. Wang, C. L. Wang, R. J. Torry, M. R. Caudle, and D. S. Torry, "Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast," *Placenta*, vol. 18, no. 8, pp. 657–665, Nov. 1997, doi: 10.1016/s0143-4004(97)90007-2.

[21] H. Li, J. Dakour, L. J. Guilbert, B. Winkler-Lowen, F. Lyall, and D. W. Morrish, "PL74, a novel member of the transforming growth factor-beta superfamily, is overexpressed in preeclampsia and causes apoptosis in trophoblast cells," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, no. 5, pp. 3045–3053, May 2005, doi: 10.1210/jc.2004-0808.

[22] J. Buchrieser *et al.*, "IFITM proteins inhibit placental syncytiotrophoblast formation and promote fetal demise," *Science*, vol. 365, no. 6449, pp. 176–180, 12 2019, doi: 10.1126/science.aaw7733.

[23] J. J. Lysiak, J. Hunt, G. A. Pringle, and P. K. Lala, "Localization of transforming growth factor beta and its natural inhibitor decorin in the human placenta and decidua throughout gestation," *Placenta*, vol. 16, no. 3, pp. 221–231, Apr. 1995, doi: 10.1016/0143-4004(95)90110-8.

[24] P. B. Seshagiri, E. Terasawa, and J. P. Hearn, "The secretion of gonadotrophin-releasing hormone by peri-implantation embryos of the rhesus monkey: comparison with the secretion of chorionic gonadotrophin," *Hum. Reprod.*, vol. 9, no. 7, pp. 1300–1307, Jul. 1994, doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138699.

[25] G. Pidoux *et al.*, "Biochemical characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation," *J. Cell. Physiol.*, vol. 212, no. 1, pp. 26–35, Jul. 2007, doi: 10.1002/jcp.20995.

[26] G. Keryer, E. Alsat, K. Tasken, and D. Evain-Brion, "Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro," *J. Cell. Sci.*, vol. 111 (Pt 7), pp. 995–1004, Apr. 1998.

[27] I. Knerr *et al.*, "Stimulation of GCMa and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions," *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 18, pp. 3991–3998, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.febslet.2005.06.029.

[28] K. Levytska, S. Drewlo, D. Baczyk, and J. Kingdom, "PPAR- γ Regulates Trophoblast Differentiation in the BeWo Cell Model," *PPAR Res*, vol. 2014, p. 637251, 2014, doi: 10.1155/2014/637251.

[29] C. Coutifaris *et al.*, "E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts," *Development*, vol. 113, no. 3, pp. 767–777, Nov. 1991.

[30] S. Getsios and C. D. MacCalman, "Cadherin-11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells in vitro," *Dev. Biol.*, vol. 257, no. 1, pp. 41–54, May 2003, doi: 10.1016/s0012-1606(03)00041-1.

[31] G. Pidoux *et al.*, "ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta," *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, vol. 298, no. 6, pp. C1517-1526, Jun. 2010, doi: 10.1152/ajpcell.00484.2008.

[32] A. S. Fanning and J. M. Anderson, "Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1165, pp. 113–120, May 2009, doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x.

[33] L. Cronier *et al.*, "Requirement of gap junctional intercellular communication for human villous trophoblast differentiation," *Biol. Reprod.*, vol. 69, no. 5, pp. 1472–

1480, Nov. 2003, doi: 10.1095/biolreprod.103.016360.
[34] C. E. Dunk *et al.*, "The molecular role of connexin 43 in human trophoblast cell fusion," *Biol. Reprod.*, vol. 86, no. 4, p. 115, Apr. 2012, doi: 10.1095/biolreprod.111.096925.
[35] J.-L. Frendo *et al.*, "Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 10, pp. 3566–3574, May 2003, doi: 10.1128/mcb.23.10.3566-3574.2003.
[36] R. Cariappa, E. Heath-Monnig, and C. H. Smith, "Isoforms of amino acid transporters in placental syncytiotrophoblast: plasma membrane localization and potential role in maternal/fetal transport," *Placenta*, vol. 24, no. 7, pp. 713–726, Aug. 2003, doi: 10.1016/s0143-4004(03)00085-7.
[37] A. Malassiné *et al.*, "Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells," *Placenta*, vol. 28, no. 2–3, pp. 185–191, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.placenta.2006.03.001.
[38] A. Malassiné *et al.*, "Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta," *Placenta*, vol. 26, no. 7, pp. 556–562, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.placenta.2004.09.002.
[39] M. D. Hayward, A. J. G. Pötgens, S. Drewlo, P. Kaufmann, and J. E. J. Rasko, "Distribution of human endogenous retrovirus type W receptor in normal human villous placenta," *Pathology*, vol. 39, no. 4, pp. 406–412, Aug. 2007, doi: 10.1080/00313020701444572.
[40] C. Esnault *et al.*, "A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 105, no. 45, pp. 17532–17537, Nov. 2008, doi: 10.1073/pnas.0807413105.
[41] C.-Y. Liang, L.-J. Wang, C.-P. Chen, L.-F. Chen, Y.-H. Chen, and H. Chen, "GCM1 regulation of the expression of syncytin 2 and its cognate receptor MFSD2A in human placenta," *Biol. Reprod.*, vol. 83, no. 3, pp. 387–395, Sep. 2010, doi: 10.1095/biolreprod.110.083915.
[42] A. Vargas *et al.*, "Syncytin-2 Plays an Important Role in the Fusion of Human Trophoblast Cells," *Journal of Molecular Biology*, vol. 392, no. 2, pp. 301–318, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.025.
[43] J. Savill, "Apoptosis. Phagocytic docking without shocking," *Nature*, vol. 392, no. 6675, pp. 442–443, Apr. 1998, doi: 10.1038/33025.
[44] B. Huppertz, H. G. Frank, J. C. Kingdom, F. Reister, and P. Kaufmann, "Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 110, no. 5, pp. 495–508, Nov. 1998, doi: 10.1007/s004180050311.
[45] M. Das, B. Xu, L. Lin, S. Chakrabarti, V. Shivaswamy, and N. S. Rote, "Phosphatidylserine efflux and intercellular fusion in a BeWo model of human villous cytotrophoblast," *Placenta*, vol. 25, no. 5, pp. 396–407, May 2004, doi: 10.1016/j.placenta.2003.11.004.
[46] R. R. Adler, A. K. Ng, and N. S. Rote, "Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR," *Biol. Reprod.*, vol. 53, no. 4, pp. 905–910, Oct. 1995, doi: 10.1095/biolreprod53.4.905.
[47] K. Benirschke, G. J. Burton, and R. N. Baergen, *Pathology of the Human Placenta*, 6th ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012.
[48] K. Vähäkangas and P. Myllynen, "Drug transporters in the human blood-placental barrier," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 158, no. 3, pp. 665–678, Oct. 2009, doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00336.x.
[49] W. Chatuphonprasert, K. Jarukamjorn, and I. Ellinger, "Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human

Placenta," *Front Pharmacol*, vol. 9, p. 1027, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01027.
[50] J. D. Aplin, T. Haigh, H. Lacey, C. P. Chen, and C. J. Jones, "Tissue interactions in the control of trophoblast invasion," *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, vol. 55, pp. 57–64, 2000.
[51] R. Jaffe, E. Jauniaux, and J. Hustin, "Maternal circulation in the first-trimester human placenta—Myth or reality?," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 176, no. 3, pp. 695–705, Mar. 1997, doi: 10.1016/S0002-9378(97)70572-6.
[52] G. Moser, K. Windsperger, J. Pollheimer, S. C. de Sousa Lopes, and B. Huppertz, "Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 150, no. 4, pp. 361–370, Oct. 2018, doi: 10.1007/s00418-018-1699-0.
[53] E. Lecarpentier *et al.*, "Computational Fluid Dynamic Simulations of Maternal Circulation: Wall Shear Stress in the Human Placenta and Its Biological Implications," *PLoS ONE*, vol. 11, no. 1, p. e0147262, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0147262.
[54] D. H. Cha and G. Kim, "Dynamic role of trophoblast in human placental development," *Human Placenta: Structure and Development, Circulation and Functions*, pp. 49–78, Jan. 2010.
[55] A. Moffett and C. Loke, "Immunology of placentation in eutherian mammals," *Nat Rev Immunol*, vol. 6, no. 8, pp. 584–594, Aug. 2006, doi: 10.1038/nri1897.
[56] P. L. Bouteiller and A. Blaschitz, "The functionality of HLA-G is emerging," *Immunological Reviews*, vol. 167, no. 1, pp. 233–244, 1999, doi: 10.1111/j.1600-065X.1999.tb01396.x.
[57] G. Chaouat, "Regulation of T-Cell Activities at the Feto-Placental Interface—by Placenta?," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 42, no. 4, pp. 199–204, 1999, doi: 10.1111/j.1600-0897.1999.tb00092.x.
[58] G. J. Burton and E. Jauniaux, "What is the placenta?," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 213, no. 4, Supplement, p. S6.e1-S6.e4, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.ajog.2015.07.050.
[59] D. Evain-Brion, "Maternal endocrine adaptations to placental hormones in humans," *Acta Paediatr Suppl*, vol. 88, no. 428, pp. 12–16, Feb. 1999, doi: 10.1111/j.1651-2227.1999.tb14345.x.
[60] P. F. Policastro, S. Daniels-McQueen, G. Carle, and I. Boime, "A map of the hCG beta-LH beta gene cluster.," *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 13, pp. 5907–5916, May 1986.
[61] C. Gehring, T. Siepmann, H. Heidegger, and U. Jeschke, "The controversial role of human chorionic gonadotropin in the development of breast cancer and other types of tumors," *Breast*, vol. 26, pp. 135–140, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.breast.2016.01.010.
[62] L. A. Cole, "Biological functions of hCG and hCG-related molecules," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 8, p. 102, Aug. 2010, doi: 10.1186/1477-7827-8-102.
[63] A. Schumacher *et al.*, "Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 6, pp. 2650–2658, Mar. 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1202698.
[64] A. Malassiné, J.-L. Frendo, and D. Evain-Brion, "Trisomy 21- affected placentas highlight prerequisite factors for human trophoblast fusion and differentiation," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 54, no. 2–3, pp. 475–482, Sep. 2009, doi: 10.1387/ijdb.082766am.
[65] K. Handschuh *et al.*, "Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells," *Placenta*, vol. 28, no. 2–3, pp. 175–184, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.placenta.2006.01.019.
[66] S. Berndt *et al.*, "Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin stimulates angiogenesis through TGF-β receptor activation," *FASEB J.*, vol. 27, no. 4, pp. 1309–

1321, Apr. 2013, doi: 10.1096/fj.12-213686.
[67] A. Tarrade *et al.*, "Characterization of Human Villous and Extravillous Trophoblasts Isolated from First Trimester Placenta," *Lab Invest*, vol. 81, no. 9, pp. 1199–1211, Jan. 2001, doi: 10.1038/labinvest.3780334.
[68] S. Handwerger and M. Freemark, "The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development," *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, vol. 13, no. 4, pp. 343–356, Apr. 2000, doi: 10.1515/jpem.2000.13.4.343.
[69] T. Napso, H. E. J. Yong, J. Lopez-Tello, and A. N. Sferruzzi-Perri, "The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation," *Front Physiol*, vol. 9, p. 1091, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01091.
[70] M.-C. Lacroix *et al.*, "Stimulation of Human Trophoblast Invasion by Placental Growth Hormone," *Endocrinology*, vol. 146, no. 5, pp. 2434–2444, May 2005, doi: 10.1210/en.2004-1550.
[71] E. Alsat, J. Guibourdenche, A. Couturier, and D. Evain-Brion, "Physiological role of human placental growth hormone," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 140, no. 1–2, pp. 121–127, May 1998, doi: 10.1016/s0303-7207(98)00040-9.
[72] H. D. McIntyre, W. Zeck, and A. Russell, "Placental growth hormone, fetal growth and the IGF axis in normal and diabetic pregnancy," *Curr Diabetes Rev*, vol. 5, no. 3, pp. 185–189, Aug. 2009, doi: 10.2174/157339909788920947.
[73] F. Petraglia, J. Vaughan, and W. Vale, "Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 86, no. 13, pp. 5114–5117, Jul. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.13.5114.
[74] M. A. Costa, "The endocrine function of human placenta: an overview," *Reprod. Biomed. Online*, vol. 32, no. 1, pp. 14–43, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.rbmo.2015.10.005.
[75] S. R. Ladyman, R. A. Augustine, and D. R. Grattan, "Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy," *J. Neuroendocrinol.*, vol. 22, no. 7, pp. 805–817, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.02017.x.
[76] M. Reverchon, V. Maillard, P. Froment, C. Ramé, and J. Dupont, "[Adiponectin and resistin: a role in the reproductive functions?]," *Med Sci (Paris)*, vol. 29, no. 4, pp. 417–424, Apr. 2013, doi: 10.1051/medsci/2013294016.
[77] T. Kadowaki and T. Yamauchi, "Adiponectin and adiponectin receptors," *Endocr. Rev.*, vol. 26, no. 3, pp. 439–451, May 2005, doi: 10.1210/er.2005-0005.
[78] M. Liu and F. Liu, "Regulation of adiponectin multimerization, signaling and function," *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 28, no. 1, pp. 25–31, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.beem.2013.06.003.
[79] M. Haghiac, S. Basu, L. Presley, D. Serre, P. M. Catalano, and S. Hauguel-de Mouzon, "Patterns of adiponectin expression in term pregnancy: impact of obesity," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 99, no. 9, pp. 3427–3434, Sep. 2014, doi: 10.1210/jc.2013-4074.
[80] E. A. McDonald and M. W. Wolfe, "Adiponectin attenuation of endocrine function within human term trophoblast cells," *Endocrinology*, vol. 150, no. 9, pp. 4358–4365, Sep. 2009, doi: 10.1210/en.2009-0058.
[81] A. I. Csapo, E. Knobil, H. J. van der Molen, and W. G. Wiest, "Peripheral plasma progesterone levels during human pregnancy and labor," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 110, no. 5, pp. 630–632, Jul. 1971, doi: 10.1016/0002-9378(71)90242-0.
[82] N. Noyola-Martínez, A. Halhali, and D. Barrera, "Steroid hormones and pregnancy," *Gynecol. Endocrinol.*, vol. 35, no. 5, pp. 376–384, May 2019, doi:

10.1080/09513590.2018.1564742.
[83] N. F. Butte, “Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 71, no. 5 Suppl, pp. 1256S–61S, 2000, doi: 10.1093/ajcn/71.5.1256s.
[84] A. Bukovsky *et al.*, “Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol,” *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 1, p. 13, Feb. 2003, doi: 10.1186/1477-7827-1-13.
[85] M. Knöfler, S. Haider, L. Saleh, J. Pollheimer, T. K. J. B. Gamage, and J. James, “Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 76, no. 18, pp. 3479–3496, Sep. 2019, doi: 10.1007/s00018-019-03104-6.
[86] M. Luckhardt *et al.*, “Effect of physiologic perfusion-fixation on the morphometrically evaluated dimensions of the term placental cotyledon,” *J. Soc. Gynecol. Investig.*, vol. 3, no. 4, pp. 166–171, Aug. 1996.
[87] N. P. Illsley, “Glucose transporters in the human placenta,” *Placenta*, vol. 21, no. 1, pp. 14–22, Jan. 2000, doi: 10.1053/plac.1999.0448.
[88] T. R. H. Regnault, B. de Vrijer, and F. C. Battaglia, “Transport and metabolism of amino acids in placenta,” *Endocrine*, vol. 19, no. 1, pp. 23–41, Oct. 2002, doi: 10.1385/ENDO:19:1:23.
[89] S. Lager and T. L. Powell, “Regulation of nutrient transport across the placenta,” *J Pregnancy*, vol. 2012, p. 179827, 2012, doi: 10.1155/2012/179827.
[90] J. Stulc, “Placental transfer of inorganic ions and water,” *Physiol. Rev.*, vol. 77, no. 3, pp. 805–836, Jul. 1997, doi: 10.1152/physrev.1997.77.3.805.
[91] H. J. McArdle, H. S. Andersen, H. Jones, and L. Gambling, “Copper and iron transport across the placenta: regulation and interactions,” *J. Neuroendocrinol.*, vol. 20, no. 4, pp. 427–431, Apr. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01658.x.
[92] N. E. Simister, “Placental transport of immunoglobulin G,” *Vaccine*, vol. 21, no. 24, pp. 3365–3369, Jul. 2003, doi: 10.1016/s0264-410x(03)00334-7.
[93] G. Banderali *et al.*, “Short and long term health effects of parental tobacco smoking during pregnancy and lactation: a descriptive review,” *J Transl Med*, vol. 13, p. 327, Oct. 2015, doi: 10.1186/s12967-015-0690-y.
[94] D. Pruett, E. H. Waterman, and A. B. Caughey, “Fetal alcohol exposure: consequences, diagnosis, and treatment,” *Obstet Gynecol Surv*, vol. 68, no. 1, pp. 62–69, Jan. 2013, doi: 10.1097/OGX.0b013e31827f238f.
[95] P. Wick *et al.*, “Barrier Capacity of Human Placenta for Nanosized Materials,” *Environ Health Perspect*, vol. 118, no. 3, pp. 432–436, Mar. 2010, doi: 10.1289/ehp.0901200.
[96] P. S. Shah, T. Balkhair, and Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm/LBW births, “Air pollution and birth outcomes: a systematic review,” *Environ Int*, vol. 37, no. 2, pp. 498–516, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.envint.2010.10.009.
[97] L. J. Salomon and V. Malan, “[Managing and identifying the causes of IUGR],” *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, vol. 42, no. 8, pp. 929–940, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.jgyn.2013.09.016.
[98] R. A. Salam, J. K. Das, and Z. A. Bhutta, “Impact of intrauterine growth restriction on long-term health,” *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, vol. 17, no. 3, pp. 249–254, May 2014, doi: 10.1097/MCO.0000000000000051.
[99] E. Lecarpentier, T. Fournier, J. Guibourdenche, and V. Tsatsaris, “[Pathophysiology of preeclampsia],” *Presse Med*, vol. 45, no. 7-8 Pt 1, pp. 631–637, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.lpm.2016.04.016.

[100] G. J. Burton, A. L. Fowden, and K. L. Thornburg, “Placental Origins of Chronic Disease,” *Physiol. Rev.*, vol. 96, no. 4, pp. 1509–1565, 2016, doi: 10.1152/physrev.00029.2015.
[101] D. J. Barker, “Fetal origins of coronary heart disease.,” *BMJ*, vol. 311, no. 6998, pp. 171–174, Jul. 1995.
[102] M. Mund, F. Louwen, D. Klingelhoefer, and A. Gerber, “Smoking and pregnancy--a review on the first major environmental risk factor of the unborn,” *Int J Environ Res Public Health*, vol. 10, no. 12, pp. 6485–6499, Nov. 2013, doi: 10.3390/ijerph10126485.
[103] W. A. Jedrychowski *et al.*, “Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and cognitive dysfunction in children,” *Environ Sci Pollut Res Int*, vol. 22, no. 5, pp. 3631–3639, Mar. 2015, doi: 10.1007/s11356-014-3627-8.
[104] M. Horii, O. Touma, T. Bui, and M. M. Parast, “Modeling human trophoblast, the placental epithelium at the maternal fetal interface,” *Reproduction*, vol. 160, no. 1, pp. R1–R11, Jul. 2020, doi: 10.1530/REP-19-0428.
[105] A. Malassiné, J. L. Frendo, and D. Evain-Brion, “A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model,” *Hum. Reprod. Update*, vol. 9, no. 6, pp. 531–539, Dec. 2003, doi: 10.1093/humupd/dmg043.
[106] J. Rossant and J. C. Cross, “Placental development: lessons from mouse mutants,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 2, no. 7, pp. 538–548, Jul. 2001, doi: 10.1038/35080570.
[107] H. J. Kliman, J. E. Nestler, E. Sermasi, J. M. Sanger, and J. F. Strauss, “Purification, Characterization, and in vitro Differentiation of Cytotrophoblasts from Human Term Placentae,” *Endocrinology*, vol. 118, no. 4, pp. 1567–1582, Apr. 1986, doi: 10.1210/endo-118-4-1567.
[108] K. T. Shiverick, A. King, H. Frank, G. S. Whitley, J. E. Cartwright, and H. Schneider, “Cell culture models of human trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report,” *Placenta*, vol. 22 Suppl A, pp. S104-106, Apr. 2001, doi: 10.1053/plac.2001.0647.
[109] H. G. Frank, D. W. Morrish, A. Pötgens, O. Genbacev, B. Kumpel, and I. Caniggia, “Cell culture models of human trophoblast: primary culture of trophoblast--a workshop report,” *Placenta*, vol. 22 Suppl A, pp. S107-109, Apr. 2001, doi: 10.1053/plac.2001.0644.
[110] R. A. Pattillo and G. O. Gey, “The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro,” *Cancer Res.*, vol. 28, no. 7, pp. 1231–1236, Jul. 1968.
[111] K. Orendi *et al.*, “Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia,” *Placenta*, vol. 32 Suppl, pp. S49-54, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.placenta.2010.11.023.
[112] M. W. Wolfe, “Culture and transfection of human choriocarcinoma cells,” *Methods Mol. Med.*, vol. 121, pp. 229–239, 2006, doi: 10.1385/1-59259-983-4:227.
[113] R. A. Pattillo *et al.*, “The hormone-synthesizing trophoblastic cell in vitro: a model for cancer research and placental hormone synthesis,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 172, no. 10, pp. 288–298, Jan. 1971, doi: 10.1111/j.1749-6632.1971.tb34942.x.
[114] L. Pavan *et al.*, “Human invasive trophoblasts transformed with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPARgamma in cell invasion process,” *Carcinogenesis*, vol. 24, no. 8, pp. 1325–1336, Aug. 2003, doi: 10.1093/carcin/bgg074.
[115] C. H. Graham *et al.*, “Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan,” *Exp. Cell Res.*, vol. 206, no. 2, pp. 204–211, Jun. 1993, doi: 10.1006/excr.1993.1139.
[116] J. A. Irving, J. J. Lysiak, C. H. Graham, S. Hearn, V. K. Han, and P. K. Lala, “Characteristics of trophoblast cells migrating from first trimester chorionic villus explants and

propagated in culture," *Placenta*, vol. 16, no. 5, pp. 413–433, Jul. 1995, doi: 10.1016/0143-4004(95)90100-0.
[117] L. Aengenheister *et al.*, "Gold nanoparticle distribution in advanced in vitro and ex vivo human placental barrier models," *J Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1, p. 79, Oct. 2018, doi: 10.1186/s12951-018-0406-6.
[118] C. Muoth *et al.*, "A 3D co-culture microtissue model of the human placenta for nanotoxicity assessment," *Nanoscale*, vol. 8, no. 39, pp. 17322–17332, Oct. 2016, doi: 10.1039/c6nr06749b.
[119] F. Yin, Y. Zhu, M. Zhang, H. Yu, W. Chen, and J. Qin, "A 3D human placenta-on-a-chip model to probe nanoparticle exposure at the placental barrier," *Toxicol In Vitro*, vol. 54, pp. 105–113, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.tiv.2018.08.014.
[120] M. E. Palmer, A. L. Watson, and G. J. Burton, "Morphological analysis of degeneration and regeneration of syncytiotrophoblast in first trimester placental villi during organ culture," *Hum. Reprod.*, vol. 12, no. 2, pp. 379–382, Feb. 1997, doi: 10.1093/humrep/12.2.379.
[121] R. K. Miller, O. Genbacev, M. A. Turner, J. D. Aplin, I. Caniggia, and B. Huppertz, "Human placental explants in culture: approaches and assessments," *Placenta*, vol. 26, no. 6, pp. 439–448, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.placenta.2004.10.002.
[122] P. Berveiller, S. Gil, and F. Vialard, "Placental perfusion: interest and limits," *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, vol. 30, no. 11, pp. 1347–1348, Jun. 2017, doi: 10.1080/14767058.2016.1213807.
[123] P. M. Mannucci, S. Harari, I. Martinelli, and M. Franchini, "Effects on health of air pollution: a narrative review," *Intern Emerg Med*, vol. 10, no. 6, pp. 657–662, Sep. 2015, doi: 10.1007/s11739-015-1276-7.
[124] D. Evain-Brion, P. Berveiller, and S. Gil, "Le passage transplacentaire des médicaments," *Therapies*, vol. 69, no. 1, pp. 3–11, Jan. 2014, doi: 10.2515/therapie/2014002.
[125] P. Grandjean *et al.*, "Life-Long Implications of Developmental Exposure to Environmental Stressors: New Perspectives," *Endocrinology*, vol. 156, no. 10, pp. 3408–3415, Oct. 2015, doi: 10.1210/EN.2015-1350.
[126] R. Morley, "Fetal origins of adult disease," *Semin Fetal Neonatal Med*, vol. 11, no. 2, pp. 73–78, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.siny.2005.11.001.
[127] P. D. Gluckman, M. A. Hanson, and F. M. Low, "The role of developmental plasticity and epigenetics in human health," *Birth Defects Res. C Embryo Today*, vol. 93, no. 1, pp. 12–18, Mar. 2011, doi: 10.1002/bdrc.20198.
[128] Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address: asrm@asrm.org and Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, "Smoking and infertility: a committee opinion," *Fertil. Steril.*, vol. 110, no. 4, pp. 611–618, 2018, doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.016.
[129] National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US) Office on Smoking and Health, *The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General*. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US), 2014.
[130] A. Burguet *et al.*, "The complex relationship between smoking in pregnancy and very preterm delivery. Results of the Epipage study," *BJOG*, vol. 111, no. 3, pp. 258–265, Mar. 2004, doi: 10.1046/j.1471-0528.2003.00037.x.
[131] G. Fantuzzi *et al.*, "Preterm delivery and exposure to active and passive smoking during pregnancy: a case-control study from Italy," *Paediatr Perinat Epidemiol*, vol. 21, no. 3, pp. 194–200, May 2007, doi: 10.1111/j.1365-3016.2007.00815.x.

[132] S. Cnattingius, “The epidemiology of smoking during pregnancy: smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes,” *Nicotine Tob. Res.*, vol. 6 Suppl 2, pp. S125-140, Apr. 2004, doi: 10.1080/14622200410001669187.
[133] J. R. DiFranza, C. A. Aligne, and M. Weitzman, “Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children’s health,” *Pediatrics*, vol. 113, no. 4 Suppl, pp. 1007–1015, Apr. 2004.
[134] M. Ernst, E. T. Moolchan, and M. L. Robinson, “Behavioral and neural consequences of prenatal exposure to nicotine,” *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, vol. 40, no. 6, pp. 630–641, Jun. 2001, doi: 10.1097/00004583-200106000-00007.
[135] K. M. Linnet *et al.*, “Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence,” *Am J Psychiatry*, vol. 160, no. 6, pp. 1028–1040, Jun. 2003, doi: 10.1176/appi.ajp.160.6.1028.
[136] I. K. Rumrich, M. Viluksela, K. Vähäkangas, M. Gissler, H.-M. Surcel, and O. Hänninen, “Maternal Smoking and the Risk of Cancer in Early Life - A Meta-Analysis,” *PLoS ONE*, vol. 11, no. 11, p. e0165040, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0165040.
[137] E. M. John, D. A. Savitz, and D. P. Sandler, “Prenatal exposure to parents’ smoking and childhood cancer,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 133, no. 2, pp. 123–132, Jan. 1991, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a115851.
[138] K. R. C. de Assis, M. S. P. Ladeira, R. C. A. Bueno, B. F. Dos Santos, I. Dalben, and D. M. F. Salvadori, “Genotoxicity of cigarette smoking in maternal and newborn lymphocytes,” *Mutat. Res.*, vol. 679, no. 1–2, pp. 72–78, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.02.006.
[139] T. Zdravkovic, O. Genbacev, M. T. McMaster, and S. J. Fisher, “The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review,” *Placenta*, vol. 26 Suppl A, pp. S81-86, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.placenta.2005.02.003.
[140] E. Jauniaux and G. J. Burton, “Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit,” *Early Hum. Dev.*, vol. 83, no. 11, pp. 699–706, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.earlhumdev.2007.07.016.
[141] D. Chelmow, D. E. Andrew, and E. R. Baker, “Maternal cigarette smoking and placenta previa,” *Obstet Gynecol*, vol. 87, no. 5 Pt 1, pp. 703–706, May 1996, doi: 10.1016/0029-7844(95)00471-8.
[142] S. Fa *et al.*, “Changes in first trimester fetal CYP1A1 and AHRR DNA methylation and mRNA expression in response to exposure to maternal cigarette smoking,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 57, pp. 19–27, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.etap.2017.11.007.
[143] O. Gruzieva *et al.*, “Epigenome-Wide Meta-Analysis of Methylation in Children Related to Prenatal NO2 Air Pollution Exposure,” *Environ. Health Perspect.*, vol. 125, no. 1, pp. 104–110, 2017, doi: 10.1289/EHP36.
[144] A. Yassi, T. Kjellström, T. de Kok, and T. L. Guidotti, *Basic Environmental Health*. Oxford University Press, 2001.
[145] N. Künzli, P. Laura, and R. Regula, *Air quality and health, Lausanne: European Respiratory Society*. 2010.
[146] J. Chang and D. Streitman, “Physiologic Adaptations to Pregnancy,” *Neurologic Clinics*, vol. 30, no. 3, pp. 781–789, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.ncl.2012.05.001.
[147] M. J. Nieuwenhuijsen, P. Dadvand, J. Grellier, D. Martinez, and M. Vrijheid, “Environmental risk factors of pregnancy outcomes: a summary of recent meta-analyses of epidemiological studies,” *Environ Health*, vol. 12, p. 6, Jan. 2013, doi: 10.1186/1476-069X-12-6.
[148] C. E. W. Herr *et al.*, “Exposure to air pollution in critical prenatal time windows and

IgE levels in newborns," *Pediatr Allergy Immunol*, vol. 22, no. 1 Pt 1, pp. 75–84, Feb. 2011, doi: 10.1111/j.1399-3038.2010.01074.x.
[149] Z. Hehua, C. Qing, G. Shanyan, W. Qijun, and Z. Yuhong, "The impact of prenatal exposure to air pollution on childhood wheezing and asthma: A systematic review," *Environ. Res.*, vol. 159, pp. 519–530, 2017, doi: 10.1016/j.envres.2017.08.038.
[150] C. Osmond and D. J. Barker, "Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women," *Environ. Health Perspect.*, vol. 108 Suppl 3, pp. 545–553, Jun. 2000, doi: 10.1289/ehp.00108s3545.
[151] K. J. Mathewson, C. H. T. Chow, K. G. Dobson, E. I. Pope, L. A. Schmidt, and R. J. Van Lieshout, "Mental health of extremely low birth weight survivors: A systematic review and meta-analysis," *Psychol Bull*, vol. 143, no. 4, pp. 347–383, 2017, doi: 10.1037/bul0000091.
[152] S. V. Glinianaia, J. Rankin, R. Bell, T. Pless-Mulloli, and D. Howel, "Particulate air pollution and fetal health: a systematic review of the epidemiologic evidence," *Epidemiology*, vol. 15, no. 1, pp. 36–45, Jan. 2004, doi: 10.1097/01.ede.0000101023.41844.ac.
[153] M. Pedersen *et al.*, "Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution," *Environ. Res.*, vol. 109, no. 8, pp. 1012–1020, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.envres.2009.08.011.
[154] F. Perera *et al.*, "In utero DNA damage from environmental pollution is associated with somatic gene mutation in newborns," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 11, no. 10 Pt 1, pp. 1134–1137, Oct. 2002.
[155] M. A. Orjuela *et al.*, "Prenatal PAH exposure is associated with chromosome-specific aberrations in cord blood," *Mutat. Res.*, vol. 703, no. 2, pp. 108–114, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.mrgentox.2010.08.004.
[156] J. B. Herbstman *et al.*, "Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo[a]pyrene-DNA adducts, and genomic DNA methylation in cord blood," *Environ. Health Perspect.*, vol. 120, no. 5, pp. 733–738, May 2012, doi: 10.1289/ehp.1104056.
[157] M. M. Veras *et al.*, "Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta," *Biol. Reprod.*, vol. 79, no. 3, pp. 578–584, Sep. 2008, doi: 10.1095/biolreprod.108.069591.
[158] M. Levario-Carrillo, D. Amato, P. Ostrosky-Wegman, C. González-Horta, Y. Corona, and L. H. Sanin, "Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation," *Chemosphere*, vol. 55, no. 10, pp. 1421–1427, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.chemosphere.2003.11.027.
[159] S. Dabrowski, W. Hanke, K. Polańska, T. Makowiec-Dabrowska, and W. Sobala, "Pesticide exposure and birthweight: an epidemiological study in Central Poland," *Int J Occup Med Environ Health*, vol. 16, no. 1, pp. 31–39, 2003.
[160] S. Lundstedt, "Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes," Jan. 2003.
[161] K. Skupińska, I. Misiewicz, and T. Kasprzycka-Guttman, "Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms," *Acta Pol Pharm*, vol. 61, no. 3, pp. 233–240, Jun. 2004.
[162] O. O. Alegbeleye, B. O. Opeolu, and V. A. Jackson, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation," *Environmental Management*, vol. 60, no. 4, pp. 758–783, Oct. 2017, doi: 10.1007/s00267-017-0896-2.
[163] D. M. Brunette and M. Katz, "The interactions of benzo(a)pyrene with cell

membranes: Uptake into chinese hamster ovary (CHO) cells and fluorescence studies with isolated membranes," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 11, no. 1, pp. 1–14, Jul. 1975, doi: 10.1016/0009-2797(75)90061-7.

[164] K. H. Jung *et al.*, "Effects of Heating Season on Residential Indoor and Outdoor Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Black Carbon, and Particulate Matter in an Urban Birth Cohort," *Atmos Environ (1994)*, vol. 44, no. 36, pp. 4545–4552, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.atmosenv.2010.08.024.

[165] Y. Ma and S. Harrad, "Spatiotemporal analysis and human exposure assessment on polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor air, settled house dust, and diet: A review," *Environ Int*, vol. 84, pp. 7–16, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.envint.2015.07.006.

[166] Y. S. Ding, J. Ward, D. Hammond, and C. H. Watson, "Mouth-level intake of benzo[a]pyrene from reduced nicotine cigarettes," *Int J Environ Res Public Health*, vol. 11, no. 11, pp. 11898–11914, Nov. 2014, doi: 10.3390/ijerph111111898.

[167] V. Bansal and K.-H. Kim, "Review of PAH contamination in food products and their health hazards," *Environ Int*, vol. 84, pp. 26–38, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.envint.2015.06.016.

[168] E. Saito, N. Tanaka, A. Miyazaki, and M. Tsuzaki, "Concentration and particle size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons formed by thermal cooking," *Food Chem*, vol. 153, pp. 285–291, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.055.

[169] A. Ramesh, F. Inyang, D. B. Hood, A. E. Archibong, M. E. Knuckles, and A. M. Nyanda, "Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(alpha)pyrene in F-344 rats following oral administration," *Exp. Toxicol. Pathol.*, vol. 53, no. 4, pp. 275–290, Sep. 2001, doi: 10.1078/0940-2993-00192.

[170] A. Ramesh, M. Greenwood, F. Inyang, and D. B. Hood, "Toxicokinetics of inhaled benzo[a]pyrene: plasma and lung bioavailability," *Inhal Toxicol*, vol. 13, no. 6, pp. 533–555, Jun. 2001, doi: 10.1080/08958370118859.

[171] H. W. Tyrer, E. T. Cantrell, R. Horres, I. P. Lee, W. B. Peirano, and R. M. Danner, "Benzo[a]pyrene metabolism in mice exposed to diesel exhaust: I. Uptake and distribution," *Environment International*, vol. 5, no. 4, pp. 307–311, Jan. 1981, doi: 10.1016/0160-4120(81)90075-1.

[172] M. Moreau and M. Bouchard, "Comparison of the kinetics of various biomarkers of benzo[a]pyrene exposure following different routes of entry in rats," *J Appl Toxicol*, vol. 35, no. 7, pp. 781–790, Jul. 2015, doi: 10.1002/jat.3070.

[173] A. Ramesh, S. A. Walker, D. B. Hood, M. D. Guillén, K. Schneider, and E. H. Weyand, "Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons," *Int. J. Toxicol.*, vol. 23, no. 5, pp. 301–333, 2004, doi: 10.1080/10915810490517063.

[174] D. Neubert and S. Tapken, "Transfer of benzo(a)pyrene into mouse embryos and fetuses," *Arch Toxicol*, vol. 62, no. 2, pp. 236–239, Mar. 1988, doi: 10.1007/BF00570149.

[175] J. R. Withey, J. Shedden, F. C. P. Law, and S. Abedini, "Distribution of benzo[a]pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 13, no. 3, pp. 193–202, 1993, doi: 10.1002/jat.2550130310.

[176] J. Wu, A. Ramesh, T. Nayyar, and D. B. Hood, "Assessment of metabolites and AhR and CYP1A1 mRNA expression subsequent to prenatal exposure to inhaled benzo(a)pyrene," *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 21, no. 6, pp. 333–346, Oct. 2003, doi: 10.1016/s0736-5748(03)00073-x.

[177] Y. Guo, X. Huo, K. Wu, J. Liu, Y. Zhang, and X. Xu, "Carcinogenic polycyclic aromatic

hydrocarbons in umbilical cord blood of human neonates from Guiyu, China," *Sci. Total Environ.*, vol. 427–428, pp. 35–40, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.007.
[178] V. Karttunen, P. Myllynen, G. Prochazka, O. Pelkonen, D. Segerbäck, and K. Vähäkangas, "Placental transfer and DNA binding of benzo(a)pyrene in human placental perfusion," *Toxicol. Lett.*, vol. 197, no. 2, pp. 75–81, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.toxlet.2010.04.028.
[179] E. Drwal, A. Rak, and E. L. Gregoraszczuk, "Review: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—Action on placental function and health risks in future life of newborns," *Toxicology*, vol. 411, pp. 133–142, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.tox.2018.10.003.
[180] N. D. Madhavan and K. A. Naidu, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta, maternal blood, umbilical cord blood and milk of Indian women," *Hum Exp Toxicol*, vol. 14, no. 6, pp. 503–506, Jun. 1995, doi: 10.1177/096032719501400607.
[181] B. C. Gladen, T. D. Zadorozhnaja, N. Chislovska, D. O. Hryhorczuk, M. C. Kennicutt, and R. E. Little, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta," *Hum Exp Toxicol*, vol. 19, no. 11, pp. 597–603, Nov. 2000, doi: 10.1191/096032700671433928.
[182] L. Zanieri *et al.*, "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: Influence of cigarette smoking and residential area," *Chemosphere*, vol. 67, no. 7, pp. 1265–1274, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.011.
[183] Y. Zhu *et al.*, "Prenatal Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Birth Weight in China," *Open Journal of Air Pollution*, vol. 3, no. 4, pp. 720–726, Dec. 2014, doi: 10.4236/ojap.2014.34010.
[184] E. Drwal, A. Rak, A. Grochowalski, T. Milewicz, and E. L. Gregoraszczuk, "Cell-specific and dose-dependent effects of PAHs on proliferation, cell cycle, and apoptosis protein expression and hormone secretion by placental cell lines," *Toxicol. Lett.*, vol. 280, pp. 10–19, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.toxlet.2017.08.002.
[185] K. Zajda *et al.*, "Effects of human blood levels of two PAH mixtures on the AHR signalling activation pathway and CYP1A1 and COMT target genes in granulosa non-tumor and granulosa tumor cell lines," *Toxicology*, vol. 389, pp. 1–12, 15 2017, doi: 10.1016/j.tox.2017.07.003.
[186] S. Santonicola *et al.*, "Comparative study on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in breast milk and infant formula and risk assessment," *Chemosphere*, vol. 175, pp. 383–390, May 2017, doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.084.
[187] N. Acharya, B. Gautam, S. Subbiah, M. M. Rogge, T. A. Anderson, and W. Gao, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in breast milk of obese vs normal women: Infant exposure and risk assessment," *Sci. Total Environ.*, vol. 668, pp. 658–667, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.02.381.
[188] K. W. Bock, "Homeostatic control of xeno- and endobiotics in the drug-metabolizing enzyme system," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 90, no. 1, pp. 1–6, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.bcp.2014.04.009.
[189] W. Xue and D. Warshawsky, "Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 206, no. 1, pp. 73–93, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.taap.2004.11.006.
[190] L. Zhang, Y. Jin, M. Huang, and T. M. Penning, "The Role of Human Aldo-Keto Reductases in the Metabolic Activation and Detoxication of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Interconversion of PAH Catechols and PAH o-Quinones," *Front Pharmacol*, vol. 3, p. 193, 2012, doi: 10.3389/fphar.2012.00193.
[191] U. M. Zanger and M. Schwab, "Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation,"

Pharmacol. Ther., vol. 138, no. 1, pp. 103–141, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.

[192] C. J. Omiecinski, J. P. Vanden Heuvel, G. H. Perdew, and J. M. Peters, "Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities," *Toxicol Sci*, vol. 120, no. suppl_1, pp. S49–S75, Mar. 2011, doi: 10.1093/toxsci/kfq338.

[193] D. Benford, M. Dinovi, and R. W. Setzer, "Application of the margin-of-exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic e.g.: benzo[a]pyrene and polycyclic aromatic hydrocarbons," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 48 Suppl 1, pp. S42-48, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.fct.2009.09.039.

[194] J. Hakkola *et al.*, "Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 51, no. 4, pp. 403–411, Feb. 1996, doi: 10.1016/0006-2952(95)02184-1.

[195] T. Shimada and Y. Fujii-Kuriyama, "Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1," *Cancer Sci.*, vol. 95, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2004, doi: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x.

[196] F. Henkler, K. Stolpmann, and A. Luch, "Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses," *Exp Suppl*, vol. 101, pp. 107–131, 2012, doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_5.

[197] K.-H. Kim, S. A. Jahan, E. Kabir, and R. J. C. Brown, "A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects," *Environment International*, vol. 60, pp. 71–80, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.envint.2013.07.019.

[198] T. Shimada, "Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons," *Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 21, no. 4, pp. 257–276, Aug. 2006, doi: 10.2133/dmpk.21.257.

[199] S. J. Kwack and B. Mu Lee, "Correlation between DNA or protein adducts and benzo[a]pyrene diol epoxide I–triglyceride adduct detected in vitro and in vivo," *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 4, pp. 629–632, Apr. 2000, doi: 10.1093/carcin/21.4.629.

[200] M. E. Knuckles, F. Inyang, and A. Ramesh, "Acute and subchronic oral toxicities of benzo[a]pyrene in F-344 rats," *Toxicol. Sci.*, vol. 61, no. 2, pp. 382–388, Jun. 2001, doi: 10.1093/toxsci/61.2.382.

[201] A. Fischer, L. M. Koeper, and H.-W. Vohr, "Specific antibody responses of primary cells from different cell sources are able to predict immunotoxicity in vitro," *Toxicol In Vitro*, vol. 25, no. 8, pp. 1966–1973, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.tiv.2011.06.020.

[202] W. H. Organization and I. P. on C. Safety, *Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons*. World Health Organization, 1998.

[203] P. K. Goyal, P. Verma, P. Sharma, J. Parmar, and A. Agarwal, "Evaluation of anti-cancer and anti-oxidative potential of Syzygium Cumini against benzo[a]pyrene (BaP) induced gastric carcinogenesis in mice," *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 11, no. 3, pp. 753–758, 2010.

[204] J.-S. Bae, K.-H. Jang, H. Yim, S.-C. Park, and H.-K. Jin, "Inhibitory effects of polysaccharides isolated from Phellinus gilvus on benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice," *World J. Gastroenterol.*, vol. 11, no. 4, pp. 577–579, Jan. 2005, doi: 10.3748/wjg.v11.i4.577.

[205] E. W. Y. Tung, N. A. Philbrook, C. L. Belanger, S. Ansari, and L. M. Winn, "Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: a possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity," *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, vol. 760, pp. 64–69, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.12.003.

[206] Y. Wu *et al.*, "Benzo(a)pyrene regulated A549 cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition by up-regulating long non-coding RNA linc00673," *Toxicol. Lett.*, vol. 320, pp. 37–45, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.toxlet.2019.11.024.
[207] H. Gao, G. Ye, Y. Lin, Y. Chi, and S. Dong, "Benzo[a]pyrene at human blood equivalent level induces human lung epithelial cell invasion and migration via aryl hydrocarbon receptor signaling," *J Appl Toxicol*, Mar. 2020, doi: 10.1002/jat.3969.
[208] Y. Wei *et al.*, "Benzo[a]pyrene promotes gastric cancer cell proliferation and metastasis likely through the Aryl hydrocarbon receptor and ERK-dependent induction of MMP9 and c-myc," *Int. J. Oncol.*, vol. 49, no. 5, pp. 2055–2063, Nov. 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3674.
[209] D. B. Barr, A. Bishop, and L. L. Needham, "Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit," *Reprod. Toxicol.*, vol. 23, no. 3, pp. 260–266, May 2007, doi: 10.1016/j.reprotox.2007.03.003.
[210] K. Annola, A. T. Heikkinen, H. Partanen, H. Woodhouse, D. Segerbäck, and K. Vähäkangas, "Transplacental transfer of nitrosodimethylamine in perfused human placenta," *Placenta*, vol. 30, no. 3, pp. 277–283, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.placenta.2008.12.012.
[211] T. Mose, L. E. Knudsen, M. Hedegaard, and G. K. Mortensen, "Transplacental transfer of monomethyl phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate in a human placenta perfusion system," *Int. J. Toxicol.*, vol. 26, no. 3, pp. 221–229, Jun. 2007, doi: 10.1080/10915810701352721.
[212] K. P. Miller, C. Borgeest, C. Greenfeld, D. Tomic, and J. A. Flaws, "In utero effects of chemicals on reproductive tissues in females," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 198, no. 2, pp. 111–131, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.taap.2003.07.016.
[213] G. E. Jules, S. Pratap, A. Ramesh, and D. B. Hood, "In utero exposure to benzo(a)pyrene predisposes offspring to cardiovascular dysfunction in later-life," *Toxicology*, vol. 295, no. 1–3, pp. 56–67, May 2012, doi: 10.1016/j.tox.2012.01.017.
[214] L. Ortiz, B. Nakamura, X. Li, B. Blumberg, and U. Luderer, "In utero exposure to benzo[a]pyrene increases adiposity and causes hepatic steatosis in female mice, and glutathione deficiency is protective," *Toxicol. Lett.*, vol. 223, no. 2, pp. 260–267, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.toxlet.2013.09.017.
[215] U. Luderer, M. J. Meier, G. W. Lawson, M. A. Beal, C. L. Yauk, and F. Marchetti, "In Utero Exposure to Benzo[a]pyrene Induces Ovarian Mutations at Doses That Deplete Ovarian Follicles in Mice," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 60, no. 5, pp. 410–420, 2019, doi: 10.1002/em.22261.
[216] X. Li *et al.*, "Exposure to benzo[a]pyrene impairs decidualization and decidual angiogenesis in mice during early pregnancy," *Environ. Pollut.*, vol. 222, pp. 523–531, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2016.11.029.
[217] A. E. Archibong *et al.*, "Alteration of pregnancy related hormones and fetal survival in F-344 rats exposed by inhalation to benzo(a)pyrene," *Reprod. Toxicol.*, vol. 16, no. 6, pp. 801–808, Dec. 2002, doi: 10.1016/s0890-6238(02)00058-8.
[218] Y. Zhao *et al.*, "Exposure of mice to benzo(a)pyrene impairs endometrial receptivity and reduces the number of implantation sites during early pregnancy," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 69, pp. 244–251, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.fct.2014.04.021.
[219] T. Duarte-Salles, M. A. Mendez, H. M. Meltzer, J. Alexander, and M. Haugen, "Dietary benzo(a)pyrene intake during pregnancy and birth weight: associations modified by vitamin C intakes in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa)," *Environ Int*, vol. 60, pp. 217–223, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.envint.2013.08.016.
[220] F. Perera, D. Tang, R. Whyatt, S. A. Lederman, and W. Jedrychowski, "DNA damage

from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo[a]pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from Northern Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and China," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 14, no. 3, pp. 709–714, Mar. 2005, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0457.

[221] J. Topinka *et al.*, "Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the foetus. Part I: bulky DNA adducts," *Mutat. Res.*, vol. 669, no. 1–2, pp. 13–19, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.04.011.

[222] M. K. Sanyal, D. Mercan, K. Belanger, and R. M. Santella, "DNA adducts in human placenta exposed to ambient environment and passive cigarette smoke during pregnancy," *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.*, vol. 79, no. 4, pp. 289–294, Apr. 2007, doi: 10.1002/bdra.20346.

[223] J. Wu, H. Hou, B. Ritz, and Y. Chen, "Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and missed abortion in early pregnancy in a Chinese population," *Sci. Total Environ.*, vol. 408, no. 11, pp. 2312–2318, May 2010, doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.02.028.

[224] F. P. Perera *et al.*, "A Summary of Recent Findings on Birth Outcomes and Developmental Effects of Prenatal ETS, PAH, and Pesticide Exposures," *NeuroToxicology*, vol. 26, no. 4, pp. 573–587, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.neuro.2004.07.007.

[225] Perera Frederica P. *et al.*, "Effect of Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Neurodevelopment in the First 3 Years of Life among Inner-City Children," *Environmental Health Perspectives*, vol. 114, no. 8, pp. 1287–1292, Aug. 2006, doi: 10.1289/ehp.9084.

[226] J. Pulkrabova *et al.*, "Relationship between atmospheric pollution in the residential area and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human breast milk," *Science of The Total Environment*, vol. 562, pp. 640–647, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.013.

[227] L. Liu *et al.*, "Benzo(a)pyrene inhibits migration and invasion of extravillous trophoblast HTR-8/SVneo cells via activation of the ERK and JNK pathway," *J Appl Toxicol*, vol. 36, no. 7, pp. 946–955, 2016, doi: 10.1002/jat.3227.

[228] J. S. Drukteinis, T. Medrano, E. A. Ablordeppey, J. M. Kitzman, and K. T. Shiverick, "Benzo[a]pyrene, but not 2,3,7,8-TCDD, induces G2/M cell cycle arrest, p21CIP1 and p53 phosphorylation in human choriocarcinoma JEG-3 cells: a distinct signaling pathway," *Placenta*, vol. 26 Suppl A, pp. S87-95, Apr. 2005, doi: 10.1016/j.placenta.2005.01.013.

[229] A. Wakx *et al.*, "New in vitro biomarkers to detect toxicity in human placental cells: The example of benzo[A]pyrene," *Toxicol In Vitro*, vol. 32, pp. 76–85, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.tiv.2015.11.022.

[230] E. Drwal, A. Rak, and E. L. Gregoraszczuk, "Differential effects of ambient PAH mixtures on cellular and steroidogenic properties of placental JEG-3 and BeWo cells," *Reprod. Toxicol.*, vol. 86, pp. 14–22, 2019, doi: 10.1016/j.reprotox.2019.03.003.

[231] R. Wang, W. Wang, L. Ao, Z. Wang, X. Hao, and H. Zhang, "Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide suppresses the migration and invasion of human extravillous trophoblast HTR-8/SVneo cells by down-regulating MMP2 through inhibition of FAK/SRC/PI3K/AKT pathway," *Toxicology*, vol. 386, pp. 72–83, 01 2017, doi: 10.1016/j.tox.2017.05.008.

[232] Z. Tian *et al.*, "Benzo[a]Pyrene-7, 8-Diol-9, 10-Epoxide Suppresses the Migration and Invasion of Human Extravillous Trophoblast Swan 71 Cells Due to the Inhibited Filopodia Formation and Down-Regulated PI3K/AKT/CDC42/PAK1 Pathway

Mediated by the Increased miR-194-3p," *Toxicol. Sci.*, vol. 166, no. 1, pp. 25–38, 01 2018, doi: 10.1093/toxsci/kfy182.
[233] M. Le Vee, E. Kolasa, E. Jouan, N. Collet, and O. Fardel, "Differentiation of human placental BeWo cells by the environmental contaminant benzo(a)pyrene," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 210, pp. 1–11, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.cbi.2013.12.004.
[234] S.-M. Kim, H.-M. Lee, K.-A. Hwang, and K.-C. Choi, "Benzo(a)pyrene induced cell cycle arrest and apoptosis in human choriocarcinoma cancer cells through reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum-stress pathway," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 107, no. Pt A, pp. 339–348, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.fct.2017.06.048.
[235] W. Wang, R. Wang, Q. Zhang, G. Mor, and H. Zhang, "Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induces human trophoblast Swan 71 cell dysfunctions due to cell apoptosis through disorder of mitochondrial fission/fusion," *Environ. Pollut.*, vol. 233, pp. 820–832, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2017.11.022.
[236] L. Zhang, E. E. Connor, N. Chegini, and K. T. Shiverick, "Modulation by benzo[a]pyrene of epidermal growth factor receptors, cell proliferation, and secretion of human chorionic gonadotropin in human placental cell lines," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 50, no. 8, pp. 1171–1180, Oct. 1995, doi: 10.1016/0006-2952(95)00253-v.
[237] L. Larigot, L. Juricek, J. Dairou, and X. Coumoul, "AhR signaling pathways and regulatory functions," *Biochim Open*, vol. 7, pp. 1–9, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.biopen.2018.05.001.
[238] T. Ikuta, H. Eguchi, T. Tachibana, Y. Yoneda, and K. Kawajiri, "Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 5, pp. 2895–2904, Jan. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.5.2895.
[239] E. C. Hoffman *et al.*, "Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor," *Science*, vol. 252, no. 5008, pp. 954–958, May 1991, doi: 10.1126/science.1852076.
[240] S. Jain, K. M. Dolwick, J. V. Schmidt, and C. A. Bradfield, "Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 50, pp. 31518–31524, Dec. 1994.
[241] O. Hankinson, "Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 433, no. 2, pp. 379–386, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.abb.2004.09.031.
[242] J. Yamamoto *et al.*, "Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells," *Life Sci.*, vol. 74, no. 8, pp. 1039–1049, Jan. 2004, doi: 10.1016/j.lfs.2003.07.022.
[243] Y. Jiang, K. Wang, R. Fang, and J. Zheng, "Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Placentas and Fetal Tissues," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 58, no. 8, p. 679, Aug. 2010, doi: 10.1369/jhc.2010.955955.
[244] L. Stejskalova *et al.*, "Aryl Hydrocarbon Receptor and Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator Expression in Human and Rat Placentas and Transcription Activity in Human Trophoblast Cultures," *Toxicol Sci*, vol. 123, no. 1, pp. 26–36, Sep. 2011, doi: 10.1093/toxsci/kfr150.
[245] H. Fan, X. Su, B. Yang, and A. Zhao, "Aryl hydrocarbon receptor and unexplained miscarriage," *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, vol. 43, no. 6, pp. 1029–1036, Jun. 2017, doi: 10.1111/jog.13309.
[246] E. Guyot, A. Chevallier, R. Barouki, and X. Coumoul, "The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications," *Drug Discovery Today*, vol. 18, no. 9–10, pp. 479–486, May 2013, doi: 10.1016/j.drudis.2012.11.014.

[247] J. R. Petrulis and G. H. Perdew, "The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 141, no. 1–2, pp. 25–40, Sep. 2002, doi: 10.1016/s0009-2797(02)00064-9.
[248] I. Pongratz, G. G. Mason, and L. Poellinger, "Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 19, pp. 13728–13734, Jul. 1992.
[249] M. R. Probst, S. Reisz-Porszasz, R. V. Agbunag, M. S. Ong, and O. Hankinson, "Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action," *Mol. Pharmacol.*, vol. 44, no. 3, pp. 511–518, Sep. 1993.
[250] K. W. Bock and C. Köhle, "Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 72, no. 4, pp. 393–404, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.bcp.2006.01.017.
[251] M. A. Sartor *et al.*, "Genomewide analysis of aryl hydrocarbon receptor binding targets reveals an extensive array of gene clusters that control morphogenetic and developmental programs," *Environ. Health Perspect.*, vol. 117, no. 7, pp. 1139–1146, Jul. 2009, doi: 10.1289/ehp.0800485.
[252] L. E. Wohak *et al.*, "Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons induce CYP1A1 in human cells via a p53-dependent mechanism," *Arch. Toxicol.*, vol. 90, no. 2, pp. 291–304, Feb. 2016, doi: 10.1007/s00204-014-1409-1.
[253] T. Baba *et al.*, "Structure and expression of the Ah receptor repressor gene," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 35, pp. 33101–33110, Aug. 2001, doi: 10.1074/jbc.M011497200.
[254] L. Stejskalova and P. Pavek, "The function of cytochrome P450 1A1 enzyme (CYP1A1) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the placenta," *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 12, no. 5, pp. 715–730, May 2011.
[255] M. S. Denison, A. A. Soshilov, G. He, D. E. DeGroot, and B. Zhao, "Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor," *Toxicol. Sci.*, vol. 124, no. 1, pp. 1–22, Nov. 2011, doi: 10.1093/toxsci/kfr218.
[256] A. Levine-Fridman, L. Chen, and C. J. Elferink, "Cytochrome P4501A1 promotes G1 phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity," *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, no. 2, pp. 461–469, Feb. 2004, doi: 10.1124/mol.65.2.461.
[257] A. Kimura *et al.*, "Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 9, pp. 2027–2035, Aug. 2009, doi: 10.1084/jem.20090560.
[258] W. Miao, L. Hu, P. J. Scrivens, and G. Batist, "Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 21, pp. 20340–20348, May 2005, doi: 10.1074/jbc.M412081200.
[259] H. L. Jin, Y. Choi, and K. W. Jeong, "Crosstalk between Aryl Hydrocarbon Receptor and Glucocorticoid Receptor in Human Retinal Pigment Epithelial Cells," *Int J Endocrinol*, vol. 2017, p. 5679517, 2017, doi: 10.1155/2017/5679517.
[260] P. Tarnow, T. Tralau, and A. Luch, "Chemical activation of estrogen and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways and their interaction in toxicology and metabolism," *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, vol. 15, no. 3, pp. 219–229, Mar. 2019, doi: 10.1080/17425255.2019.1569627.
[261] C. Tomkiewicz *et al.*, "The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites

through a non-genomic FAK/Src pathway," *Oncogene*, vol. 32, no. 14, pp. 1811–1820, Apr. 2013, doi: 10.1038/onc.2012.197.
[262] A. Mayati, E. Le Ferrec, D. Lagadic-Gossmann, and O. Fardel, "Aryl hydrocarbon receptor-independent up-regulation of intracellular calcium concentration by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human endothelial HMEC-1 cells," *Environ. Toxicol.*, vol. 27, no. 9, pp. 556–562, Sep. 2012, doi: 10.1002/tox.20675.
[263] A. Palatnik, H. Xin, and E. J. Su, "Dichotomous effects of aryl hydrocarbon receptor (AHR) activation on human fetoplacental endothelial cell function," *Placenta*, vol. 44, pp. 61–68, 2016, doi: 10.1016/j.placenta.2016.06.004.
[264] National Toxicology Program, "Polychlorinated biphenyls," *Rep Carcinog*, vol. 12, pp. 349–353, 2011.
[265] H. Ashida, S. Nishiumi, and I. Fukuda, "An update on the dietary ligands of the AhR," *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, vol. 4, no. 11, pp. 1429–1447, Nov. 2008, doi: 10.1517/17425255.4.11.1429.
[266] M. Murray, "Altered CYP expression and function in response to dietary factors: potential roles in disease pathogenesis," *Curr. Drug Metab.*, vol. 7, no. 1, pp. 67–81, Jan. 2006, doi: 10.2174/138920006774832569.
[267] L. P. Nguyen and C. A. Bradfield, "The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, no. 1, pp. 102–116, Jan. 2008, doi: 10.1021/tx7001965.
[268] D. Phelan, G. M. Winter, W. J. Rogers, J. C. Lam, and M. S. Denison, "Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 357, no. 1, pp. 155–163, Sep. 1998, doi: 10.1006/abbi.1998.0814.
[269] S. Heath-Pagliuso *et al.*, "Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites," *Biochemistry*, vol. 37, no. 33, pp. 11508–11515, Aug. 1998, doi: 10.1021/bi980087p.
[270] J. E. Cheong and L. Sun, "Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR Pathway for Cancer Immunotherapy - Challenges and Opportunities," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 39, no. 3, pp. 307–325, 2018, doi: 10.1016/j.tips.2017.11.007.
[271] W. G. Helferich and M. S. Denison, "Ultraviolet photoproducts of tryptophan can act as dioxin agonists," *Mol. Pharmacol.*, vol. 40, no. 5, pp. 674–678, Nov. 1991.
[272] A. Rannug and E. Fritsche, "The aryl hydrocarbon receptor and light," *Biol. Chem.*, vol. 387, no. 9, pp. 1149–1157, Sep. 2006, doi: 10.1515/BC.2006.143.
[273] A. Puga, C. Ma, and J. L. Marlowe, "The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 77, no. 4, pp. 713–722, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.bcp.2008.08.031.
[274] K. M. Dolwick, J. V. Schmidt, L. A. Carver, H. I. Swanson, and C. A. Bradfield, "Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA," *Mol. Pharmacol.*, vol. 44, no. 5, pp. 911–917, Nov. 1993.
[275] T. Ikuta, Y. Kobayashi, and K. Kawajiri, "Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 317, no. 2, pp. 545–550, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.03.076.
[276] X. Xing *et al.*, "SUMOylation of AhR modulates its activity and stability through inhibiting its ubiquitination," *J. Cell. Physiol.*, vol. 227, no. 12, pp. 3812–3819, Dec. 2012, doi: 10.1002/jcp.24092.
[277] B. Oesch-Bartlomowicz *et al.*, "Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 102, no. 26, pp. 9218–9223, Jun. 2005, doi: 10.1073/pnas.0503488102.

[278] T. Ikuta, T. Tachibana, J. Watanabe, M. Yoshida, Y. Yoneda, and K. Kawajiri, "Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor," *J. Biochem.*, vol. 127, no. 3, pp. 503–509, Mar. 2000, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022633.
[279] D. E. Conway *et al.*, "Expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human endothelial cells: regulation by fluid shear stress," *Cardiovasc. Res.*, vol. 81, no. 4, pp. 669–677, Mar. 2009, doi: 10.1093/cvr/cvn360.
[280] J. V. Giannone, W. Li, M. Probst, and A. B. Okey, "Prolonged depletion of AH receptor without alteration of receptor mRNA levels after treatment of cells in culture with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 55, no. 4, pp. 489–497, Feb. 1998, doi: 10.1016/s0006-2952(97)00493-0.
[281] N. A. Davarinos and R. S. Pollenz, "Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytosplasmic proteasome following nuclear export," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 40, pp. 28708–28715, Oct. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.40.28708.
[282] J. Mimura, M. Ema, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama, "Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function," *Genes Dev.*, vol. 13, no. 1, pp. 20–25, Jan. 1999, doi: 10.1101/gad.13.1.20.
[283] S. I. Karchner, D. G. Franks, W. H. Powell, and M. E. Hahn, "Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 9, pp. 6949–6959, Mar. 2002, doi: 10.1074/jbc.M110779200.
[284] B. R. Evans *et al.*, "Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator," *Mol. Pharmacol.*, vol. 73, no. 2, pp. 387–398, Feb. 2008, doi: 10.1124/mol.107.040204.
[285] D. W. Nebert, T. P. Dalton, A. B. Okey, and F. J. Gonzalez, "Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 23, pp. 23847–23850, Jun. 2004, doi: 10.1074/jbc.R400004200.
[286] K. W. Bock and C. Köhle, "Coordinate regulation of drug metabolism by xenobiotic nuclear receptors: UGTs acting together with CYPs and glucuronide transporters," *Drug Metab. Rev.*, vol. 36, no. 3–4, pp. 595–615, Oct. 2004, doi: 10.1081/dmr-200033455.
[287] M. Cella and M. Colonna, "Aryl Hydrocarbon Receptor: linking environment to immunity," *Seminars in immunology*, vol. 27, no. 5, p. 310, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.smim.2015.10.002.
[288] J. V. Schmidt, G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon, and C. A. Bradfield, "Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 93, no. 13, pp. 6731–6736, Jun. 1996, doi: 10.1073/pnas.93.13.6731.
[289] A. K. Lund, M. B. Goens, N. L. Kanagy, and M. K. Walker, "Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 193, no. 2, pp. 177–187, Dec. 2003, doi: 10.1016/j.taap.2003.08.008.
[290] P.-Y. Wu *et al.*, "Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor by Kynurenine Impairs Progression and Metastasis of Neuroblastoma," *Cancer Res.*, vol. 79, no. 21, pp. 5550–5562, Nov. 2019, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3272.
[291] P. Yakkundi, E. Gonsalves, M. Galou-Lameyer, M. J. Selby, and W. K. Chan, "Aryl hydrocarbon receptor acts as a tumor suppressor in a syngeneic MC38 colon carcinoma tumor model," *Hypoxia (Auckl)*, vol. 7, pp. 1–16, 2019, doi:

10.2147/HP.S196301.
[292] I. A. Murray, R. G. Nichols, L. Zhang, A. D. Patterson, and G. H. Perdew, "Expression of the aryl hydrocarbon receptor contributes to the establishment of intestinal microbial community structure in mice," *Sci Rep*, vol. 6, p. 33969, Sep. 2016, doi: 10.1038/srep33969.
[293] X. Wang *et al.*, "Role of the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway in promoting mitochondrial biogenesis against oxidative damage in human melanocytes," *J. Dermatol. Sci.*, vol. 96, no. 1, pp. 33–41, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.09.001.
[294] T. Baba *et al.*, "Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 22, pp. 10040–10051, Nov. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.22.10040-10051.2005.
[295] F. J. Quintana *et al.*, "Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor," *Nature*, vol. 453, no. 7191, pp. 65–71, May 2008, doi: 10.1038/nature06880.
[296] K. Hao *et al.*, "Possible role of the 'IDO-AhR axis' in maternal-foetal tolerance," *Cell Biol Int*, vol. 37, no. 2, pp. 105–108, Feb. 2013, doi: 10.1002/cbin.10023.
[297] Y. Li, K. Wang, Q.-Y. Zou, C. Zhou, R. R. Magness, and J. Zheng, "A possible role of aryl hydrocarbon receptor in spontaneous preterm birth," *Med. Hypotheses*, vol. 84, no. 5, pp. 494–497, May 2015, doi: 10.1016/j.mehy.2015.02.001.
[298] Z. Yu *et al.*, "In utero exposure of mice to dibenzo[a,l]pyrene produces lymphoma in the offspring: role of the aryl hydrocarbon receptor," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 2, pp. 755–762, Jan. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3390.
[299] B. J. Lew, R. Manickam, and B. P. Lawrence, "Activation of the aryl hydrocarbon receptor during pregnancy in the mouse alters mammary development through direct effects on stromal and epithelial tissues," *Biol. Reprod.*, vol. 84, no. 6, pp. 1094–1102, Jun. 2011, doi: 10.1095/biolreprod.110.087544.
[300] M. Viluksela and R. Pohjanvirta, "Multigenerational and Transgenerational Effects of Dioxins," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 12, Jun. 2019, doi: 10.3390/ijms20122947.
[301] C. Buzea, I. I. Pacheco, and K. Robbie, "Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity," *Biointerphases*, vol. 2, no. 4, pp. MR17-71, Dec. 2007, doi: 10.1116/1.2815690.
[302] A. Albanese, P. S. Tang, and W. C. W. Chan, "The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems," *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 14, pp. 1–16, 2012, doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124.
[303] H. L. Karlsson, J. Gustafsson, P. Cronholm, and L. Möller, "Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size," *Toxicol. Lett.*, vol. 188, no. 2, pp. 112–118, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.toxlet.2009.03.014.
[304] V. Forest, L. Leclerc, J.-F. Hochepied, A. Trouvé, G. Sarry, and J. Pourchez, "Impact of cerium oxide nanoparticles shape on their in vitro cellular toxicity," *Toxicol In Vitro*, vol. 38, pp. 136–141, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.tiv.2016.09.022.
[305] C. F. Jones and D. W. Grainger, "In vitro assessments of nanomaterial toxicity," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 6, pp. 438–456, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.addr.2009.03.005.
[306] S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, and S. Seal, "Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential," *Biomaterials*, vol. 28, no. 31, pp. 4600–4607, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.029.
[307] A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis, and J. M. Perez, "Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 4, no. 9,

pp. 5321–5331, Sep. 2010, doi: 10.1021/nn100816s.
[308] A. M. Bannunah, D. Vllasaliu, J. Lord, and S. Stolnik, "Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge," *Mol. Pharmaceutics*, vol. 11, no. 12, pp. 4363–4373, Dec. 2014, doi: 10.1021/mp500439c.
[309] A. Bruinink, J. Wang, and P. Wick, "Effect of particle agglomeration in nanotoxicology," *Arch. Toxicol.*, vol. 89, no. 5, pp. 659–675, May 2015, doi: 10.1007/s00204-015-1460-6.
[310] B. Halamoda-Kenzaoui *et al.*, "The agglomeration state of nanoparticles can influence the mechanism of their cellular internalisation," *J Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, p. 48, Jun. 2017, doi: 10.1186/s12951-017-0281-6.
[311] A. E. Nel *et al.*, "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface," *Nat Mater*, vol. 8, no. 7, pp. 543–557, Jul. 2009, doi: 10.1038/nmat2442.
[312] P. Borm *et al.*, "Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles," *Toxicol. Sci.*, vol. 90, no. 1, pp. 23–32, Mar. 2006, doi: 10.1093/toxsci/kfj084.
[313] L. Soddu *et al.*, "Identification of physicochemical properties that modulate nanoparticle aggregation in blood," *Beilstein J Nanotechnol*, vol. 11, pp. 550–567, 2020, doi: 10.3762/bjnano.11.44.
[314] X. Wang, T. Sun, H. Zhu, T. Han, J. Wang, and H. Dai, "Roles of pH, cation valence, and ionic strength in the stability and aggregation behavior of zinc oxide nanoparticles," *J. Environ. Manage.*, vol. 267, p. 110656, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.jenvman.2020.110656.
[315] H. Zhang, B. Gilbert, F. Huang, and J. F. Banfield, "Water-driven structure transformation in nanoparticles at room temperature," *Nature*, vol. 424, no. 6952, pp. 1025–1029, Aug. 2003, doi: 10.1038/nature01845.
[316] G. Oberdörster, "Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology," *J. Intern. Med.*, vol. 267, no. 1, pp. 89–105, Jan. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x.
[317] R. Y. Prasad *et al.*, "Investigating oxidative stress and inflammatory responses elicited by silver nanoparticles using high-throughput reporter genes in HepG2 cells: effect of size, surface coating, and intracellular uptake," *Toxicol In Vitro*, vol. 27, no. 6, pp. 2013–2021, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.tiv.2013.07.005.
[318] N. Ould-Moussa, M. Safi, M.-A. Guedeau-Boudeville, D. Montero, H. Conjeaud, and J.-F. Berret, "In vitro toxicity of nanoceria: effect of coating and stability in biofluids," *Nanotoxicology*, vol. 8, no. 7, pp. 799–811, Nov. 2014, doi: 10.3109/17435390.2013.831501.
[319] N. Liu, M. Tang, and J. Ding, "The interaction between nanoparticles-protein corona complex and cells and its toxic effect on cells," *Chemosphere*, vol. 245, p. 125624, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125624.
[320] T. Cedervall *et al.*, "Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, no. 7, pp. 2050–2055, Feb. 2007, doi: 10.1073/pnas.0608582104.
[321] Z. J. Deng, G. Mortimer, T. Schiller, A. Musumeci, D. Martin, and R. F. Minchin, "Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 45, p. 455101, Nov. 2009, doi: 10.1088/0957-4484/20/45/455101.
[322] E. Fröhlich, T. Kueznik, C. Samberger, E. Roblegg, C. Wrighton, and T. R. Pieber, "Size-dependent effects of nanoparticles on the activity of cytochrome P450 isoenzymes," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 242, no. 3, pp. 326–332, Feb. 2010, doi:

10.1016/j.taap.2009.11.002.
[323] M. Horie *et al.*, "Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 22, no. 3, pp. 543–553, Mar. 2009, doi: 10.1021/tx800289z.
[324] C. D. Walkey and W. C. W. Chan, "Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment," *Chem Soc Rev*, vol. 41, no. 7, pp. 2780–2799, Apr. 2012, doi: 10.1039/c1cs15233e.
[325] K. Donaldson, V. Stone, C. Tran, W. Kreyling, and P. Borm, "Nanotoxicology," *Occup Environ Med*, vol. 61, no. 9, pp. 727–728, Sep. 2004, doi: 10.1136/oem.2004.013243.
[326] A. Zielińska *et al.*, "Nanotoxicology and Nanosafety: Safety-By-Design and Testing at a Glance," *Int J Environ Res Public Health*, vol. 17, no. 13, Jun. 2020, doi: 10.3390/ijerph17134657.
[327] E. Fröhlich, "Cellular elimination of nanoparticles," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 46, pp. 90–94, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.etap.2016.07.003.
[328] R. Sakhtianchi, R. F. Minchin, K.-B. Lee, A. M. Alkilany, V. Serpooshan, and M. Mahmoudi, "Exocytosis of nanoparticles from cells: role in cellular retention and toxicity," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 201–202, pp. 18–29, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.cis.2013.10.013.
[329] F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger, and B. Nowack, "Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world," *J Nanopart Res*, vol. 14, no. 9, p. 1109, Aug. 2012, doi: 10.1007/s11051-012-1109-9.
[330] A. S. Karakoti *et al.*, "Preparation and Characterization Challenges to Understanding Environmental and Biological Impacts of Nanoparticles," *Surf Interface Anal*, vol. 44, no. 5, pp. 882–889, Aug. 2012, doi: 10.1002/sia.5006.
[331] N. Thakur, P. Manna, and J. Das, "Synthesis and biomedical applications of nanoceria, a redox active nanoparticle," *J Nanobiotechnology*, vol. 17, no. 1, p. 84, Jul. 2019, doi: 10.1186/s12951-019-0516-9.
[332] S. Das, J. M. Dowding, K. E. Klump, J. F. McGinnis, W. Self, and S. Seal, "Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine," *Nanomedicine*, vol. 8, no. 9, pp. 1483–1508, Aug. 2013, doi: 10.2217/nnm.13.133.
[333] T. Suzuki, I. Kosacki, H. U. Anderson, and P. Colomban, "Electrical Conductivity and Lattice Defects in Nanocrystalline Cerium Oxide Thin Films," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 84, no. 9, pp. 2007–2014, 2001, doi: 10.1111/j.1151-2916.2001.tb00950.x.
[334] A. Abdal Dayem *et al.*, "The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 1, p. 120, Jan. 2017, doi: 10.3390/ijms18010120.
[335] M. Schieber and N. S. Chandel, "ROS function in redox signaling and oxidative stress," *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 10, pp. R453-462, May 2014, doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
[336] C. Xu and X. Qu, "Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications," *NPG Asia Materials*, vol. 6, no. 3, Art. no. 3, Mar. 2014, doi: 10.1038/am.2013.88.
[337] A. Filippi *et al.*, "Antioxidant activity of cerium dioxide nanoparticles and nanorods in scavenging hydroxyl radicals," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 20, pp. 11077–11081, Apr. 2019, doi: 10.1039/C9RA00642G.
[338] K. Reed *et al.*, "Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom?," *Environmental Science: Nano*, vol. 1, no. 5, pp. 390–405, 2014, doi: 10.1039/C4EN00079J.
[339] F. R. Cassee *et al.*, "Exposure, Health and Ecological Effects Review of Engineered

Nanoscale Cerium and Cerium Oxide Associated with its Use as a Fuel Additive," *Critical Reviews in Toxicology*, vol. 41, no. 3, pp. 213–229, Mar. 2011, doi: 10.3109/10408444.2010.529105.
[340] J. J. Zhang *et al.*, "Effects of a nanoceria fuel additive on the physicochemical properties of diesel exhaust particles," *Environ Sci Process Impacts*, vol. 18, no. 10, pp. 1333–1342, Oct. 2016, doi: 10.1039/c6em00337k.
[341] M. V. Kumar, A. V. Babu, and P. R. Kumar, "Influence of metal-based cerium oxide nanoparticle additive on performance, combustion, and emissions with biodiesel in diesel engine," *Environ Sci Pollut Res Int*, vol. 26, no. 8, pp. 7651–7664, Mar. 2019, doi: 10.1007/s11356-018-04075-0.
[342] J. Zhang *et al.*, "Impacts of a nanosized ceria additive on diesel engine emissions of particulate and gaseous pollutants," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, no. 22, pp. 13077–13085, Nov. 2013, doi: 10.1021/es402140u.
[343] A. Böhlandt *et al.*, "High concentrations of cadmium, cerium and lanthanum in indoor air due to environmental tobacco smoke," *Sci. Total Environ.*, vol. 414, pp. 738–741, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.017.
[344] J. A. Vassie, J. M. Whitelock, and M. S. Lord, "Targeted Delivery and Redox Activity of Folic Acid-Functionalized Nanoceria in Tumor Cells," *Mol. Pharm.*, vol. 15, no. 3, pp. 994–1004, 05 2018, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00920.
[345] H. Li *et al.*, "Nanoceria-Mediated Drug Delivery for Targeted Photodynamic Therapy on Drug-Resistant Breast Cancer," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 8, no. 46, pp. 31510–31523, Nov. 2016, doi: 10.1021/acsami.6b07338.
[346] M. Shokrzadeh, H. Abdi, A. Asadollah-Pour, and F. Shaki, "Nanoceria Attenuated High Glucose-Induced Oxidative Damage in HepG2 Cells," *Cell J*, vol. 18, no. 1, pp. 97–102, 2016, doi: 10.22074/cellj.2016.3992.
[347] Z. Vafaei-Pour, M. Shokrzadeh, M. Jahani, and F. Shaki, "Embryo-Protective Effects of Cerium Oxide Nanoparticles against Gestational Diabetes in Mice," *Iran J Pharm Res*, vol. 17, no. 3, pp. 964–975, 2018.
[348] S. Naz *et al.*, "Cerium oxide nanoparticles: a 'radical' approach to neurodegenerative disease treatment," *Nanomedicine (Lond)*, vol. 12, no. 5, pp. 545–553, Mar. 2017, doi: 10.2217/nnm-2016-0399.
[349] A. Tisi, M. Passacantando, L. Lozzi, S. Riccitelli, S. Bisti, and R. Maccarone, "Retinal long term neuroprotection by Cerium Oxide nanoparticles after an acute damage induced by high intensity light exposure," *Exp. Eye Res.*, vol. 182, pp. 30–38, 2019, doi: 10.1016/j.exer.2019.03.003.
[350] L. Kong *et al.*, "Nanoceria extend photoreceptor cell lifespan in tubby mice by modulation of apoptosis/survival signaling pathways," *Neurobiol. Dis.*, vol. 42, no. 3, pp. 514–523, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.nbd.2011.03.004.
[351] J. Modrzynska *et al.*, "In vivo-induced size transformation of cerium oxide nanoparticles in both lung and liver does not affect long-term hepatic accumulation following pulmonary exposure," *PLoS ONE*, vol. 13, no. 8, p. e0202477, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0202477.
[352] D. Li *et al.*, "In vivo biodistribution and physiologically based pharmacokinetic modeling of inhaled fresh and aged cerium oxide nanoparticles in rats," *Part Fibre Toxicol*, vol. 13, no. 1, p. 45, 20 2016, doi: 10.1186/s12989-016-0156-2.
[353] L. Geraets, A. G. Oomen, J. D. Schroeter, V. A. Coleman, and F. R. Cassee, "Tissue distribution of inhaled micro- and nano-sized cerium oxide particles in rats: results from a 28-day exposure study," *Toxicol. Sci.*, vol. 127, no. 2, pp. 463–473, Jun. 2012, doi: 10.1093/toxsci/kfs113.

[354] M. T. Tseng *et al.*, "Alteration of hepatic structure and oxidative stress induced by intravenous nanoceria," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 260, no. 2, pp. 173–182, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.taap.2012.02.008.
[355] K. Park, J. Park, H. Lee, J. Choi, W.-J. Yu, and J. Lee, "Toxicity and tissue distribution of cerium oxide nanoparticles in rats by two different routes: single intravenous injection and single oral administration," *Arch. Pharm. Res.*, vol. 41, no. 11, pp. 1108–1116, Nov. 2018, doi: 10.1007/s12272-018-1074-7.
[356] M. Mauro *et al.*, "Cerium Oxide Nanoparticles Absorption through Intact and Damaged Human Skin," *Molecules*, vol. 24, no. 20, Oct. 2019, doi: 10.3390/molecules24203759.
[357] Y. Li, H. Yu, P. Li, and Y. Bian, "Assessment the Exposure Level of Rare Earth Elements in Workers Producing Cerium, Lanthanum Oxide Ultrafine and Nanoparticles," *Biol Trace Elem Res*, vol. 175, no. 2, pp. 298–305, Feb. 2017, doi: 10.1007/s12011-016-0795-z.
[358] A. Srinivas, P. J. Rao, G. Selvam, P. B. Murthy, and P. N. Reddy, "Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats," *Toxicol. Lett.*, vol. 205, no. 2, pp. 105–115, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.toxlet.2011.05.1027.
[359] Y. Morimoto *et al.*, "Pulmonary toxicity of well-dispersed cerium oxide nanoparticles following intratracheal instillation and inhalation," *J Nanopart Res*, vol. 17, no. 11, p. 442, 2015, doi: 10.1007/s11051-015-3249-1.
[360] D. Schwotzer *et al.*, "Effects from a 90-day inhalation toxicity study with cerium oxide and barium sulfate nanoparticles in rats," *Part Fibre Toxicol*, vol. 14, no. 1, p. 23, 12 2017, doi: 10.1186/s12989-017-0204-6.
[361] C. Guo *et al.*, "Pulmonary toxicity of inhaled nano-sized cerium oxide aerosols in Sprague-Dawley rats," *Nanotoxicology*, vol. 13, no. 6, pp. 733–750, 2019, doi: 10.1080/17435390.2018.1554751.
[362] K. M. Rice *et al.*, "Exposure to Cerium Oxide Nanoparticles Is Associated With Activation of Mitogen-activated Protein Kinases Signaling and Apoptosis in Rat Lungs," *J Prev Med Public Health*, vol. 48, no. 3, pp. 132–141, May 2015, doi: 10.3961/jpmph.15.006.
[363] J. Y. Ma *et al.*, "Induction of pulmonary fibrosis by cerium oxide nanoparticles," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 262, no. 3, pp. 255–264, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.taap.2012.05.005.
[364] M. Kumari, S. I. Kumari, and P. Grover, "Genotoxicity analysis of cerium oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration," *Mutagenesis*, vol. 29, no. 6, pp. 467–479, Nov. 2014, doi: 10.1093/mutage/geu038.
[365] A. Nemmar, P. Yuvaraju, S. Beegam, M. A. Fahim, and B. H. Ali, "Cerium Oxide Nanoparticles in Lung Acutely Induce Oxidative Stress, Inflammation, and DNA Damage in Various Organs of Mice," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2017, p. 9639035, 2017, doi: 10.1155/2017/9639035.
[366] S. J. Snow *et al.*, "Inhaled diesel emissions generated with cerium oxide nanoparticle fuel additive induce adverse pulmonary and systemic effects," *Toxicol. Sci.*, vol. 142, no. 2, pp. 403–417, Dec. 2014, doi: 10.1093/toxsci/kfu187.
[367] K. Meldrum *et al.*, "Diesel exhaust particle and dust mite induced airway inflammation is modified by cerium dioxide nanoparticles," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 73, p. 103273, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.etap.2019.103273.
[368] S. Behzadi *et al.*, "Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 46, no. 14, pp. 4218–4244, Jul. 2017, doi: 10.1039/C6CS00636A.
[369] S. Singh, A. Kumar, A. Karakoti, S. Seal, and W. T. Self, "Unveiling the mechanism of uptake and sub-cellular distribution of cerium oxide nanoparticles," *Mol Biosyst*, vol.

6, no. 10, pp. 1813–1820, Oct. 2010, doi: 10.1039/c0mb00014k.
[370] J. Mazzolini *et al.*, "Protein Corona Modulates Uptake and Toxicity of Nanoceria via Clathrin-Mediated Endocytosis," *Biol. Bull.*, vol. 231, no. 1, pp. 40–60, 2016, doi: 10.1086/689590.
[371] J. A. Vassie, J. M. Whitelock, and M. S. Lord, "Endocytosis of cerium oxide nanoparticles and modulation of reactive oxygen species in human ovarian and colon cancer cells," *Acta Biomater*, vol. 50, pp. 127–141, 01 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2016.12.010.
[372] C. Strobel, H. Oehring, R. Herrmann, M. Förster, A. Reller, and I. Hilger, "Fate of cerium dioxide nanoparticles in endothelial cells: exocytosis," *J Nanopart Res*, vol. 17, no. 5, p. 206, 2015, doi: 10.1007/s11051-015-3007-4.
[373] B. Rzigalinski *et al.*, "Cerium oxide nanoparticles increase the lifespan of cultured brain cells and protect against free radical and mechanical trauma," *FASEB J*, vol. 17, p. A606, Jan. 2003.
[374] A. L. Popov, N. R. Popova, I. I. Selezneva, A. Y. Akkizov, and V. K. Ivanov, "Cerium oxide nanoparticles stimulate proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts in vitro," *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 68, pp. 406–413, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.05.103.
[375] S.-M. Tsai *et al.*, "CeO2 nanoparticles attenuate airway mucus secretion induced by TiO2 nanoparticles," *Sci. Total Environ.*, vol. 631–632, pp. 262–269, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.001.
[376] N. Eskandari *et al.*, "Biophysical, docking, and cellular studies on the effects of cerium oxide nanoparticles on blood components: in vitro," *Int J Nanomedicine*, vol. 13, pp. 4575–4589, 2018, doi: 10.2147/IJN.S172162.
[377] L. Vila *et al.*, "Effects of cerium oxide nanoparticles on differentiated/undifferentiated human intestinal Caco-2 cells," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 283, pp. 38–46, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.cbi.2018.01.018.
[378] S. Das *et al.*, "The induction of angiogenesis by cerium oxide nanoparticles through the modulation of oxygen in intracellular environments," *Biomaterials*, vol. 33, no. 31, pp. 7746–7755, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.019.
[379] S. Giri *et al.*, "Nanoceria: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, p. e54578, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0054578.
[380] A. R. Gliga *et al.*, "Cerium oxide nanoparticles inhibit differentiation of neural stem cells," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 9284, 24 2017, doi: 10.1038/s41598-017-09430-8.
[381] L. Préaubert *et al.*, "Very low concentration of cerium dioxide nanoparticles induce DNA damage, but no loss of vitality, in human spermatozoa," *Toxicol In Vitro*, vol. 50, pp. 236–241, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.tiv.2018.03.013.
[382] L. Benameur *et al.*, "DNA damage and oxidative stress induced by CeO2 nanoparticles in human dermal fibroblasts: Evidence of a clastogenic effect as a mechanism of genotoxicity," *Nanotoxicology*, vol. 9, no. 6, pp. 696–705, 2015, doi: 10.3109/17435390.2014.968889.
[383] D. Ali, S. Alarifi, S. Alkahtani, A. A. AlKahtane, and A. Almalik, "Cerium Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Genotoxicity in Human Skin Melanoma Cells," *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 71, no. 3, pp. 1643–1651, Apr. 2015, doi: 10.1007/s12013-014-0386-6.
[384] S. Mittal and A. K. Pandey, "Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis," *Biomed Res Int*, vol. 2014, p. 891934, 2014, doi: 10.1155/2014/891934.
[385] S. Del Turco *et al.*, "Effects of cerium oxide nanoparticles on hemostasis: Coagulation,

platelets, and vascular endothelial cells," *J Biomed Mater Res A*, vol. 107, no. 7, pp. 1551–1562, 2019, doi: 10.1002/jbm.a.36669.
[386] A. Azari, M. Shokrzadeh, E. Zamani, N. Amani, and F. Shaki, "Cerium oxide nanoparticles protects against acrylamide induced toxicity in HepG2 cells through modulation of oxidative stress," *Drug Chem Toxicol*, vol. 42, no. 1, pp. 54–59, Jan. 2019, doi: 10.1080/01480545.2018.1477793.
[387] J. Niu, K. Wang, and P. E. Kolattukudy, "Cerium oxide nanoparticles inhibit oxidative stress and nuclear factor-κB activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 338, no. 1, pp. 53–61, Jul. 2011, doi: 10.1124/jpet.111.179978.
[388] B. C. Nelson, M. E. Johnson, M. L. Walker, K. R. Riley, and C. M. Sims, "Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine," *Antioxidants (Basel)*, vol. 5, no. 2, May 2016, doi: 10.3390/antiox5020015.
[389] M. S. Lord *et al.*, "Cellular uptake and reactive oxygen species modulation of cerium oxide nanoparticles in human monocyte cell line U937," *Biomaterials*, vol. 33, no. 31, pp. 7915–7924, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.024.
[390] S. Chen, Y. Hou, G. Cheng, C. Zhang, S. Wang, and J. Zhang, "Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress," *Biol Trace Elem Res*, vol. 154, no. 1, pp. 156–166, Jul. 2013, doi: 10.1007/s12011-013-9678-8.
[391] R. Singh, A. S. Karakoti, W. Self, S. Seal, and S. Singh, "Redox-Sensitive Cerium Oxide Nanoparticles Protect Human Keratinocytes from Oxidative Stress Induced by Glutathione Depletion," *Langmuir*, vol. 32, no. 46, pp. 12202–12211, 22 2016, doi: 10.1021/acs.langmuir.6b03022.
[392] L. Rubio, B. Annangi, L. Vila, A. Hernández, and R. Marcos, "Antioxidant and anti-genotoxic properties of cerium oxide nanoparticles in a pulmonary-like cell system," *Arch. Toxicol.*, vol. 90, no. 2, pp. 269–278, Feb. 2016, doi: 10.1007/s00204-015-1468-y.
[393] H.-J. Eom and J. Choi, "Oxidative stress of CeO2 nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B," *Toxicol. Lett.*, vol. 187, no. 2, pp. 77–83, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.toxlet.2009.01.028.
[394] V. Höllriegl *et al.*, "Measurement of cerium in human breast milk and blood samples," *J Trace Elem Med Biol*, vol. 24, no. 3, pp. 193–199, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.jtemb.2010.03.001.
[395] J. Wei *et al.*, "Concentrations of rare earth elements in maternal serum during pregnancy and risk for fetal neural tube defects," *Environ Int*, vol. 137, p. 105542, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.envint.2020.105542.
[396] P. Heitland and H. D. Köster, "Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS," *J Trace Elem Med Biol*, vol. 20, no. 4, pp. 253–262, 2006, doi: 10.1016/j.jtemb.2006.08.001.
[397] Y. Liu *et al.*, "Prenatal exposure of rare earth elements cerium and ytterbium and neonatal thyroid stimulating hormone levels: Findings from a birth cohort study," *Environ Int*, vol. 133, no. Pt B, p. 105222, 2019, doi: 10.1016/j.envint.2019.105222.
[398] H. Zhong *et al.*, "Maternal exposure to CeO2NPs during early pregnancy impairs pregnancy by inducing placental abnormalities," *Journal of Hazardous Materials*, p. 121830, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.121830.
[399] E. Paul *et al.*, "Pulmonary exposure to metallic nanomaterials during pregnancy irreversibly impairs lung development of the offspring," *Nanotoxicology*, vol. 11, no. 4, pp. 484–495, May 2017, doi: 10.1080/17435390.2017.1311381.
[400] V. M. Levack, P. A. Hone, A. W. Phipps, and J. D. Harrison, "The placental transfer of

cerium: experimental studies and estimates of doses to the human fetus from 141Ce and 144Ce," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 78, no. 3, pp. 227–235, Mar. 2002, doi: 10.1080/09553000110097226.
[401] L. Preaubert *et al.*, "Cerium dioxide nanoparticles affect in vitro fertilization in mice," *Nanotoxicology*, vol. 10, no. 1, pp. 111–117, 2016, doi: 10.3109/17435390.2015.1030792.
[402] L. Aengenheister *et al.*, "Investigating the accumulation and translocation of titanium dioxide nanoparticles with different surface modifications in static and dynamic human placental transfer models," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 142, pp. 488–497, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.ejpb.2019.07.018.
[403] J. Vidmar *et al.*, "Translocation of silver nanoparticles in the ex vivo human placenta perfusion model characterized by single particle ICP-MS," *Nanoscale*, vol. 10, no. 25, pp. 11980–11991, Jul. 2018, doi: 10.1039/C8NR02096E.
[404] P. K. Myllynen, M. J. Loughran, C. V. Howard, R. Sormunen, A. A. Walsh, and K. H. Vähäkangas, "Kinetics of gold nanoparticles in the human placenta," *Reproductive Toxicology*, vol. 26, no. 2, pp. 130–137, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.reprotox.2008.06.008.
[405] Y. Zhang *et al.*, "Titanium dioxide nanoparticles induce proteostasis disruption and autophagy in human trophoblast cells," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 296, pp. 124–133, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.cbi.2018.09.015.
[406] H. Bové *et al.*, "Ambient black carbon particles reach the fetal side of human placenta," *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 3866, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11654-3.
[407] C. O. Asweto *et al.*, "Combined Effect of Silica Nanoparticles and Benzo[a]pyrene on Cell Cycle Arrest Induction and Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells," *Int J Environ Res Public Health*, vol. 14, no. 3, 09 2017, doi: 10.3390/ijerph14030289.
[408] J. Wu *et al.*, "Co-exposure to amorphous silica nanoparticles and benzo[a]pyrene at low level in human bronchial epithelial BEAS-2B cells," *Environ Sci Pollut Res Int*, vol. 23, no. 22, pp. 23134–23144, Nov. 2016, doi: 10.1007/s11356-016-7559-3.
[409] F. Filipak Neto, L. Cardoso da Silva, S. Liebel, C. L. Voigt, and C. A. de Oliveira Ribeiro, "Responses of human hepatoma HepG2 cells to silver nanoparticles and polycyclic aromatic hydrocarbons," *Toxicol. Mech. Methods*, vol. 28, no. 1, pp. 69–78, Jan. 2018, doi: 10.1080/15376516.2017.1357778.
[410] L. Valero *et al.*, "Assessment of dually labelled PEGylated liposomes transplacental passage and placental penetration using a combination of two ex-vivo human models: the dually perfused placenta and the suspended villous explants," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 532, no. 2, pp. 729–737, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.076.
[411] H. Bompais *et al.*, "Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells," *Blood*, vol. 103, no. 7, pp. 2577–2584, Apr. 2004, doi: 10.1182/blood-2003-08-2770.
[412] S. A. Degrelle and T. Fournier, "Use of GATA3 and TWIST1 Immunofluorescence Staining to Assess In Vitro Syncytial Fusion Index," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1710, pp. 165–171, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-7498-6_13.
[413] J.-L. Frendo *et al.*, "Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation," *J. Cell. Sci.*, vol. 116, no. Pt 16, pp. 3413–3421, Aug. 2003, doi: 10.1242/jcs.00648.
[414] E. Proietti, M. Röösli, U. Frey, and P. Latzin, "Air pollution during pregnancy and neonatal outcome: a review," *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, vol. 26, no. 1, pp. 9–23,

Feb. 2013, doi: 10.1089/jamp.2011.0932.
[415] H. Kaiser, E. Parker, and M. W. Hamrick, "Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor: Implications for aging and healthspan," *Exp. Gerontol.*, vol. 130, p. 110797, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.exger.2019.110797.
[416] J. D. Mezrich, J. H. Fechner, X. Zhang, B. P. Johnson, W. J. Burlingham, and C. A. Bradfield, "An interaction between kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor can generate regulatory T-Cells," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 185, no. 6, p. 3190, Sep. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0903670.
[417] P. Murthi, E. M. Wallace, and D. W. Walker, "Altered placental tryptophan metabolic pathway in human fetal growth restriction," *Placenta*, vol. 52, pp. 62–70, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.placenta.2017.02.013.
[418] M. T. Pallotta, F. Fallarino, D. Matino, A. Macchiarulo, and C. Orabona, "AhR-Mediated, Non-Genomic Modulation of IDO1 Function," *Front. Immunol.*, vol. 5, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00497.
[419] H. Nishizawa *et al.*, "Genetic Variation in the Indoleamine 2,3-Dioxygenase Gene in Pre-eclampsia," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 64, no. 1, pp. 68–76, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00820.x.
[420] P. Ligam, U. Manuelpillai, E. M. Wallace, and D. Walker, "Localisation of Indoleamine 2,3-dioxygenase and Kynurenine Hydroxylase in the Human Placenta and Decidua: Implications for Role of the Kynurenine Pathway in Pregnancy," *Placenta*, vol. 26, no. 6, pp. 498–504, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.placenta.2004.08.009.
[421] P. Sedlmayr *et al.*, "Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in human female reproductive organs and the placenta," *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 8, no. 4, pp. 385–391, Apr. 2002.
[422] Y. Kudo *et al.*, "Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta," *J. Reprod. Immunol.*, vol. 61, no. 2, pp. 87–98, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.jri.2003.11.004.
[423] A. Hönig, L. Rieger, M. Kapp, M. Sütterlin, J. Dietl, and U. Kämmerer, "Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance," *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 61, no. 2, pp. 79–86, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.jri.2003.11.002.
[424] S. Dekkers *et al.*, "Differences in the toxicity of cerium dioxide nanomaterials after inhalation can be explained by lung deposition, animal species and nanoforms," *Inhal Toxicol*, vol. 30, no. 7–8, pp. 273–286, Jul. 2018, doi: 10.1080/08958378.2018.1516834.
[425] L. S. Cox and C. Redman, "The role of cellular senescence in ageing of the placenta," *Placenta*, vol. 52, pp. 139–145, 2017, doi: 10.1016/j.placenta.2017.01.116.
[426] Y. Nakanishi *et al.*, "Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens increase ubiquitination of p21 protein after the stabilization of p53 and the expression of p21," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 22, no. 6, pp. 747–754, Jun. 2000, doi: 10.1165/ajrcmb.22.6.3877.
[427] I. Marrocco, F. Altieri, and I. Peluso, "Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2017, p. 6501046, 2017, doi: 10.1155/2017/6501046.
[428] S. Val, "Réponses de l'épithélium respiratoire à des particules atmosphériques de tailles et origines différentes : mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu," These de doctorat, Paris 7, 2011.
[429] H. Nishizawa, S. Imanishi, and N. Manabe, "Effects of exposure in utero to bisphenol a on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic

metabolizing enzymes in murine embryos," *J. Reprod. Dev.*, vol. 51, no. 5, pp. 593–605, Oct. 2005, doi: 10.1262/jrd.17026.
[430] D. W. Nebert and J. E. Jones, "Regulation of the mammalian cytochrome P1-450 (CYP1A1) gene," *Int. J. Biochem.*, vol. 21, no. 3, pp. 243–252, 1989, doi: 10.1016/0020-711x(89)90182-1.
[431] Y. M. Tang *et al.*, "Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 45, pp. 28324–28330, Nov. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.45.28324.
[432] T. Ikuta, Y. Kobayashi, and K. Kawajiri, "Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 18, pp. 19209–19216, Apr. 2004, doi: 10.1074/jbc.M310492200.
[433] N. M. E. Fogarty, G. J. Burton, and A. C. Ferguson-Smith, "Different epigenetic states define syncytiotrophoblast and cytotrophoblast nuclei in the trophoblast of the human placenta," *Placenta*, vol. 36, no. 8, pp. 796–802, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.placenta.2015.05.006.
[434] B. Zhao, D. E. Degroot, A. Hayashi, G. He, and M. S. Denison, "CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (Dioxin) receptor," *Toxicol. Sci.*, vol. 117, no. 2, pp. 393–403, Oct. 2010, doi: 10.1093/toxsci/kfq217.
[435] J. Detmar *et al.*, "Fetal growth restriction triggered by polycyclic aromatic hydrocarbons is associated with altered placental vasculature and AhR-dependent changes in cell death," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 295, no. 2, pp. E519-530, Aug. 2008, doi: 10.1152/ajpendo.90436.2008.
[436] P. Sedlmayr, "Indoleamine 2,3-dioxygenase in materno-fetal interaction," *Curr. Drug Metab.*, vol. 8, no. 3, pp. 205–208, Apr. 2007, doi: 10.2174/138920007780362491.
[437] S. Cvitic *et al.*, "The Human Placental Sexome Differs between Trophoblast Epithelium and Villous Vessel Endothelium," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0079233.
[438] R. Schwarcz, J. P. Bruno, Paul J. Muchowski, and H.-Q. Wu, "Kynurenines in the mammalian brain : when physiology meets pathology," *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 13, no. 7, p. 465, Jul. 2012, doi: 10.1038/nrn3257.
[439] D. N. Das *et al.*, "Bacopa monnieri-Induced Protective Autophagy Inhibits Benzo[a]pyrene-Mediated Apoptosis," *Phytother Res*, vol. 30, no. 11, pp. 1794–1801, Nov. 2016, doi: 10.1002/ptr.5682.
[440] H. Gal *et al.*, "Molecular pathways of senescence regulate placental structure and function," *EMBO J.*, vol. 38, no. 18, p. e100849, 16 2019, doi: 10.15252/embj.2018100849.
[441] R. Zhang, W. Chen, and P. D. Adams, "Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 6, pp. 2343–2358, Mar. 2007, doi: 10.1128/MCB.02019-06.
[442] J.-P. Coppé *et al.*, "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor," *PLoS Biol.*, vol. 6, no. 12, pp. 2853–2868, Dec. 2008, doi: 10.1371/journal.pbio.0060301.
[443] S. Sohr and K. Engeland, "The tumor suppressor p53 induces expression of the pregnancy-supporting human chorionic gonadotropin (hCG) CGB7 gene," *Cell Cycle*, vol. 10, no. 21, pp. 3758–3767, Nov. 2011, doi: 10.4161/cc.10.21.17946.
[444] Z. Sultana, K. Maiti, J. Aitken, J. Morris, L. Dedman, and R. Smith, "Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes," *American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 77, no. 5, p. e12653, 2017, doi: 10.1111/aji.12653.

[445] X. Dong, Q. Wang, J. Peng, M. Wu, B. Pan, and B. Xing, "Transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons from mother to fetus in relation to pregnancy complications," *Sci. Total Environ.*, vol. 636, pp. 61–68, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.274.
[446] A. W. S. Yeung, A. C. Terentis, N. J. C. King, and S. R. Thomas, "Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease," *Clin. Sci.*, vol. 129, no. 7, pp. 601–672, Oct. 2015, doi: 10.1042/CS20140392.
[447] Y. Kudo, C. A. R. Boyd, I. L. Sargent, and C. W. G. Redman, "Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2,3-dioxygenase in preeclampsia," *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 188, no. 3, pp. 719–726, Mar. 2003, doi: 10.1067/mob.2003.156.
[448] M. A. Suter *et al.*, "Association between elevated placental polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-DNA adducts from Superfund sites in Harris County, and increased risk of preterm birth (PTB)," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 516, no. 2, pp. 344–349, 20 2019, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.06.049.
[449] J. S. Heo *et al.*, "Environmental Benzopyrene Attenuates Stemness of Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells via Aryl Hydrocarbon Receptor," *Stem Cells Int*, vol. 2019, p. 7414015, 2019, doi: 10.1155/2019/7414015.
[450] E. Drwal, A. Rak, W. Tworzydło, and E. Ł. Gregoraszczuk, "'Real life' polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures modulate hCG, hPL and hPLGF levels and disrupt the physiological ratio of MMP-2 to MMP-9 and VEGF expression in human placenta cell lines," *Reprod. Toxicol.*, vol. 95, pp. 1–10, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.reprotox.2020.02.006.
[451] I. M. Adjei, B. Sharma, and V. Labhasetwar, "Nanoparticles: Cellular Uptake and Cytotoxicity," in *Nanomaterial: Impacts on Cell Biology and Medicine*, D. G. Capco and Y. Chen, Eds. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, pp. 73–91.
[452] S. Singh, A. Ly, S. Das, T. S. Sakthivel, S. Barkam, and S. Seal, "Cerium oxide nanoparticles at the nano-bio interface: size-dependent cellular uptake," *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol. 46, no. sup3, pp. S956–S963, Nov. 2018, doi: 10.1080/21691401.2018.1521818.
[453] Y. Min, M. Akbulut, K. Kristiansen, Y. Golan, and J. Israelachvili, "The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly," *Nature Mater*, vol. 7, no. 7, pp. 527–538, Jul. 2008, doi: 10.1038/nmat2206.
[454] S. Vranic *et al.*, "Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry," *Part Fibre Toxicol*, vol. 10, p. 2, Feb. 2013, doi: 10.1186/1743-8977-10-2.
[455] T. dos Santos, J. Varela, I. Lynch, A. Salvati, and K. A. Dawson, "Quantitative Assessment of the Comparative Nanoparticle-Uptake Efficiency of a Range of Cell Lines," *Small*, vol. 7, no. 23, pp. 3341–3349, 2011, doi: 10.1002/smll.201101076.
[456] D. A. Kuhn *et al.*, "Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1625–1636, Sep. 2014, doi: 10.3762/bjnano.5.174.
[457] S. Hussain *et al.*, "Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells," *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 7, no. 1, p. 10, Apr. 2010, doi: 10.1186/1743-8977-7-10.
[458] S. Hussain *et al.*, "Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human peripheral blood monocytes," *ACS Nano*, vol. 6, no. 7, pp. 5820–5829, Jul. 2012, doi: 10.1021/nn302235u.
[459] C. Zeng *et al.*, "The size-dependent apoptotic effect of titanium dioxide nanoparticles on endothelial cells by the intracellular pathway," *Environ. Toxicol.*, vol. 33, no. 12, pp.

1221–1228, Dec. 2018, doi: 10.1002/tox.22628.
[460] R. M. Hashem, L. A. Rashd, K. S. Hashem, and H. M. Soliman, “Cerium oxide nanoparticles alleviate oxidative stress and decreases Nrf-2/HO-1 in D-GALN/LPS induced hepatotoxicity,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 73, pp. 80–86, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.biopha.2015.05.006.
[461] S. Pichon, M. Bryckaert, and E. Berrou, “Control of actin dynamics by p38 MAP kinase - Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells,” *J. Cell. Sci.*, vol. 117, no. Pt 12, pp. 2569–2577, May 2004, doi: 10.1242/jcs.01110.
[462] G. N. Masoud and W. Li, “HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy,” *Acta Pharm Sin B*, vol. 5, no. 5, pp. 378–389, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.apsb.2015.05.007.
[463] R. E. Albers *et al.*, “Trophoblast-Specific Expression of Hif-1α Results in Preeclampsia-Like Symptoms and Fetal Growth Restriction,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 2742, 26 2019, doi: 10.1038/s41598-019-39426-5.
[464] D. Baimanov, R. Cai, and C. Chen, “Understanding the Chemical Nature of Nanoparticle-Protein Interactions,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 30, no. 7, pp. 1923–1937, 17 2019, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00348.
[465] F. M. Reis, D. D’Antona, and F. Petraglia, “Predictive Value of Hormone Measurements in Maternal and Fetal Complications of Pregnancy,” *Endocr Rev*, vol. 23, no. 2, pp. 230–257, Apr. 2002, doi: 10.1210/edrv.23.2.0459.

ANNEXE

CHAPITRE 8

Physiologie et hormonologie du placenta humain

Margaux Nedder, Ioana Ferecatu, Thierry Fournier

◆ Physiologie placentaire

Le placenta est un organe transitoire d'origine embryonnaire et extra embryonnaire indispensable à la nidation, au maintien de la grossesse et au développement du fœtus. Il joue un rôle dans l'immunotolérance du conceptus et la mise en place de la vascularisation utéro- placentaire, et représente une barrière sélective qui va permettre les échanges entre le sang maternel et fœtal. Le placenta humain est également un organe endocrine dont les hormones peptidiques et stéroïdiennes vont orchestrer le déroulement de la grossesse, de la nidation à l'accouchement. Un défaut de développement placentaire précoce est associé à des complications obstétricales tel que retard de croissance intra utérin, prématurité et pré- éclampsie.

Description anatomique

Le placenta humain est un organe transitoire de forme discoïde d'environ 22 cm de diamètre et de 4 à 5 cm d'épaisseur au centre pour 4 à 6 mm sur la périphérie. Le rapport masse placentaire sur masse fœtal varie tout au long de la grossesse pour atteindre à terme 1/6 du poids du fœtus soit environ 500 g [1]. Le placenta humain est de type hémochorial, c'est-à-dire que les villosités placentaires ou choriales qui le constituent sont en contact direct avec le sang maternel. Les villosités sont regroupées en amas appelés cotylédons, séparés par des cloisons incomplètes appelées septa. Le placenta humain est très invasif, il pénètre profondément la paroi utérine et lors de la délivrance, le placenta entraine une partie de cette muqueuse utérine décidualisée (**Figure 1**).

Le placenta possède deux faces : la face chorionique tapissée par l'amnios orientée vers le fœtus et à laquelle le cordon ombilical est relié, et la face basale ancrée dans la decidua basalis au niveau du site d'implantation. Sur le versant fœtal, on observe l'arborisation des vaisseaux ombilicaux ainsi que la membrane amniotique. Sur le versant maternel, les cotylédons ont une surface irrégulière et sont séparés par des sillons qui délimitent 10 à 40 lobules placentaires. Le placenta humain est un placenta de type villeux : il est constitué de villosités choriales ou placentaires qui représentent les unités structurales et fonctionnelles du placenta (**Figure 2**). Ces villosités sont insérées entre les plaques choriale et basale et baignent, au niveau de la chambre intervilleuse, dans du sang maternel provenant des artères utérines spiralées. La structure hémochoriale de la placentation chez l'humain permet l'apposition la plus intime des circulations maternelle et fœtale parmi les différents types de placentation existants. En effet, au terme de la grossesse, seules deux couches de chorion séparent les circulations maternelle et fœtale : le syncytiotrophoblaste en bordure des villosités et en contact avec le sang maternel, et les cyrotrophoblastes villeux qui forment un épithélium continu en contact avec les cellules endothéliales des capillaires fœtaux et le mésenchyme de la villosité ; le placenta est de type hémodichorial.

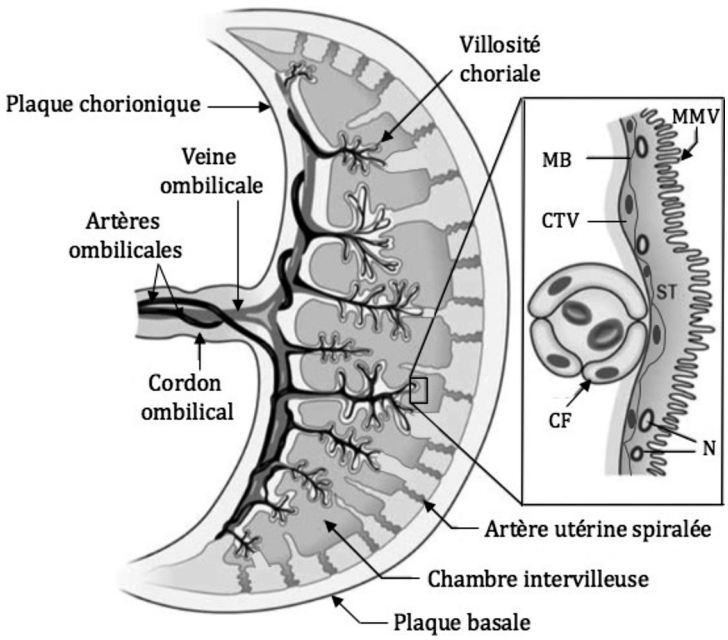


Figure 1/ Schéma de l'organisation du placenta humain.

Le placenta possède une cavité en son centre : la chambre intervilleuse, remplie de sang maternel en provenance des artères utérines spiralées et dans laquelle baignent les villosités choriales. Ces villosités représentent l'unité structurale et fonctionnelle du placenta. Elles sont bordées d'un syncytium trophoblastique polarisé. Les circulations maternelle et fœtale sont séparées par le syncytiotrophoblaste, le cytotrophoblaste sous-jacent et par les cellules endothéliales des capillaires fœtaux localisées dans le mésenchyme des villosités. Adapté d'après [2].

CF : capillaire fœtal ; CTV : cytotrophoblaste villeux ; MB : membrane basale ; MMV : membrane microvillositaire ; N : noyau ; ST : syncytiotrophoblaste

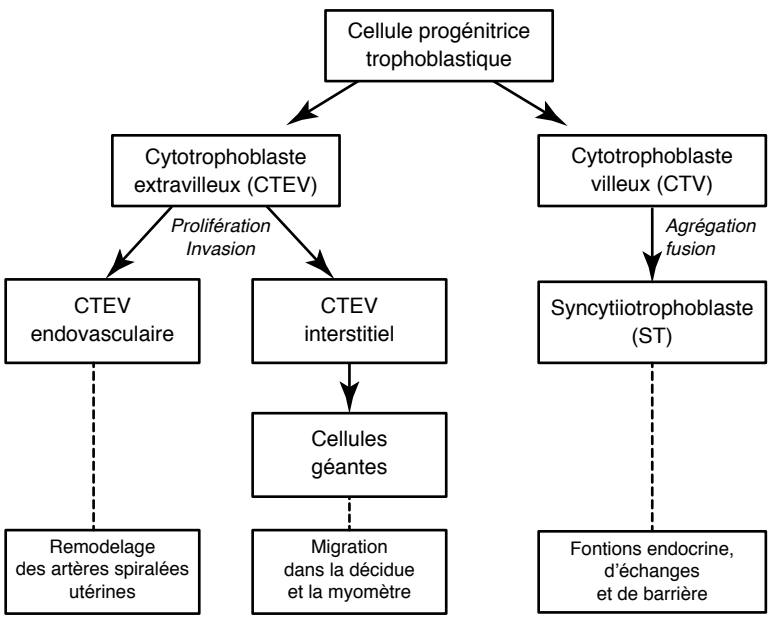


Figure 2/ Schéma des voies de différenciation du cytotrophoblaste.

Tout comme le fœtus, le placenta évolue en poids, taille et morphologie tout au long de la grossesse, ce que l'on définit comme l'ontogenèse placentaire. Le rapport poids du placenta/poids du fœtus s'inverse au cours des 9 mois de grossesse et est un indicateur du bon développement fœtal et placentaire (efficience placentaire).

Développement du placenta humain

À 6 jours post-fécondation, les réserves nutritives du blastocyste tendent à s'épuiser et le conceptus s'implante dans la cavité utérine pour poursuivre son développement. C'est par la couche de cellules externes (trophectoderme) que le blastocyste va s'accoler à l'épithélium utérin. Le premier événement de différenciation cellulaire durant le développement embryonnaire est l'établissement de la lignée trophoblastique à partir des cellules constituant la coque externe du blastocyste : le trophectoderme. Il se différencie en une assise cellulaire interne, formée par les cytotrophoblastes, et une assise cellulaire externe, le syncytiotrophoblaste qui se forme par fusion des cytotrophoblastes. C'est la phase prélacunaire du développement placentaire [3]. Le conceptus est alors nourri par diffusion des sécrétions des glandes utérines (histotrophe).

Le syncytiotrophoblaste primitif très invasif est pourvu de capacités enzymatiques lytiques lui permettant de digérer et de pénétrer l'épithélium utérin et l'endomètre réalisant l'enfouissement du blastocyste au sein de la muqueuse utérine [4]. L'implantation embryonnaire est différente selon les espèces, ce qui influe sur l'organisation des cellules trophoblastiques et la placentation [5]. Au 8e jour post-fécondation, la masse syncytiale est percée de vacuoles. Ces vacuoles vont former des lacunes délimitant des travées syncytiales, constituant ainsi un espace qui deviendra la chambre intervilleuse. C'est la phase lacunaire du développement placentaire. Au 13e jour post-fécondation, les cytotrophoblastes envahissent les travées de syncytium pour former les villosités choriales primaires : le stade villeux du développement placentaire débute. En parallèle, les vacuoles formées par les travées syncytiales entrent en contact avec des vaisseaux utérins et se remplissent de sang maternel pour constituer la chambre intervilleuse. Aux alentours du 17e-18e jour post-fécondation, le mésenchyme allantoïdien d'origine extra- embryonnaire envahit les villosités primaires pour former ainsi les villosités secondaires. Les villosités tertiaires sont formées à partir du 18e jour post-fécondation avec l'apparition des capillaires fœtaux, issus des hémangioblastes différenciés à partir des cellules mésenchymateuses et l'élaboration des arbres villositaires se poursuit jusqu'au terme de la grossesse [6]. L'unité structurale et fonctionnelle du placenta, représentée par la villosité choriale, est donc mise en place dès la 3e semaine après la fécondation dans sa structure définitive. L'arbre villositaire continue de s'étendre tout au long de la grossesse par branchements et élongation. Dans la chambre intervilleuse, ces villosités sont flottantes. À l'interface fœto-maternelle (plaque basale), au niveau du site d'implantation, les villosités sont ancrées dans l'endomètre maternel décidualisé : on parle alors de villosités crampons.

Le placenta atteint donc sa structure définitive en fin de premier trimestre (vers la 14e semaine de grossesse). Il est constitué de la plaque choriale, de la chambre intervilleuse dans laquelle flotte les villosités choriales et de la plaque basale.

Différenciation trophoblastique

La cellule trophoblastique progénitrice, située à la base de la villosité choriale, se différencie selon deux voies distinctes (**Figure 2**) : d'une part en cytotrophoblastes villeux (CTV) qui assurent les échanges fœto-maternels, les fonctions endocrines et la fonction de barrière, et d'autre part en cytotrophoblastes extravilleux (CTEV) invasifs, indispensables à l'implantation, à l'immunotolérance du conceptus considéré comme une greffe semi- allogénique par l'organisme maternel, et au remodelage des vaisseaux utérins. Les cellules arrivées à un stade de différenciation terminale sont sorties du cycle cellulaire (le ST différencié à partir des CTV, les cellules géantes issues des CTEV, les CTEV endovasculaires).

La cellule progénitrice trophoblastique se différencie selon deux voies : le cytotrophoblastes extravilleux (CTEV) et le cytotrophoblaste villeux (CTV). Le CTEV prolifère, devient invasif et migre dans la décidue et le myomètre pour coloniser les vaisseaux maternels ou se différencier en cellules géantes. Les CTV s'agrègent et fusionnent pour former et renouveler le syncytiotrophoblaste, responsable des fonctions endocrine, d'échanges et de barrière du placenta.

Trophoblastes villeux et villosités flottantes

La villosité choriale flottante dans sa structure finale est formée d'un axe mésenchymateux dans lequel se développent les vaisseaux fœtaux par vasculogenèse et angiogenèse, des fibroblastes et des cellules immunitaires (macrophages, aussi appelés cellules de Hofbauer). Ce mésenchyme est bordé par un épithélium de cellules trophoblastiques mononuclées (CTV) reposant sur une membrane basale. Cet épithélium est recouvert d'un syncytium, le syncytiotrophoblaste dont les microvillosités sont en contact direct avec le sang maternel. Ce dernier est une masse cytoplasmique polynucléée, polarisée et possédant à sa surface apicale des microvillosités, augmentant ainsi sa surface d'un facteur 5 à 7 [7], ce qui favorise sa fonction d'échange (**Figure 3**).

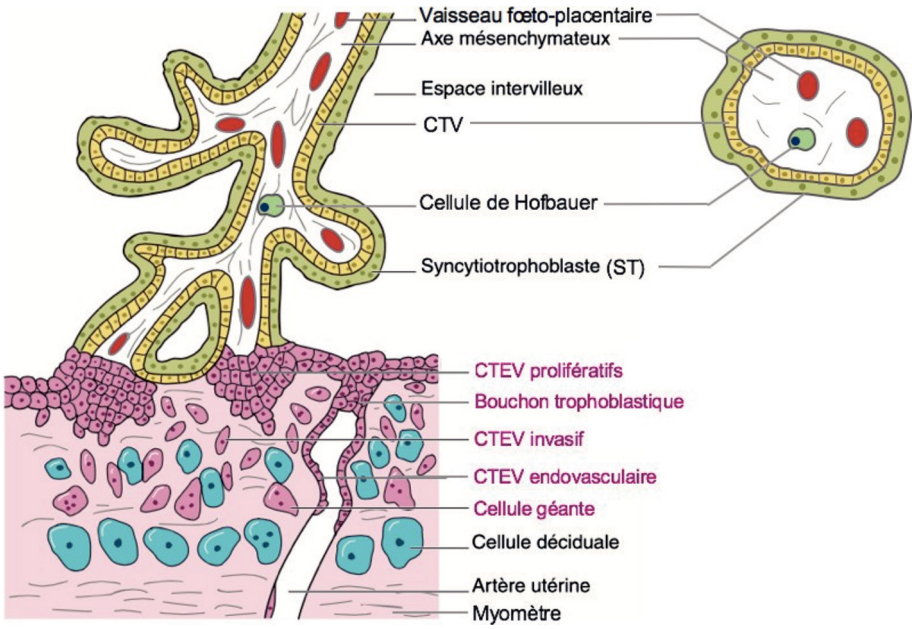


Figure 3/ Schéma d'une coupe longitudinale et transversale d'une villosité choriale.

La villosité choriale est constituée d'un axe mésenchymateux contenant les vaisseaux fœto-placentaires et des macrophages placentaires (cellules de Hofbauer) bordé d'un épithélium trophoblastique et d'un syncytium : les cytotrophoblastes villeux mononucléés (CTV) au-dessus desquels se situe le syncytiotrophoblaste polynucléé, issu de la fusion des CTV sous-jacents. La villosité crampon est ancrée dans l'endomètre maternel décimalisé par des colonnes de cytotrophoblastes extravilleux (CTEV) qui vont envahir la paroi et les artères utérines.

Le syncytiotrophoblaste (ST) représente la cellule en différenciation terminale, sortie du cycle cellulaire donc ne possédant pas de capacité de prolifération. Le ST est en contact direct avec le sang maternel, participant aux fonctions placentaires (nutrition fœtale, échanges gazeux, biosynthèse de protéines et d'hormones, barrière). Ce syncytium se renouvelle tout au long de la grossesse par agrégation et fusion avec les CTV sous-jacents. Une fois les noyaux des cytotrophoblastes intégrés au syncytium, la transcription continue puis est suivie d'une phase de différentiation terminale dans laquelle les noyaux changent de forme et perdent leur activité transcriptionnelle,

dû à la condensation globale de la chromatine [8]. Par conséquent, l'activité fonctionnelle du ST dépend de l'incorporation continue d'ARNm, protéines et organelles via la fusion du contenu cytoplasmique provenant des CTV. Pour équilibrer l'incorporation constante de nouveaux organites par ce processus de fusion, les organites vieillissants du ST sont empaquetés dans des structures semblables à des vésicules apoptotiques et se desquament dans la chambre intervilleuse, formant ainsi des débris syncytiaux polynucléés, appelés *syncytial knots*, libérés dans la circulation maternelle [9]. Ces débris, incluant des fragments membranaires et cytoplasmiques, sont en grande partie à l'origine de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN) fœto-placentaire circulant dans le sang maternel. Le nombre de ces débris syncytiaux est augmenté en cas de souffrance placentaire, comme lors de la pré-éclamspie [10].

Évolution de la barrière placentaire

Au début de la grossesse, les CTV sont de forme cuboïdale avec un grand ratio noyau/cytoplasme et constituent un épithélium (**Figure 4A**). Au fur et à mesure de l'avancement de la grossesse, les arbres villositaires s'étendent et les CTV s'engagent dans la fusion avec le ST pour assurer son renouvellement. Les CTV proliférant peu, leur pool s'épuise, et ils s'étirent de plus en plus afin de rester en contact les uns avec les autres [11] (**Figure 4B**). Seule une fine couche de syncytium et de membrane cytoplasmiques de CTV sépare donc l'axe mésenchymateux du sang maternel en fin de grossesse. En effet, la distance entre la circulation maternelle et la circulation fœtale est réduite à environ 5 µm à terme, alors qu'elle est d'environ 50 µm au premier trimestre de grossesse [12].

Cette syncytialisation s'accompagne également d'une différenciation fonctionnelle, marquée par l'expression de certains gènes spécifiques du ST comme ceux de l'hormone placentaire lactogène (hPL), de l'hormone de croissance placentaire (PGH), ou encore du cytochrome P450 aromatase impliqué dans la stéroïdogenèse placentaire pour la production de progestérone et d'œstrogènes.

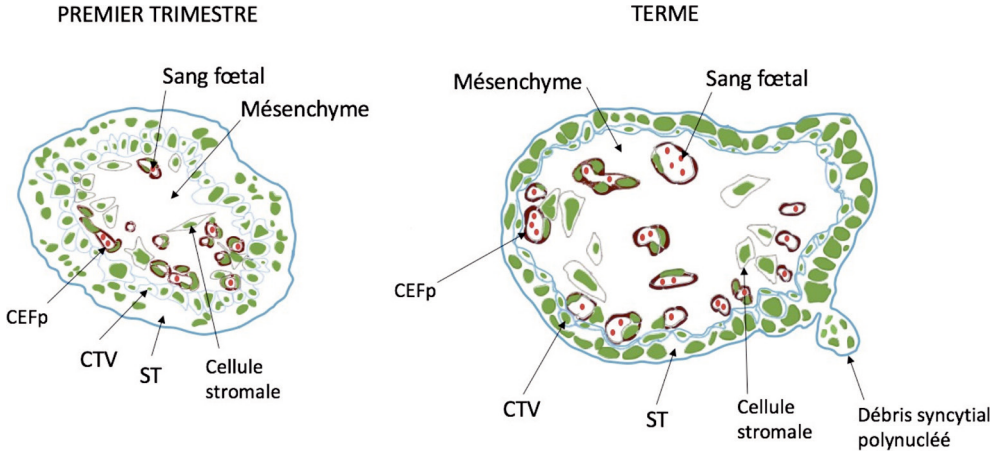


Figure 4/ Représentation schématique en coupe de l'évolution des villosités choriales au cours de la grossesse

Schéma de coupes d'une villosité choriale de premier trimestre (A) et à terme (B) de grossesse montrant les principaux types cellulaires et la barrière placentaire. La barrière placentaire constituée de la bicouche trophoblastique s'amincit au cours de l'ontogenèse placentaire.

CEFp : cellule endothéliale fœtale placentaire ; CTV : cytotrophoblaste villeux ; ST : syncytiotrophoblaste

Trophoblastes extravilleux et villosités crampons

Le trophoblaste extravilleux se caractérise par son phénotype migratoire et invasif, capable d'envahir la décidue et le myomètre jusqu'au tiers supérieur et de remodeler les tissus maternels utérins, notamment les artères spiralées utérines pour garantir l'apport sanguin maternel vers le placenta. Il « dialogue »

également avec les cellules immunitaires utérines (lymphocyte T, macrophage, *Natural Killer* utérin) À l'endroit où les cytotrophoblastes sont en contact avec la décidue (à l'interface fœto-maternelle), les cellules trophoblastiques envahissent la décidue et se différencient en CTEV, dans un processus qui se rapproche de la transition épithélio-mésenchymateuse. Ces CTEV sont situés à la base de la villosité crampon et regroupées sous forme de colonnes de cellules polarisées et agrégées les unes aux autres (**Figure 3**).

À la base de la villosité crampon, les CTEV sont prolifératifs et forment des colonnes qui pénètrent dans la decidua basalis permettant l'ancrage des villosités choriales. Cette capacité de prolifération est ensuite perdue lorsque les cellules s'éloignent de l'axe mésenchymateux de la villosité. En effet, les CTEV sortent du cycle cellulaire et deviennent invasifs (TEM) [13]. Il est intéressant de noter que les CTEV invasifs sont aneuploïdes par endoréplication. Deux types de trophoblastes invasifs ont été identifiés : interstitiels et endovasculaires. Les CTEV interstitiels sont responsables de la colonisation de l'endomètre et du myomètre superficiel et terminent leur parcours en se différenciant en cellules géantes multinucléées par fusion et endoréplication. Les CTEV endovasculaires participent au remodelage vasculaire utérin. Ces cellules infiltrent les vaisseaux utérins par voie endovasculaire et périvasculaire (extravasation) [14], en particulier les artères et les artérioles et supplantent l'endothélium vasculaire par destruction de la tunique élastique artérielle et remplacement par une paroi fibreuse atone insensible aux substances vaso-actives. On observe alors des bouchons de cellules trophoblastiques obstruant la lumière de ces artères utérines jusqu'à environ 10 semaines d'aménorrhée (SA).

En plus de ces mécanismes caractérisés depuis de nombreuses années, l'invasion trophoblastique commencerait déjà au moment de l'implantation, permettant une nutrition histiotrophique de l'embryon avant la perfusion du placenta par le sang maternel [15]. Une invasion trophoblastique des vaisseaux lymphatiques de l'utérus a également été décrite. L'invasion des artères spiralées par les trophoblastes interviendrait ensuite pour laisser place à une nutrition hémotrophique du fœtus.

Les bouchons trophoblastiques sont formés par les CTEV. Ces cellules empêchent les éléments figurés du sang maternel d'entrer dans la chambre intervilleuse jusqu'à environ la 8e SA. De ce fait, l'environnement placentaire est pauvre en oxygène durant cette période, avec une pression partielle en oxygène (pO_2) dans l'espace intervilleux d'environ 20 mmHg à la 8e SA. On observe le délitement progressif de ces bouchons à partir de la 10e SA, la chambre intervilleuse se remplit alors de sang maternel et la pO_2 augmente jusqu'à 55 mmHg à 12 SA.

Mise en place des circulations maternelle et fœtale

À terme de grossesse, le réseau vasculaire placentaire est très développé et a une longueur de plus de 550 km. La vasculogenèse fœtale commence environ au 20e jour post- fécondation et est initiée par la différenciation d'hémangioblastes au niveau local, précurseurs des cellules endothéliales. Les premières lumières vasculaires au sein de la villosité flottante apparaissent au 23e jour post-fécondation, et la circulation entre l'embryon et le placenta s'établit à ce moment. Cette différenciation des hémangioblastes est induite par le *vascular endothelial growth factor* (VEGF-A), produit par les cellules trophoblastiques, qui agit via deux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Le trophoblaste produit également du PlGF (*placental growth factor*), un facteur pro-angiogénique. Ces facteurs angiogéniques sont régulés par les concentrations locales en oxygène. La faible pression partielle en oxygène pendant le premier trimestre de grossesse est favorable à l'angiogenèse et la vasculogenèse placentaire. Le cordon ombilical est constitué de 2 artères conduisant le sang de l'embryon vers le placenta et d'une veine qui ramène le sang ayant circulé dans les villosités choriales vers l'embryon (**Figure 5**).

Le sang maternel arrive dans la chambre intervilleuse par les artères spiralées utérines, qui se situent dans le myomètre (Figure 5). Après avoir irrigué les villosités, ce sang repart vers l'organisme maternel par les sinus veineux. La chambre intervilleuse est un vaste espace dont le volume augmente au cours de la grossesse et atteint 150 à 200 mL à terme, avec un débit de 600 mL/min.

Le flux du sang maternel circulant autour des villosités placentaires joue un rôle dans les échanges materno-fœtaux. De plus, le flux sanguin et la stimulation mécanique des cellules par les forces de cisaillement générée, appelé *shear stress*, sont critiques pour le développement placentaire en ce qui concerne l'homéostasie vasculaire des villosités (expansion et remodelage vasculaire) et les échanges materno-fœtaux [17, 18].

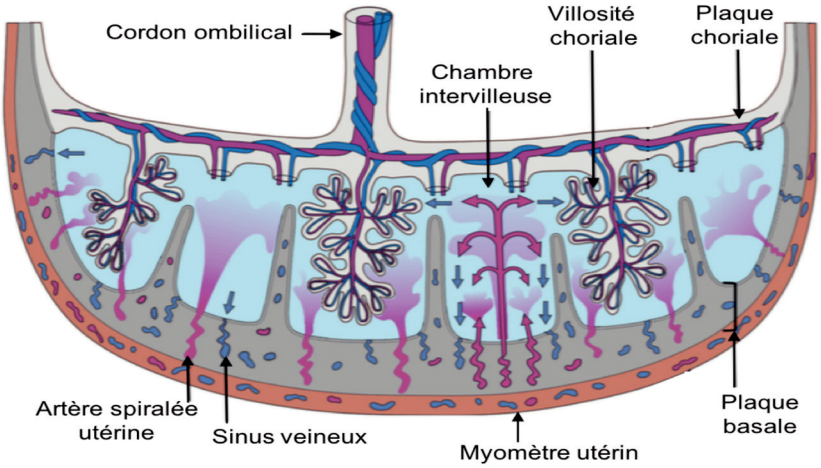


Figure 5/ Circulations maternelle et fœto-placentaire

Le sang maternel arrive dans la chambre intervilleuse par les artères spiralées utérines, irrigue les villosités placentaires et retourne vers l'organisme maternel par les sinus veineux. Le cordon ombilical est constitué de deux artères conduisant le sang fœtal vers les villosités et d'une veine qui ramène le sang oxygéné des villosités vers l'embryon. Adapté d'après [16].

Les fonctions placentaires

Le placenta possède de multiples fonctions nécessaires au bon déroulement de la grossesse : tolérance immunitaire du fœtus dans l'environnement maternel, fonctions endocrines, échanges fœto-maternels, fonction de barrière. Des liens ont été établis entre des dysfonctionnements placentaires et des pathologies de la grossesse telles que la pré-éclamspie ou le retard de croissance intra-utérin [19]. Les cellules trophoblastiques participent au développement fœtal en facilitant la délivrance des ressources maternelles au fœtus et protègent ce dernier d'expositions adverses émanant du côté maternel.

Tolérance immunitaire

Le trophoblaste ayant pour origine le trophectoderme, il possède le même caryotype que le fœtus. Les cellules trophoblastiques expriment donc des molécules d'origine paternelle en contact direct avec les tissus maternels et qui devraient être reconnues par la mère comme du « non-soi ». Le ST fonctionne comme une barrière protectrice immunologique locale, car il n'exprime aucun antigène humain de leucocyte (HLA pour *human leukocyte antigen*). Malgré la présence de tissus semi-allogénique (placenta et embryon), les cellules immunitaires circulantes dans le sang maternel ne détectent pas le ST comme du « non-soi » [20]. Le non-rejet des CTEV par les cellules immunitaires maternelles est lié à l'expression à leur surface d'antigènes de classe 1 appelés HLA-G et à la sécrétion de nombreuses cytokines et facteurs immunomodulateurs [21]. Les CTEV établissent donc un dialogue avec les cellules de la décidue maternelle et jouent un rôle prépondérant dans le non-rejet de l'unité fœto-placentaire par l'organisme maternel [22].

Échanges

La surface d'échange au niveau des villosités choriales représente 12 à 20 m^2 à terme de grossesse [23], et les capillaires fœtaux contiennent environ 80 mL, soit 25 % du total du volume de sang fœto-placentaire [24]. De plus, comme expliqué dans le paragraphe concernant la barrière

placentaire, la distance entre les circulations maternelle et fœtale s'amoindrit au cours de la grossesse. La qualité des échanges entre la mère et le fœtus dépend en grande partie de la circulation du sang maternel dans la chambre intervilleuse et de l'intégrité de la surface du ST qui est couvert de microvillosités. Le ST étant en contact direct avec le sang maternel, des altérations, d'origine infectieuse ou environnementale (tabac, alcool, pollution), du développement et/ou des fonctions du ST peuvent interférer sur la croissance fœtale et l'issue de grossesse. Le ST est le siège de toutes les fonctions d'échange du placenta et possède à ce titre de nombreux transporteurs à ses surfaces basale et apicale.

Transfert des gaz respiratoires

Le placenta est très perméable aux gaz respiratoires. La PO_2 fœtale est plus faible que les PO_2 maternelles, permettant ainsi à l'oxygène de diffuser de manière passive du sang maternel vers le sang fœtal. De plus, l'hémoglobine fœtale (HbF) possède une plus forte affinité pour l'oxygène que l'hémoglobine maternelle (HbA), ce qui facilite le transfert de l'oxygène vers le fœtus. Le dioxyde de carbone, au contraire, diffuse de manière passive du sang fœtal vers le sang maternel en raison des différences de pression partielle.

Transport des nutriments

Glucose

Le glucose maternel est la source d'énergie fondamentale du fœtus pour sa croissance et son développement, en raison de l'absence de néoglucogenèse fœtale significative. Le transport du glucose maternel vers le compartiment fœtal se fait par diffusion facilitée *via* les transporteurs de glucose GLUT présents à la membrane des trophoblastes et de l'endothélium des capillaires fœtaux [25]. Une grande partie du glucose ainsi extrait de la circulation maternelle, environ 60 %, est utilisé par le placenta pour son propre métabolisme.

Acides aminés

Les acides aminés sont nécessaires pour la synthèse protéique mais également comme métabolites énergétiques et comme précurseurs de molécules non protéiques telles que les nucléotides, les neurotransmetteurs par exemple. Exceptés pour deux acides aminés, le glutamate et l'aspartate, la concentration en acides aminés dans la circulation maternelle est plus faible que dans la circulation fœtale, le placenta les transporte alors de manière active vers le fœtus. Le transport de la circulation maternelle vers le ST nécessite une dépense d'énergie pouvant impliquer la Na+/K+ ATPase, Mg^{2+} dépendante. Les acides aminés diffusent ensuite librement à travers l'axe mésenchymateux villositaire et l'endothélium des capillaires vers le sang fœtal [26].

Lipides

La plupart des lipides sont liés à des protéines circulantes dans le sang maternel, formant ainsi des complexes lipoprotéiques. Les lipides comprennent des acides gras, des phospholipides, des glycolipides, des triglycérides, des sphingolipides, des esters de cholestérol et d'autres composés. La surface maternelle du placenta comprend des lipoprotéines lipases, permettant la libération des lipides de ces complexes. Le passage transplacentaire des lipides se fait par internalisation de lipoprotéines et par transporteur pour les acides gras [27].

Transfert de l'eau et des ions

L'eau diffuse de manière passive grâce aux différences de pression hydrostatique entre les compartiments vasculaires maternels et fœtaux. Ce transfert se fait de manière passive et est facilité par des canaux protéiques transmembranaires appelés aquaporines (route paracellulaire). Les taux de sodium et ions chlorure sont identiques dans le sang maternel et fœtal, alors que les taux de potassium, calcium, magnésium et phosphate sont plus importants dans le sang fœtal [28]. Ces derniers sont donc transportés de manière active à travers la barrière placentaire.

Transfert du fer

Le fœtus est dépendant du fer maternel. Dans la circulation maternelle le fer est lié à la transferrine, capable de se lier aux récepteurs de la transferrine localisés sur la membrane microvillositaire du syncytiotrophoblaste. Le complexe est ainsi internalisé dans le trophoblaste et conduit à la libération du fer dans le cytoplasme où il va être transporté vers la membrane basale afin de rejoindre la circulation sanguine fœtale [29].

Transfert des immunoglobulines

Le fœtus possède un système immunitaire immature et l'acquisition des immunoglobulines G (IgG) s'effectue exclusivement pendant la grossesse de source maternelle via le placenta.

Ces protéines d'un haut poids moléculaire (150 kDa) traversent le placenta par transendocytose et confèrent au nouveau-né une immunité qui le protège durant les 6 premiers mois de vie [30]. Les immunoglobulines G sont les seules protéines à pouvoir passer la barrière placentaire.

Transfert des xénobiotiques et polluants

Tabac

L'exposition du fœtus à la fumée de tabac est reconnue comme le facteur de risque le plus important des complications de la grossesse. La fumée de cigarette contient de nombreuses substances toxiques dont des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les études épidémiologiques ont montré que le tabagisme maternel est associé à de nombreuses pathologies obstétricales telles qu'un retard de croissance intra-utérin, une insuffisance placentaire et la prématurité [31]. Les HAP sont liposolubles et traversent la barrière placentaire aisément.

Alcool

L'alcool traverse le placenta par diffusion passive et se retrouve dans le sang fœtal à une concentration plus élevée que chez la mère. La consommation d'alcool par la mère entraîne à la fois des effets délétères sur le fœtus (regroupés sous le terme de syndrome d'alcoolisation fœtale) et sur le placenta [32].

Pollution environnementale

L'air contient un certain nombre de polluants : des gaz (ozone O_3, dioxyde d'azote NO_2, dioxyde de soufre SO_2, monoxyde de carbone CO), des métaux lourds, des hydrocarbures aromatiques polycyclique, des particules fines. Ces polluants peuvent se retrouver dans la circulation sanguine maternelle après franchissement de la barrière pulmonaire. Des particules avec un diamètre inférieur à 500 nm ont été montrées comme passant la barrière placentaire et des particules de polystyrène d'un diamètre inférieur à 240 nm sont capables de rejoindre la circulation fœtale [33]. De nombreuses études ont montré une association entre l'exposition prénatale et une prématurité ou un petit poids de naissance [34, 35].

◆ Endocrinologie placentaire

Le placenta est un organe endocrine majeur, sécrétant plus de 100 hormones peptidiques et stéroïdes qui modulent la physiologie maternelle permettant ainsi l'adaptation de l'organisme maternel à la grossesse [36]. Les hormones placentaires jouent des rôles importants dans différents évènements de la grossesse : implantation, placentation, remodelage vasculaire, immunomodulation, lactation. La fonction endocrine placentaire est cruciale pour le bon déroulement de la grossesse. La source majeure d'hormones placentaires est le syncytiotrophoblaste, qui exprime la machinerie nécessaire pour la biosynthèse de nombreuses hormones incluant les hormones stéroïdes (progestérone, œstrogènes), les hormones polypeptidiques (hormone chorionique gonadotrope hCG, hormone lactogène placentaire hPL, hormone de croissance placentaire PGH, leptine) ainsi qu'une variété de facteurs de croissance, cytokines et autres peptides impliqués dans la physiologie de la grossesse par un rôle autocrine ou paracrine [37, 38]. L'activité hormonale du ST est fortement polarisée : il sécrète plus de 99 % de ces hormones dans la circulation maternelle.

Les hormones polypeptidiques placentaires

L'hormone chorionique gonadotrope

La gonadotrophine chorionique humaine (hCG) est une des plus importantes hormones liées à la grossesse. Cette hormone de 37 kDa, spécifique de l'espèce humaine, appartient à la famille des hormones glycoprotéiques, dont fait également partie les hormones hypophysaires LH, FSH et TSH. Ces hormones sont composées de deux sous-unités : une sous unité α commune et une sous-unité β leur conférant leur spécificité. La sous-unité β est codée par un cluster de gènes localisé sur le chromosome 19 [39] issu de la duplication au cours de l'évolution du gène de la LH. La sous-unité β de l'hCG est caractérisée par une forte glycosylation : 2 sites de N-glycosylation et 4 sites de O-glycosylation dans sa partie C- terminale. Il existe 5 isoformes majeures d'hCG connues : l'hétérodimère hCG, l'hétérodimère hCG hyperglycosylé, l'hCG sulfaté, la sous-unité β-hCG libre, et la sous-unité β-hCG libre hyperglycosylée. Les deux premières isoformes produites par le placenta sont impliquées dans le processus de placentation et dans la grossesse. L'hCG sulfaté d'origine hypophysaire intervient pendant le cycle menstruel en participant à l'ovulation et à la formation du corps jaune cyclique. Les deux dernières isoformes sont majoritairement produites par les cellules tumorales notamment dans les cancers des cellules endométriales et des cellules germinales ovariennes et testiculaires [40].

Dès le 7e jour post-fécondation au moment de l'implantation, l'hCG est le premier message soluble produit par le trophoblaste vers l'organisme maternel. L'hCG est donc détectable très tôt dans l'organisme maternel et son dosage est d'ailleurs utilisé pour diagnostiquer une grossesse. Cette hormone possède un grand nombre de fonctions biologiques. L'hCG est indispensable au déroulement de la grossesse chez la femme, puisqu'elle permet la transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gravidique, qui assure le maintien de la sécrétion ovarienne de progestérone, œstrone et œstradiol durant les six premières semaines de grossesse [41]. Passé ce délai, l'unité fœto-placentaire prend le relai et supplée aux fonctions ovariennes, illustrant ainsi l'indépendance du système endocrine placentaire vis-à-vis de l'organisme maternel [42]. L'hCG joue également un rôle dans l'implantation en contribuant à la réceptivité endométriale de la décidue [43] et en modulant les réponses immunitaires utérines [44], dans l'angiogenèse et la vasculogenèse au niveau de l'endothélium utérin [45, 46], dans la maintenance de la quiescence myométriale [47, 48], contribue à l'immunotolérance maternelle par la régulation des cellules Treg, dendritiques, uNK et cellules B régulatrices [49, 50], et joue un rôle important dans la différenciation du trophoblaste par un mécanisme autocrine [51]. *In vitro*, la production d'hCG favorise et reflète la bonne différenciation fonctionnelle des CTV en ST. Cette hormone semble également avoir des effets protecteurs contre le cancer du sein, dû à la différentiation du tissu mammaire après une grossesse menée à terme [40]. Ces effets sont médiés par la liaison de l'hCG à son récepteur appelé LHCGR, un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à la voie de signalisation de l'AMP cyclique et de la phospholipase C. Ce récepteur est exprimé principalement par les CTV, CTEV et à un moindre degré par le ST [52].

Le ST est la principale source de production d'hCG tout au long de la grossesse sécrétée à 99 % dans le sang maternel [53]. Compte tenu de son importante copule glycanique qui lui confère une demi vie élevée, l'hCG est considérée comme un super agoniste de la LH.

Au premier trimestre de grossesse, le trophoblaste extravilleux invasif produit également de l'hCG : une forme comparable à celle sécrétée par le ST et une forme hyperglycosylée (hCG-H) comparable à celle produite par le choriocarcinome. L'hCG-H stimule l'invasion du trophoblaste de façon autocrine et contribuerait à la modulation du processus physiologique d'invasion trophoblastique en début de grossesse [54]. L'hCG-H stimule également de façon paracrine l'angiogenèse en interagissant avec le récepteur du TGFβ et activant la voie de signalisation Smad de façon indépendente du LHCGR [55].

La concentration d'hCG dans l'organisme maternel augmente progressivement dès l'implantation de l'embryon pour atteindre un pic vers la 10e semaine post-fécondation puis diminue de manière drastique jusqu'au 3e mois de grossesse pour rester stable jusqu'à l'accouchement (**Figure 6**).

L'hormone placentaire lactogène

L'hormone placentaire lactogène (hPL), aussi appelée hormone chorionique somatotrope (hCS), est une hormone constituée d'une seule chaine polypeptidique de 23 kDa. Elle est produite principalement par le syncytiotrophoblaste, mais les CTEV peuvent également en produire [56]. Détectable dès la 3e semaine de grossesse dans le sang maternel, l'augmentation de sa sécrétion au cours de la grossesse suit l'évolution de la masse placentaire (**Figure 6**). Le rôle de cette hormone est peu caractérisé mais elle préparerait la lactation en induisant la prolifération et différenciation des cellules de la glande mammaire. De plus, cette hormone interviendrait dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique maternel en augmentant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose pendant la grossesse, important pour l'homéostasie énergétique de la mère et du fœtus [57, 58].

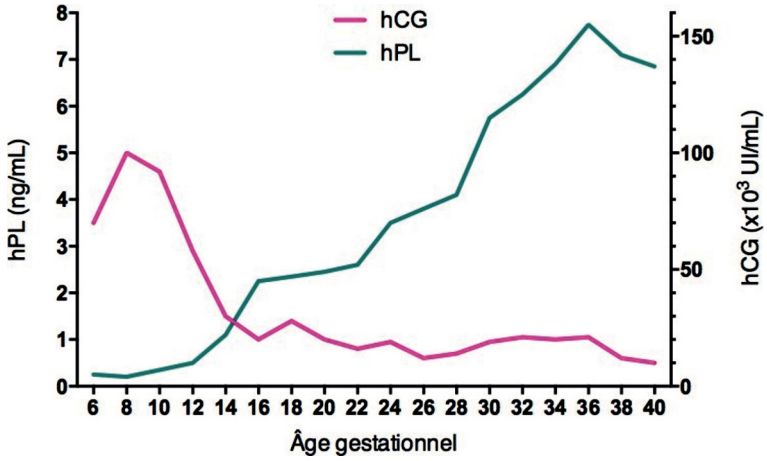


Figure 6/ Concentrations maternelles plasmatiques d'hPL et d'hCG au cours de la grossesse.

Les valeurs sont exprimées en moyenne +/- SEM en fonction de l'âge gestationnel en semaines de grossesse.

L'hormone de croissance placentaire

L'hormone de croissance placentaire (pGH ou GHv) est une protéine de 25 kDa, partiellement glycosylée. La pGH possède une forte homologie avec l'hPL et est encodée par le même cluster de gènes. Hormone chorionique somatotrope CSH etc. Cette hormone est sécrétée par le trophoblaste invasif au premier trimestre de la grossesse et stimule de façon autocrine l'invasion [59]. Le syncytiotrophoblaste sécrète à partir du deuxième trimestre la pGH dans le sang maternel de manière continue. La pGH est donc détectable dans le sang maternel à 15-20 semaines post-fécondation et son niveau augmente de manière importante durant le troisième trimestre de grossesse. La pGH ne semble pas avoir d'effet direct sur la croissance fœtale car cette hormone n'est pas détectable dans la circulation fœtale [60] mais pourrait agir indirectement sur cette croissance en modifiant la disponibilité placentaire des éléments nutritifs par la régulation de la résistance à l'insuline maternelle [61].

Autres hormones polypeptidiques

Le syncytiotrophoblaste sécrète également d'autres hormones polypeptidiques au cours de la grossesse telles que l'activine A et l'inhibine A, deux membres de la superfamille du TGF-β, ainsi que des régulateurs de l'homéostasie énergétique tels que la leptine, la résistine et l'adiponectine.

Activine A et inhibine A

L'activine A est un activateur in vitro de la fusion des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblaste. De plus, l'activine et l'inhibine modulent la sécrétion placentaire d'hCG et de progestérone [62].

La concentration maternelle d'activine augmente graduellement durant la grossesse et atteint un maximum à terme et le placenta est la principale source de production [58].

Leptine

Le ST produit également de la leptine, une adipokine impliquée dans la régulation de l'appétit et stimulant la sécrétion d'insuline, et possède des récepteurs pour cette hormone. Pendant la grossesse, la leptine synthétisée par le placenta est sécrétée dans la circulation maternelle et fœtale et dans le liquide amniotique [63]. La concentration sérique maternelle de leptine augmente au cours de la grossesse et atteint un maximum à terme [64] et un taux élevé est observé en cas de diabète maternel ou de pré-éclampsie. La principale source de production est le ST mais les CTEV sont également capable de la sécréter [65] et la production est plus importante au premier trimestre qu'au terme de la grossesse [66]. La leptine possède des effets pléïotropes sur les trophoblastes en modulant la fonction endocrine du ST, en stimulant la sécrétion d'hCG et en inhibant celle de progestérone [67] et d'œstradiol [68]. Après le second trimestre, la grossesse est généralement un état physiologique de résistance à la leptine causé par les autres hormones de la gestation (progestérone, œstrogène et hPL), requis pour l'apport nutritif au fœtus et pour la préparation du corps à la demande métabolique de la lactation [69].

Résistine

La résistine possède une action métabolique opposée à celle de la leptine et est produite par le ST qui possède d'ailleurs des récepteurs pour cette hormone [70].

Adiponectine

L'adiponectine est une adipokine. Cette hormone promeut la sensibilité à l'insuline, a des effets anti-inflammatoires et son taux est inversement corrélé avec la graisse corporelle [71]. Sa production par le placenta est controversée [71-74].

Les hormones stéroïdes

La progestérone

Durant les 6 premières semaines de grossesse, la progestérone est produite par le corps jaune gravidique stimulé par l'hCG placentaire. Le placenta prend ensuite le relai dans la production de progestérone avec la mise en place progressive dans le ST des différentes enzymes de la sétroïdogenèse.

La progestérone (P4) a pour précurseur le cholestérol, véhiculé par les lipoprotéines du plasma maternel. Le ST, en contact direct avec le sang maternel, possède des récepteurs spécifiques pour les lipoprotéines : les récepteurs LDL (*low density lipoprotein*) et VLDL (*very low density lipoprotein*). Ces récepteurs permettent au ST de capturer les LDL maternels circulants par le mécanisme classique d'internalisation médiée par récepteur. Le cholestérol ainsi internalisé sera utilisé pour la biosynthèse des membranes cellulaires placentaires et pour la stéroïdogenèse. Ce cholestérol intracellulaire est transporté par la *Sterol Carrier Protein-2* (SCP2) à la membrane externe de la mitochondrie. Contrairement aux autres organes stéroïdogènes, le placenta n'exprime pas la StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), une protéine qui transfère le cholestérol vers la membrane mitochondriale interne, une étape critique et limitante dans la synthèse de la progestérone. Cette fonction est assurée par le *Metastatic Lymph Node* 64 (MLN64). La première étape de la sétroïdogenèse est la conversion du cholestérol en prégnénolone sous l'action du cytochrome P450 *side chain cleaveage* (P450scc), codé par le gène *CYP11A1*. La progestérone est ensuite synthétisée à partir de la prégnénolone grâce à la 3β-hydroxystéroide-deshydrogénase (3β-HSD), localisée dans la mitochondrie également (**Figure 7**).

Le taux sanguin de progestérone augmente au cours de la grossesse, avec un pic pendant les 4 dernières semaines de grossesse et une diminution après le travail et la délivrance [75] (**Figure 8**).

La P4 possède une action myorelaxante du myomètre utérin et promeut la quiescence utérine tout au long de la grossesse [76], ce qui est indispensable à son bon déroulement. La P4 joue également un

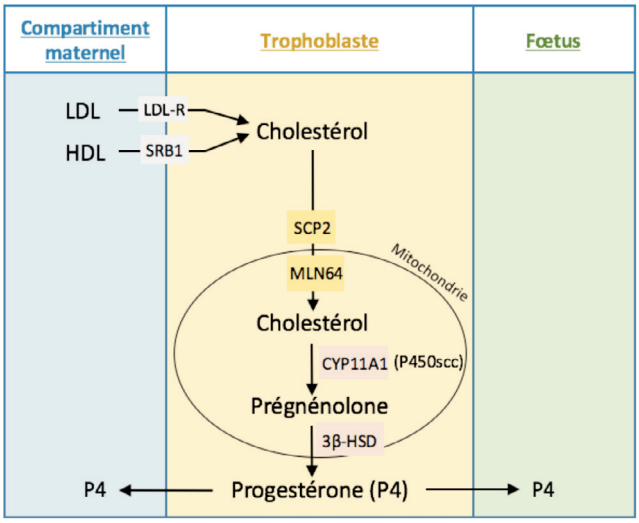


Figure 7/ Schéma de la synthèse de progestérone dans le syncytiotrophoblaste.

Le cholestérol provenant de la circulation maternelle est internalisé par le syncytiotrophoblaste et est transporté dans la mitochondrie via les transporteurs SCP2 (transporteur de la membrane externe) et MLN64 (transporteur de la membrane interne). L'enzyme CYP11A1 catalyse le clivage de la chaine latérale du cholestérol pour former la prégnénolone qui sera ensuite pris en charge par l'enzyme 3β-HSD pour obtenir la progestérone.

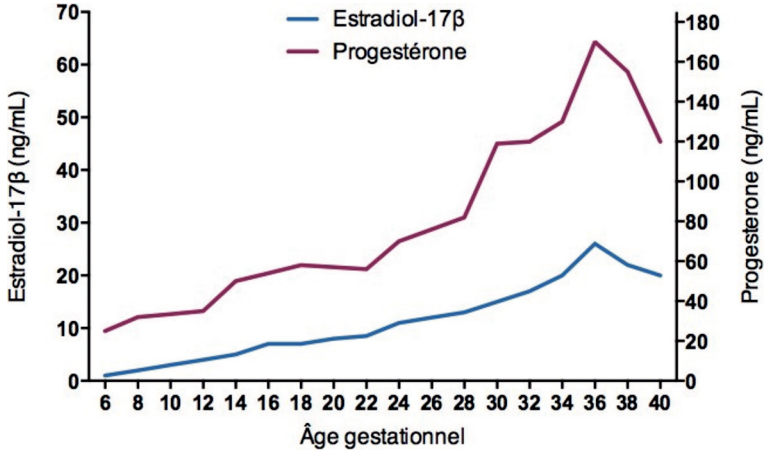


Figure 8/ Concentrations maternelles plasmatiques d'œstradiol et de progestérone au cours de la grossesse

Les valeurs sont exprimées en moyenne +/– SEM en fonction de l'âge gestationnel en semaines de grossesse.

rôle dans l'immunotolérance en stimulant l'expression de cytokines par les lymphocytes T maternels et en inhibant l'activité des cellules NK utérines [77]. Il a également été montré in vitro que la progestérone inhibe la fonction endocrine du placenta humain, en réduisant la sécrétion de l'hCG [78, 79], de la leptine [80] et de la résistine [81]. De plus, la progestérone prépare la glande mammaire à la lactation en stimulant la prolifération de l'épithélium mammaire et en empêchant la lactation avant le travail, ayant donc un effet antagoniste de la prolactine [82]. Enfin, la P4 participe aux changements métaboliques pendant la grossesse, en favorisant l'hyperphagie, le stockage des lipides et la résistance à l'insuline [83, 84].

La progestérone exerce ses effets par des voies génomiques et non-génomiques en activant différent récepteurs. Pour la voie génomique, cela passe par le récepteur nucléaire de la progestérone (PRα et PRβ), exprimés de manière ubiquitaire dans le placenta. Ce récepteur se dimérise après la liaison de la progestérone, médiant son action génomique par sa liaison à des éléments de réponse dans les promoteurs des gènes cibles. L'effet non-génomique passe par des voies de signalisation cytoplasmiques, médiées par un récepteur membranaire de la progestérone (membrane-associated progesterone receptor, MPR) et inclue l'activation des MAPK, une diminution de la production d'AMPc et une mobilisation du calcium intracellulaire [85].

Les œstrogènes

Les œstrogènes placentaires représentent un groupe de 4 hormones stéroïdes : œstrone (E1), 17β-œstradiol (E2), œstriol (E3) et œstetrol (E4). Il existe pour la synthèse des œstrogènes une coopération entre l'organisme maternel, le fœtus et le placenta car ce dernier est dépourvu du complexe enzymatique 17α-hydroxylase/17-20-lyase, nécessaire à la conversion de la pregnénolone en androgènes, eux-mêmes substrats de la synthèse des œstrogènes. Ce sont les glandes surrénales maternelles et fœtales qui participent à la production placentaire d'œstrogènes en fournissant le sulfate de déhydroépiandrosterone (DHEAS), un précurseur androgène, qui pénètre dans le ST par simple diffusion. Une stéroïde sulfatase placentaire hydrolyse ce précurseur en DHEA, puis les enzymes 3β-HSD et 17β-HSD forment de la testostérone et la cytochrome P450 aromatase (CYP19) convertit cette testostérone en œstrogènes (œstrone, œstradiol, œstriol) (**Figure 9**). Cette coopération entre le fœtus et le placenta a conduit au concept d'unité fœto-placentaire.

Durant les premières semaines de grossesse, les œstrogènes sont produits par le corps jaune puis le placenta prend le relai. Le niveau sanguin maternel d'œstrogènes augmente tout au long de la grossesse, avec un pic à terme, et l'œstradiol (E2) en est le plus abondant au niveau plasmatique [86].

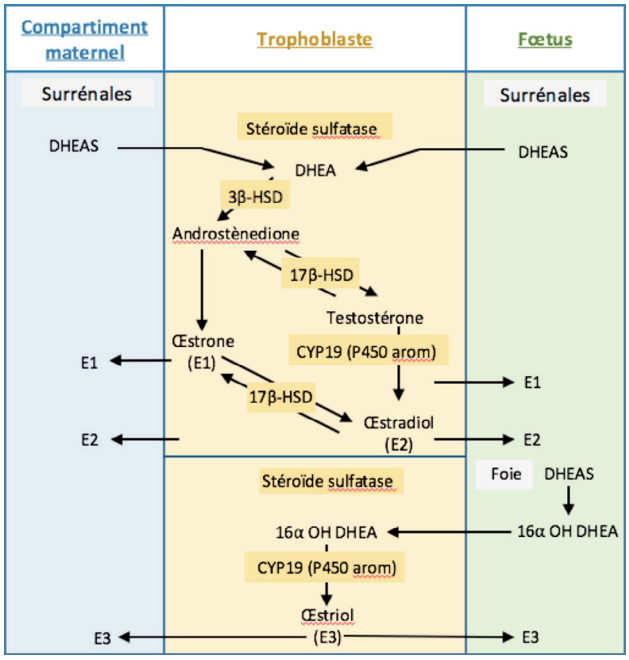


Figure 9. Schéma de la synthèse des œstrogènes dans le syncytiotrophoblaste

La synthèse placentaire des œstrogènes dépend du sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEAS) produit par les surrénales maternelles et fœtales ainsi que du 16α-hydroxydéhydroépiandrostérone (16α OH DHEAS) produit par le foie fœtal. Ces précurseurs sont hydrolysés dans le syncytiotrophoblaste par la stéroïde sulfatase puis pris en charge par la 3β-HSD, la 17β-HSD et le cytochrome P450 aromatase pour former les œstrogènes : œstrone (E1), œstradiol (E2) et œstriol (E3).

Les œstrogènes exercent plusieurs rôles pendant la gestation. Ils induisent notamment l'expression des récepteurs à la progestérone dans le muscle lisse utérin. Leurs effets sont classiquement médiés par l'activation des récepteurs nucléaires des œstrogènes ERα et ERβ. Comme pour la progestérone, ces récepteurs se dimérisent après liaison au ligand et modulent l'expression de nombreux gènes. Les œstrogènes peuvent également activer des récepteurs membranaires, ayant des effets non-génomiques incluant la mobilisation du calcium intracellulaire, l'activation de l'adenylyl cyclase conduisant à l'augmentation du niveau d'AMPc et à l'activation des MAPK [87]. Dans le placenta, l'expression de ERα est restreinte au CTV alors que ERβ est plus exprimé dans le ST [88].

Œstriol

L'œstriol est le plus abondant des œstrogènes dans l'urine. Sa principale fonction serait d'augmenter le flux sanguin utéroplacentaire [89] et aurait un possible rôle dans l'initiation du travail en augmentant la communication intercellulaire par jonctions gap dans les cellules du myomètre [90].

Œstetrol

L'Œstetrol est exclusivement produite par le foie fœtal, détectable à partir de la neuvième semaine post-fécondation, ses fonctions biologiques restent à identifier [91].

Œstradiol

L'œstradiol (E2) promeut l'implantation embryonnaire, stimule la croissance et la différentiation endométriale [92]. De plus, l'E2 promeut l'angiogenèse [93] et la vasodilatation des artères placentaires et utérines, indiquant un rôle dans la régulation du flux sanguin utéroplacentaire [94]. Tout comme l'œstriol, l'E2 joue un rôle dans la contraction du myomètre par formation de jonctions gap [90]. L'E2 stimule également la prolifération de l'épithélium mammaire, en préparation à la lactation [82]. Le rôle de l'œstradiol sur les trophoblastes reste peu élucidé, cette hormone a été montrée comme stimulant la syncytialisation des CTV primaires humains via ERα [88]. De plus, *in vitro,* chez l'humain, l'E2 stimule la formation du ST à partir de la fusion des cytotrophoblastes. Sa concentration maternelle plasmatique augmente au cours de la grossesse pour atteindre un pic en fin de grossesse, tout comme la progestérone (**Figure 8**).

Références

NON APPELÉ. Lecarpentier E, Fournier T, Guibourdenche J, Tsatsaris V. [Pathophysiology of preeclampsia]. *Presse Med* 2016b ; 45 : 631-7.

[1] Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015 ; 370 : 20140066.

[2] Gaccioli F, Lager S, Powell TL, Jansson T. Placental transport in response to altered maternal nutrition. *J Dev Orig Health Dis* 2013 ; 4 : 101-15.

[3] Boyd JD, Hamilton WJ, eds. *The Human Placenta*. Cambridge : Heffer, 1970.

[4] Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta. *Development* 2019 ; 146.

[5] Aplin JD, Ruane PT. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci* 2017 ; 130 : 15-22.

[6] Simpson RA, Mayhew TM, Barnes PR. From 13 weeks to term, the trophoblast of human placenta grows by the continuous recruitment of new proliferative units: A study of nuclear number using the disector. *Placenta* 1992 ; 13 : 501-12.

[7] Teasdale F, Jean-Jacques G. Morphometric evaluation of the microvillous surface enlargement factor in the human placenta from mid-gestation to term. *Placenta* 1985 ; 6 : 375-81.

[8] Fogarty NME, Mayhew TM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. A quantitative analysis of transcriptionally active syncytiotrophoblast nuclei across human gestation. *J Anat* 2011 ; 219 : 601-10.

[9] Burton GJ, Jones CJP. Syncytial Knots, Sprouts, Apoptosis, and Trophoblast Deportation from the Human Placenta. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009 ; 48 : 28-37.

[10] **Heazell et al., 2007 [[à compléter]]**

[11] Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN, eds. *Pathology of the Human Placenta*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012.

[12] Vähäkangas K, Myllynen, P. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol* 2009 ; 158 : 665-78.

[13] Aplin JD, Haigh T, Lacey H, Chen CP, Jones CJ. Tissue interactions in the control of trophoblast invasion. *J Reprod Fertil Suppl* 2000 ; 55 : 57-64.

[14] Jaffe R, Jauniaux E, Hustin J. Maternal circulation in the first-trimester human placenta-Myth or reality? *Am J Obstet Gynecol* 1997 ; 176 : 695-705.

[15] Moser G, Windsperger K, Pollheimer J, de Sousa Lopes SC, Huppertz B. Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions. *Histochem Cell Biol* 2018 ; 150 : 361-70.

[16] Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K, Ellinger I. Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta. *Front Pharmacol* 2018 ; 9 : 1027.

[17] **Lecarpentier 2016a [[merci de completer]]**

[18] Morley LC, Beech DJ, Walker JJ, Simpson NAB. Emerging concepts of shear stress in placental development and function. *Mol Hum Reprod* 2019 ; 25 : 329-39.

[19] Cha DH, Kim G. Dynamic role of trophoblast in human placental development. In: Berven E, Freberg A, eds. *Human Placenta: Structure and Development, Circulation and Functions*. Nova Biomedical, 2010, pp. 49-78.

[20] Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* 2006 ; 6 : 584-94.

[21] Le Bouteiller P, Blaschitz A. The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol Rev* 1999 ; 167 : 233-44.

[22] Chaouat G. Regulation of T-Cell Activities at the Feto-Placental Interface-by Placenta? *Am J Reprod Immunol* 1999 ; 42 : 199-204.

[23] Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell Mol Life Sci* 2016 ; 76 : 3479-96.

[24] Luckhardt M, Leiser R, Kingdom J, Malek A, Sager R, Kaisig C, Schneider H. Effect of physiologic perfusion-fixation on the morphometrically evaluated dimensions of the term placental cotyledon. *J Soc Gynecol Investig* 1996 ; 3 : 166-71.

[25] Illsley NP. Glucose transporters in the human placenta. *Placenta* 2000 ; 21 : 14-22.

[26] Regnault TRH, de Vrijer B, Battaglia FC. (2002). Transport and metabolism of amino acids in placenta. *Endocrine* 2002 ; 19 : 23-41.

[27] Lager S, Powell TL. Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy* 2012 ; 179827.

[28] Stulc J. Placental transfer of inorganic ions and water. *Physiol Rev* 1997 ; 77 : 805-36.

[29] McArdle HJ, Andersen HS, Jones H, Gambling L. Copper and iron transport across the placenta: regulation and interactions. *J Neuroendocrinol* 2008 ; 20 : 427-31.

[30] Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003 ; 21 : 3365-9.

[31] Banderali G, Martelli A, Landi M, *et al*. Short and long-term health effects of parental tobacco smoking during pregnancy and lactation: a descriptive review. *J Transl Med* 2015 ; 13 : 327.

[32] Pruett D, Waterman EH, Caughey AB. Fetal alcohol exposure: consequences, diagnosis, and treatment. *Obstet Gynecol Surv* 2013 ; 68 : 62-9.

[33] Wick P, Malek A, Manser P, *et al*. Barrier Capacity of Human Placenta for Nanosized Materials. *Environ Health Perspect* 2010 ; 118 : 432-6.

[34] Lamichhane DK, Leem JH, Lee JY, Kim HC. A meta-analysis of exposure to particulate matter and adverse birth outcomes. *Environ Health Toxicol* 2015 ; 30 : e2015011.

[35] Shah PS, Balkhair T, Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm/LBW births. Air pollution and birth outcomes: a systematic review. *Environ Int* 2011 ; 37 : 498-516.

[36] Burton GJ, Jauniaux E. What is the placenta? *Am J Obstet Gynecol* 2015 ; 213 : S6.e1-e4.

[37] Evain-Brion D. Maternal endocrine adaptations to placental hormones in humans. *Acta Paediatr Supp* 1999 ;

[38] Symonds ME, Mostyn A, Stephenson T. Cytokines and cytokine receptors in fetal growth and development. *Biochem Soc Trans* 2001 ; 29 : 33-7.

[39] Policastro PF, Daniels-McQueen S, Carle G, Boime I. A map of the hCG beta-LH beta gene cluster. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 5907-16.

[40] Gehring C, Siepmann T, Heidegger H, Jeschke U. The controversial role of human chorionic gonadotropin in the development of breast cancer and other types of tumors. *Breast* 2016 ; 26 : 135-40.

[41] Hay DL. Placental histology and the production of human choriogonadotrophin and its subunits in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1988 ; 95 : 1268-75.

[42] Alsat E, Malassiné A, Tarrade A, Merviel P, Evain-Brion D. Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste. *Med Sci* 1999 ; 15 : 1236-43.

[43] Makrigiannakis A, Vrekoussis T, Zoumakis E, Kalantaridou SN, Jeschke U. The Role of HCG

in Implantation: A Mini-Review of Molecular and Clinical Evidence. *Int J Mol Sci* 2017 ; 18 : 1305.

[44] Schumacher A, Zenclussen AC. Human Chorionic Gonadotropin-Mediated Immune Responses That Facilitate Embryo Implantation and Placentation. *Front Immunol* 2019 ; 10 : 2896.

[45] Berndt S, Blacher S, Perrier d'Hauterive S, *et al*. Chorionic gonadotropin stimulation of angiogenesis and pericyte recruitment. *J Clin Endocrinol Metab* 2009 ; 94 : 4567-74.

[46] Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, *et al*. Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 ; 87 : 5290-6.

[47] Ambrus G, Rao CV. Novel regulation of pregnant human myometrial smooth muscle cell gap junctions by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1994 ; 135 : 2772-9.

[48] Slattery MM, Brennan C, O'Leary MJ, Morrison JJ. Human chorionic gonadotrophin inhibition of pregnant human myometrial contractility. *BJOG* 2001 ; 108 : 704-8.

[49] Kane N, Kelly R, Saunders PTK, Critchley HOD. Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology* 2009 ; 150 : 2882-8.

[50] Schumacher A, Heinze K, Witte J, *et al*. Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. *J Immunol* 2013 ; 190 : 2650-8.

[51] Malassiné A, Frendo JL, Evain-Brion D. Trisomy 21 – affected placentas highlight prerequisite factors for human trophoblast fusion and differentiation. *Int J Dev Biol* 2010 ; 54 : 475-82.

[52] Pidoux G, Gerbaud P, Tsatsaris V, *et al*. Biochemical characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation. *J Cell Physiol* 2007 ; 212 : 26-35.

[53] Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem* 1997 ; 43 : 2233-43.

[54] Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, *et al*. Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. Placenta 2007 ; 28 : 175-84.

[55] Berndt S, Blacher S, Munaut C, *et al*. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin stimulates angiogenesis through TGF-β receptor activation. *FASEB J* 2013 ; 27 : 1309-21.

[56] Tarrade A, Lai Kuen R, Malassiné A, *et al*. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest* 2001 ; 81 : 1199-211.

[57] Handwerger S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000 ; 13 : 343-56.

[58] Napso T, Yong HEJ, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Front Physiol* 2018 ; 9 : 1091.

[59] Lacroix MC, Guibourdenche J, Fournier T, *et al*. Stimulation of Human Trophoblast Invasion by Placental Growth Hormone. *Endocrinology* 2005 ; 146 : 2434-44.

[60] Alsat E, Guibourdenche J, Couturier A, Evain-Brion D. Physiological role of human placental growth hormone. *Mol Cell Endocrinol* 1998 ; 140 : 121-7.

[61] McIntyre HD, Zeck W, Russell A. Placental growth hormone, fetal growth and the IGF axis in normal and diabetic pregnancy. *Curr Diabetes Rev* 2009 ; 5 : 185-9.

[62] Petraglia F, Vaughan J, Vale W. Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin- releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 5114-7.

[63] Schubring C, Kiess W, Englaro P, *et al*. Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 ; 82 : 1480-3.

[64] Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, *et al*. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997 ; 3 : 1029-33.

[65] Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, *et al*. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod* 2000 ; 6 : 951-8.

[66] Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998 ; 92 : 1020-8.

[67] Cameo P, Bischof P, Calvo JC. Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture. *Biol Reprod* 2003 ; 68 : 472-7.

[68] Coya R, Martul P, Algorta J, Aniel-Quiroga MA, Busturia MA, Señarís R. Effect of leptin on the regulation of placental hormone secretion in cultured human placental cells. *Gynecol Endocrinol* 2006 ; 22 : 620-6.

[69] Ladyman SR, Augustine RA, Grattan DR. Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. *J Neuroendocrinol* 2010 ; 22 : 805-17.

[70] Reverchon M, Maillard V, Froment P, Ramé C, Dupont J. Adiponectin and resistin: a role in the reproductive functions? *Med Sci* 2013 ; 29 : 417-24.

[71] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005 ; 26 : 439-51.

[72] Haghiac M, Basu S, Presley L, Serre D, Catalano PM, Hauguel-de Mouzon S. Patterns of adiponectin expression in term pregnancy: impact of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 ; 99 : 3427-34.

[73] Liu M, Liu F. Regulation of adiponectin multimerization, signaling and function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014 ; 28 : 25-31.

[74] McDonald EA, Wolfe MW. Adiponectin attenuation of endocrine function within human term trophoblast cells. *Endocrinology* 2009 ; 150 : 4358-65.

[75] Csapo AI, Knobil E, van der Molen HJ, Wiest WG. Peripheral plasma progesterone levels during human pregnancy and labor. *Am J Obstet Gynecol* 1971 ; 110 : 630-2.

[76] Ruddock NK, Shi SQ, Jain S, *et al*. Progesterone, but not 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate, inhibits human myometrial contractions. *Am J Obstet Gynecol* 2008 ; 199 : 391.e1-7.

[77] Raghupathy R, Al Mutawa E, Makhseed M, Azizieh F, Szekeres-Bartho J. Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *BJOG* 2005 ; 112 : 1096-101.

[78] Szilágyi A, Benz R, Rossmanith WG. Human chorionic gonadotropin secretion from the early human placenta: in vitro regulation by progesterone and its antagonist. *Gynecol Endocrinol* 1993 ; 7 : 241-50.

[79] Wilson EA, Jawad MJ, Powell DE. Effect of estradiol and progesterone on human chorionic gonadotropin secretion in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1984 ; 149 : 143-8.

[80] Coya R, Martul P, Algorta J, Aniel-Quiroga MA, Busturia MA, Señarís R. Progesterone and human placental lactogen inhibit leptin secretion on cultured trophoblast cells from human placentas at term. *Gynecol Endocrinol* 2005 ; 21 : 27-32.

[81] Lappas M, Yee K, Permezel M, Rice GE. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol* 2005 ; 186 : 457-65.

[82] Pang WW, Hartmann PE. Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2007 ; 12 : 211-21.

[83] Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2000 ; 71 : 1256S-61S.

[84] Kalkhoff RK. Metabolic effects of progesterone. *Am J Obstet Gynecol* 1982 ; 142 : 735-8.

[85] Goldman S, Shalev E. Progesterone receptor profile in the decidua and fetal membrane. *Front Biosci* 2007 ; 12 : 634-48.

[86] Loriaux DL, Ruder HJ, Knab DR, Lipsett MB. Estrone sulfate, estrone, estradiol and estriol plasma levels in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1972 ; 35 : 887-91.

[87] Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005 ; 19 : 833-42. 88 : 12-6.

[88] Bukovsky A, Cekanova M, Caudle MR, *et al*. Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reprod Biol Endocrinol* 2003 ; 1 : 13.

[89] Resnik R, Killam AP, Battaglia FC, Makowski EL, Meschia G. The stimulation of uterine blood flow by various estrogens. *Endocrinology* 1974 ; 94 : 1192-6.

[90] Di WL, Lachelin GC, McGarrigle HH, Thomas NS, Becker DL. Oestriol and oestradiol increase cell to cell communication and connexin43 protein expression in human myometrium. *Mol Hum Reprod* 2001 ; 7 : 671-9.

[91] Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJT. Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008 ; 110 : 138-43.

[92] Groothuis PG, Dassen HHNM, Romano A, Punyadeera C. Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update* 2007 ; 13 : 405-17.

[93] Jobe SO, Ramadoss J, Koch JM, Jiang Y, Zheng J, Magness RR. Estradiol-17beta and its cytochrome P450 – and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites stimulate proliferation in uterine artery endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha versus estrogen receptor-beta. *Hypertension* 2010 ; 55 : 1005-11.

[94] Corcoran JJ, Nicholson C, Sweeney M, *et al*. Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute responses to 17β-estradiol and estrogen-receptor-specific agonists. *Mol Hum Reprod* 2014 ; 20 : 433-41.

RESUME

La pollution atmosphérique est une préoccupation majeure et l'exposition de la femme enceinte peut conduire à des effets néfastes sur le développement et la croissance du fœtus ainsi que sur l'évolution de la grossesse. Le placenta est l'organe d'interface entre les circulations sanguines maternelle et fœtale, dont les échanges et les fonctions endocrines jouent un rôle crucial dans le bon déroulement de la grossesse. Le placenta agit également comme une barrière sélective contre les xénobiotiques qui peuvent passer les barrières épithéliales et se retrouver dans la circulation sanguine maternelle. La barrière placentaire est constituée d'un épithélium trophoblastique, des cytotrophoblastes villeux (CTV) bordés par un syncytium (ST) en contact avec le sang maternel. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les nanoparticules (NP) sont des polluants environnementaux pouvant franchir les barrières épithéliales, atteindre le placenta et porter atteinte à son intégrité et ses fonctions. Le Benzo(a)pyrène (BaP), un prototype de HAP, est formé lors de la combustion incomplète de la matière organique et retrouvé dans l'air ambiant (fumée de cigarette, gaz d'échappement automobile) ainsi que dans l'alimentation (grillades). Le BaP exerce ses effets cellulaires via sa métabolisation/bioactivation par le récepteur des hydrocarbures aromatiques AhR. Les NP de CeO_2 sont nouvellement utilisées pour diverses applications tels que agents pharmaceutiques potentiels, additif de cigarette et dans le carburant Diesel et donc émises massivement dans l'atmosphère.

Les travaux réalisés lors de ma thèse visent à évaluer l'impact des NP de CeO_2 et du BaP sur l'intégrité et les fonctions de la barrière placentaire humaine. Nous nous sommes intéressés à la caractérisation d'AhR au cours de l'ontogenèse placentaire dans différents modèles (villosités choriales, lignée trophoblastique BeWo et trophoblastes primaires humains) ainsi qu'à l'étude des effets des NP de CeO_2 et du BaP sur les trophoblastes primaires en exposition individuelle ou combinée. Nous avons établi une cartographie de l'expression placentaire d'AhR ainsi que de son activité au premier trimestre et à terme de grossesse, montrant sa localisation nucléaire constitutive en absence de ligand exogène, ajouté expérimentalement. Nos données suggèrent une activation intrinsèque d'AhR, probablement par des ligands placentaires endogènes, tel que la kynurénine formée à partir du tryptophane par l'enzyme IDO1 (indoleamine 2,3-dioxygénase 1). Nous avons montré qu'IDO1 a le même profil d'expression qu'AhR sans mettre en évidence de lien direct entre la présence d'IDO1 et l'activation constitutive d'AhR. Nous avons ensuite décrit pour la première fois que les NP de CeO_2 sont internalisées par les CTV et ST, diminuent l'activité métabolique trophoblastique de manière concentration et temps-dépendante, ont une action anti-oxydante et affectent la différenciation trophoblastique par la diminution de la capacité de fusion des CTV et la perturbation de la sécrétion des principales hormones de la grossesse (hCG, hPL, P4 et E2). L'étude de la cytotoxicité du BaP sur les trophoblastes nous a indiqué que le BaP induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et stabilise p53, un facteur de transcription stabilisé en cas de dommages à l'ADN et/ou stress oxydant, sans conduire à la mortalité des cellules. Nous n'avons pas rapporté d'effet supplémentaire de la co-exposition des trophoblastes aux deux polluants sur la viabilité cellulaire par rapport à l'exposition aux NP seules. Enfin, nous avons identifié les acteurs majeurs du stress cellulaire (p53, p21, NF-κB, HIF-1α, HIF-1β) dont le niveau est modulé lors d'une co-exposition des CTV au BaP et NP de CeO_2 versus leurs expositions individuelles. Nos travaux ont permis de mieux caractériser les conséquences biologiques de l'exposition de femmes enceintes à ces polluants seuls et en mélange, sur le développement et les fonctions placentaires.

Mots-clés : placenta humain, AhR, benzo(a)pyrène, nanoparticules, dioxyde de cérium, trophoblaste, hormones, différenciation cellulaire, IDO1, p53, ERO