Université de Paris

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité – ED 562

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

Traitements Maternels au long cours et Développement Foeto-Placentaire: Impact des Inhibiteurs de Protéases anti-VIH sur la Fonction Endocrine Placentaire, *In Vitro*

Par Camille Fraichard

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Dirigée par Jean Guibourdenche

Présentée et soutenue publiquement le 03 Décembre 2020

Devant un jury composé de :

Pr Michael Schumacher, DR INSERM 1195-Université Paris Sud–Paris Saclay, rapporteur

Dr Séverine Mazaud-Guittot, CR INSERM 1085-Université Rennes 1, rapporteure

Pr Marie-Noëlle Dieudonné, PU Université de Versailles St-Quentin en Yvelines, examinatrice

Dr Ioana Ferecatu, MCU Université de Paris, examinatrice

Dr Jeanne Sibiude, MCU-PH Université de Paris, examinatrice

Pr Jean Guibourdenche, PU-PH Université de Paris, directeur de thèse

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

Remerciements

Je remercie le Pr Michael Schumacher et la Dr Séverine Mazaud-Guittot pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci pour le temps que vous avez accordé à mon manuscrit.

Je remercie également la Pr Marie-Noëlle Dieudonné, la Dr Ioana Ferecatu et la Dr Jeanne Sibiude pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Pr Jean Guibourdenche pour avoir accepté de m'encadrer durant mon master 2 puis pendant cette thèse. Votre expérience a été nécessaire pour orienter les recherches tout au long de cette thèse.

A Madame la Dr Marylise Hébert-Schuster pour son encadrement, son dynamisme, ses précieux conseils et sa bienveillance.

A Madame la Dr Jeanne Sibiude pour m'avoir permis d'intégrer le projet de recherche ANRS n°17198 et m'avoir guidé sur la partie clinique de cette thèse.

A Monsieur le Dr Thierry Fournier de m'avoir accueilli dans son laboratoire « Physiopathologie et Pharmacotoxicologie du Placenta Humain, Microbiote Pré et Post Natal » pendant 5 ans depuis mon stage de Master 2.

A Madame la Dr Séverine Trabado et Monsieur le Dr Anthony Garnier du CHU Bicêtre pour avoir effectué les dosages en spectrométrie de masse ainsi que pour leur aide dans l'élaboration du premier article.

A Madame la Dr Marie Cohen de m'avoir si bien accueillie à Genève et conseillée dans la poursuite du travail. Je remercie également tous les membres de l'équipe : Christine WUILLEMIN, Pascale Ribaux, Lucile Yart et Daniel Bastida-Ruiz. Cette expérience à Genève m'a beaucoup appris et j'ai beaucoup apprécié travailler à vos côté durant cette période.

A Monsieur le Dr Bruno Ragazzon et Madame la Dr Marthe Rizk de l'unité INSERM UMR-S 8104 pour m'avoir appris les techniques nécessaires à l'étude de l'activité PKA.

A Monsieur René Lai-Kuen de la plateforme d'imagerie de la faculté de pharmacie pour avoir réalisé les coupes nécessaires aux expériences de microscopie électronique.

A Madame la Dr Christelle Laguillier-Morizot pour m'avoir aider sur ces expériences de microscopie électronique depuis la fixation des cellules à l'analyse des résultats.

A Madame la Dr Fidéline Bonnet et Madame la Dr Amina Bouzerrara ainsi que les personnels hospitalier du Service d'Hormonologie du Pr Jean Guibourdenche de l'hôpital Cochin pour avoir réalisé les dosages en immuno-analyse essentiels à ce travail.

A Monsieur le Pr Vassilis Tsatsaris et Monsieur le Dr Edouard Lecarpentier pour m'avoir permis de participer au projet APHERESE. Cette expérience a été très enrichissante.

Aux maternités de Port-Royal (Paris), de l'hôpital Antoine Béclère (Clamart), de l'hôpital privé d'Antony (Antony), de l'hôpital Bichat-Beaujon (Clichy) et de l'Institut Mutualiste Montsouris (Paris) d'avoir collaborer avec le laboratoire et nous avoir permis de recueillir les placentas nécessaires à cette étude.

Aux patientes de ces maternités d'avoir donné leur consentement pour le recueil de leur placenta. Sans leur participation cette étude n'aurait jamais vu le jour.

A Madame Audrey Chissey, à Madame Françoise Vibert, à Madame la Dr Pascale Gerbaud et à Madame Fatima Ferreira qui m'ont appris toutes les techniques de laboratoire utilisées pour ce travail. Merci pour votre patience face aux différentes erreurs de manip, pour vos conseils et votre soutien.

A Madame le Dr Amina Bouzerara, Madame Nathalie Sadanowicz et Madame Marie-Delphine Song qui ont travaillé avec moi sur ce projet pendant leurs stages de M1 et de M2 et qui ont permis de faire avancer cette thèse.

Merci à toute l'équipe UMR-S 1139, Amal Zerrad-Saadi, Ioana Ferecatu, Séverine Degrelle, Anne-Gaël Cordier, Sophie Gil, Josette Badet et Giovanna Vinci qui ont par leurs conseils, participé à améliorer ce travail de thèse.

Un grand merci à mes co-thésards : Margaux Nedder, Jessica Dalmasso, Louise Fliedel et Fulin Liu pour les discussions scientifiques ou non, pour leur soutien et leur conseils. J'ai beaucoup aimé partager cette aventure avec vous.

Un très grand merci à Madame Jasmina Rogozarski pour nos conversations, ses encouragements, son soutien et sa bienveillance continue. J'espère t'avoir apporté autant que tu l'as fait pour moi.

Merci Roger, Vivien, Ibtissam et Ibtissem, rencontrés au laboratoire et avec qui nous avons partagé de très bon moments.

Merci à mes amies Isabelle Hernandez, Anne-Sophie Bouvier et Nathalie Ly pour leurs précieux conseils et leur soutien sans faille. Merci d'avoir toujours répondu présente quand j'avais besoin de discuter et de me changer les idées.

Merci à la "family" de Besançon, Jeanne, Amélie, Justine, Justine, Jimmy et Thibault, qui ont été présents du commencement de mes études de biologie jusqu'à la fin. Nos échanges longues distances ou pas ont apporté rires et sourires tout au long de ce parcours.

Merci à la « team BCPP » Sarah et Marion, pour votre soutien et vos conseils. Merci également pour nos discussions sur la vie d'un laboratoire et ses complications qui m'ont permis de partager mon expérience.

Merci à Raphaëlle pour ton écoute et ton soutien. Notre rencontre au laboratoire a été le début d'un belle amitié.

Merci à toute ma superbe famille : tontons, tatas, cousins et cousines pour vos encouragements et votre soutien. Merci pour m'avoir permis de rire et changer d'air auprès de vous tous.

Un grand merci à mon frère Clément pour ces « ça va le faire grosse » et à ma sœur Clotilde pour son émerveillement sur ces résultats scientifiques. Leur soutien et leurs encouragement par skype ou lors de retour à la maison, ont été indispensables tout au long de ces 6 ans à Paris.

Merci ne suffirait pour mes parents Françoise et Patrice qui m'ont permis de faire ce que je souhaitais, quand je le souhaitais et où je le souhaitais. J'espère vous rendre fiers par ce travail autant que je suis fière de vous avoir.

Enfin merci à Thomas pour m'avoir écouté, pour m'avoir soutenu et pour avoir supporté H24 pendant ces 3 ans de thèse. La page d'une aventure se tourne pour ouvrir la plus belle de toute.

Abréviations

20-α-HSD : 20-α-Hydroxystéroïde Déshydrogénase

ABC transporters : ATP Binding Casset transporters

AC : Adénylate Cyclase

ACAT1 : Acyl-Coenzyme A/Cholesterol AcylTransferase 1

ACTH : Adreno Cortico Tropic Hormone

ActRII : Activin Receptor II

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

aFP : α-foetoprotéine

AKAP : A Kinase Anchoring Protein

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AMPK : AMP-activated protein kinase

ANT : Adenine Nucleotide Translocator

AP-1 : Activating-Protein 1

AP-2 : Activating-Protein 2

APOBEC : APOlipoprotein B mRNA-editing Enzyme

AQP : Aquaporine

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messager

ARNv : Acide RiboNucléique viral

ARV : AIDS-associated RetroViruses

ATF-1 : Activating Transcription Factor-1

ATF4 : Activating Transcription Factor 4

ATF6 : Activating Transcription Factor 6

ATP : Adénosine TriPhosphate

AZV : Atazanavir

BAX : Bcl-2 Associated X protein

BCRP : Breast Cancer Resistant Protein

BSA : Bovine Serum Albumine

CREB : cAMP Responsive Element Binding protein

CAP : Contraction-Associated Proteins

CCR5 : C-C motif chemokine receptor 5

CD4 : Cluster de Différenciation 4

Chol-S : cholestérol-sulfate

CHOP : C/EBP Homologous Protein

CMV : CytoMégaloVirus

CMX Ros : MitoTracker Red CMX Ros

CPI : Complexe de Pré-Intégration

CPSF6 : Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor subunit 6

CRE : CREB Response Element

CRH : Cortico-Releasing Hormone

CRM : Chaine Respiratoire Mitochondriale

CRM1 : Chromosomal Maintenance 1

CTs : Cytotrophoblastes

CTEV : Cytotrophoblaste Extra-Villeux

CTV : Cytotrophoblaste Villeux

CXCR4 : C-X-C motif chemokine receptor 4

CYP17 : 17α-monooxygénase,17α-hydroxylase

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

DHEA : Dhydroépiandrostérone

DHEA-S : Dhydroépiandrostérone Sulfaté

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

Drp1 : Dynamin related protein 1

DRV : Darunavir

DSP : Desmoplakine

DTT : Dithiothréitol

E1 : Oestrone

E2 : Oestradiol (estradiol)

E3 : Oestriol

EFV : Efavirenz

EGF : Epidermal Growth Factor

Epac : Exchange protein directly activated by cAMP

ER-α : Récepteur aux oestrogènes α

ER-β : Récepteur aux oestrogènes β

ERE : Estrogens Response Element

$ERK_{1/2}$: Extracellular signal-Regulated Kinase

ERR-γ : Estrogen-Related Receptor γ

Fiss1 : Fission protein 1

FSH : Follicle Stimuling Hormone

FSK : Forskoline

GATA : GATA binding protein

GCM1 : Glial Cell Missing 1

GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormone

GP120 : GlycoProtein120

GP41 : GlycoProtein41

GRP78 : Glucose-Related Protein 78

GRP94 : Glucose-Related Protein 94

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

hCG : human Chorionic Gonadotrophin

hCG-H : hCG Hyperglycosylée

HDL : High Density Lipoprotein

HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor-1

hPL : hormone Placental Lactogen

HRP-2 : Hepatoma-derived growth factor Related Protein 2

HSD3B1 : 3-β-HydroxyStéroïde Déshydrogénase/isomérase isoforme 1

HSD17B1 : 17-β-HydroxyStéroïde Déshydrogénase/isomérase isoforme 1

HSP60 : Heat Shock Protein 60

HTLV : Human T-Lymphotropic Virus

IDOL : Inducible degrader of LDL receptor

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1

IL-1 : Interleukine-1

IL-1β : Interleukine-1β

IL-4 : Interleukine-4

IL-6 : Interleukine-6

INTI : Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse

INNTI : Inhibiteurs Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse

IP : Inhibiteurs de Protéase

IRE1α : Inositol-Requiring Enzyme 1 α

JAK : Janus Kinase

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

LAV : Lymphadenopathy Associated Virus

LBP : Long terminal repeat Binding Protein

LC3b : Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B

LDL : Light Density Lipoprotein

LEDGF/p75 : Lens Epithelium Derived Growth Factor

LH : Luteinizing Hormone

LIF : Leukaemia Inhibitory Factor

LPV : Lopinavir

LRH : Liver Receptor Homologue

LT : Lymphocyte T

LTR : Long Terminal Repeat

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

Mash2 : Mammalian achaete/scute homolog-2

MDR1 : Multi Drug Resistance 1

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MEK : MAP ERK Kinase

MET : Microscopie Electronique à Transmission

Mfn1 : Mitofusine 1

Mfn2 : Mitofusine 2

miRNA : microRNA

MLN64 : Metastatic Lymph Nod 64

MRP : Multi-drug Resistance Proteins

NFkB : Nuclear Factor kappa B

NK : Natural Killer

NLS : Nuclear Localisation Sequence

NPC : Nuclear Pore Complex

NPC1 : Nieman-Pick type C1

NPC2 : Nieman-Pick type C2

NRF2 : Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPA1 : Optic Atrophy 1

P4 : Progestérone

P5 : Prégnénolone

P450SCC : Cytochrome P450 Side Chain Cleavage

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCSK9 : Proprotein convertase subtilisin/kexin-9

PE : Pré-Eclampsie

PERK : PKR-like ER-associated protein Kinase

PGC1α : PPARγ coactivator-1α

pGH : placental Growth Hormone

P-gp : P-glycoprotéine

PIP2 : Phosphatidylinositol-bisphosphate

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PLC : Phospholipase C

PlGF : Placental Growth Factor

pCO_2 : pression partielle en CO_2

pO_2 : pression partielle en oxygène

PPARγ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ

PR-A : Progesterone Receptor A

PR-B : Progesterone Receptor B

PRE : Progesterone Receptor Element

PREP : prophylaxie pré-exposition

PS : Pénicilline-Streptomycine

PTPD1 : Protein Tyrosin Phosphatase 1

qPCR : quantitative Reaction Chain Polymerase

RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin

RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G

RE : Réticulum Endoplasmique

R-LDL : Récepteur aux LDL

R-LH/CG : Récepteur LH/CG

ROS : Reactive Oxygen Species

RRE : Rev Response Element

RT : Reverse Transcription

RTC : Reverse Transcription Complex

RTV : Ritonavir

R-VLDL : Récepteur aux VLDL

SA : Semaine d'Aménorrhée

SCAP : SREBP Cleavage Activating Protein

SCP2 : Sterol Carrier Protein-2

SF-1 : Steroidogenic Factor-1 » (SF-1)

sFlt-1 : soluble Fms-like tyrosine kinase 1

SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise

Sp1 : Transcription Factor Sp1

SQV : Saquinavir

SR : Scavenger Receptor

SR-B1 : Scavenger Receptor B1

SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Proteins

ST : Syncytiotrophoblaste

StAR : Steroidogenic Acute Regulatory

STF : STF-083010

STS : Stéroïde Sulfatase

SVF : Sérum de Veau Fœtal

sXBP1 : spliced XBP1

T21 : Trisomie 21

TA : Température Ambiante

TAR : Transactivation Response Region

TBS : Tris-Buffered Saline

TGF-β : Transforming Growth Factor β

TGS : Tris-Glycine-SDS

TME : Transmission Mère-Enfant

TNF-α : Tumor Necrosis Factor-α

TSH : Thyroid Stimulating Hormone

uNK : uterin Natural Killer

UPR : Unfolded Protein Response

USF : Upstream Stimulatory Factors

VDAC : Voltage Dependant Anion Channel

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF-R1 ou VEGF-R2 : VEGF-Receptor 1 VEGF-Receptor 2

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLDL : Very Light Density Lipoprotein

XBP1 : X-Box Binding Protein 1

Liste des figures

Figure 1 : Structure du placenta humain…….. P23

Figure 2 : Implantation embryonnaire dans l'endomètre utérin……..P25

Figure 3 : Développement des villosités choriales……..P26

Figure 4 : Représentation schématique d'une villosité choriale tertiaire……..P27

Figure 5 : Barrière placentaire……..P29

Figure 6 : Formations des membranes fœtales……P31

Figure 7 : Schéma représentant l'internalisation et le transfert des acides gras à partir de lipoprotéines ou d'acides gras libre……..P32

Figure 8 : Métabolisme intracellulaire du cholestérol……P34

Figure 9 : Schéma représentant la localisation de différents transporteurs de glucose au niveau des villosités flottantes……P36

Figure 10 : Schéma représentant la localisation de différents transporteurs de glucose au niveau des villosités flottantes……P37

Figure 11 : Structure de l'hCG glycosylée……P40

Figure 12 : Evolution des taux sériques maternels d'hPL et d'hCG au cours de la grossesse……..P41

Figure 13 : Profil de sécrétion du PlGF en cours de grossesse……P45

Figure 14 : Profil de sécrétion de s-Flt1 au cours de grossesse……..P46

Figure 15 : Schéma représentant la synthèse des progestatifs à partir du cholestérol……P47

Figure 16 : Schéma représentant la voie de synthèse de la Progestérone (P4)……..P48

Figure 17 : Profil de sécrétion de l'hCG (bleu), la P4 (vert) et la 17-α-OH-P4 (rose)……P49

Figure 18 : Schéma représentant les voies de synthèse des oestrogènes, oestrone, oestradiol et oestriol……P52

Figure 19 : Schéma représentant la voie de signalisation AMPc/PKA……P56

Figure 20 : Schéma représentatif de la voie de signalisation induite par l'Activine……P57

Figure 21 : Schéma représentant la voie MEK/ERK$_{1/2}$ P59

Figure 22 : Schéma représentatif de la dynamique mitochondriale expliquant la différence structurale observée entre les mitochondries des CTV et celles des du ST.....P61

Figure 23 : Mécanisme d'entrée du cholestérol dans la mitochondrie.....P63

Figure 24 : Schéma représentatif des voies UPR en cas de stress du RE.....P65

Figure 25 : Image du VIH en microscopie électronique.....P72

Figure 26 : Génome du VIH.....P73

Figure 27 : Structure du VIH.....P74

Figure 28 : Schéma récapitulatif du cycle de réplication du VIH.....P75

Figure 29 : Mécanisme d'entrée du virus au sein des cellules cibles.....P76

Figure 30 : Mécanisme de décapsidation du cor viral.....P77

Figure 31 : Physiopathologie de l'infection par le VIH.....P81

Figure 32 : Cycle de réplication du virus et traitements anti-VIH.....P83

Figure 33 : Structure de certains Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI).....P84

Figure 34 : Structure des inhibiteurs de protéase anti-VIH.....P86

Figure 35 : Schéma représentatif des transporteurs d'efflux présents au niveau du syncytiotrophoblaste.....P93

Figure 36 : Schéma général du protocole d'extraction des CTV humains à partir de placenta à terme.....P105

Figure 37 : Schéma général des expérimentations réalisées.....P108

Figure 38 : Expression de l'enzyme Stéroïde Sulfatase (STS).....P145

Figure 39 : Augmentation de la sécrétion de prégnénolone (P5) et de progestérone (P4) par le cholestérol-sulfate (Chol-S).....P146

Figure 40 : Le substrat de la synthèse de progestérone (cholestérol-sulfate) n'influence pas l'expression des partenaires de synthèse.....P147

Figure 41 : Le LPV ne semble pas altérer la voie de signalisation AMPc/PKA.....P184

Figure 42 : Effet potentialisateur du RTV sur le LPV……P185

Figure 43 : Diminution de la sécrétion d'oestradiol (E2) au cours de la différenciation trophoblastique……P188

Figure 44 : Expression protéique des enzymes Stéroïdes Sulfatase (STS), HSD3B1, Aromatase et HSD17B1 impliquées dans la synthèse d'oestradiol dans les CTV et ST……P189

Figure 45 : Augmentation de la sécrétion d'oestradiol (E2) par la FSK à la fois au niveau CTV et ST……P190

Figure 46 : Augmentation de l'expression protéique des enzymes Stéroïdes Sulfatase (STS), HSD3B1 et Aromatase par la FSK……P191

Figure 47 : Corrélation négative entre les sécrétions d'hCG et d'E2 et entre celles de P4 et d'E2….P192

Figure 48 : Le RTV n'impacte pas la sécrétion d'oestradiol……P193

Figure 49 : Le RTV n'impacte pas l'expression des enzymes spécifiques de la synthèse de l'oestradiol……P194

Figure 50 : Le LPV augmente la sécrétion d'oestradiol……P195

Figure 51 : Le LPV diminue l'expression des enzymes STS, HSD3B1 et aromatase impliquées de la synthèse de l'oestradiol……P196

Figure 52 : Sécrétion d'oestradiol et de progestérone par les cellules BeWo……P197

Figure 53 : Les cellules BeWo expriment les enzymes clefs, Stéroïdes Sulfatase, Aromatase, HSD3B1 et P450SCC de la stéroïdogenèse placentaire……P198

Figure 54 : Schéma d'hypothèse d'auto-activation de l'hCG et de la P4 au cours de la différenciation trophoblastique……P231

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des données pharmacologiques des antirétroviraux……P88

Tableau 2 : Récapitulatif des différentes molécules privilégiées dans le traitement du VIH chez la femme enceinte……..P96

Tableau 3 : Concentration sérique maternelle maximale des IP étudiés au cours de la grossesse…..P97

Tableau 4 : Composition de la solution de trypsine pour la digestion des villosités……P106

Tableau 5 : Références et concentration des anticorps primaires utilisés pour le western-blot…….P110

Tableau 6 : Références et dilutions des anticorps secondaires utilisés pour le western-blot……P111

Tableau 7 : Références et concentrations des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunocytofluorescence……P112

Tableau 8 : Séquences « Forward » et « Reverse » des amorces utilisées pour la qPCR……. P115

Tableau 9 : Exemple de mélange réactionnel pour 1 extrait protéique……P119

Table des matières

Remerciements 2

Abréviations 5

Liste des figures 12

Liste des tableaux 15

Avant-propos 21

Le placenta humain 23

I. Développement du Placenta (Evain-Brion et Malassiné 2010; Benirschke, Burton, et Baergen 2013; « Embryology », s. d.) 23

i. Implantation Embryonnaire 24

ii. Développement des villosités choriales et du tissu trophoblastique 25

iii. Maturation villositaire, évolution placentaire et formation des membranes fœtales 29

II. Fonctions d'échanges placentaires 31

i. Transport des lipides 32

ii. Transports des autres nutriments 35

iii. Echanges gazeux et aqueux 37

III. Fonction de barrière placentaire 37

i. Transmission d'agents infectieux 37

ii. Transmission de médicaments et toxiques 38

IV. Fonction Endocrine du placenta (Ogren et Talamantes 1994; Evain-Brion et Malassiné 2010) 39

i. Hormones peptidiques 39

ii. Hormones stéroïdes 46

Fonction endocrine placentaire et Régulation intracellulaire 55

I. Voies de signalisation canoniques impliquées 55

i. Voie AMPc 55

ii. Voie des Smad 57

iii. Voie MEK/ERK$_{1/2}$ 58

iv. Autres voies de signalisation 60
II. Organites cellulaires impliqués 60
i. Mitochondrie 60
ii. Réticulum endoplasmique et voie UPR 64
III. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle 66
i. Facteurs de transcription 66
ii. Les microRNA (miRNA) 69
Virus de l'Immunodéficience Humaine 71
I. Présentation du virus 71
i. Description du virus 71
ii. Cycle de réplication du virus 74
II. Physiopathologie de l'Infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Bregnard 2012; Chaillon 2012) 80
i. Mode de transmission du VIH 80
ii. Déroulement de l'infection à VIH 81
iii. Suivi biologique des patients (Morlat et al. 2018) 82
III. Traitements anti-Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) 83
i. Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) (Tableau 1) 84
ii. Inhibiteurs de Protéases (IP) (Tableau 1) 85
iii. Inhibiteurs Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse (INNTI) (Tableau 1) 87
iv. Inhibiteurs d'entrée et Inhibiteurs d'intégration (Tableau 1) 87
Virus de l'Immunodéficience Humaine et Grossesse 89
I. Transmission mère-enfant du virus et traitements 89
i. Transmission du virus 89
ii. Passage des traitements antirétroviraux 91
II. Impact clinique des traitements anti-VIH sur la grossesse 94
i. Prise en charge maternelle 94
ii. Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) 97

iii. Inhibiteurs de protéases (IP) 97
III. Impact des inhibiteurs de protéase au niveau cellulaire 99
i. Voie de signalisations intracellulaire et IP 99
ii. Mitochondrie et IP 100
iii. Voie UPR et IP 101
Objectifs 102
Matériels et Méthodes 104
I. Culture primaire de Cytotrophoblastes Villeux (CTV) humain 104
i. Recueil des placentas et exclusion 104
ii. Surnageant et culot cellulaire 107
II. Extraction et dosage des protéines 108
i. Extraction des protéines 108
ii. Dosage des protéines 109
III. Western Blot 109
i. Préparation des échantillons 109
ii. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes : SDS-PAGE 109
iii. Transfert sur membrane de nitrocellulose 109
iv. Immuno-détection 110
IV. Immunocytofluorescence 111
i. Fixation des cellules 111
ii. Immunomarquage et coloration des noyaux 111
iii. Index de fusion 112
iv. Analyse des mitochondries par la sonde CMX Ros 112
V. Extraction des ARN totaux : kit Acturus® Picopure® 113
VI. Transcription Inverse 113
VII. Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR) 114
VIII. Microscopie Electronique à Transmission : en collaboration avec le Plateau Technique d'Imagerie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté de Pharmacie (M. René Lai-Kuen) 115

IX. Dosages hormonaux 116

i. Dosages par Immuno-Analyse : collaboration avec le service d'Hormonologie de l'hôpital Cochin (Pr J. Guibourdenche) 116

ii. Dosages par spectrométrie de masse GC-MS/MS : collaboration avec le service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie de l'hôpital Bicêtre (Dr S. Trabado et Dr A. Garnier A) 116

X. Culture cellulaire de la lignée de choriocarcinome BeWo 118

XI. Analyse de l'activité PKA : collaboration avec l'unité UMR-S 8104 (Dr Bruno Ragazzon et Dr Marthe Rizk) 118

XII. Etudes statistiques 119

Résultats Partie I : Caractérisation de la production placentaire in vitro de progestérone par le trophoblaste villeux humain 120

I. Introduction 120

II. Résumé des matériels et méthodes utilisés 120

III. Résultats 121

i. Article 1 : "Placental production of progestins is fully effective in villous cytotrophoblasts and increases with the syncytiotrophoblast formation" 121

ii. Résultats complémentaires : Effet du cholestérol sulfate 145

IV. Conclusion et discussion 147

Résultats Partie II : Altération de la fonction endocrine placentaire *in vitro* par les inhibiteurs de protéase anti-VIH 150

I. Introduction 150

II. Résumé des matériels et méthodes utilisés 150

III. Résultats 151

i. Article 2 : « Protease Inhibitor anti-HIV, Lopinavir, Impaires Placental Endocrine Function » 151

ii. Résultats complémentaires 184

IV. Conclusion 186

Résultats partie III : Résultats complémentaires 188

I. Oestrogènes placentaires et Inhibiteurs de Protéase (IP) 188
i. Caractérisation de la production des oestrogènes par le trophoblaste villeux 188
ii. Impact des IP (LPV et RTV) sur la synthèse d'oestradiol 193
II. Stéroïdogenèse dans un modèle de lignée cellulaire trophoblastique BeWo 197
Résultats partie IV : Résultats annexes 199
I. Article 3 : « Urinary sFlt-1 and PlGF levels are strongly correlated to serum sFlt-1/PlGF ratio and serum PlGF in women with preeclampsia » 200
II. Article 4 : « VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Functionalized Magnetic Beads in a Microfluidic Device to Improve the Angiogenic Balance in Preeclampsia » 204
Discussion et conclusion 224
Perspectives 237
Bibliographie 240
Annexes 276

Avant-propos

A l'heure actuelle, un nombre croissant de grossesses se déroule dans un contexte de traitement maternel au long cours comme celui du diabète ou de l'infection maternelle par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (World Health Organization 2016). Les Inhibiteurs de Protéase (IP) font partie intégrante de la thérapie anti-VIH qui se poursuit pendant la grossesse pour traiter les femmes mais aussi prévenir la transmission mère-enfant (TME) du virus en contrôlant sa réplication virale (Morlat et al. 2018). Cependant, plusieurs études cliniques ont mis en évidence une augmentation du nombre Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU) et du risque d'accouchement prématuré associés à l'utilisation des IP (Powis et al. 2011; Sibiude et al. 2012). Sur le plan biologique, il a été montré que les traitements des patientes VIH+ par les IP sont associés à une diminution des taux circulants de progestérone et une augmentation de ceux d'œstradiol, hormones placentaires indispensables respectivement au maintien de la grossesse et à la bonne adaptation maternelle (Papp et al. 2015; McDonald et al. 2018). Néanmoins, ni la relation de cause à effet ni les mécanismes cellulaires sous-jacents n'ont été clairement établis à ce jour mais ils pourraient résulter d'une perturbation de la stéroïdogenèse placentaire.

Le placenta est un organe situé à l'interface entre le fœtus et la mère qui assure différentes fonctions dont une fonction endocrine comprenant la production de glycoprotéines hormonales telles que l'hormone Chorionique Gonadotrope humaine (hCG), des facteurs de croissance comme le facteur de croissance placentaire (« Placental Growth Factor » [PlGF]) et son récepteur soluble de type 1 le « soluble Fms-like tyrosine kinase 1 » (sFlt-1), ainsi que des hormones stéroïdes telles que la progestérone et les oestrogènes. Cette fonction endocrine est assurée au sein du placenta, par le tissu trophoblastique principalement de type villeux à savoir le CytoTrophoblaste Villeux (CTV) et le SyncytioTrophoblaste (ST) (Malassiné et Cronier 2002). Cette fonction endocrine évolue avec la différenciation et le développement du placenta pour assurer le bon déroulement de la grossesse. L'hCG et la progestérone y occupent une position clef. En effet, le placenta produit rapidement et en quantité croissante de la progestérone indispensable au maintien de la grossesse par son action relaxante sur le muscle utérin. Cette production prend ainsi précocement le relais de la production de progestérone par le corps jaune ovarien induite par l'hCG en début de grossesse. A côté de cette action endocrine *stricto sensu*, l'hCG exerce aussi des actions paracrines et autocrines au niveau du placenta contrôlant son bon développement fonctionnel dont la production d'hormones stéroïdes et de facteurs de croissance (Rodway et al. 1988; Islami, Bischof, et Chardonnens 2003; Cole 2009). Ces hormones et ces facteurs sont à leur tour impliqués dans le développement du placenta comme l'angiogenèse pour le PlGF et sFlt-1, voire même le contrôle de la production d'hCG par la progestérone et les oestrogènes. Tous les acteurs de la fonction endocrine du placenta sont intriqués entre eux et

sont nécessaires au bon déroulement de la grossesse et du développement fœtal (Rodway et al. 1988; Barnea, Feldman, et Kaplan 1991; Islami, Bischof, et Chardonnens 2003; Cole 2009; Yung et al. 2014).

L'altération de cette fonction endocrine peut être « endogène » c'est-à-dire liée à la grossesse. La trisomie 21 (T21) fœtale est associée à des fausses couches importantes dans la première moitié de la grossesse mais aussi à une baisse de la concentration sanguine d'oestriol maternel (Loncar, Barnabei, et Larsen 1995; Wald et al. 1997). On observe aussi une augmentation des concentrations sériques maternelles en hCG en cas de T21 fœtale, à l'origine du dépistage sérique maternel de cette pathologie (Goetzl et al. 2004; Lindquist et al. 2018). La Pré-Eclampsie (PE), à l'origine de complications maternelles importantes et de naissances prématurées, résulte d'une dérégulation de la balance angiogénique sFlt-1/PlGF d'origine placentaire. Cette maladie spécifique du placenta humain est aussi associée à une diminution des concentrations maternelles sériques en oestradiol (Hertig et al. 2010; Berkane et al. 2018).

La perturbation de la fonction endocrine placentaire peut aussi être d'origine « exogène » sous l'action de médicaments, polluants ou perturbateurs endocriniens. Ainsi, la sécrétion d'hCG peut être diminuée par le Resvératrol et peut être augmentée par le Bisphénol-A et l'Atrazine *in vitro* souvent de façon dose dépendante (Paulesu et al. 2018; Shoaito et al. 2019). Si les choses sont bien établies pour l'hCG, elles sont par contre très peu connues pour les stéroïdes placentaires notamment la progestérone. Néanmoins, sur d'autres tissus endocrines comme l'ovaire ou la surrénale, la stéroïdogenèse peut être perturbée par divers médicaments dont les IP. Ainsi, les IP altèrent la synthèse des stéroïdes surrénaliens chez les nouveau-nés exposés *in utero* au traitement anti-VIH maternel (Kariyawasam et al. 2014), entrainant des faux positifs au dépistage néonatal de l'hyperplasie congénitale des surrénales. Il a aussi été montré sur un modèle murin que les IP perturbent la production de progestérone en cours de gestation (Papp et al. 2015).

Nous postulons donc que la prématurité observée au cours des grossesses traitées par IP pourrait résulter d'une atteinte iatrogène du placenta, perturbant la différenciation du trophoblaste villeux, sa fonctionnalité notamment endocrine, et *in fine* l'action de ces hormones.

Le placenta humain

Le placenta est un organe à l'interface de la mère et de son fœtus, indispensable au bon déroulement de la grossesse de par les nombreuses fonctions qu'il assure. Dans l'espèce humaine, le placenta se met en place dès le premier mois de développement pour devenir un placenta de type chorio-allantoïdien et hémochorial. Il est composé à terme, coté fœtal, de la plaque choriale où arrivent les vaisseaux fœtaux, du chorion renfermant les villosités choriales, et de la plaque basale côté maternel (*Figure 1*). Ces villosités baignent dans le sang maternel au sein de la chambre intervilleuse où s'abouchent les artères spiralées maternelles (*Figure 1*).

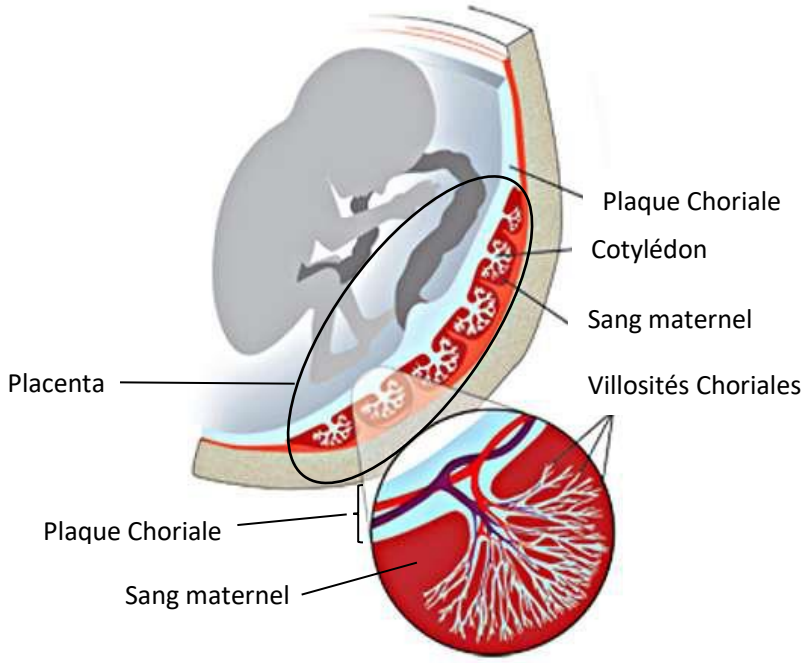


Figure 1 : Structure du placenta humain (adapté de (Vaillant s. d.)).

I. Développement du Placenta (Evain-Brion et Malassiné 2010; Benirschke, Burton, et Baergen 2013; « Embryology », s. d.)

Le placenta est un tissu d'origine extra-embryonnaire. L'embryon ou zygote qui résulte de la fécondation d'un ovocyte maternel par un spermatozoïde paternel, se divise et migre dans la trompe. Au bout d'une semaine de développement, il a épuisé ses réserves et doit s'implanter au niveau utérin pour survivre grâce aux ressources maternelles.

i. Implantation Embryonnaire

Au 6e jour de développement, le zygote atteint la cavité utérine sous forme blastocyste. Celui-ci est formé d'une couche cellulaire externe, le trophectoderme, qui encercle la masse cellulaire interne et une cavité, le blastocèle.

Du 6e au 8e jour après fécondation, le blastocyste s'appose à l'épithélium utérin, généralement dans la partie supérieure et postérieure de l'utérus. Le trophectoderme s'organise alors en un épithélium, le trophoblaste, donnant deux couches : une monocouche interne composée de cytotrophoblastes (CTs) et une assise externe polynucléée le syncytiotrophoblaste (ST). Grâce aux propriétés invasives de ce dernier, le blastocyste va rompre l'épithélium utérin pour s'implanter dans l'endomètre, phénomène appelé nidation définissant le stade pré-lacunaire du développement placentaire (*Figure 2.A, 2.B* et *2.C*). Au 9e jour après fécondation, des vacuoles apparaissent au sein du ST puis se regroupent pour former des lacunes (*Figure 2.D*). Le ST invasif érode l'endothélium des capillaires maternels permettant l'afflux du sang maternel dans ces lacunes, définissant le stade lacunaire du développement placentaire (*Figure 2.E* et *2.F*) (Evain-Brion et Malassiné 2010; Benirschke, Burton, et Baergen 2013; « Embryology », s. d.).

Concomitamment, le blastocèle mène à la cavité vitelline. Au sein de la masse cellulaire interne se différencie l'hypoblaste, couche cellulaire ventrale en contact avec le blastocèle, recouverte en position dorsale par l'épiblaste. Ce feuillet est en contact avec la cavité amniotique qui s'est développée dans la masse cellulaire interne dès le 7e jour de développement. L'apparition des deux feuillets l'hypoblaste et l'épiblaste permet de définir le stade d'embryon didermique (*Figure 2.B* et *2.C*). Au 9e jour post fécondation, le blastocyste se retrouve totalement enfoui dans l'endomètre utérin, le point d'implantation est comblé par un bouchon de fibrine (*Figure 2.D*). A partir de la 3e semaine de développement se développe un troisième feuillet, le mésoblaste situé entre l'hypoblaste et l'épiblaste. L'embryon est alors au stade tridermique comprenant trois tissus : entoderme, mésoderme, et ectoderme à l'origine des futurs organes et tissus du fœtus.

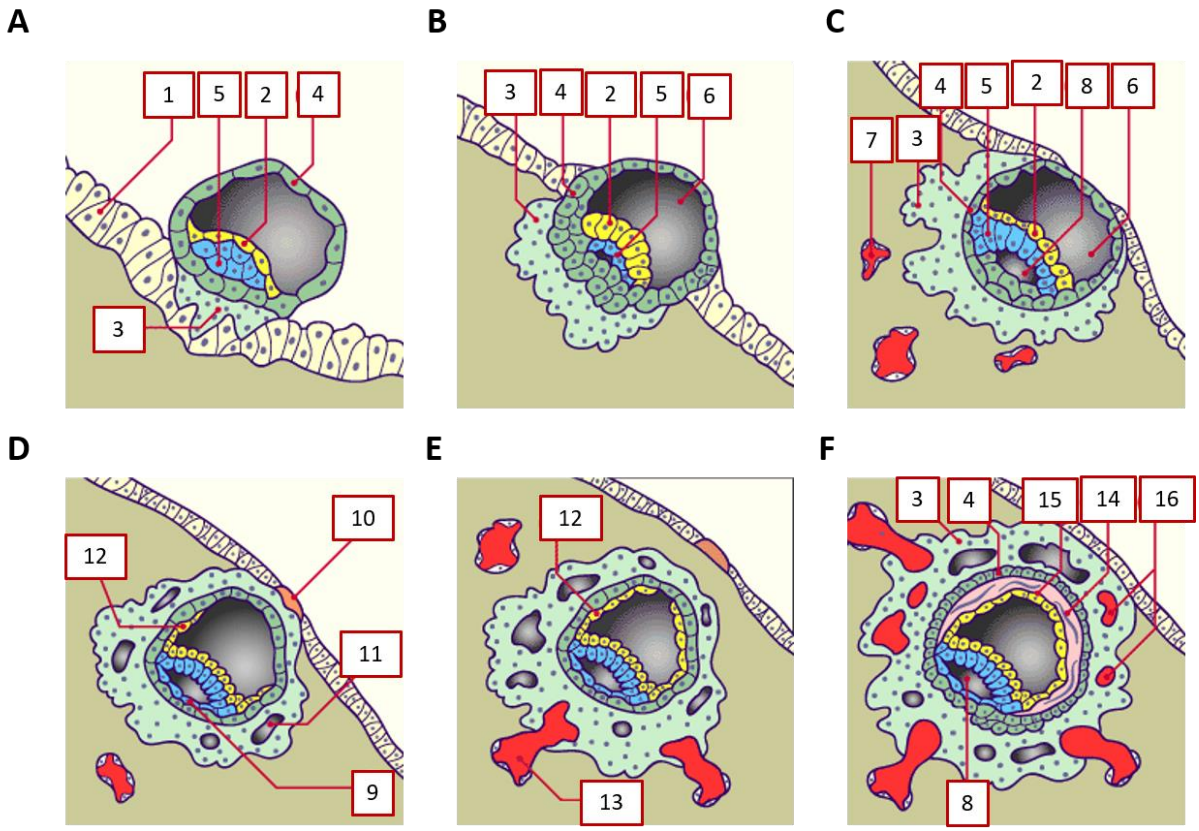


Figure 2 : Implantation embryonnaire dans l'endomètre utérin (adapté de « Embryology », s. d.). A : 6-7e jour. B : 7-8e jour. C : 8e jour. D : 9e jour. E : 9-10e jour. F : 10-11e jour. Légende : 1. Epithélium Utérin, 2. Hypoblaste (couche externe de la masse cellulaire interne), 3. Syncytiotrophoblaste (ST), 4. Cytotrophoblaste (CT), 5. Epiblaste (couche interne de la masse cellulaire interne), 6. Blastocèle (cavité du blastocyste), 7. Capillaire sanguin maternel, 8. Cavité amniotique, 9. Amnioblastes (cellules séparant la cavité amniotique des cytotrophoblastes), 10. Bouchon de fibrine obturant le point d'implantation, 11. Lacune du trophoblaste, 12. Hypoblaste en voie de prolifération, 13. Erosion des capillaires sanguins, 14. Réticulum extra-embryonnaire, 15. Membrane de Heuser, 16. Lac sanguin.

ii. *Développement des villosités choriales et du tissu trophoblastique*

Il s'effectue parallèlement au développement embryonnaire et en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les lacunes divisent le ST en travées syncytiales radiaires. Vers le 11e jour de développement, les CTs vont proliférer et envahir ces travées syncytiales formant ainsi les villosités choriales primaires (*Figure 3.B*). Le ST invasif érode les capillaires de l'endomètre permettant l'arrivée du sang maternel dans les lacunes. On parle de lacs sanguins maternels qui mèneront aux futures chambres intervilleuses. A partir du 16e jour, les cellules mésenchymateuses indifférenciées provenant du mésoderme extra-embryonnaire vont pénétrer dans le tronc cytotrophoblastique des villosités primaires et constituer un axe mésenchymateux menant aux villosités choriales secondaires (*Figure 3.C*). Ces villosités s'allongent et s'arborisent. Les CTs, par prolifération, peuvent déborder le ST et être

au contact direct de l'endomètre utérin, définissant ainsi les Cytotrophoblastes Extra-Villeux (CTEV). L'embryon est alors entouré d'une coque trophoblastique constituée de ces cellules trophoblastiques qui permettent la formation des villosités crampons. Vers le 21e jour, les capillaires fœtaux se développent dans l'axe mésenchymateux à partir du réseau chorio-allantoïdien menant aux villosités choriales tertiaires (*Figure 3.D*). Autour de ces villosités, les lacunes confluent pour constituer la future chambre intervilleuse.

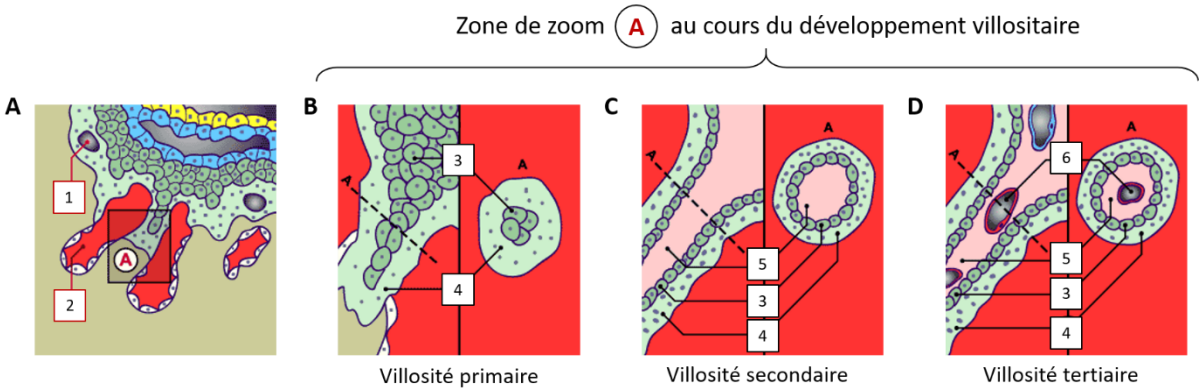


Figure 3 : Développement des villosités choriales (adapté de « Embryology », s. d.). A : Schéma de l'interface de développement des villosités. B : Villosité primaire. C : Villosité secondaire. D : Villosité tertiaire. Légende : 1. Vacuole syncytiale, 2. Vaisseaux sanguins maternels, 3. Cytotrophoblastes villeux (CTV), 4. Syncytiotrophoblaste (ST), 5. Mésoblaste extra-embryonnaire, 6. Capillaires fœtaux.

La villosité choriale tertiaire représente la structure histologique élémentaire du placenta humain. Sa structure définitive est composée d'un axe mésenchymateux comprenant les vaisseaux fœtaux, des cellules de Hoffbauer (macrophage) et des myofibroblastes. Cet axe est bordé par une couche de cytotrophoblastes villeux (CTV) mononucléés eux-mêmes recouverts d'un syncytium polynucléé, le ST (*Figure 4*). Cette villosité choriale constitue l'unité structurale et fonctionnelle du placenta humain et va ensuite maturer.

Ainsi, après le 21e jour, ces villosités tertiaires constituent les villosités primordiales qui s'arborisent formant des troncs villositaires de 3e et 4e ordre. Les troncs ancrés dans la caduque constituent les villosités dites crampons. Elles vont bourgeonner pour donner les villosités dites flottantes baignant dans la chambre intervilleuse. Cet ancrage est assuré par des dérivés des CTs progéniteurs et les CTEV, par opposition aux CTV situés dans les villosités choriales libres ou flottantes dans la chambre intervilleuse (*Figure 4*).

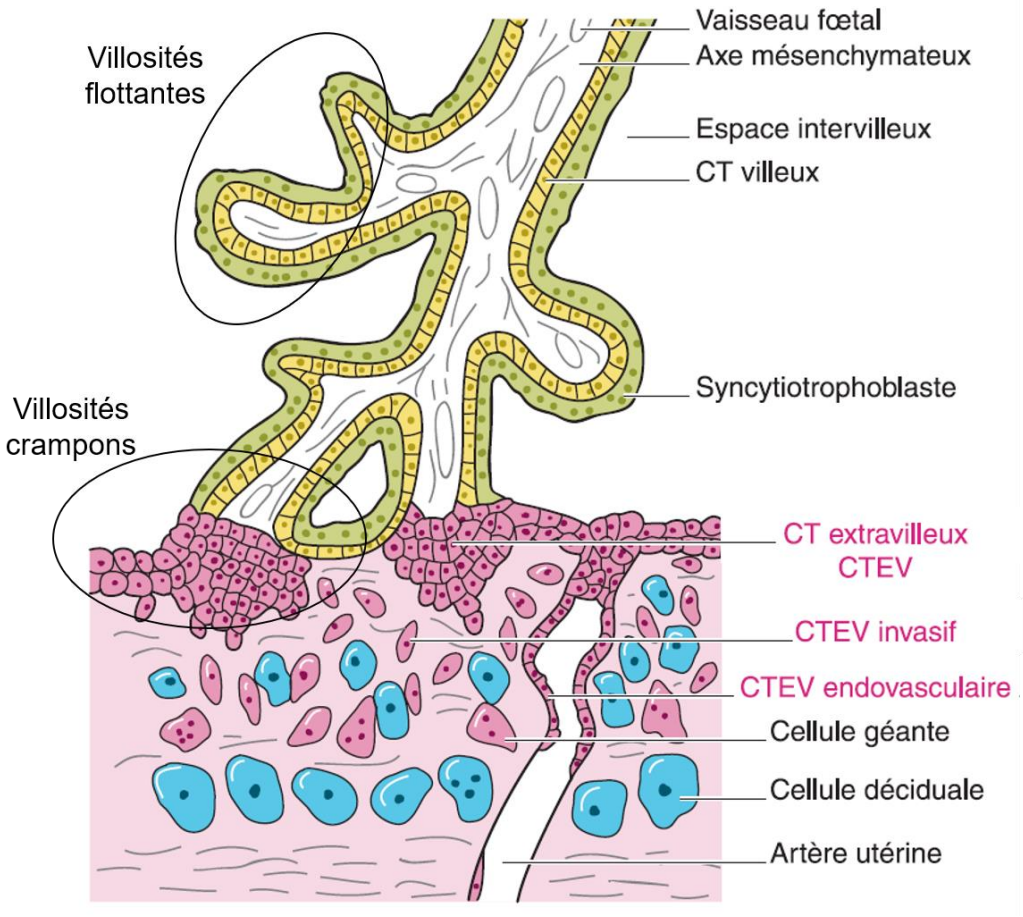


Figure 4 : Représentation schématique d'une villosité choriale tertiaire (adapté de Evain-Brion et Malassiné 2010). Deux types de villosités choriales, crampons ou flottantes, définissant les trophoblastes villeux et trophoblastes extra-villeux.

Les Cytotrophoblastes Extra-Villeux (CTEV)

Les CTEV sont, par définition, des cytotrophoblastes présents à l'extérieur de la villosité dans l'endomètre et le myomètre maternel. Au pied de la villosité ancrée, on distingue des CTEV prolifératifs organisés en colonne polarisée. Les CTEV les plus distants de la colonne vont perdre leur capacité prolifératives au profit d'un pouvoir invasif très important leur permettant d'envahir l'endomètre puis le myomètre utérin, menant aux CTEV invasifs. Lorsque qu'ils atteignent le tiers supérieur du myomètre, ils perdent leur pouvoir invasif et fusionnent entre eux pour former des cellules géantes polynucléées. La migration des CTEV est donc contrôlée. Elle est aussi dirigée puisque certains CTEV atteignent les artères spiralées pour les remodeler et donner ainsi les CTEV endovasculaires. En l'état actuel des connaissances, deux mécanismes expliquant l'origine de ces cellules coexistent. L'un est basé sur le phénomène d'intravasation, phénomène par lequel les CTEV invasifs colonisent la paroi des artères utérines pour la remodeler, ce qui entraine la disparition de la paroi musculaire des artères spiralées et donc une diminution de la résistance des artères au flux sanguin maternel. L'autre est basé

sur le phénomène d'extravasation, caractérisé par l'accumulation de cellules trophoblastiques endovasculaires à l'intérieur de la lumière des artères spiralées. Ils entrainent la présence des bouchons trophoblastiques qui empêchent le passage du sang au premier trimestre, principalement les hématies maternelles dans la chambre intervilleuse créant un environnement avec une faible pression partielle en oxygène (pO_2). A partir de la 10e semaine d'aménorrhée (SA), la disparition progressive des bouchons trophoblastiques et la diminution de la résistance artérielle permettent l'entrée progressive du sang maternel dans la chambre intervilleuse (Evain-Brion et Malassiné 2010; Benirschke, Burton, et Baergen 2013). La modification de la pO_2 est essentielle au bon développement placentaire. En effet, avec une faible pO_2, le facteur de transcription « Hypoxia Inducible Factor-1 » (HIF-1) permet de réguler l'expression de ses gènes cibles impliqués dans la régulation de l'angiogenèse, le maintien de la prolifération des CTs ainsi que le contrôle de la différenciation des CTs en CTEV ou ST (Chang, Wakeland, et Parast 2018).

La différenciation des CTEV est marquée par des modifications de l'expression de diverses protéines telles que les intégrines, les récepteurs à la matrice extracellulaire (MEC) et les protéases (enzymes capables de digérer la MEC et permettre ainsi l'invasion). Cette différenciation et cette invasion des CTEV relèvent d'un phénomène contrôlé par voie autocrine et paracrine grâce aux cellules environnantes (cytotrophoblastes, fibroblastes, cellules déciduales et cellules « Natural Killer » [NK] de la décidue maternelle) qui sécrètent différents facteurs comme des interleukines (IL-1 et IL-6), des facteurs de croissances (« Insulin-like Growth Factor-1 » [IGF-1] et « Epidermal Growth Factor » [EGF]) ou encore l'hCG. Le contrôle de l'invasion des CTEV est indispensable pour le déroulement de la grossesse. Un défaut d'invasion et/ou de remodelage des artères utérines entraine des pathologies de la grossesse (RCIU et PE). Au contraire, une invasion et/ou prolifération non contrôlées des CTEV peuvent conduire à la formation de môle hydatiforme et de choriocarcinome.

Les Cytotrophoblastes Villeux (CTV) et Syncytiotrophoblaste (ST)

Au sein des villosités choriales flottantes, l'axe mésenchymateux contenant les vaisseaux fœtaux est recouvert de CTV mononucléés qui se différencient en ST. Ce dernier est renouvelé constamment au cours de la grossesse grâce à la différenciation, agrégation et fusion des CTV sous-jacents. Ce renouvellement permet l'élimination du ST apoptotique, des organites intracellulaires en fin de vie, des fragments cytoplasmiques et membranaires à l'intérieur de vésicules appelées « knots syncytiaux ».

La différenciation des CTV en ST est une étape elle aussi hautement régulée notamment de façon autocrine et paracrine. Cette régulation implique des hormones placentaires comme l'hCG, des facteurs de croissance (EGF) ou encore des cytokines (« Tumor Necrosis Factor-α » [TNF-α]). La

différenciation trophoblastique résulte de nombreux processus cellulaires dont la fusion des membranes plasmiques entre CTVs ou entre CTV et ST. Cette fusion implique différentes protéines membranaires comme la connexine-43 et les syncytines (protéine d'enveloppe de rétrovirus) (Dupressoir et al. 2005; Malassiné et al. 2007; Evain-Brion et Malassiné 2010).

iii. Maturation villositaire, évolution placentaire et formation des membranes fœtales

Maturation villositaire

Les villosités tertiaires ou primordiales formées vont croitre en longueur et largeur jusqu'à définir les limites des chambres intervilleuses. Elles vont ensuite bourgeonner et former des ramifications définissant ainsi respectivement les villosités de second et troisième ordre. Au cours de la grossesse, les CTV sous-jacents au ST (*Figure 5.A*) perdent leur capacité de prolifération et ne forment plus qu'une fine monocouche. Le ST se retrouve donc parfois, par endroit, au contact de l'axe mésenchymateux en fin de grossesse (*Figure 5.B*). Cet amincissement de la barrière placentaire au cours de grossesse favorise les échanges entre la mère et le fœtus.

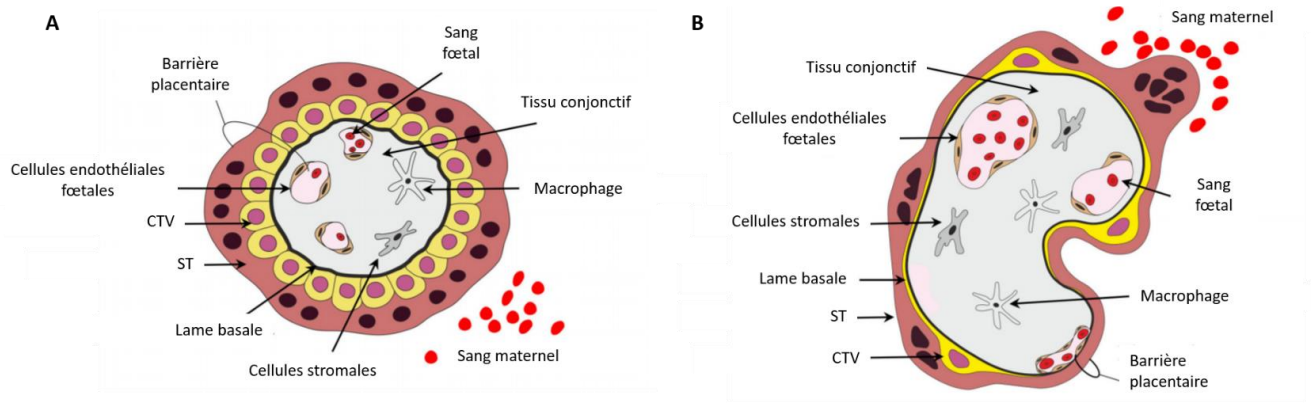


Figure 5 : Barrière placentaire (adapté de Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018). Schéma représentant la barrière placentaire au 1er trimestre de grossesse (A) et à terme (B). CTV : Cytotrophoblaste Villeux. ST : Syncytiotrophoblaste.

Parallèlement, au sein de ses villosités choriales tertiaires, les vaisseaux sanguins fœtaux formés à partir d'hémangioblastes se développent et maturent. Ils vont se ramifier et s'allonger sous contrôle notamment, des facteurs de croissance tel que le « Vascular Endothelium Growth Factor » (VEGF) ou « Placental Growth Factor » (PlGF) après fixation sur leurs récepteurs VEGF-R de type 1 (VEGF-R1) et 2. Le VEGF-R1 possède une forme soluble « soluble Fms-like Tyrosine kinase 1 » (s-Flt1) produite par le placenta qui agit comme un antagoniste du VEGF-R1 en modulant les fractions libres et bioactives de VEGF et de PlGF. A partir du 2e trimestre de grossesse, parallèlement à la maturation de la couche de CTV, le nombre de vaisseaux fœtaux augmente. Ces vaisseaux se rapprochent du ST

afin de faciliter les échanges materno-fœtaux et voient l'apparition dans leur paroi de micropores, définissant des vaisseaux fenestrés qui facilitent encore plus les échanges (Aoki, Metz, et Forssmann 1978; « Embryology », s. d.).

Evolution placentaire

A terme, le placenta est une structure discoïde d'environ 20 cm de diamètre pesant environ 500 g. Au cours du premier trimestre, sa masse est d'environ 100 g et donc bien supérieure à celle de l'embryon. Elles ne deviennent égales qu'à la fin du premier trimestre. A partir du second trimestre, la masse fœtale dépasse celle du placenta pour être 6 fois plus lourde à terme. Le placenta comprend alors la plaque basale, le chorion villeux avec la chambre intervilleuse et la plaque choriale avec les vaisseaux chorio-allantoïdiens. Côté maternel, les replis de la caduque constituent des septa qui cloisonnent le placenta en cotylédons.

Formation des membranes fœtales et localisation du placenta

Au contact du ST, l'endomètre se décidualise formant les caduques. La caduque basale correspond à la zone de l'endomètre décidualisé au niveau du site d'implantation, la caduque réfléchie à celle située au-dessus de l'œuf, et la caduque pariétale partout ailleurs. En regard de ces caduques, se trouve le tissu trophoblastique qui entoure initialement entièrement l'embryon dans une coque qui aboutira à la formation du chorion (*Figure 6*). Vers la 12e semaine, la cavité amniotique qui se développe à l'interface entre les cellules hypoblastiques et trophoblastiques, devient la principale et unique cavité ovulaire (*Figure 6*). Les villosités qui ne se trouvent pas en rapport avec la caduque basale régressent pour donner, face à la caduque réfléchie, le chorion lisse ou chauve. Le placenta se localise lui face à la caduque basale (*Figure 6*). La croissance de l'embryon entraine la disparition de la cavité utérine et donc la fusion des caduques réfléchie et pariétale. La cavité amniotique demeure alors la seule cavité intra-utérine (*Figure 6*). Les structures situées entre cette cavité et l'endomètre constituent les membranes fœtales en continuité avec le placenta.

Dès le quatrième mois, les annexes fœtales (placenta et membranes, cordon ombilical, cavité amniotique) sont en place.

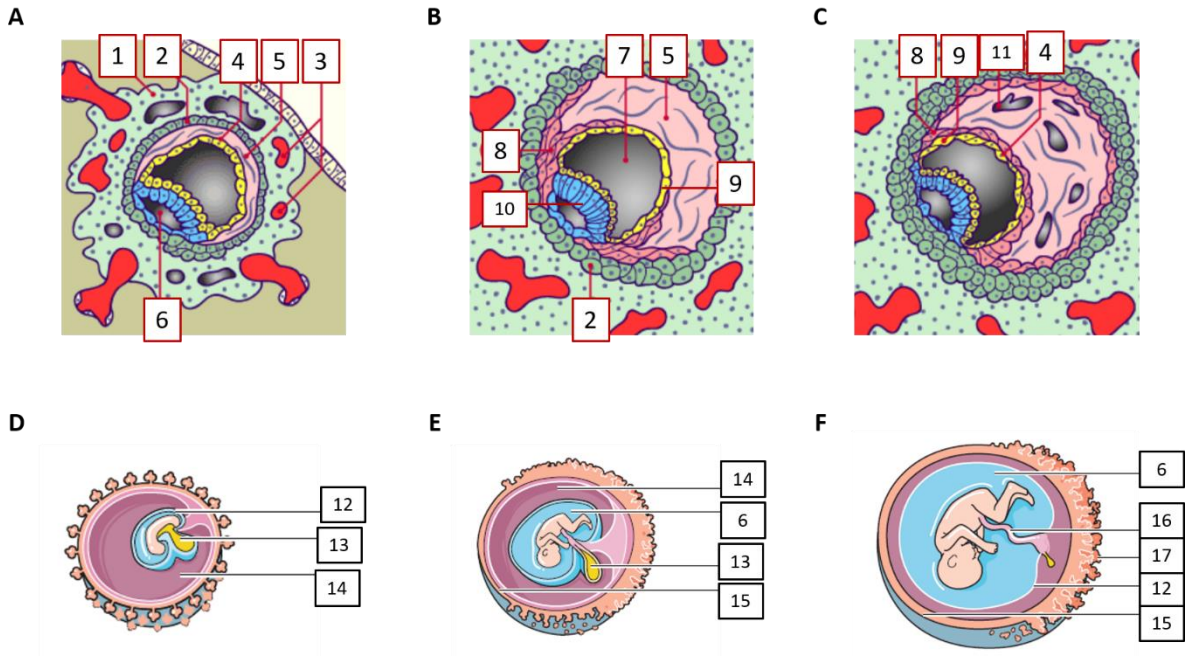


Figure 6 : Formations des membranes fœtales (adapté de (Evain-Brion et Malassiné 2010; « Embryology », s. d.). A. Développement du réticulum extra embryonnaire entre les cytotrophoblastes et hypoblastes. B. Différenciation des mésoblastes extra-embryonnaire à l'origine de l'axe mésenchymateux villositaire. C. Apparition de lacune à l'origine de la cavité chorionique au sein du réticulum extra-embryonnaire. D. Schéma des 3 cavités embryonnaires : chorionique, amniotique et vitelline. E. Apparition du chorion lisse par dégénérescence des villosités choriales situées à l'opposé du point d'implantation. F. Schéma final représentant les chorions lisse et chevelu ainsi que la cavité amniotique. 1 : Syncytiotrophoblaste (ST). 2 : Cytotrophoblastes (CT). 3 : Lacune sanguine. 4 : Membrane de Heuser. 6 : Cavité amniotique. 5 : Réticulum extra embryonnaire. 7 : Vésicule vitelline primitive. 8 : Mésoblaste extra-embryonnaire. 9 : Hypoblaste. 10 : Epiblaste. 11 : Lacune du Réticulum. 12 : Amnios. 13 : Vésicule vitelline. 14 : Cavité chorionique. 15 : Chorion lisse. 16 : Cordon ombilical. 17 : Chorion chevelu

II. Fonctions d'échanges placentaires

Pour assurer son développement et celui de l'embryon puis du fœtus, le placenta assure l'apport d'O_2 et de nutriments dont le glucose ainsi que l'export des catabolites comme le CO_2, la bilirubine et l'urée. Afin d'assurer cette fonction d'échanges, le placenta présente à la surface du ST, en contact direct avec le sang maternel, de nombreuses microvillosités permettant d'augmenter la surface d'échange. De plus, ces microvillosités sont pourvues d'un grand nombre de transporteurs essentiels à la fois au fœtus et au placenta. Au niveau placentaire, le métabolisme oxydatif est prépondérant. Les transferts d'eau et d'électrolytes impliquent également les membranes plasmiques placentaires notamment grâce à l'expression d'aquaporines. Au niveau placentaire, les échanges materno-fœtaux diffèrent entre le premier et les second et troisième trimestre à cause de l'obstruction physiologique

des artères spiralées jusqu'à la 10e SA. Une fois gagné le placenta, les nutriments doivent gagner la circulation sanguine fœtale là aussi via différents mécanismes et transporteurs.

i. Transport des lipides

La synthèse *de novo* de lipides par l'unité foeto-placentaire étant très faible, les lipides sont apportés par le sang maternel sous différentes formes : acides gras véhiculés par l'albumine ou l'α-foetoprotéine (aFP), les lipoprotéines pour le cholestérol, les phospholipides ou les triglycérides.

Acide Gras libres

Les acides gras sont internalisés dans le ST grâce à des protéines de transports « Fatty Acids Binding Protein plasma membrane », « Fatty Acids Translocase » ou « Fatty Acid Transporter Proteins » situés dans la membrane plasmique du ST, puis subissent l'action des lipases placentaires (*Figure 7*).

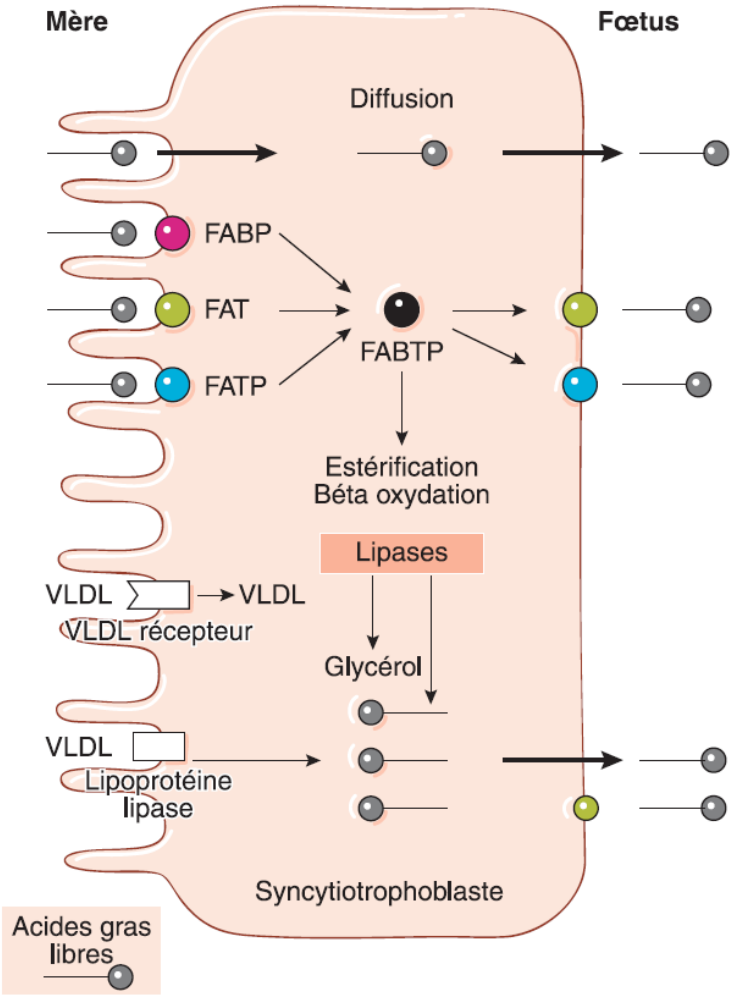


Figure 7 : Schéma représentant l'internalisation et le transfert des acides gras à partir de lipoprotéines ou d'acides gras libre (d'après Evain-Brion et Malassiné 2010).

Lipoprotéines, cholestérol et triglycérides

Le cholestérol et les triglycérides sont apportés par les lipoprotéines sanguines maternelles. En circulation, le cholestérol est associé aux lipoprotéines « Very Light Density Lipoprotein » (VLDL), « Light Density Lipoprotein » (LDL) ou « High Density Lipoprotein » (HDL) (Tal et al. 2015; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018). A son pôle apical, le ST possède des récepteurs spécifiques aux lipoprotéines, R-LDL et R-VLDL, ainsi que les « Scavenger Receptor » (SR) notamment le « Scavenger Receptor class B type 1» (SR-B1), capables de lier les différents types de lipoprotéines (*Figure 8*).

Après liaison aux R-LDL ou R-VLDL, les lipoprotéines sont internalisées par endocytose clathrine dépendante, aboutissant à la fusion des vésicules avec les endosomes précoces. Au cours du métabolisme, au sein des endosomes, les R-LDL vont être régénérés au niveau de la membrane plasmique. Le cholestérol, sous forme d'ester de cholestérol, est quant à lui métabolisé notamment par les lipases acides, permettant l'accumulation de cholestérol au sein des endosomes tardifs et lysosomes. Le transport des endosomes puis lysosomes vers la mitochondrie est contrôlé par les protéines « Nieman-Pick type C1 and C2 » (NPC1 et NPC2) ainsi qu'un transporteur spécifique le « Metastatic Lymph Node 64 » (MLN64). Ce dernier codé par le gène STARD3 appartient à la famille des transporteurs « Steroidogenic Acute Regulatory » (StAR). Le transport vers la mitochondrie est essentiel pour permettre la synthèse des hormones stéroïdes placentaires (*Figure 8.A*) (Hu et al. 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

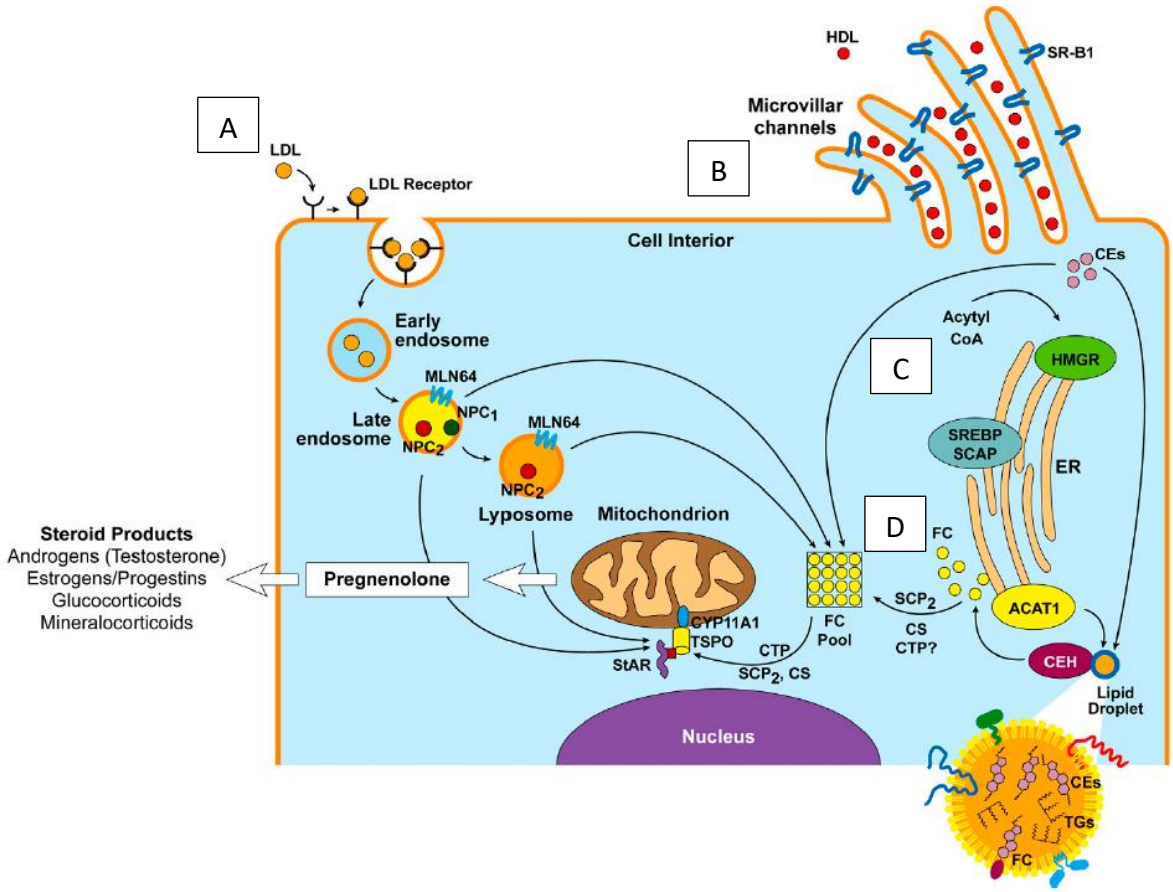


Figure 8 : Métabolisme intracellulaire du cholestérol (d'après Hu et al. 2010). A. L'internalisation du cholestérol contenu dans les LDL fait intervenir la voie endosomale et aboutit au transfert du cholestérol dans la mitochondrie à l'aide du transporteur MLN64. B. Les HDL après fixation sur le récepteur SR-B1, libèrent leurs esters de cholestérol constituant les gouttelettes lipidiques et le stock de cholestérol libre. C. La synthèse de novo de cholestérol s'effectue au sein du RE à partir de l'Acétyl-coA. D. Le transport intracellulaire du cholestérol fait intervenir SCP2.

L'apport de cholestérol, à partir du récepteur SR-B1, est permis par la formation d'un canal pour les esters de cholestérol à la base des microvillosités syncytiales, à proximité du récepteur. Les esters de cholestérol, ainsi libérés, sont incorporés dans des gouttelettes lipidiques qui peuvent être adressées à la mitochondrie pour la synthèse des hormones stéroïdes (*Figure 8.B*) (Hu et al. 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

Une très faible synthèse *de novo* de cholestérol peut s'effectuer à partir de l'Acétyl-CoA grâce à un complexe multienzymatique comprenant l'enzyme « HMG-CoA reductase » localisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Cette enzyme catalyse l'étape limitante de la synthèse de cholestérol. Elle est donc hautement contrôlée au niveau du RE, notamment par les facteurs « Sterol Regulatory Element Binding Proteins » (SREBP) eux-mêmes sous contrôle de la protéine « SREBP

Cleavage Activating Protein » (SCAP) (*Figure 8.C*). Le cholestérol libre ainsi formé est transporté vers la membrane plasmique ou estérifié par l'enzyme du RE « Acyl-Coenzyme A/Cholesterol AcylTransferase 1 » (ACAT1). Les esters de cholestérol sont stockés alors sous forme de gouttelettes lipidiques qui peuvent être adressées par la protéine MLN64 à la mitochondrie pour la synthèse d'hormones stéroïdes (Hu et al. 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

Il existe aussi un transport du cholestérol libre, au sein du cytoplasme, dépendant de différentes protéines comme NCP1, le transporteur « Sterol Carrier Protein-2 » (SCP2), la protéine chaperonne « Heat Shock Protein 60 » (HSP60) et la petite GTPase Rab 9 (*Figure 8.D*) (Evain-Brion et Malassiné 2010; Hu et al. 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

ii. Transports des autres nutriments

Le placenta est également capable de capter le glucose, les lactates et les acides aminés maternels pour assurer son propre métabolisme oxydatif ou transférer ces nutriments au fœtus.

Le glucose est un substrat énergétique essentiel pour le fœtus et le placenta qui sont tous deux incapables de réaliser la néoglucogenèse. La concentration en glucose côté fœto-placentaire étant plus faible que côté maternel, il n'est pas nécessaire d'utiliser un transport actif. Le glucose emprunte alors un transport facilité via des transporteurs les GLUT qui ont une localisation et une régulation placentaire différentes selon le type de GLUT (*Figure 9*). La pénétration du glucose dans le syncytiotrophoblaste est assurée par le GLUT1, localisé au niveau des microvillosités.

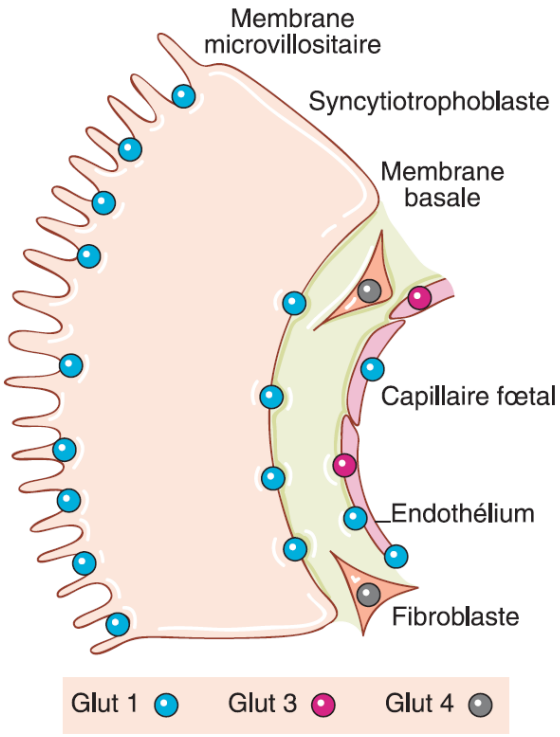


Figure 9 : Schéma représentant la localisation de différents transporteurs de glucose au niveau des villosités flottantes (d'après Evain-Brion et Malassiné 2010).

En ce qui concerne les acides aminés, leur transport nécessite de l'énergie. Les transporteurs sont donc couplés soit à une pompe Na+/K+/ATPase, soit à un canal ionique à Na+, ou alors sont organisés en symport ou antiport. Il est possible de classer les transporteurs selon leur besoin en Na+ ou selon le type d'acides aminés transportés, définissant ainsi les transporteurs Na+ dépendant comme les transporteurs du système A (protéines ATA1, 2 ou 3), les transporteurs du système ASC (protéine ASCT1), du système B° (protéine ASCT2), du système N, du système GLY, du système β et du système X^-_{GA} (protéines EAAT 1 à 5). Les autres transporteurs indépendants du Na+ appartiennent au système b°+, L, Y+L ou Y+ (*Figure 10*). Comme pour les GLUT, leurs localisations et régulations au niveau placentaire varient selon le type de transporteur (Jansson 2001; Evain-Brion et Malassiné 2010).

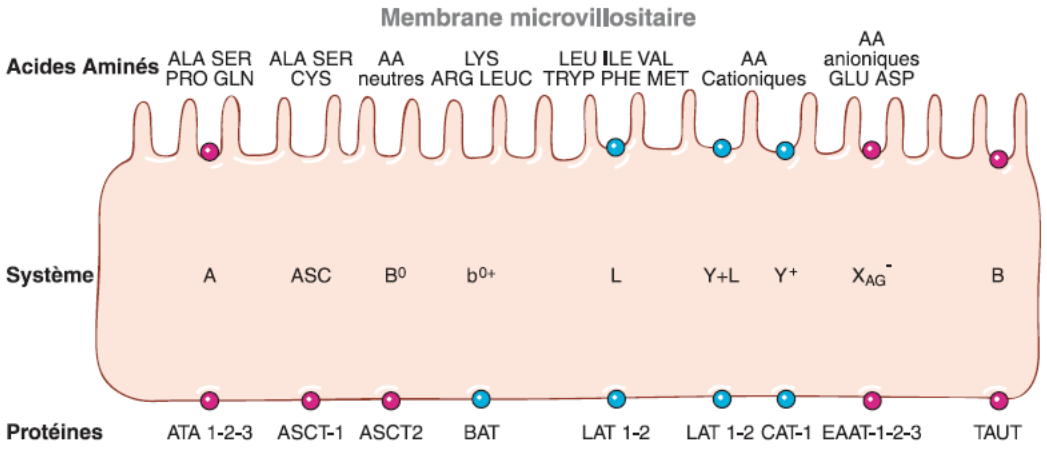


Figure 10 : Schéma représentant la localisation de différents transporteurs de glucose au niveau des villosités flottantes (d'après Evain-Brion et Malassiné 2010). Rose : Transporteur dépendant du sodium. Bleu : Transporteur indépendant du sodium.

iii. Echanges gazeux et aqueux

Les gaz, CO_2 et O_2, se diffusent à travers le placenta du fait du différentiel des pressions partielles pO_2 et pCO_2 entre la circulation maternelle et la circulation fœtale. Le transfert de l'eau, pour assurer l'homéostasie fœtale, se fait soit passivement à travers le ST grâce à des différences de pressions osmotiques, soit de façon facilitée par des transporteurs membranaires d'eau et de petites molécules, les aquaporines (AQP). De plus, il existe des discontinuités au niveau du ST créant des zones de passage pour l'eau et les molécules hydrosolubles, on parle de voies paracellulaires.

III. Fonction de barrière placentaire

Situé à l'interface entre la mère et le fœtus, le placenta assure un rôle de barrière plus ou moins protectrice vis-à-vis des agents infectieux, des médicaments et toxiques, des anticorps et des hormones maternelles. La transmission materno-fœtale sera variable d'une part, selon la molécule ou l'agent infectieux et d'autre part, selon l'âge gestationnel en raison de l'évolution tissulaire et de la maturation du placenta.

i. Transmission d'agents infectieux

La villosité flottante baignant dans le sang maternel, le ST qui la borde constitue le premier rempart aux agents pathogènes. La présence abondante de microvillosités apicales ainsi que le réseau sous membranaire d'actine permettent de limiter fortement l'incorporation d'agents infectieux dans le tissu trophoblastique (Arora et al. 2017). A cette barrière s'ajoutent des outils de défenses immunologiques (expression des récepteur Toll-like, expression de peptides de la famille des

défensines…) (Arora et al. 2017). A l'heure actuelle, différents mécanismes de transmissions ont été invoqués : la transmission par des lymphocytes eux-mêmes infectés, la trans-endocytose à travers le placenta ou la formation de complexe Immunoglobuline-Virus capable de traverser le placenta (détails dans la partie « VIH et grossesse »).

Les bactéries traversent relativement peu le placenta à l'exception de la listeria et du tréponème. Certains virus traversent facilement la barrière placentaire et se révèlent tératogènes comme le virus de la rubéole ou le cytomégalovirus alors que d'autres comme le VIH traverse peu ou pas le placenta. En ce qui concerne les parasites, le toxoplasme entraine des atteintes embryo-fœtales alors que le plasmodium responsable du paludisme pénètre dans le placenta sans pour autant atteindre le compartiment fœtal.

ii. Transmission de médicaments et toxiques

Les molécules exogènes peuvent être transmises au fœtus à travers différents mécanismes : phagocytose, pinocytose, diffusion passive ou facilitée et transport actif. Contrairement aux infections par des agents pathogènes, les effets tératogènes des toxines ne varient pas ou peu avec l'âge gestationnel. Seul le taux de transfert changera au cours de la grossesse en raison notamment, de l'évolution de la barrière placentaire mais aussi du métabolisme fœtal et maternel. La transmission de ces molécules est souvent dépendante de leur nature et de leurs propriétés physicochimiques.

Médicaments

Le transfert placentaire des médicaments n'implique pas ou peu la phagocytose et la pinocytose car ce sont des processus trop lents. La diffusion passive est possible pour des molécules liposolubles de petit poids moléculaire non chargées et non ionisées. Le taux de transfert dépendra aussi de la liaison de ces molécules aux protéines vectrices telles que l'albumine et α1-glycoprotéine dont les concentrations maternelles varient au cours de la grossesse (Evain-Brion et Malassiné 2010). Les autres molécules peuvent emprunter différents types de transporteurs. Ainsi, certains transporteurs d'acides aminés (Hlat1, NET ou SERT) seront utilisés permettant l'entrée des molécules dans le placenta vers le fœtus. On parle alors de transporteurs d'influx. Dans cette catégorie se trouvent des transporteurs de cations (OCTN1 et OCTN2), des transporteurs des acides nucléiques (ENT1 et ENT2) ou encore des canaux « Solute Carrier ». En sens inverse, des transporteurs protègent le fœtus en exportant les molécules vers le compartiment maternel, on parle alors de transporteurs d'efflux. A l'heure actuelle, 3 familles ont été décrites, (i) le transporteur type P-glycoprotéine (ii) les transporteurs « Breast Cancer Resistant Protein » (BCRP) et enfin (iii) les transporteurs « Multi-drug Resistance Proteins » (MRP) (Gulati, Boudinot, et Gerk 2009; Neumanova et al. 2015). Les inhibiteurs

de protéase anti-VIH font partie des médicaments pouvant être transportés côté fœtal et seront détaillés ultérieurement (détails dans la partie « VIH et grossesse »).

Toxiques

Certains composés de la fumée de cigarette sont des particules hydrosolubles avec un faible poids moléculaire ou sont des composés gazeux, ils sont donc facilement transmissibles par voie transplacentaire. La nicotine est transférée grâce au transporteur à cations OCTN1. L'alcool par ses propriétés physico-chimiques peut diffuser passivement à travers le placenta et comme le fœtus ne possède pas l'équipement enzymatique permettant de le métaboliser, il entraine une toxicité fœtale.

IV. Fonction Endocrine du placenta (Ogren et Talamantes 1994; Evain-Brion et Malassiné 2010)

La fonction endocrine placentaire est indispensable au bon déroulement de la grossesse. Elle est assurée par la villosité choriale, principalement le trophoblaste villeux : CTV et ST. Le placenta produit des hormones de types peptidiques et stéroïdes. Ces hormones vont agir de manière endocrine à la fois sur l'organisme maternel et fœtal, mais aussi paracrine sur les cellules placentaires (fibroblastes, cellules endothéliales…) ou autocrine sur le tissu trophoblastique lui-même.

i. Hormones peptidiques

Le placenta est capable de produire de nombreuses hormones peptidiques : l'hormone Chorionique Gonadotrope humaine (hCG), l'hormone de croissance placentaire « placental Growth Hormones », (pGH), l'hormone lactogène placentaire (« hormone Placental Lactogen », (hPL)…..), des facteurs de croissances comme le facteur de croissance placentaire « Placental Growth Factor » (PlGF), des facteurs de la famille du « Transforming Growth Factor β » (TGF-β) et des neuropeptides (« Cortico-Releasing Hormone » [CRH]). Celui-ci présente ainsi une certaine similitude avec les gonades et l'axe hypothalamo-hypophysaire (Tal et al. 2015).

hCG

Structure et synthèse

L'hCG est une glycoprotéine constituée de 2 sous unités α et β liées de manière non covalente (***Figure 11***). La sous unité α codée par le gène *CGA* située sur le chromosome 6 est commune aux autres gonadotrophines (« Follicle Stimuling Hormone » [FSH], « Luteinizing Hormone » [LH]…). En revanche, la sous unité β est différente pour chaque gonadotrophine conférant au dimère sa spécificité d'action. La sous unité α est synthétisée en excès au contraire de la sous unité β qui régule donc la synthèse globale de l'hCG. La sous unité β de l'hCG est codée par le gène *CGB* organisé en cluster sur le

chromosome 19. La sous unité β de l'hCG est la plus longue des différentes gonadotrophines avec, au niveau de l'extrémité C-ter une séquence de 30 acides aminés, non présente dans la sous unité β de la LH. La constitution du dimère α/β a lieu au sein du réticulum endoplasmique (RE) (Cahoreau, Klett, et Combarnous 2015; Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015).

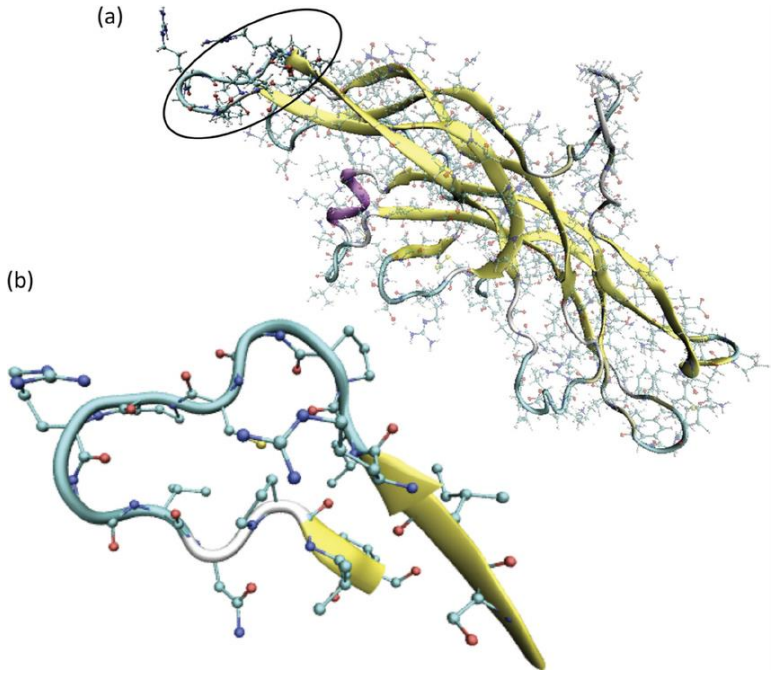


Figure 11 : Structure de l'hCG glycosylée (d'après Gregor et al. 2011). (a) Structure globale de l'hCG. (b) Structure du segment 66-80 de la sous unité β de l'hCG.

Comme toutes les gonadotrophines, l'hCG subit diverses glycosylations à la fois au niveau du RE puis de l'appareil de Golgi. La sous unité α possède 2 sites de N-glycosylation. La sous unité β de l'hCG est la plus glycosylée des sous unités β des gonadotrophines avec 2 sites de N-glycosylation et 4 sites de O-glycosylation (Cahoreau, Klett, et Combarnous 2015; Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015). Ces glycosylations conditionnent la conformation, l'activité biologique et la clairance de l'hormone. En effet, des études ont démontré qu'un défaut de glycosylation entraine une activité biologique plus faible de l'hCG (Frendo et al. 2004). De plus, des formes hyperglycosylées de l'hCG (hCG-H), sécrétées massivement pendant les premières semaines de grossesse par les CTEV, régulent l'invasion grâce à une action de type facteurs de croissances (Berndt et al. 2013; Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015; Evans 2016).

Sécrétion et catabolisme

L'hCG correspond au premier signal connu, produit par l'embryon et sécrété par le trophoblaste dans le sang maternel après implantation. Sa présence dans le sang maternel démontre la présence d'une grossesse. Elle est détectable dans la circulation maternelle dès le 7e jour de

grossesse (Evain-Brion et Malassiné 2010). Les concentrations d'hCG dans le sang maternel augmentent de manière exponentielle au cours des premières semaines de grossesse pour atteindre une concentration maximale d'environ 100 000 UI/L vers la 10e semaine de grossesse (Tal et al. 2015). La sécrétion d'hCG diminue rapidement à partir de la 12e semaine de grossesse et atteint autour de la 16e semaine de grossesse un niveau basal d'environ 20 000 UI/L qui est maintenu jusqu'à l'accouchement (*Figure 12*) (Evain-Brion et Malassiné 2010; Tal et al. 2015).

La demi vie de l'hCG total est comprise entre 24 et 36h contre 3h pour la sous unité β et 2h pour la sous unité α. Elle est métabolisée au niveau hépatique et rénal puis éliminée par les urines majoritairement sous la forme d'un petit peptide, le fragment β core de la sous unité β.

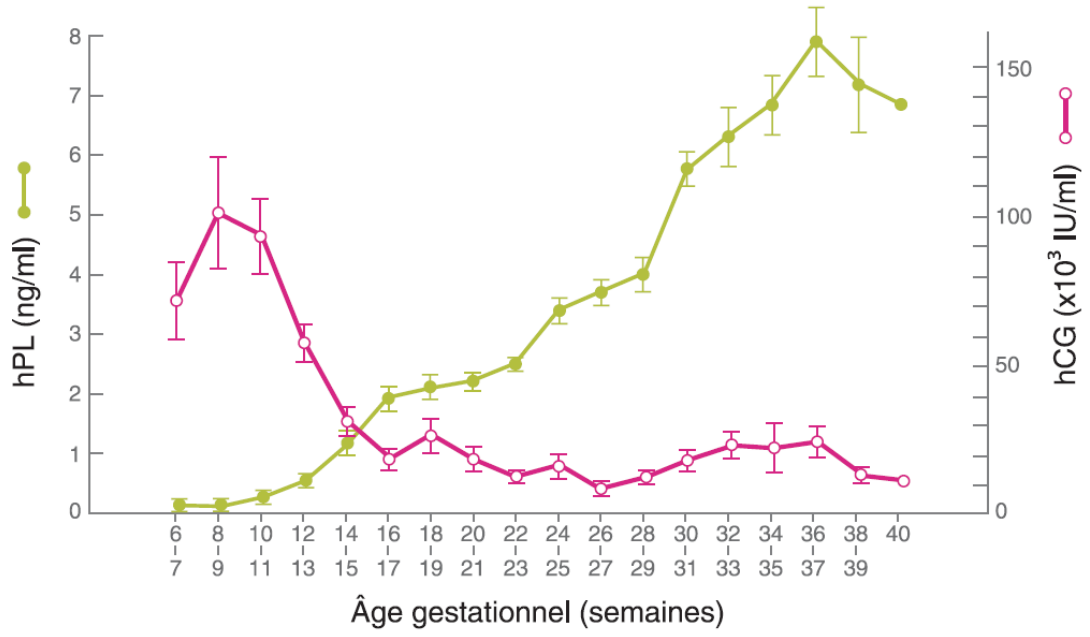


Figure 12 : Evolution des taux sériques maternels d'hPL (vert) et d'hCG (rose) au cours de la grossesse (d'après Evain-Brion et Malassiné 2010).

Action et Rôles physiologiques

Mécanisme d'action

L'hCG agit de manière : endocrine sur le corps jaune mais aussi sur la thyroïde, paracrine sur l'endomètre utérin et le placenta, autocrine sur le tissu trophoblastique. Son action intracellulaire passe principalement par la liaison à son récepteur LH/CG (R-LH/CG) qui est capable, entre autre, d'activer la stéroïdogenèse. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. La fixation entre l'hCG et le R-LH/CG aboutit à l'activation de l'adénylate cyclase (AC) ou de la phospholipase C (PLC) par la protéine G associée au récepteur. L'activation de l'AC induit une augmentation de l' « Adénosine Mono Phosphate cyclique » (AMPc) intracellulaire provoquant

l'activation de la Protéine Kinase A (PKA) ou de la protéine « Exchange protein directly activated by cAMP » (Epac). L'activation de PLC induit le clivage du « Phosphatidylinositol-bisphosphate » (PIP2) aboutissant notamment à l'activation de la Protéine Kinase C (PKC) (Evain-Brion et Malassiné 2010; Tsampalas et al. 2010).

Rôles sur l'organisme maternel

L'hCG a une action paracrine indispensable au maintien de la grossesse dès l'implantation en stimulant notamment l'expression des facteurs « Leukaemia Inhibitory Factor » (LIF), « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) et de l'Interleukine-6 (IL-6) indispensable à l'adhésion du blastocyste (Tsampalas et al. 2010; Evans 2016). L'hCG-H contrairement à l'hCG agit comme une cytokine car elle se fixe sur le récepteur du TGF-β de type II, aboutissant à l'activation de la voie des Smad (Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015). L'hCG-H semble impliquée dans l'implantation embryonnaire en régulant de manière autocrine l'invasion des CTEV et de façon paracrine l'angiogenèse placentaire (Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015; Evans 2016). Lors de l'implantation, l'hCG joue un rôle dans la régulation de l'immunotolérance maternelle vis-à-vis de l'allogreffe que représente l'implantation de l'embryon dans l'endomètre maternel. Elle régule notamment la balance entre les cellules type Th1 (Lymphocyte CD8+ et macrophage) et Th2 (Lymphocyte CD4+). De plus, elle favorise le recrutement des cellules T régulatrices et cellules « Natural Killer » utérines (uNK) (Tsampalas et al. 2010; Evans 2016). Il en résulte un profil cytokinique favorable à l'implantation embryonnaire.

L'hCG sécrétée dans le sang maternel exerce elle, une action endocrine permettant de transformer le corps jaune ovarien en corps jaune gravidique. Ce dernier assure alors la production de progestérone essentielle au maintien de la grossesse grâce à son action myorelaxante pendant les 6 premières semaines de grossesse (Vause et Saroya 2005; Evain-Brion et Malassiné 2010; Tal et al. 2015; Evans 2016). L'hCG exerce aussi une action de type « Thyroid Stimulating Hormone » (TSH) sur la thyroïde. L'hCG est sécrétée en beaucoup plus faible quantité dans le compartiment fœtal où elle intervient dans le développement gonadique.

Actions sur le placenta

Tout au long de la grossesse, l'hCG en agissant de manière paracrine et autocrine assure le « turn-over » et la bonne différenciation des CTV en ST. La fusion des CTV en ST est associée à une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Par conséquent, l'hCG en activant l'AC est un stimulateur essentiel de la différenciation trophoblastique (Malassiné et Cronier 2002). Cet effet stimulant sur les CTV est médié par son R-LH/CG majoritairement exprimé au niveau des CTV (Pidoux et al. 2007). L'hCG

induit également une réorganisation de la connexine-43 au niveau membranaire permettant la fusion des membranes (Pidoux et al. 2014). Enfin, la voie AMPc/PKA inductible par l'hCG, régule positivement le facteur « Glial Cell Missing 1 » (GCM1) aboutissant à l'augmentation de l'expression des syncytines et donc de la différenciation des CTV en ST (Knerr et al. 2005).

L'hCG, par activation de la voie AMPc/PKA, contrôle donc directement et indirectement la production de différentes hormones placentaires notamment la progestérone et les oestrogènes, conférant à l'hCG et à l'AMPc un rôle pivot dans le développement morphologique et fonctionnel du placenta humain (Rodway et al. 1988; Gerbaud, Taskén, et Pidoux 2015).

Autres Hormones peptidiques

Hormone Lactogène Placentaire (hPL)

L'hPL est une hormone monomérique synthétisée en grande quantité, principalement par le ST (Evain-Brion et Malassiné 2010). Sa structure est semblable à celle de la prolactine et de l'hormone de croissance placentaire (pGH) (Tal et al. 2015). Contrairement à l'hCG, les concentrations d'hPL dans le sang maternel augmentent tout au long de la grossesse jusqu'au terme en relation avec l'augmentation de la masse placentaire (*Figure 12*). La demi-vie de l'hPL est courte, entre 15 min à 60 min.

L'hPL agit en se liant au récepteur de l'hormone de croissance et au récepteur de la prolactine, induisant l'activation de kinases et de phospholipases. Par voie endocrine, l'hPL régule l'adaptation métabolique maternelle notamment pancréatique favorisant le développement d'une insulino-résistance. On observe ainsi l'augmentation de la synthèse d'insuline par stimulation de la prolifération des cellules β pancréatiques (Nadal et al. 2009). De plus, l'hPL stimule le catabolisme des réserves lipidiques maternelles (Tal et al. 2015). Elle est aussi indispensable à la lactation puisqu'elle régule l'expression des protéines du lait (caséine, lactoglobuline et lactalbumine) et qu'elle est impliquée dans le développement de la glande mammaire (Maazouzi 1993; Kelly et al. 2002).

Hormone de Croissance placentaire (pGH)

La pGH (« placental Growth Hormone ») circule à des concentrations beaucoup plus faibles que l'hPL dans le sang maternel. A la différence de l'hormone de croissance hypophysaire, sa sécrétion n'est pas pulsatile. Elle augmente ainsi constamment au cours de la grossesse de façon à remplacer la sécrétion de l'hormone de croissance hypophysaire à mi grossesse (Alsat, Haziza, et Evain-Brion 1993; Lacroix et al. 2002; Hill 2018). La pGH est métabolisée au niveau hépatique et rénal.

La pGH, comme l'hPL, agit sur les récepteurs de l'hormone de croissance et de la prolactine qui appartiennent à la famille des récepteurs tyrosine kinase, aboutissant à l'activation des « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK) ou de la PKC. Tout comme l'hPL, la pGH module l'adaptation métabolique maternelle selon des mécanismes différents. En effet, la pGH n'influe pas l'insulino-résistance maternelle mais stimule, au niveau hépatique, la production d'IGF-1, le catabolisme lipidique et la néoglucogenèse (Hill 2018). Elle module également le transport du glucose au niveau tissulaire et donc placentaire via les GLUT. La pGH intervient dans la lactation uniquement dans le développement alvéolaire de la glande mammaire sans influer sur l'expression des protéines du lait (Kelly et al. 2002).

Facteurs de croissance

Le placenta sécrète de nombreux facteurs de croissance notamment de la famille du TGF-β comme les activines et les inhibines. L'activité de ces hormones est médiée après liaison à des récepteurs de type tyrosine kinase, par activation des voies de signalisation dépendantes des facteurs Smad. Au niveau placentaire, ces hormones synthétisées surtout par le trophoblaste villeux, vont agir de manière paracrine ou autocrine afin de réguler la différenciation des CTV en ST ainsi que la sécrétion d'hCG, de progestérone et d'oestrogènes (Petraglia, Vaughan, et Vale 1989; Song, Keelan, et France 1996; Petraglia 1997; Florio et al. 2004; Gerbaud et al. 2011).

Le placenta produit également des facteurs angiogéniques comme le « Placental Growth Factor » (PlGF) et son récepteur soluble de type 1 (sFlt-1). Le PlGF est un facteur de croissance de la famille du « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF). Au cours de la grossesse, sa production et sa sécrétion dans le compartiment maternel augmente jusqu'à atteindre un plateau en fin du 2e trimestre de grossesse puis décroitre (*Figure 13*).

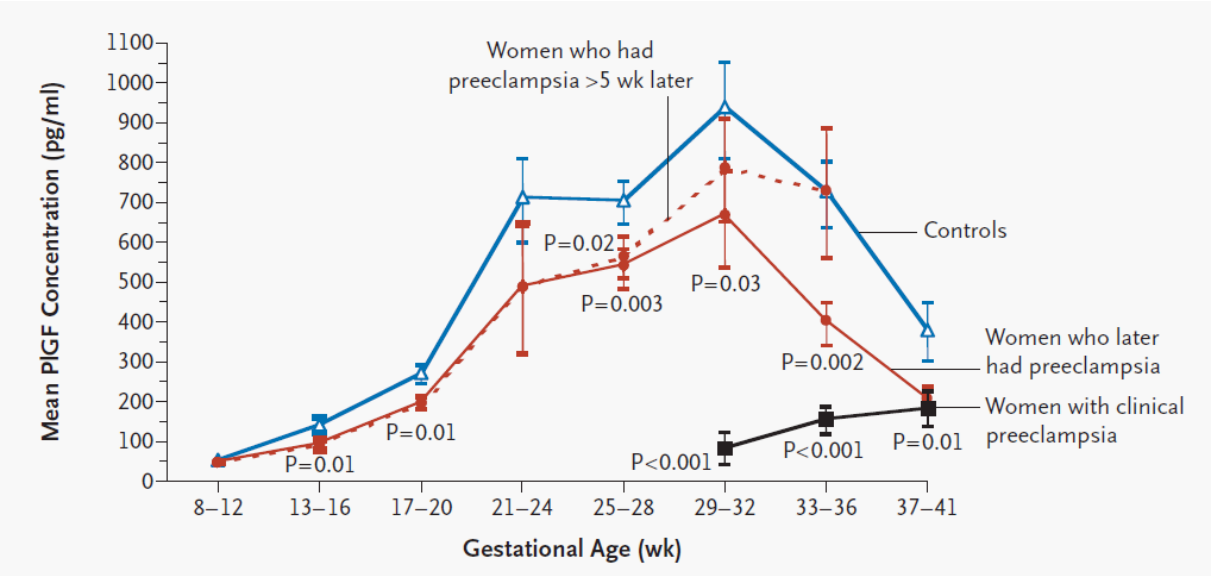


Figure 13 : Profil de sécrétion du PlGF en cours de grossesse (d'après Levine et al. 2004). Bleu : Patientes contrôles. Rouge : Patientes qui vont présenter une pré-éclampsie . Noir : Patientes présentant un pré-éclampsie.

Le PlGF est métabolisé par le foie et le rein puis éliminé dans les urines. Son activité biologique est médiée par des récepteurs à activité tyrosine kinase : les récepteurs du VEGF de type 1 et 2 (VEGF-R1 ou Flt1 et VEGF-R2). Le PlGF, en compétition avec le VEGF, contrôle l'angiogenèse vasculaire et le remodelage des artères utérines spiralées. En dehors de son rôle pro-angiogénique, le PlGF régule également la prolifération des trophoblastes via son récepteur de type 2 ainsi que l'invasion trophoblastique (Levine et al. 2004; Lecarpentier et al. 2016; Chau, Hennessy, et Makris 2017).

Le placenta produit une forme soluble du VEGF-R1, le s-Flt1 qui résulte principalement de l'épissage alternatif du récepteur membranaire Flt1, mais aussi de la coupure par des protéases trophoblastiques, de la partie extracellulaire du récepteur. Les concentrations maternelles de s-Flt1 augmentent plus tardivement que celles de PlGF mais de façon continue jusqu'à la fin de la grossesse (*Figure 14*).

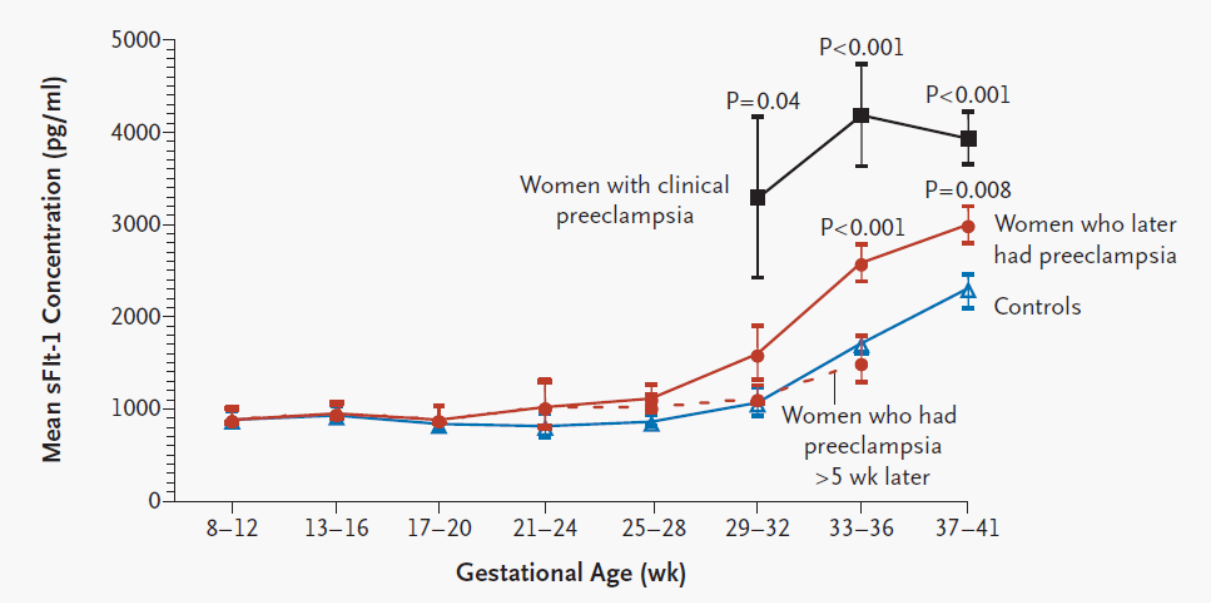


Figure 14 : Profil de sécrétion de s-Flt1 au cours de grossesse (d'après Levine et al. 2004). Bleu : Patientes contrôles. Rouge : Patientes qui vont présenter une pré-éclampsie. Noire : Patientes présentant une pré-éclampsie.

En circulation, le s-Flt1 est capable de lier le PlGF ou VEGF, modulant ainsi leur fraction libre bioactive au niveau vasculaire. C'est la raison pour laquelle le s-Flt1 est défini comme un facteur anti-angiogénique. Il est métabolisé par le foie et les reins avant d'être éliminé par voie urinaire (Levine et al. 2004; Lecarpentier et al. 2016; Chau, Hennessy, et Makris 2017).

ii. Hormones stéroïdes

Progestérone (P4)

Synthèse

En début de grossesse, la synthèse de P4 à partir du cholestérol (*Figure 15*) est assurée par le corps jaune gravidique sous stimulation par l'hCG. A partir de la 8e semaine de grossesse, le placenta prend le relai de cette production, de façon autonome. La synthèse de P4 devient alors strictement d'origine placentaire après la 10e semaine de grossesse (Evain-Brion et Malassiné 2010; Tal et al. 2015).

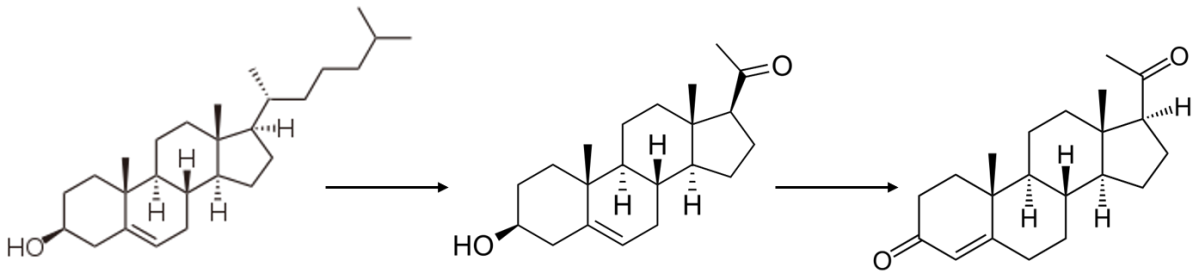


Figure 15 : Schéma représentant la synthèse des progestatifs à partir du cholestérol.

Entrée du cholestérol dans le cytoplasme des cellules trophoblastiques

Au niveau placentaire, la synthèse *de novo* de cholestérol étant quasi inexistante, la P4 est synthétisée à partir de cholestérol d'origine maternelle. Après liaison aux R-LDL, R-VLDL ou SR-B1, les lipoprotéines soit libèrent le cholestérol sous forme d'ester de cholestérol, soit sont métabolisées par voie endosomale (Hu et al. 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018). Le cholestérol libéré est alors soit redirigé vers la membrane plasmique, soit stocké dans les gouttelettes lipidiques, soit utilisé par la mitochondrie pour la synthèse de P4 (Evain-Brion et Malassiné 2010; Hu et al. 2010).

Le transport du cholestérol au sein du cytoplasme implique différentes protéines comme NPC1 et NPC2, le transporteur SCP2, la protéine chaperonne HSP60 et la petite GTPase Rab 9 (Evain-Brion et Malassiné 2010; Hu et al. 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

Passage du cholestérol du cytoplasme dans la mitochondrie

Au niveau de la mitochondrie, le passage du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne s'effectue au niveau de points de contact entre les 2 membranes et implique la création d'un canal formé de la protéine « Voltage-Dependent Anion Channel » (VDAC) et du transporteur « Adenine Nucleotide Translocator » (ANT) (Martinez et al. 2015). L'apport du cholestérol au niveau de ce canal est régulé par une protéine spécifiquement placentaire, « Metastatic Lymph Node 64 » (MLN64) (*Figure 16*) qui grâce à son domaine de liaison au cholestérol permet l'ancrage puis le passage du cholestérol du cytoplasme vers la matrice mitochondriale. Les gouttelettes lipidiques ou endosomes peuvent de leur côté s'ancrer au niveau de la mitochondrie par les complexes SNARES avec l'aide de la protéine MLN64 (Martinez et al. 2015).

Les enzymes stéroïdogènes

A proximité du canal, sur la face matricielle de la membrane interne mitochondriale, l'enzyme « cytochrome P450SCC side chain cleavage » (P450SCC) catalyse la transformation du cholestérol en

prégnénolone (P5) (*Figure 16*) (Evain-Brion et Malassiné 2010). La formation de P5 nécessite 3 réactions successives (i) l'hydroxylation du carbone 20 (C20), (ii) l'hydroxylation du carbone 22 (C22) et enfin (iii) le clivage de la liaison carbone/carbone entre C20 et C22 (Hu et al. 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018). Cette enzyme appartient à un complexe formé d'une flavoprotéine (NADPH-Adrénotoxine Réductase), de son substrat l'adrénotoxine (ou ferrédoxine) et du cytochrome P450. Ce dernier est codé par le gène *CYP11A1* et son activité catalytique nécessite l'apport d'électrons fournis par la réduction du coenzyme NADPH et de son substrat par l'Adrénotoxine Réductase (Tuckey 2005; Hu et al. 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

La P5 ainsi formée est alors transformée en progestérone (P4) par l'enzyme 3-β–HydroxyStéroïde-Déshydrogénase/isomérase de type 1 (HSD3B1) (*Figure 16*) localisée au niveau des mitochondries. La P4 est alors sécrétée côté fœtal et côté maternel (Tuckey 2005; Evain-Brion et Malassiné 2010; Hu et al. 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

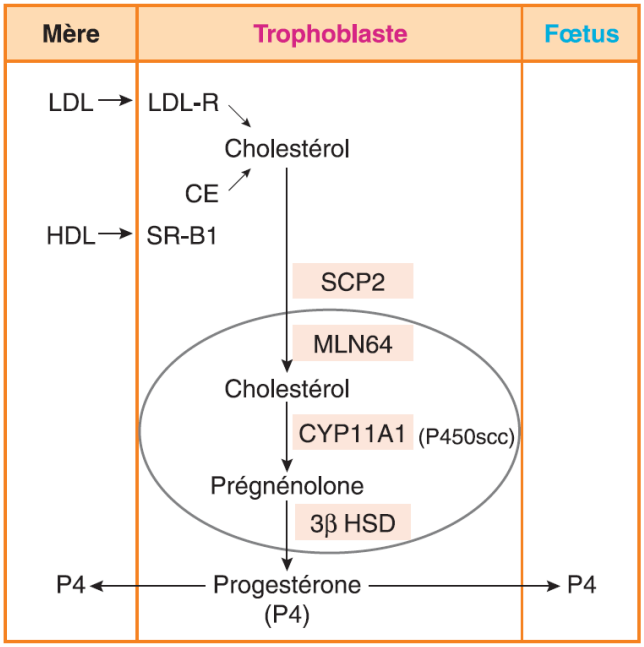


Figure 16 : Schéma représentant la voie de synthèse de la Progestérone (P4) (d'après Evain-Brion et Malassiné 2010).

Au niveau placentaire, la P4 peut être métabolisée en donnant divers métabolites hydroxylés : 5-α-dihydroxyprogestérone ou 16-déhydroprogestérone. La P4 peut également être inactivée par transformation en 20-α-dihydroprogestérone (Pasqualini 2005).

Sécrétion et catabolisme

Au cours de la grossesse, les concentrations sériques maternelles de P4 augmentent de 6 à 8 fois, de façon continue jusqu'à atteindre une concentration entre 100 et 300 ng/mL à terme (*Figure 17*) (Tal et al. 2015).

Dans le sang, la P4 circule surtout sous forme liée à l'albumine avec une demi-vie d'environ 30 min. Elle est métabolisée au niveau hépatique puis éliminée par voie urinaire majoritairement sous forme de prégnanédiol.

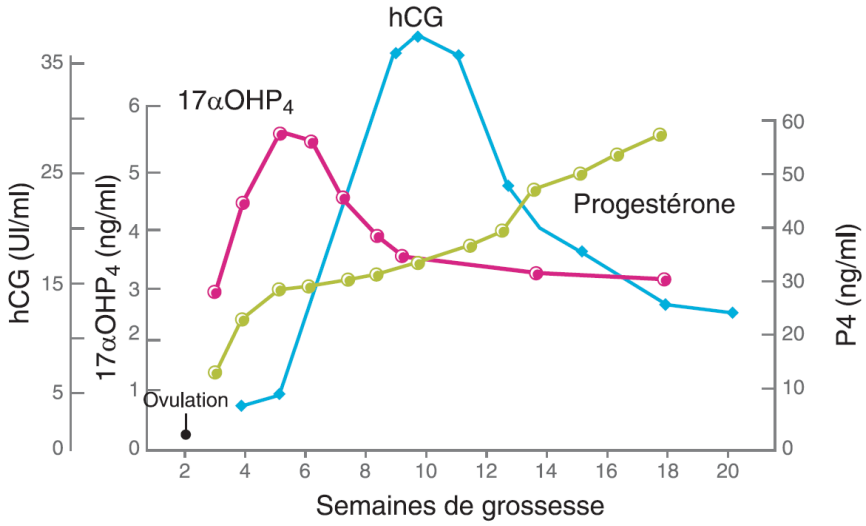


Figure 17 : Profil de sécrétion de l'hCG (bleu), la P4 (vert) et la 17-α-OH-P4 (rose) (d'après Evain-Brion et Malassiné 2010). La sécrétion d'hCG augmente au cours du 1er trimestre de grossesse (bleu). Le pic de sécrétion de 17-α-OH-P4 avant la 8ème semaine de grossesse représente la production ovarienne et démontre l'impossibilité du placenta à produire cette hormone (rose). Les sécrétions de P4 augmentent de manière continue jusqu'au terme de la grossesse (vert).

Rôle

Mécanisme d'action

Les effets physiologiques de la P4 sont médiés par des récepteurs nucléaires qui agissent comme facteurs de transcription après fixation de l'hormone. Il existe 2 isoformes de récepteur à la P4 : PR-A et PR-B codé à partir du gène *PGR* mais transcrit à partir de 2 promoteurs distincts (Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018). Après liaison de la P4, les récepteurs se fixent au niveau des éléments de réponse à la P4 (PRE) situés dans les promoteurs des gènes cibles et contrôlent la transcription de ces derniers. L'activité transcriptionnelle de la P4 est différente selon le récepteur auquel elle se fixe. A partir d'expérience utilisant des gènes rapporteurs, il a été démontré que l'activité

transcriptionnelle du PR-A était plus faible que celle du PR-B, suggérant que l'expression de PR-A limiterait l'action de la P4. De plus, l'activité transcriptionnelle du PR-A semble induire une répression de celle du PR-B (Wilson et Mesiano 2020). Ces récepteurs sont présents dans différents tissus et cellules, notamment les cellules trophoblastiques (CTV et ST) et les cellules du myomètre utérin.

Effets physiologiques sur l'organisme maternel

La P4 est essentielle lors de l'implantation embryonnaire et pour le maintien de la grossesse. Elle permet d'une part l'immunotolérance maternelle, et d'autre part exerce une action myorelaxante sur le myomètre utérin. Elle permet la préparation de la glande mammaire à la lactation. Elle est essentielle au cours de la parturition, et plus particulièrement le ratio entre ses récepteurs PR-A et PR-B (Evain-Brion et Malassiné 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018; Wilson et Mesiano 2020).

Au moment de l'implantation embryonnaire, la P4 comme l'hCG contrôle la balance cytokinique Th1/Th2 en régulant l'expression du facteur « Progesterone-Induced Blocking Factor ». De plus, elle module l'invasion trophoblastique en régulant l'activité et l'expression de métalloprotéases (Halasz et Szekeres-Bartho 2013). Au cours de la grossesse, la contractilité du myomètre utérin est inhibée grâce à la P4. Les cellules myométriales expriment des protéines « Contraction-Associated Proteins » (CAP) (les canaux calciques VOC, les prostaglandines ou l'ocytocine), qui favorisent ou défavorisent la contraction du myomètre. En cours de grossesse, la P4 diminue l'expression des CAP activatrices et stimule l'expression des CAP inhibitrices, aboutissant à la quiescence du myomètre utérin. Cet effet sur l'expression des CAP peut être direct ou indirect via les médiateurs de l'inflammation. En effet, la P4 via PR-B diminue l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Cette action anti-inflammatoire aboutit à l'inhibition des contractions utérines induites par le Ca^{2+} expliquant la quiescence du myomètre au cours de la grossesse (INSERM, s. d.; Méhats, Marcellin, et Schmitz 2018; Wilson et Mesiano 2020).

Lors de l'initiation de la parturition, l'isoforme PR-A est fortement exprimée par les cellules myométriales. Il induit donc un effet répressif sur PR-B et inhibe l'effet anti-inflammatoire de la P4 médié par PR-B. Les cytokines pro-inflammatoires peuvent alors induire l'expression des CAP activatrices et provoquer les contractions myométriales dépendante du Ca^{2+}. Le déclenchement du processus de parturition impliquerait un stimuli pro-inflammatoire d'origine fœtal qui d'une part augmenterait l'expression de PR-A, et d'autre part provoquerait une phosphorylation de PR-A favorisant son activité répressive sur PR-B (Wilson et Mesiano 2020).

Au cours de la grossesse, au niveau de la glande mammaire, la P4 favorise le développement des acini et l'hypertrophie des cellules sécrétoires et myoépithéliales. En revanche, la P4 bloque la lactation en inhibant directement l'expression de la caséine, et indirectement en inhibant l'effet de la prolactine (Monks 2007). Après la parturition et l'élimination du placenta, les taux maternels de P4 chutent rapidement levant ces effets inhibiteurs et permettant la lactation.

Actions sur le placenta

Au niveau du tissu trophoblastique, les CTV et ST expriment des récepteurs à la P4. L'isoforme PR-B semble être moins exprimée que PR-A voir pas exprimée (Wang et al. 1996; Taylor et al. 2009; Asavasupreechar et al. 2020). Leurs expressions évoluent également au cours de la grossesse (Goldman et Shalev 2006). Lors de l'implantation, la P4 contrôle via ses récepteurs l'expression de métalloprotéases. Elle régule également l'expression de cytokines qui contrôlent l'activité de ces métalloprotéases. La P4 est donc impliquée directement et indirectement dans le contrôle de l'invasion trophoblastique (Halasz et Szekeres-Bartho 2013). La P4 régule la transcription de la sous unité α de l'hCG par les cellules trophoblastiques (Barnea, Feldman, et Kaplan 1991; Yamamoto et al. 2001). Elle régule l'expression de la connexine-43 impliquée dans la différenciation des CTV en ST (Cervellati et al. 2011). La P4 contrôle également la production de l'hPL par les trophoblastes (Soares et Glasser 1987).

Oestrogènes

Synthèse

Habituellement, dans les tissus stéroïdogènes, les oestrogènes sont synthétisés à partir du cholestérol, en partie grâce à l'enzyme 17α-monooxygénase,17α-hydroxylase (CYP17). En revanche, le placenta n'exprimant pas cette enzyme, il ne peut pas convertir les progestatifs en androgènes. Pour pallier à cette absence, la synthèse des oestrogènes nécessite la coopération du fœtus, de l'organisme maternel et du placenta (Pasqualini 2005; Reed et al. 2005; Evain-Brion et Malassiné 2010; Berkane et al. 2017).

Comme le placenta ne peut synthétiser les précurseurs androgéniques, ces derniers sont produits par les glandes surrénales maternelles puis fœtales. Les surrénales synthétisent le Déhydroépiandrostérone Sulfaté (DHEA-S) qui atteint le placenta où il perd son groupement sulfate sous l'action de la Stéroïde Sulfatase (STS) codée par le gène *STS*, menant ainsi au DHEA. Ce dernier, substrat de l'enzyme HSD3B1, est alors converti en Δ-4-androstènedione. A partir de cette étape, la Δ−4-androstènedione peut être aromatisée en oestrone (E1) puis sous l'action de l'enzyme 17-β-HydroxyStéroïde-Déshydrogénase de type 1 (HSD17B1) codée par le gène *HSD17B1*, être transformée

en oestradiol (E2). La Δ-4-androstènedione peut également être convertie par l'enzyme HSD17B1, en testostérone qui est ensuite aromatisée en E2 par l'aromatase codée par le gène *CYP19A1* (*Figure 18*). Au contraire des autres enzymes, l'enzyme HSD17B1 est bidirectionnelle, ce qui explique les différentes voies aboutissant à la synthèse de E1 et E2 (Pasqualini 2005; Reed et al. 2005; Evain-Brion et Malassiné 2010; Berkane et al. 2017).

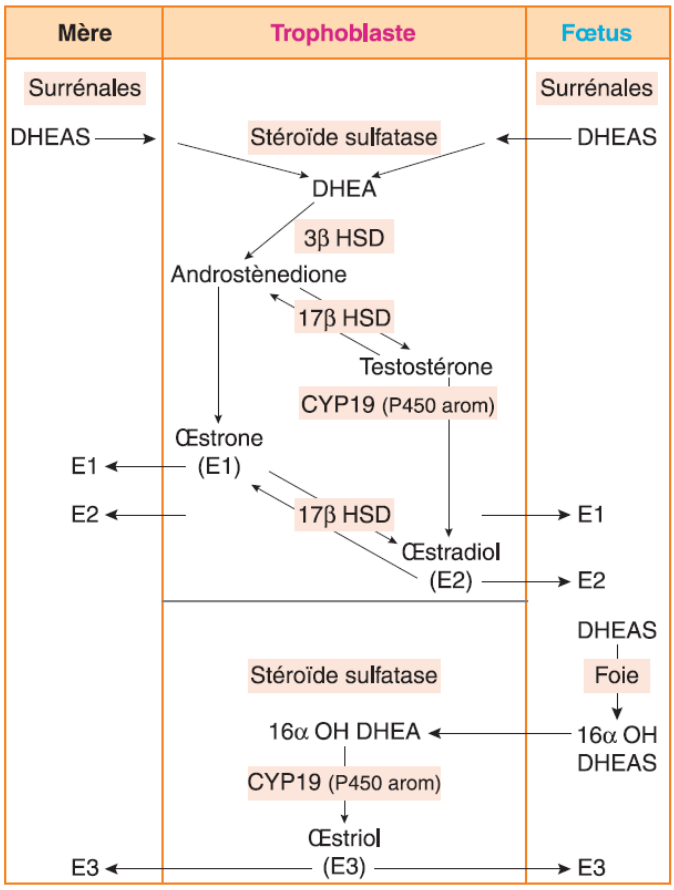


Figure 18 : Schéma représentant les voies de synthèse des oestrogènes, oestrone, oestradiol et oestriol (d'après Evain-Brion et Malassiné 2010).

Côté fœtal, le DHEA-S peut subir une hydroxylation au niveau hépatique, aboutissant à la formation du 16-α-OH-DHEA-S. Ce dernier, comme le DHEA-S, est désulfaté par la STS puis est converti en oestriol (E3) par l'aromatase (*Figure 18*) (Evain-Brion et Malassiné 2010).

L'expression de l'aromatase, enzyme essentielle à la synthèse des oestrogènes, est dépendante du tissu dans lequel elle est exprimée. Le contrôle de son expression s'effectue via un promoteur directement lié au premier exon spécifique à chaque tissu. Dans le cas du placenta, la transcription de l'aromatase s'effectue à partir de l'exon 1.a situé à 100 000 paires de base de l'exon 2 (Mendelson et al. 2005; Berkane et al. 2017). La régulation de l'expression de l'aromatase sera détaillée dans le chapitre « Régulation de la fonction endocrine ».

Comme pour la P4, les oestrogènes peuvent être convertis en métabolites hydroxylés comme le 4-hydroxy-oestradiol. Ils peuvent également subir des méthylations sur leur fonction hydroxyle aboutissant à la formation de 2-méthoxy-oestradiol, 4-méthoxy-oestrone ou 2-méthoxy-oestrone (Berkane et al. 2017).

Profil de sécrétion et catabolisme

Tout comme pour la P4, le corps jaune gravidique est la source d'oestrogènes pendant les premières semaines de grossesse. A partir de la 8e semaine de grossesse, le placenta devient la source principale d'oestrogènes. Les taux sériques des différents oestrogènes augmentent de manière continue et parallèle jusqu'à la fin de la grossesse (Tal et al. 2015; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

Les oestrogènes, comme la P4, sont des hormones lipophiles qui sont associées à des protéines de liaison dans la circulation sanguine. Ils sont métabolisés au niveau hépatique puis éliminés par voie urinaire et fécale.

Rôle

Mécanisme d'action

Comme pour la P4, les oestrogènes vont agir grâce à des récepteurs nucléaires qui se lient aux promoteurs et régulent l'expression de leurs gènes cibles. En revanche, contrairement à la P4, les récepteurs aux oestrogènes ER-α et ER-β sont exprimés à partir de 2 gènes distincts, respectivement *ER1* et *ER2*. Chaque isoforme présente également des variants d'épissage dont l'expression varie d'un tissu à l'autre. Après liaison de l'hormone à son récepteur, le complexe ligand/récepteur se lie au niveau des « Estrogens Response Element » (ERE) au sein des promoteurs des gènes cibles des oestrogènes. Par conséquent, comme pour la P4, les oestrogènes n'activent pas de voie de signalisation mais contrôlent directement la transcription de leurs gènes cibles (Scobie et al. 2002).

Rôle sur l'organisme maternel

Les oestrogènes ont un rôle essentiel dans l'adaptation métabolique maternelle, notamment en augmentant la fréquence cardiaque et le débit sanguin maternel, permettant ainsi d'apporter au niveau placentaire les nutriments essentiels à la croissance fœtale (Nadal et al. 2009; Mauvais-Jarvis 2016).

Ils exercent également une action proliférative et trophique sur les glandes maternelles comme l'hypophyse et les tissus comme le foie (stimulation de la synthèse des protéines hépatiques, modulation enzymatiques).

Les oestrogènes sont impliqués dans l'établissement de la parturition notamment en augmentant la synthèse de CAP activatrice (prostaglandine et ocytocine) ainsi que celle du récepteur à l'ocytocine et prostaglandine, rendant le myomètre davantage sensible aux molécules contracto-stimulantes (Vannuccini et al. 2016). De plus, les oestrogènes régulent l'expression de PR-A et PR-B en faveur du ratio PR-A/PR-B, aboutissant ainsi à l'inhibition de l'activité myorelaxante de la P4 (Evain-Brion et Malassiné 2010; Tal et al. 2015).

Tout comme la P4, les oestrogènes sont nécessaires au processus de lactation en régulant la prolifération de l'épithélium de la glande mammaire permettant de créer les canaux galactophores.

Actions sur le placenta

Au niveau du placenta à terme, le récepteur ER-α est fortement exprimé dans les CTV et ER-β dans le ST. Cette expression différentielle semble maintenue en culture (Bukovsky, Cekanova, et al. 2003; Bukovsky, Caudle, et al. 2003). Comme pour les récepteurs à la P4, l'expression des récepteurs aux oestrogènes évolue au cours de la grossesse (Fujimoto et al. 2005). Au cours de la grossesse, les oestrogènes vont favoriser la différenciation trophoblastique en régulant l'expression de la connexine-43, protéine des jonctions membranaires, impliquée dans la fusion des membranes. Les oestrogènes augmentent également la sécrétion d'hCG, reflétant l'augmentation de la différenciation des CTV en ST. De plus, ils sont capables de moduler, au niveau des CTV, l'expression de protéines du cycle cellulaire, ce qui permet d'inhiber la prolifération des CTV pour qu'ils se différencient en ST (Cronier et al. 1999; Gambino et al. 2012).

Au niveau placentaire, les oestrogènes modulent la production de P4 en régulant d'une part l'apport de cholestérol maternel via l'expression des R-LDL et des SR-B1, et d'autre part en activant l'enzyme P450SCC (Evain-Brion et Malassiné 2010; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

Fonction endocrine placentaire et Régulation intracellulaire

La production des hormones à la fois peptidiques et stéroïdes, est un processus hautement régulé dans les différents organes endocrines dont le placenta. La régulation de la synthèse des hormones peptidiques se fait directement par modulation de la synthèse protéique au niveau de la transcription génique, de la traduction et des processus post-traductionnels. A contrario, la régulation de la synthèse des hormones stéroïdes est, elle, indirecte, par modulation de l'expression et de l'activité des transporteurs et enzymes impliqués. Dans les deux cas, la régulation implique donc des voies de signalisations intracellulaires qui aboutissent à l'activation de facteurs de transcription. L'expression génique des différents acteurs est aussi régulée de façon post-transcriptionnelle par des microARN.

La synthèse des hormones peptidiques débute dans le noyau de la cellule et se poursuit dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de golgi alors que celle des hormones stéroïdes se déroule dans la mitochondrie et le cytoplasme. En conséquence, le développement, la structure et l'intégrité de ces organites conditionneront également la production des hormones. La dynamique et la régulation des fonctions mitochondriales sont donc cruciales pour le bon déroulement de la stéroïdogenèse. Le réticulum endoplasmique, essentiel à la synthèse protéique peut quant à lui, faire l'objet d'un stress cellulaire qui modifiera sa fonctionnalité. Il est également le siège d'une voie de signalisation inductible par le stress, la voie « Unfolded Protein Response » (UPR), impliquée dans la régulation physiologique notamment de la différenciation trophoblastique (Bastida-Ruiz et al. 2019).

I. Voies de signalisation canoniques impliquées

i. Voie AMPc

Après fixation du ligand sur son récepteur, la protéine G associée au récepteur, est activée, conduisant à la dissociation de sa sous unité α du dimère β/γ. La sous unité α peut alors activer l'enzyme adénylate cyclase (AC) qui catalyse la conversion de l'Adénosine Diphosphate (ADP) en Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc se lie alors aux sous unités régulatrices de la Protéine Kinase A (PKA), permettant la libération des sous unités catalytiques qui vont pouvoir phosphoryler leurs cibles notamment le facteur de transcription « cAMP Responsive Element Binding protein » (CREB) (*Figure 19*).

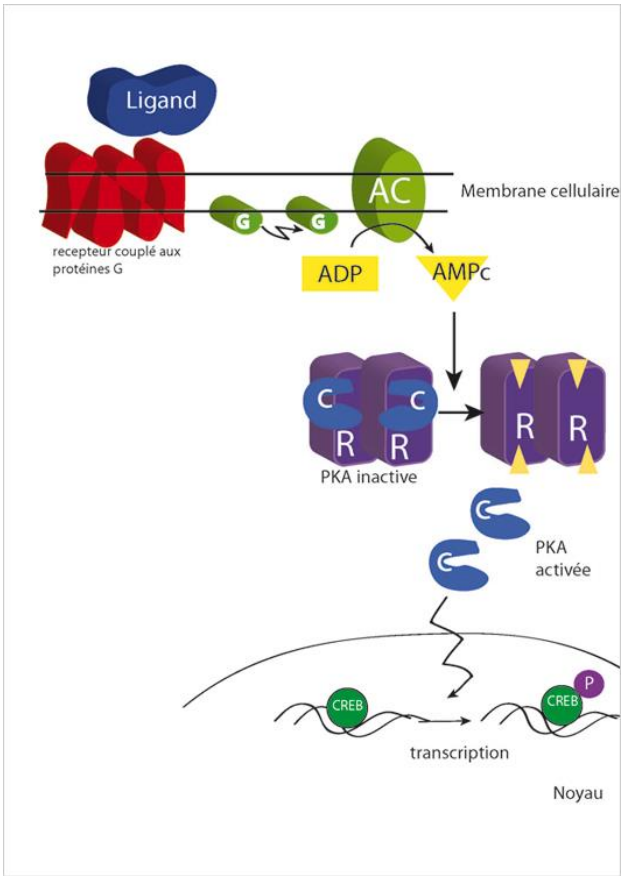


Figure 19 : Schéma représentant la voie de signalisation AMPc/PKA (d'après Communiqué - Salle de presse, INSERM 2011).

La voie de signalisation AMPc/PKA est une voie majeure au niveau placentaire médiée notamment par l'hCG (Pidoux et al. 2007). Cette voie régule en retour la production des principales hormones placentaires : hCG, oestrogènes et P4 *in vitro* (Rodway et al. 1988). En effet, dans un modèle culture de trophoblastes villeux, il a été montré que l'AMPc est capable d'augmenter l'activité enzymatique de l'aromatase (Lobo et Bellino 1989). L'hCG, via la voie AMPc/PKA, régule l'expression des récepteurs à la P4 dans les cellules de la granulosa ovarienne (Choi et al. 2017). Des études sur les mitochondries placentaires ont démontré que la stimulation de la sécrétion de P4 par la voie AMPc/PKA impliquait l'activité transcriptionnelle de CREB mais également directement la PKA (Gomez-Concha et al. 2011).

La voie AMPc/PKA peut être activée par différents stimuli dans les tissus endocrines : hCG, GnRH, LH, FSH, les prostaglandines…(Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015; Tal et al. 2015; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018). Au niveau placentaire, la Cortico-Releasing Hormone (CRH) est capable d'activer la voie AMPc/PKA puis le facteur de transcription Sp1 afin d'augmenter l'expression de l'aromatase (W. S. Wang et al. 2014). A l'inverse, la CRH mène à une

diminution de l'expression des enzymes P450SCC et HSD3B1 et donc de la production de P4, probablement par activation de la voie PKC (Yang et al. 2006).

L'accumulation d'AMPc intracellulaire peut également conduire à l'activation de la protéine « Exchange protein directly activated by cAMP » (Epac) qui active la petite protéine G Rap1. Cette voie AMPc/Epac est impliquée dans la régulation de différenciation à la fois morphologique de cellules BeWo en régulant la fusion membranaire, et la différenciation fonctionnelle en augmentant la sécrétion d'hCG et de P4 (Yoshie et al. 2010). L'activation de Rap1 peut conduire l'activation de la voie « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK) « MAP ERK Kinase » (MEK)/ « Extracellular signal-Regulated Kinase » ($ERK_{1/2}$) (voie MAPK MEK/$ERK_{1/2}$) dans des cellules neuroendocrines (Emery et al. 2013). Dans des cellules de l'endomètre, l'hCG peut augmenter l'AMPc intracellulaire qui va activer Epac puis la voie MEK/$ERK_{1/2}$ afin d'augmenter l'expression des récepteurs à la P4 (Tapia-Pizarro et al. 2017).

ii. Voie des Smad

L'activine et l'inhibine sont des hormones appartenant à la famille du TGF-β produites par différentes glandes endocrines dont le placenta. Elles peuvent activer la voie des Smad dans ces tissus, notamment le tissu ovarien. En se liant aux récepteurs « Activin Receptor II » (ActRII), l'activine conduit à la dimérisation puis activation du récepteur qui induit la phosphorylation des facteurs Smad2 ou 3, qui vont alors s'associer au facteur Smad4. Le dimère de Smad, ainsi formé, régule alors la transcription des gènes cibles de l'activine ou de l'inhibine (*Figure 20*).

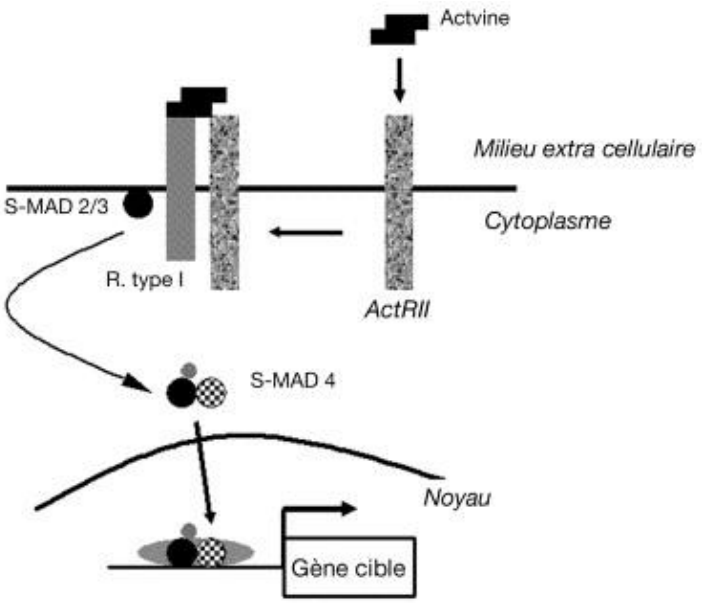


Figure 20 : Schéma représentatif de la voie de signalisation induite par l'Activine (d'après Deffieux et Antoine 2003).

Ces hormones régulent la sécrétion d'hCG, de P4 et d'oestrogènes par le trophoblaste *in vitro* (Petraglia, Vaughan, et Vale 1989; Petraglia 1997; Tal et al. 2015). La voie de l'activine est également impliquée dans le contrôle de la différenciation trophoblastique normale et pathologique (Gerbaud et al. 2011). L'incubation de cellules trophoblastiques avec de l'activine induit une stimulation de l'activité de l'aromatase ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'hCG (Song, Keelan, et France 1996). La voie Smad serait impliquée dans le contrôle de la fonction endocrine placentaire par l'activine mais également pour le TGF-β. En effet, ce dernier inhibe l'expression de l'aromatase et de la P450SCC dans des cellules de choriocarcinome JEG-3, aboutissant à une diminution de la sécrétion d'E2 et de P4, notamment par activation du facteur Smad2 (Luo et al. 2002; Zhou et al. 2009).

La voie de l'activine module également la production de P4 en régulant notamment l'expression du transporteur mitochondrial StAR au niveau ovarien. En effet, sur des cellules de la granulosa *in vitro*, l'activine après liaison sur le récepteur du TGF-β, induit l'activation de la protéine « Activine Like Kinase 4 » qui phosphoryle Smad2. Ce dernier va former un dimère avec Smad4 et réguler la transcription du transporteur StAR (Chang et al. 2015).

iii. Voie MEK/ERK$_{1/2}$

Les enzymes MEK et ERK$_{1/2}$ appartiennent à la famille des « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK). Ces dernières s'organisent entre elles pour former des voies d'activation intracellulaires. La fixation du ligand sur son récepteur entraine l'activation d'une petite GTPase qui elle-même active une MAPK Kinase Kinase (MAPKK Kinase ou MAPKKK). Cette dernière entraine une phosphorylation activatrice d'une MAPK Kinase (ou MAPKK) qui phosphoryle à son tour une MAPK. Cette dernière MAPK considérée comme effectrice provoque la phosphorylation de facteurs de transcriptions cibles.

La voie MEK/ERK$_{1/2}$ est composée de la MAPK Kinase Kinase, Raf, de la MAPK Kinase, MEK, et de la MAPK, ERK$_{1/2}$ (***Figure 21***). Ces voies MAPK sont essentielles au bon fonctionnement de la cellule et régulent de nombreuses fonctions dont la fonction endocrine (hormones peptidiques et stéroïdes) notamment au niveau des ovaires, de l'endomètre et du placenta.

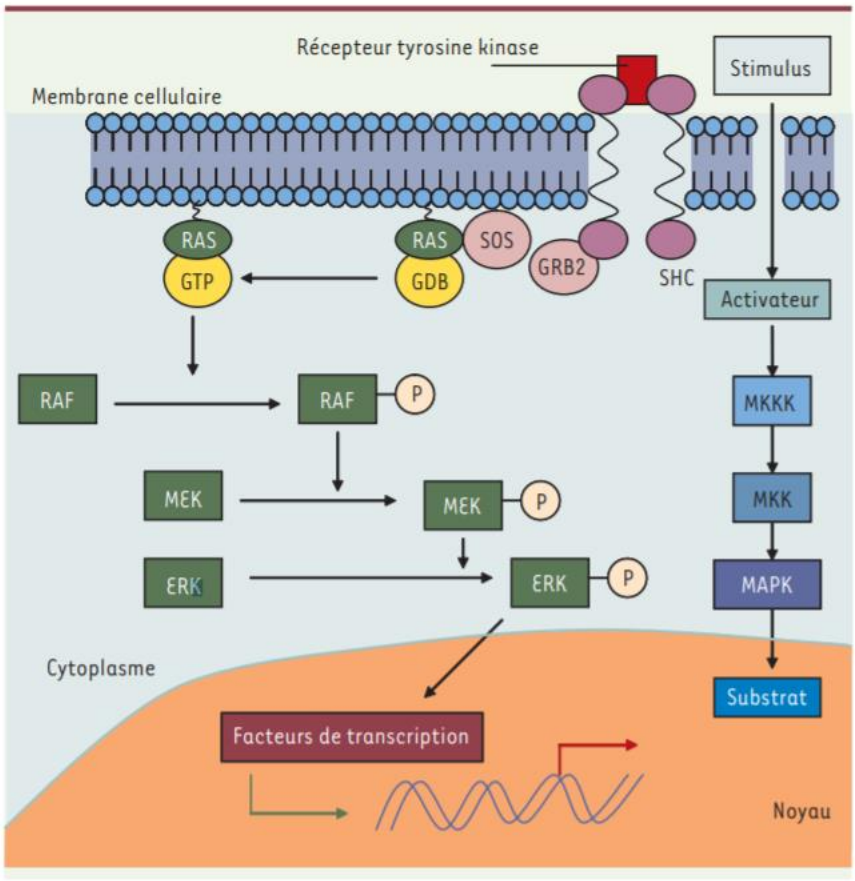


Figure 21 : Schéma représentant la voie MEK/ERK$_{1/2}$ (d'après Dalle, Martin-Denavit, et Thomas 2006).

Ainsi, dans les cellules de la granulosa ovarienne, cette voie MAPK favorise la sécrétion de P4. Cette régulation est intriquée puisqu'elle fait intervenir aussi l'AMPc, démontrant un lien entre la voie MEK/ERK$_{1/2}$ et la voie AMPc/PKA dans la régulation de la sécrétion de P4 (Dewi, Abayasekara, et Wheeler-Jones 2002). Les voies AMPc/PKA et MEK/ERK$_{1/2}$ activées par l'hCG, sont également impliquées dans l'augmentation de l'expression des récepteurs à la P4 (Henríquez et al. 2017). De plus, au niveau des cellules endométriales, l'hCG induit l'expression des récepteurs à la P4 (PR-A et PR-B) en activant la voie AMPc/Epac qui ensuite active la voie MEK/ERK$_{1/2}$ (Tapia-Pizarro et al. 2017).

Concernant le tissu placentaire, il a été montré sur des cellules de choriocarcinomes, JEG-3 ou BeWo, que la voie MEK/ERK$_{1/2}$ régule l'expression de la sous unité β de l'hCG (Keun Kang et al. 2000; Wang et al. 2013). Cette régulation est également retrouvée sur culture primaire de CTV humain (Daoud et al. 2005). Sur les cellules BeWo, il a été démontré que l'interconnexion de la voie MEK/ERK$_{1/2}$ et de la voie AMPc/PKA est impliquée dans la régulation de la différenciation trophoblastique caractérisée par l'augmentation de la sécrétion d'hCG (Delidaki et al. 2011). Cette relation entre ces 2 voies de signalisation a également été démontrée en réponse intracellulaire à l'hCG dans du tissu placentaire, à la fois des cellules JEG-3 et des explants de placentas à terme (Maymó et al. 2012).

La voie MAPK peut être est activée au niveau placentaire par l' « Epidermal Growth Factor » (EGF) ou l'insuline afin de réguler la synthèse d'hCG, de P4 ou d'oestrogènes (Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

iv. Autres voies de signalisation

D'autres voies de signalisation interviennent dans la régulation de la fonction endocrine au niveau placentaire comme l'activation du facteur « Nuclear Factor kappa B » (NFkB) par des cytokines, ou l'activation de la voie « Janus Kinase » (JAK)/Stat par la leptine. Ces voies sont impliquées dans la régulation de la sécrétion d'hCG, de la P4 et d'oestrogènes. Ainsi, l'« Interleukine-4 » (IL-4), par activation de JAK puis de Stat6, régule l'expression et l'activité de l'enzyme HSD3B1 essentielle à la synthèse de P4 (Simard et al. 2005; Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018). L'hCG est également capable de contrôler l'expression des principaux acteurs de la production de P4 via la voie mTOR/S6K1 (Moravek et al. 2016).

L' « Epidermal Growth Factor » (EGF) est un facteur de croissance capable de réguler la sécrétion d'hormones peptidiques et stéroïdes, par une voie différente des MAPK, notamment au niveau placentaire. L'incubation de cellules JEG-3 avec l'EGF conduit à la phosphorylation de son récepteur qui active la protéine kinase Akt et permet la stimulation de la sécrétion d'hCG, de P4 et d'oestrogènes (Wang et al. 2018).

Sur des cellules de la surrénales, la stéroïdogenèse est inhibée par la voie MAPK p38 en ciblant notamment le facteur de transcription CREB (Li et al. 2017). De plus, la voie MAPK p38 inhibe la stéroïdogenèse en inhibant l'expression du transporteur mitochondrial StAR (Zaidi et al. 2014). Au niveau ovarien, la voie MAPK p38 semble réguler la sécrétion d'E2 indépendamment de l'AMPc et donc du facteur CREB (Inagaki et al. 2009). L'interleukine IL-1β active la synthèse de P4 par activation de la voie MAPK p38 (Dang et al. 2017). Au niveau placentaire, sur le modèle de lignée cellulaire BeWo, la voie MAPK p38 est impliquée dans la régulation de la différenciation et la sécrétion d'hCG (Delidaki et al. 2011).

II. Organites cellulaires impliqués

i. Mitochondrie

Structure

La mitochondrie est un organite intracellulaire notamment nécessaire à la production de l'énergie (sous forme d' « Adénosine Tri-Phosphate » [ATP]) dans la cellule mais aussi à la stéroïdogenèse. Elle est constituée d'une membrane externe et d'une membrane interne délimitant

l'espace intermembranaire. La membrane interne présente des invaginations à l'intérieur de la matrice créant les crêtes mitochondriales. Au sein de ces membranes se trouvent les complexes qui forment la chaine respiratoire mitochondriale (CRM) impliquée dans la synthèse d'ATP.

Le fonctionnement de la CRM est essentiel au placenta et à la différenciation trophoblastique. En effet, à partir de culture primaire de placenta humain, l'utilisation d'inhibiteurs des complexes de la CRM (Roténone, Oligomycine et Antimycine-A) conduit à l'altération de la fusion des CTV en ST et de la sécrétion d'hCG (Poidatz et al. 2015). De plus, le fonctionnement de la CRM est sous le contrôle d'un facteur nucléaire « Estrogen-Related Receptor γ » (ERR-γ). Grâce à des expériences de siRNA, il a été montré que l'absence de ERR-γ conduit à une diminution de la production d'ATP associée à une diminution de fusion des CTV et de la sécrétion d'hCG (Poidatz et al. 2012; Poidatz et al. 2015).

Dynamique mitochondriale

La biogenèse de la mitochondrie est sous le contrôle du facteur « PPARγ coactivator-1α » (PGC1α) qui est considéré comme le régulateur majeur (Cai et al. 2012; Zhang et Xu 2016). Néanmoins, d'autres facteurs comme mTOR sont impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale (Zhang et Xu 2016). La mitochondrie subit des processus de fusion et de fission qui permettent de modifier le nombre de mitochondries contenues dans le cytoplasme cellulaire (Meyer, Leuthner, et Luz 2017). La fusion est régulée par différents facteurs comme les Mitofusines 1 et 2 (Mfn1 et Mfn2) et le facteur « Optic-Atrophy 1 » (OPA1). La fission, elle, est assurée par la protéine « Dynamin related protein 1 » (Drp1) et la protéine « Fission protein 1 » (Fiss1) (*Figure 22*) (Frank et al. 2001; Rojo et al. 2002; Chen et al. 2003; Wasilewski et al. 2012).

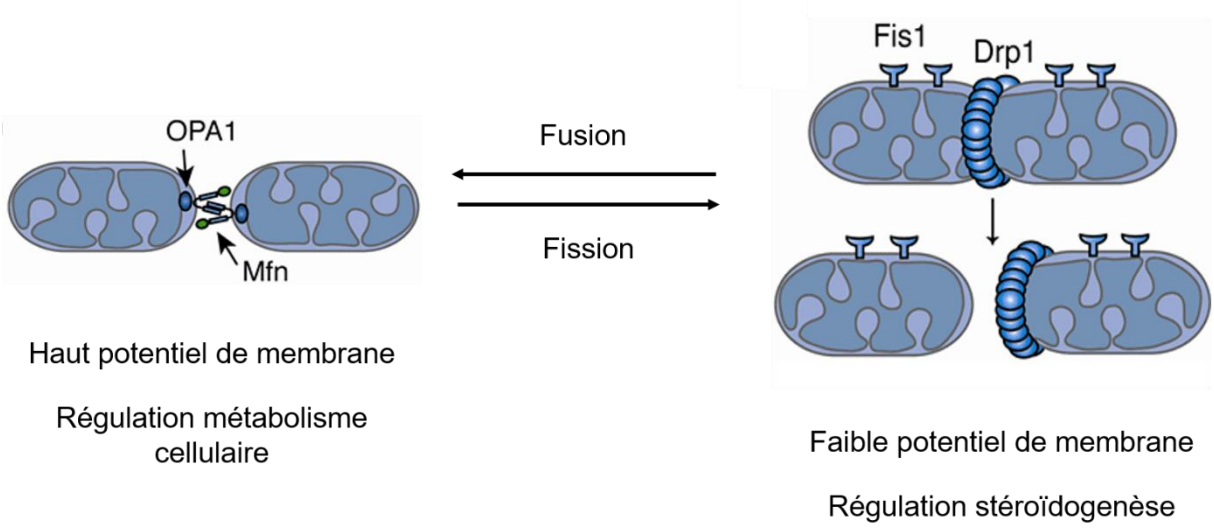


Figure 22 : Schéma représentatif de la dynamique mitochondriale expliquant la différence structurale observée entre les mitochondries des CTV et celles des du ST.

Au niveau du placenta humain, la structure des mitochondries diffère entre le syncytiotrophoblaste (ST) et les cytotrophoblastes villeux (CTV). Le ST possède de petites mitochondries avec un faible potentiel de membrane et une structure atypique notamment au niveau des crêtes créant une matrice mitochondriale dense. En revanche, les mitochondries du CTV sont plus larges et de structure classique avec des crêtes bien définies et une matrice moins dense, ainsi qu'un haut potentiel de membrane (Martinez, Kiriakidou, et Strauss 1997; De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014; Holland et al. 2017; Fisher et al. 2019). Ces différences résultent des processus de fusion/fission mais les mécanismes sous-jacents restent controversés. Des études démontrent que la fusion mitochondriale est associée avec la différenciation des CTV en ST (H. Cai et al. 2018; Walker et al. 2020). D'autres en revanche, démontrent que les facteurs pro-fissions augmentent lors de la différenciation trophoblastique (Wasilewski et al. 2012). La dynamique mitochondriale est essentielle au bon fonctionnement des cellules et, l'altération des processus de fusion/fission conduit à une dysfonction cellulaire observée dans le développement de certains cancers comme les mélanomes (Dal Yontem et al. 2019).

La mitochondrie intervient également dans la stéroïdogenèse. Elle exprime en effet la P450SCC et la HSD3B1, enzymes qui respectivement convertissent le cholestérol en prégnénolone (P5) puis en progestérone (P4). L'altération de la dynamique mitochondriale perturbe aussi cette stéroïdogenèse. Ainsi, l'exposition de la lignée de choriocarcinome BeWo à un perturbateur endocrinien entraine une diminution de production de P4 associée à une diminution de l'expression de Mfn2 (Shan et al. 2019). L'inhibition de l'expression des facteurs OPA1 par des siRNA sur BeWo entraine une augmentation de la production de prégnénolone par la P450SCC confirmant le rôle de la dynamique mitochondriale dans la synthèse des hormones stéroïdes (Wasilewski et al. 2012).

Clivage du transporteur MLN64

Contrairement aux autres cellules stéroïdogènes, les cellules trophoblastiques n'expriment pas le transporteur de cholestérol StAR, qui est ici remplacé par la protéine « Metastatic Lymph Node 64 » (MLN64). Si la protéine StAR est exprimée uniquement au niveau mitochondrial, MLN64 est localisée dans différents compartiments cellulaires comme les endosomes et les gouttelettes lipidiques, permettant ainsi d'assurer le transport du cholestérol à l'intérieur du cytoplasme.

Au niveau des mitochondries, après la liaison des endosomes et gouttelettes lipidiques à la membrane mitochondriale, la protéine MLN64 subit un clivage peptidique libérant son domaine de liaison au cholestérol. Une fois clivée, elle s'associe au canal formé par le canal «Voltage Dependent Anion Channel » (VDAC) et le transporteur « Adenine Nucleotide Translocator » ANT pour permettre le transfert du cholestérol au sein de la mitochondrie (Esparza-Perusquía et al. 2015).

Points de contact

En parallèle de la dynamique mitochondriale, la formation des points de contacts entre les membranes externes et internes est essentielle à la synthèse de la P4. Ces points de contact sont assurés par la liaison entre le canal VDAC de la membrane externe et le transporteur ANT de la membrane interne, créant un canal pour le transport du cholestérol.

A proximité des points de contacts, on trouve des protéines « A-Kinase Anchoring Protein » (AKAP), notamment AKAP-121, qui permettent de recruter la PKA (Gomez-Chang et al. 2014). L'activité catalytique de la PKA permet la phosphorylation des cibles nécessaires à la synthèse des hormones stéroïdes. Parmi ces cibles, on trouve des phosphatases, notamment l'enzyme « Protein Tyrosin Phosphatase 1 » (PTPD1) (Gomez-Concha et al. 2011; Martinez et al. 2015). En plus d'induire des phosphorylations inhibitrices ou activatrices, l'activité de la PKA permet de rétablir le ratio ADP/ATP nécessaire au transporteur ANT essentiel au transfert du cholestérol (*Figure 23*) (Martinez et al. 2015).

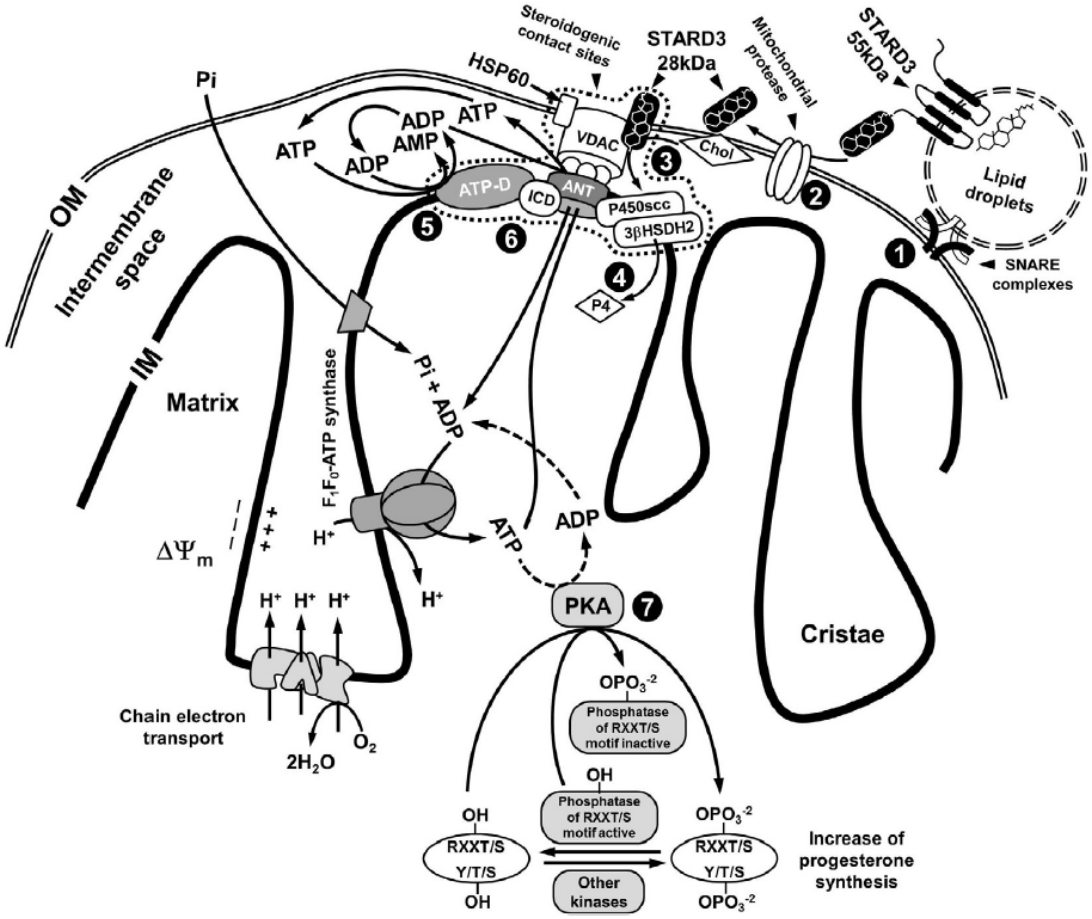


Figure 23 : Mécanisme d'entrée du cholestérol dans la mitochondrie (de Martinez et al. 2015). (1) Les endosomes ou gouttelettes lipidiques s'ancre au niveau mitochondriale à l'aide des protéines du complexe SNARE. (2) La protéase mitochondriale catalyse le clivage de la protéine MLN64 (STARD3) d'une protéine de 55

kDa à une protéine de 28 kDa. (3) La protéine clivée s'associe au canal VDAC/ANT et facilite le transport du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie. (4) Le cholestérol subit alors les catalyses assurées par laP450SCC puis la HSD3B1 afin de produire la P4. Si l'activité des protéases est inhibée et qu'aucune protéine STARD3-28 kDa n'est produite, aucune synthèse de progestérone ne se produit. (5) Le potentiel transmembranaire provoque l'hydrolyse de l'ATP par l'ATP diphosphohydrolase (ATP-D). Ce gradient d'ATP et ADP de chaque côté de la membrane interne mitochondriale est nécessaire au fonctionnement du canal ANT et permet donc le transport du cholestérol. (6) Isocitrate déshydrogénase NADP-dépendante (ICD) située à proximité est nécessaire à la formation de l'adrénotoxine par l'adréntoxine réductase, réaction qui fournit les électrons nécessaires au fonctionnement de la P450SCC. (7) A proximité des points de contacts, la PKA cible les protéines à motif RRXT/S. Elle phosphoryle les activateurs de la synthèse de P4. De plus, la PKA provoquant les phosphorylations inactives de nombreuses phosphatases responsables les activateurs de cette synthèse. En parallèle, la PKA utilisant l'ATP, elle contribue à la formation du gradient ATP/ADP essentiel au transporteur ANT. OM : Outer Membrane = Membrane externe. IM : Inner Membrane = Membrane interne. Chol : Cholestérol. R : Acide aminé Arginine. Y : Acide aminé Tyrosine. S : Acide aminé Sérine. T : Acide aminé Thréonine.

Si la mitochondrie est indispensable à la synthèse des hormones stéroïdes, celles-ci en retour régulent la fonction mitochondriale. En effet, la P4 et l'E2 régulent l'activité transcriptionnelle du promoteur du facteur PGC1-α aboutissant à une augmentation de l'expression de la protéine PGC1-α. Les hormones stéroïdes régulent ainsi la biogenèse des mitochondries au niveau cellulaire (Ruiz et al. 2012).

ii. Réticulum endoplasmique et voie UPR

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite essentiel à la synthèse protéique, entre les ribosomes et l'appareil de Golgi. Les protéines formées gagnent le RE pour y subir différentes modifications post-traductionnelles comme un début de glycosylation et un repliement structural.

La voie UPR (Bastida-Ruiz et al. 2017)

La voie « Unfolded Protein Response » (UPR) est activée en cas de stress cellulaire aboutissant à l'accumulation de protéines structurellement inactives dans le RE. En absence de stress cellulaire, la protéine « Glucose-Related Protein 78 » (GRP78) est associée aux protéines « Inositol-Requiring Enzyme 1 α » (IRE1α), « Activating Transcription Factor 6 » (ATF6) et « PKR-like ER-associated protein Kinase » (PERK), bloquant ainsi leur activation.

Lorsqu'un stress cellulaire survient, des protéines non repliées s'accumulent dans le RE entrainant la dissociation de GRP78 et donc l'activation des voies IRE1α, ATF6 et PERK. L'activation d'IRE1α conduit à l'épissage de l'ARNm de XBP1 aboutissant à l'expression du facteur « spliced XBP1 »

(sXBP1). Ce dernier régule l'expression des gènes cibles tels que GRP78 ou certaines protéines chaperonnes. L'activation de IRE1α conduit également à l'activation de la voie « c-Jun N-terminal Kinase » (JNK) impliquée dans la régulation de l'autophagie (*Figure 24*).

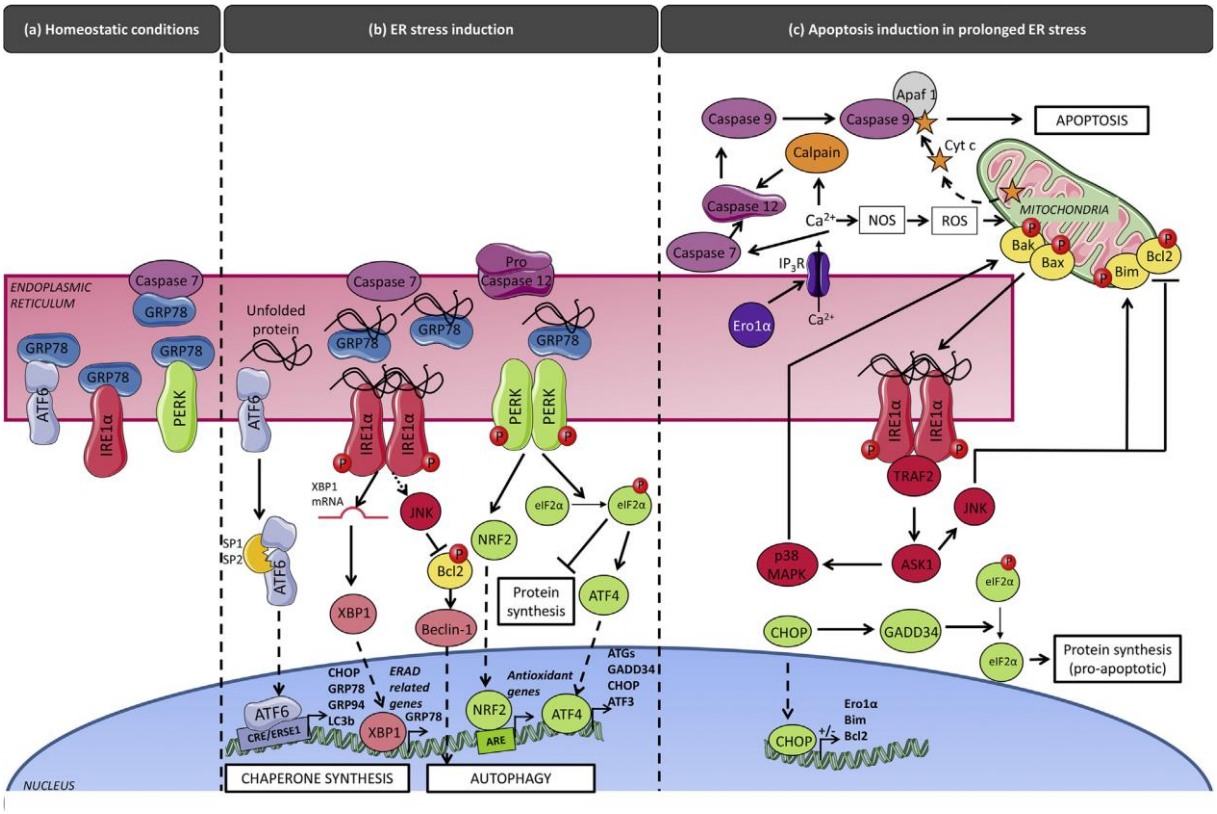


Figure 24 : Schéma représentatif des voies UPR en cas de stress du RE (d'après Bastida-Ruiz et al. 2017).

La dissociation des GRP78 entraine le clivage activateur de ATF6. La forme active de cette protéine est alors transloquée dans le noyau et interagit avec des éléments de réponse afin de réguler la transcription de ces gènes cibles tels que « C/EBP Homologous Protein » (CHOP), GRP78, « Glucose-Related Protein 94 » (GRP94) et « Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B » (LC3b) (*Figure 24*).

Après dissociation de GRP78, la protéine PERK se dimérise et induit la transphosphorylation de chacun de ses monomères. Ainsi activée, PERK phosphoryle eIF2a bloquant la synthèse protéique et permettant la translocation du facteur ATF4. Ce dernier régule alors l'expression de ces gènes cibles tels CHOP. Parallèlement, PERK active « Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2 » (NRF2) qui module l'expression des gènes du système anti-oxydant (*Figure 24*).

La diminution de synthèse protéique, l'expression de protéines chaperonnes et la régulation de l'autophagie sont mises en place par la cellule pour contrôler le stress cellulaire. Si la cellule n'arrive

pas à contrôler ce stress, la voie UPR induit l'apoptose dépendante des mitochondries ainsi que l'activation des caspases (*Figure 24*).

Voie UPR et fonction endocrine

De nombreux perturbateurs endocriniens induisent un stress du RE conduisant à l'altération de la fonction endocrine.

L'induction d'un stress du RE au niveau des cellules de la granulosa ovarienne, bloque la sécrétion de P4 induite par l'hCG (Takahashi et al. 2017). Il a été montré sur des ovaires de souris, que l'induction d'un stress du RE conduit dans un premier temps, à l'augmentation de l'expression des facteurs de la voie UPR. Puis dans un second temps, ce stress diminue l'expression des facteurs StAR, P450SCC et HSD3B1 aboutissant à la diminution de la production de P4 (H.-J. Park et al. 2014). Sur un modèle de cellules de la granulosa immortalisées, il a été montré que l'induction d'un stress du RE par incubation avec la thapsigargine provoque la diminution de l'expression des facteurs de la synthèse de P4 et celle de sa sécrétion (Yang et al. 2017).

Dans les cellules de Leydig, la protéine GRP78 est impliquée dans la régulation de la synthèse de testostérone notamment en contrôlant le transport du cholestérol par le transporteur StAR et la formation du canal VDAC/ANT (Prasad et al. 2017). L'induction du stress du RE dans ces cellules conduit à la diminution de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de P4 (Park et al. 2013).

Au niveau du placenta, l'induction de la voie UPR augmente avec la différenciation des CTV en ST. La voie UPR régule la sécrétion d'hCG au cours de cette différenciation trophoblastique (Bastida-Ruiz et al. 2019). En cas de suractivation de la voie UPR ou en cas de stress du RE, les cellules trophoblastiques subissent un processus d'autophagie qui empêche à la fois la différenciation trophoblastique et la sécrétion d'hCG (Bastida-Ruiz et al. 2019).

III. Régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

i. Facteurs de transcription

Régulation de la synthèse d'hCG

La transcription des gènes CGα et CGβ est sous le contrôle de différents facteurs comme « Transcription Factor AP-2 » (AP-2) et « Transcription Factor Sp1 » (Sp1) (Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015). La production d'hCG étant régulée par la voie AMPc/PKA, l'expression des gènes CGα et CGβ est donc sous le contrôle du facteur CREB. Le promoteur du gène CGα possède également un élément de réponse au facteur « Glial Cell Missing homolog 1 » (GCM1), gène impliqué dans la régulation de la différenciation trophoblastique. Cela pourrait expliquer le lien fréquemment observé

in vitro entre la différenciation morphologique des CTV et leur différenciation fonctionnelle caractérisée par la sécrétion d'hCG. Les facteurs « Activating Transcription Factor-1 » (ATF-1) et CREB sont essentiels dans la régulation de la synthèse de l'hCG au niveau placentaire. Leur liaison au niveau des promoteurs cibles est facilitée par $ERK_{1/2}$ (Delidaki et al. 2011).

D'autres récepteurs nucléaires activés après liaison de leur ligand interviennent également dans cette régulation. Parmi ces facteurs, « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ » (PPARγ), ER-α et PR-B sont capables de réguler la synthèse d'hCG et de son récepteur LH/CG (Yung et al. 2014; Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015). La P4 et les oestrogènes sont donc capables d'induire la synthèse d'hCG qui elle-même régule la synthèse de P4 et des oestrogènes ; créant ainsi une boucle d'autorégulation.

Régulation de la synthèse de la progestérone

La régulation de la synthèse de P4 au niveau transcriptionnel repose sur la modulation par différents facteurs, de l'expression des récepteurs aux lipoprotéines, du transporteur mitochondrial et des enzymes impliquées (P450SCC et HSD3B).

La régulation de l'expression des récepteurs aux lipoprotéines, notamment le récepteur aux LDL, fait intervenir des facteurs de transcription de la famille des « Sterol Regulatory Element Binding Protein » (SREBP) (Goldstein et Brown 2009). L'expression de ces récepteurs fait également intervenir la protéine « Proprotein convertase subtilisin/kexin-9 » (PCSK9) et le facteur « Inducible degrader of LDL receptor » (IDOL) qui ensemble, contrôlent l'expression des R-LDL au niveau membranaire (Melendez et al. 2017). L'expression des récepteurs SR-B1 est stimulée par des voies de signalisation (PKA et PKC) aboutissant à l'activation transcriptionnelle de leur expression par les facteurs transcriptions cibles de ces kinases (Pilon et al. 2003).

Grâce à des constructions plasmidiques, l'activité transcriptionnelle des gènes codant le transporteur mitochondrial MLN64 ainsi que les enzymes P450SCC et HSD3B2, est augmentée lorsque les cellules HEK293 transfectées sont incubées avec les facteurs « Steroidogenic Factor-1 » (SF-1) et « Liver Receptor Homologue » (LRH) (Sirianni et al. 2002). Sur des cellules ovariennes, il a été montré qu'un antagoniste des récepteurs de la P4 (PR), RU-486, induisait une diminution de l'expression du transporteur mitochondrial StAR, des enzymes P450SCC et HSD3B, et des PR eux-mêmes. Ces résultats démontrent que la P4 est capable d'induire une boucle positive d'autorégulation à la fois sur les acteurs de sa synthèse et ses récepteurs (Yung et al. 2014).

La régulation de l'expression de l'enzyme HSD3B1 implique CREB, mais aussi les facteurs de transcription TEF-5 et « GATA binding protein » (GATA). Le promoteur du gène HSD3B1 contient

également des éléments de réponse au facteur Stat6. L'IL-4, en se liant sur son récepteur, induit l'activation de la protéine JAK qui phosphoryle Stat6. Cela permet la dimérisation puis la translocation nucléaire du dimère qui après liaison sur le promoteur, induit l'activation de la transcription du gène HSD3B1 (Simard et al. 2005).

Concernant l'enzyme P450SCC, son expression est fortement régulée notamment par des facteurs de la famille des « Long terminal repeat Binding Protein » (LBP). Cette régulation est complexe puisque LBP-1b et LBP-1a sont des activateurs transcriptionnels alors que LBP-9 et LBP-32 sont des inhibiteurs transcriptionnels (Huang et Miller 2000; 2005). De plus, l'expression du facteur LBP-32 est régulée positivement par les facteurs LBP-1b et LBP-9 au niveau placentaire (Henderson et al. 2008). Comme pour l'HSD3B1, le promoteur du gène de l'enzyme P450SCC contient des éléments de réponse pour le facteur CREB et GATA2 qui activent la transcription du gène. Ce promoteur est également sous contrôle des facteurs « Activating Protein-1 et 2 » (AP-1 et AP-2) (Sher, Yivgi-Ohana, et Orly 2007; Henderson et al. 2008; Lavoie et King 2009; Shih et al. 2011; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

Régulation de la synthèse des oestrogènes

La production des oestrogènes fait intervenir au niveau placentaire deux enzymes spécifiques : la Stéroïde Sulfatase (STS) et l'aromatase.

La stéroïde sulfatase (STS)

La STS est cible de différents facteurs de transcription comme NFkB au niveau de cellules hépatiques et de kératinocyte (Hattori et al. 2012). Au niveau ovarien, son expression est stimulée par le TNF-α qui active le facteur NFkB, et l'IL-6 qui active les facteurs CREB et Stat (Reed et al. 2005). L'expression de la STS est régulée par les hormones stéroïdes, notamment les progestatifs dans les modèles de lignée de cancer du sein (Reed et al. 2005). L'analyse du promoteur du gène de la STS, contrairement aux autres enzymes stéroïdogènes, révèle l'absence d'élément de réponse au facteur Sp1 qui n'est donc pas impliqué dans la régulation de l'expression de cette enzyme.

L'aromatase

La transcription de l'aromatase est dépendante de l'exon 1 contenant le point de départ de la transcription, et plus précisément de l'exon 1.a au niveau du placenta. Le promoteur de l'aromatase contient des éléments de réponse à différents facteurs de transcription à la fois à proximité et à distance de ce point de départ. Quelques soient les séquences étudiées, la séquence consensus « CREB Response Element » (CRE) de fixation du facteur CREB n'est pas présente au sein du promoteur de l'aromatase. Par contre, il possède des séquences de fixation de facteurs de transcription sensibles à

l'AMPc (Kamat et al. 1998; Harada, Yoshimura, et Honda 2003). Au cours de la culture des CTV humain, l'expression et l'activité de l'aromatase augmentent en parallèle de l'augmentation de l'expression de la sous unité β de l'hCG. L'incubation avec la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, provoque l'augmentation de l'expression de l'aromatase ainsi que l'augmentation de son activité enzymatique (Hudon Thibeault, Vaillancourt, et Sanderson 2018).

Le promoteur de l'aromatase contient également des éléments de réponse au facteur GCM1 essentiel à la différenciation trophoblastique, et aux facteurs SF-1 et Sp1 (Harada, Yoshimura, et Honda 2003; Zhou et al. 2009).

Dans un modèle de lignée de choriocarcinome JEG-3, l'analyse des promoteurs du gène codant pour l'aromatase démontre la présence d'éléments de réponse aux facteurs Smad. Grâce à des expériences de plasmide rapporteur sous contrôle de ce promoteur, il a été montré que le TGF-β via la phosphorylation de Smad2 régulait négativement l'expression de l'aromatase (Zhou et al. 2009).

L'expression de l'aromatase est également régulée par la pression partielle en oxygène. En effet, en cas d'hypoxie, l'expression du facteur « Mammalian achaete/scute homolog-2 » (Mash2) est augmentée, conduisant à l'augmentation de l'expression des facteurs « Upstream Stimulatory Factors » (USF) 1 et 2 qui après dimérisation répriment l'expression de l'aromatase et donc la production d'oestrogènes (Mendelson et al. 2005; Mendelson et Kamat 2007). L'oxygène régule également un autre facteur de transcription essentiel pour le placenta, le facteur « Hypoxia Inductible Factor 1α » (HIF1α). En cas d'hypoxie, HIF1α réprime la transcription du gène ERRγ impliqué dans la différenciation des CTV. ERRγ régule également l'expression de l'aromatase. En effet, en cas d'augmentation de la pression partielle en oxygène, l'expression de ERRγ n'est pas réprimée, il peut donc s'associer au récepteur ERα lié à l'E2. Le complexe ERRγ-ERα/E2 se fixe sur le promoteur du gène de l'aromatase et favorise sa transcription provoquant l'augmentation de la production d'oestrogènes (Kumar et Mendelson 2011).

ii. Les microRNA (miRNA)

Les microRNA (miRNA) sont de courtes séquences nucléotidiques (environ 20 nucléotides) capables de s'apparier avec un ARNm aboutissant à la dégradation de ce dernier. Ils sont donc essentiels à la régulation de l'expression génique et ont été étudiés dans de nombreux tissus endocrines dont la granulosa ovarienne.

Le facteur de croissance « Insuline-like Growth Factor 1 » (IGF1) contrôle via le miRNA-320a, l'expression des gènes *CYP11A1* et *CYP19A1* codant respectivement pour l'enzyme P450SCC et l'aromatase. Ils régulent ainsi la production de P4 et d'E2 par les cellules de la granulosa (Zhang et al.

2017). D'autre miRNA, notamment le miRNA-378, diminue la production d'hormones stéroïdes. Dans les cellules de la granulosa, le miRNA-378 diminue l'expression de l'aromatase aboutissant à la diminution de la production d'E2 (Xu et al. 2011).

Au niveau utérin, les miRNA notamment le miRNA-200a, contrôlent la prolifération et la différenciation des cellules endométriales. En effet, en dehors de la zone d'implantation, le niveau d'expression du miRNA-200a augmente provoquant d'une part la diminution de l'expression des récepteurs à la P4 (PR) et d'autre part, la diminution de Stat5. Ce dernier diminuant l'expression de l'enzyme 20-α-Hydroxystéroïde Déshydrogénase (20-α-HSD), la chute de Stat5 induit l'expression de cet enzyme aboutissant au catabolisme inactivateur de la P4. Au contraire, la faible expression du miRNA-200a au niveau de la zone d'implantation permet l'expression des PR et de Stat5. Ce dernier en empêchant l'action de l'enzyme 20-α-HSD, bloque le métabolisme de la P4. La P4 et ses récepteurs régulent donc la prolifération et différenciation des cellules endométriales indispensables à une bonne implantation du zygote (Haraguchi et al. 2014).

Au niveau du placenta, les miRNA-19b et miRNA-16a régulent négativement l'expression des gènes *CGβ*, *CYP19A1* codant pour l'enzyme aromatase, ainsi que ceux codant la protéine GCM1 (Kumar et al. 2013).

Virus de l'Immunodéficience Humaine

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) responsable du Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA) est un virus qui affaiblit le système immunitaire en détruisant les lymphocytes T « Cluster Differentiation 4 » (CD4). Il a été découvert au début des années 1980 par 3 équipes différentes. Aux Etats-Unis, l'équipe de Robert Gallo a découvert le rétrovirus (virus à ARN) « Human T-Lymphotropic Virus-1 » (HTLV-1) responsable de la prolifération des Lymphocytes T4. Le virus du SIDA diminuant les réserves en lymphocytes T CD4+, ils ont supposé que ce virus serait un mutant du HTLV-1. En 1984, à partir d'échantillons sanguins de patients atteints du SIDA, ils ont isolé un rétrovirus qu'ils nomment HTLV-3 (Broder et Gallo 1984). Simultanément, à San Francisco, l'équipe de Jay A. Levy a découvert plusieurs rétrovirus dans les « Peripheral Mononuclear Cell » isolés à partir d'échantillons sanguins de patients atteints du SIDA, et les ont nommées « AIDS-associated retroviruses » (ARV) (Levy et al. 1984). En France, suite à la demande de Willy Rozenbaum, l'équipe de l'institut Pasteur composée de Jean-Claude Chermann, Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier (Prix Nobel de Médecine en 2008) a recherché le virus dans les ganglions lymphatiques de personnes notamment atteintes de lymphadénopathies au stade pré-SIDA. En effet, Willy Rozenbaum supposait que les cellules infectées étaient détruites, expliquant ainsi pourquoi il est très difficile d'isoler les virus à partir de prélèvement sanguin. L'analyse de ces échantillons par Françoise Barré-Sinoussi a mis en évidence une activité de transcriptase inverse, confirmant la nature rétrovirale du virus impliqué et a ensuite visualisé ce virus en microscopie électronique (Barré-Sinoussi et al. 1983). Après des échanges avec l'équipe de Robert Gallo, ils ont confirmé qu'il ne s'agissait pas du virus HTLV-1 et ont nommé ce nouveau virus « Lymphadenopathy Associated Virus » (LAV). Il prendra le nom de Virus de l'Immundodéficience Humaine (VIH) en 1986 (Institut 2017). L'équipe de Luc Montagnier en collaboration avec une équipe portugaise mettra ensuite en évidence l'existence d'un second rétrovirus responsable du SIDA qui sera nommé VIH-2.

I. Présentation du virus

i. Description du virus

Le virus est composé d'une enveloppe virale lipidique sous laquelle se situe une matrice protéique. Elle renferme le cor viral formé de la capside protéique encerclant le génome viral qui est protégé par la nucléocapside (*Figure 25*).

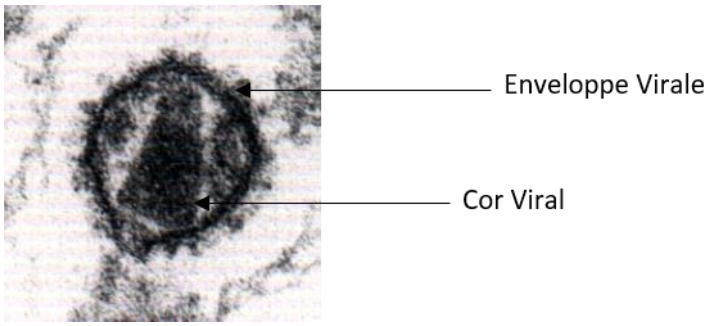


Figure 25 : Image du VIH en microscopie électronique (d'après Chaillon 2012).

Génome viral

Le VIH est un rétrovirus de la famille *Rétroviridae* et du genre *lentivirus*. Le génome viral se présente donc sous forme d'ARN, plus précisément, de deux ARN simple brin de polarité positive, on parle alors d'ARN diploïde. Il contient 3 gènes principaux et communs à tous les rétrovirus : le gène *Gag* codant les protéines des capsides, le gène *Pol* codant les enzymes nécessaires au cycle de réplication dont la transcriptase inverse, et le gène *Env* codant les glycoprotéines de l'enveloppe externe. En plus de ces gènes principaux, le génome contient également des gènes auxiliaires : *Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu* et *Nef*. A chaque extrémité des ARN se trouvent des séquences spécifiques non codantes, dont les « Long Terminal Repeat » (LTR), encadrant ces différents gènes et impliquées dans l'intégration au sein du génome de la cellule cible (*Figure 26*). En fonction de l'avancée du cycle de réplication virale, l'ARN messager (ARNm) va être épissé pour exprimer les protéines nécessaires à chaque étape du cycle.

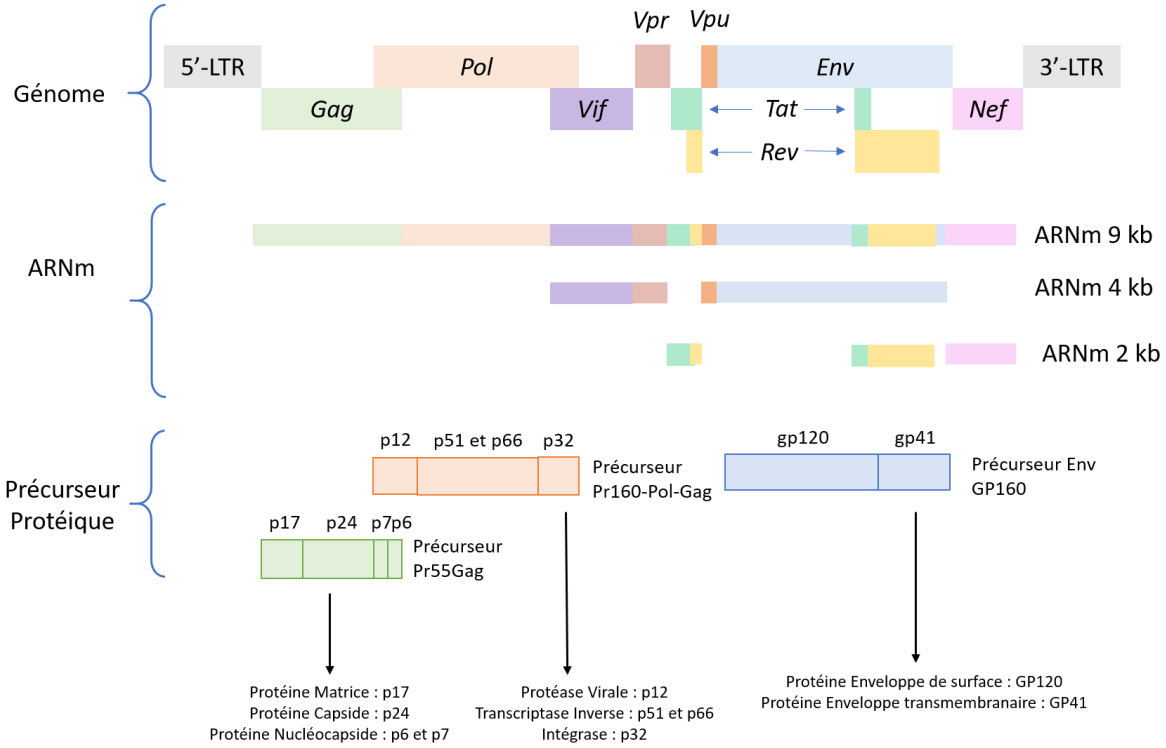


Figure 26 : Génome du VIH (adapté de Gemrot et Lefranc 2009). Comme tous les rétrovirus, le génome du virus est composé du gène Gag codant pour les protéines de structures, du gène Pol codant pour les enzymes virales et du gène Env codant pour les glycoprotéines d'enveloppe. Le génome du VIH possède également des gènes codant pour des protéines régulatrices : Tat et Rev ainsi que des gènes codant pour des protéines auxiliaires : Vpr, Vpu, Vif et Nef. Il est encadré en 5' et 3' par des séquences LTR.

Structure du virus

Le VIH possède une bicouche phospholipidique formant l'enveloppe virale qui comprend une glycoprotéine codée par le gène *Env*. Cette protéine d'enveloppe est formée d'une première sous unité, la GlycoProtéine 120 (GP120) qui encadre une seconde sous unité la GlycoProtéine 41 (GP41), qui sont impliquées dans la fixation puis la fusion du virus aux cellules cibles. Cette enveloppe est soutenue par une matrice protéique composée notamment de la protéine p17 codée par le gène *Gag*. L'ensemble « enveloppe + matrice » renferme le cor viral délimité par la capside formée de la protéine p24 codée par le gène *Gag*. Cette capside encercle et protège les brins d'ARN viraux recouverts de nucléocapsides composées des protéines p7 et p6 codées par le gène *Gag*. Chaque brin d'ARN possède à son extrémité une intégrase, la protéine p32, codée par le gène *Pol*. Ce gène code également les enzymes nécessaires à la réplication du virus : une protéase virale (la protéine p12) et une transcriptase inverse (protéines p51 et p66). La protéase virale est stockée dans la matrice, alors que la transcriptase inverse est stockée au cœur de la capside (*Figure 27*) (Gemrot et Lefranc 2009; Bregnard 2012).

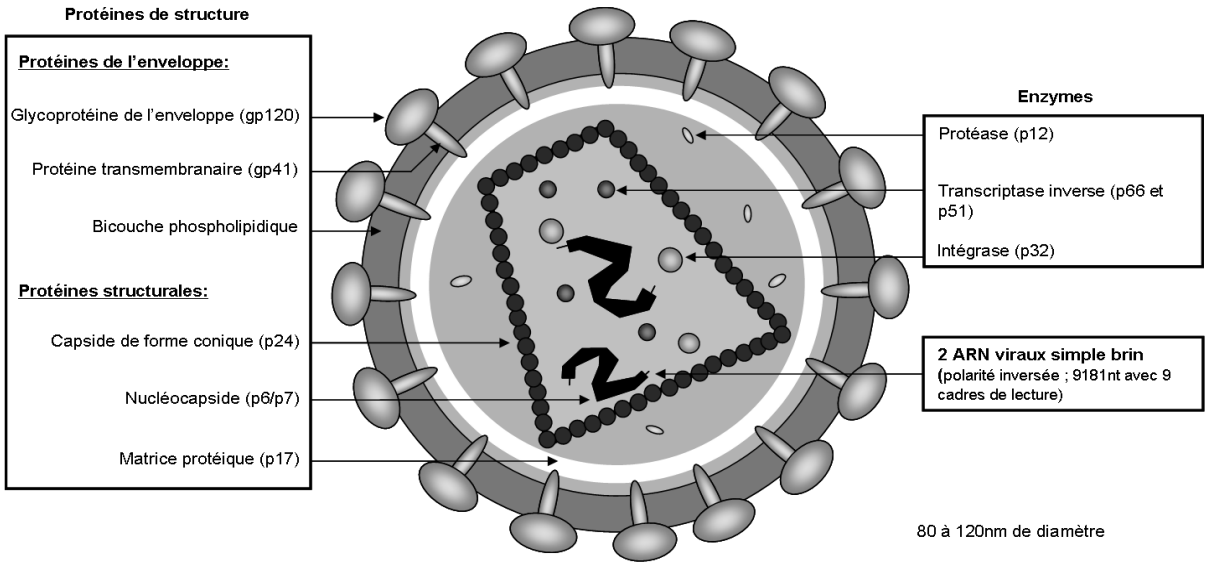


Figure 27 : Structure du VIH (d'après Gemrot et Lefranc 2009). La bicouche phospholipidique comprenant les protéines de liaison GP120 et de fusion GP41 soutenue par la matrice protéique p17 renferme une capside protéique p24. Cette dernière contient le génome viral protégé par les nucléocapsides ainsi que la transcriptase inverse et intégrase. L'enzyme virale protéase est contenue à l'extérieur de la capside.

ii. Cycle de réplication du virus

Afin de pouvoir survivre dans l'organisme infecté, le VIH va devoir se répliquer au sein des cellules du système immunitaire présentant la protéine CD4 à leur membrane (cellules CD4+) à savoir : les Lymphocytes T (LT), macrophages ou cellules dendritiques. Le cycle de réplication comporte une succession d'étapes indispensables : la fixation du virus, la fusion des membranes, la libération du contenu viral, la transcription inverse de l'ARN en ADN, l'intégration de l'ADN proviral au génome cellulaire, l'expression des gènes viraux et enfin l'assemblage du virion (*Figure 28*).

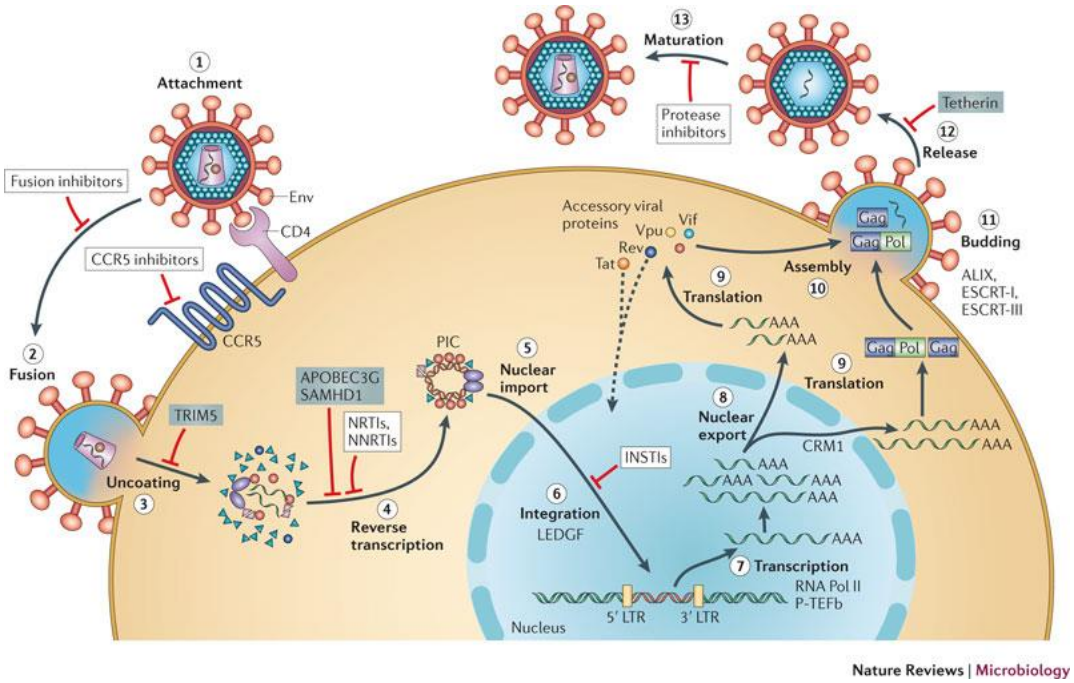


Figure 28 : Schéma récapitulatif du cycle de réplication du VIH (d'après Engelman et Cherepanov 2012) . Cycle réplicatif du VIH-1 ainsi que les moyens d'action des antirétroviraux. Cadres bleus : facteurs cellulaires limitant la réplication virale. (1) Liaison du virus à la cellule cible. (2) Fusion de la membrane du virus à celle de la membrane cellulaire. (3) Libération et décapsidation de la capside virale dans le cytoplasme cellulaire. (4) Transcription inverse de l'ARN viral and ADN. (5) Transport de l'ADN viral dans le noyau. (6) Intégration du génome viral à l'ADN cellulaire. (7) Transcription de l'ADN viral. (8) Export nucléaire des ARNm viraux épissés ou non. (9) Traduction de l'ARNm viral notamment pour exprimer les protéines auxiliaires (Rev, Vif…) ou les protéines de structures (GP120, GP41, capside…). (10) Transport et assemblage à la membrane pour former une nouvelle particule virale. (11,12,13) Bourgeonnement, libération et maturation de la nouvelle particule virale.

Liaison et fusion

Liaison du virus aux cellules cibles

Le VIH présente à la surface de son enveloppe virale des glycoprotéines impliquées dans la liaison du virus aux cibles. Parmi ces glycoprotéines, la protéine de surface GP120, protéine d'ancrage du virus, cible deux récepteurs différents permettant soit de disséminer le virus, soit de répliquer le virus. La liaison entre GP120 et « Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin » (DC-SIGN), une lectine présente à la surface des cellules dendritiques, permet au virus de se propager dans la circulation lymphatique et de rejoindre les ganglions où résident notamment les lymphocytes CD4+ (Geijtenbeek et al. 2000; Weiss 2013). La protéine GP120 se lie à la protéine CD4 exprimée à la membrane des cellules cibles. Cette fixation induit un changement de conformation de la protéine GP120. Cela permet de révéler un second site de fixation qui permet à la protéine GP120 de se lier à des récepteurs de chimiokines, « C-C motif chemokine receptor 5 » (CCR5) ou « C-X-C motif

chemokine receptor 4 » (CXCR4), qui constituent alors les corécepteurs du virus au niveau de la cellule cible (Finzi, Dieffenbach, et Basavappa 2007; Weiss 2013). Cette succession de liaisons avec la protéine GP120 permet de rapprocher les membranes du virus de celles de la cellule hôte afin d'initier la fusion des membranes (*Figure 29*).

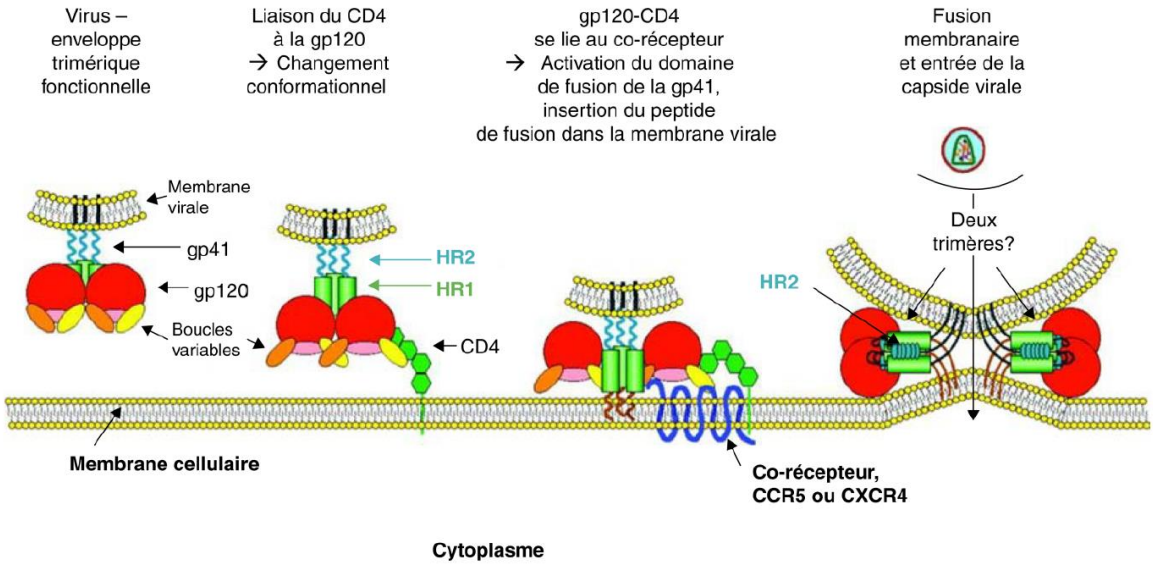


Figure 29 : Mécanisme d'entrée du virus au sein des cellules cibles (d'après Chaillon 2012). La liaison entre la protéine GP120 et le récepteur CD4 entraine un changement de conformation de boucle variable de GP120, libérant un second site de fixation qui se lie à un corécepteur (CCR5 ou CXCR4). Cette seconde interaction provoque un changement de conformation de la protéine GP41 permettant l'insertion du peptide de fusion ainsi que la formation de structure hélicoïdale des domaines HR1 et HR2 permettant la fusion membranaire.

Fusion des membranes

L'interaction entre la protéine GP120 et son corécepteur permet d'exposer la protéine GP41, notamment le peptide de fusion en position N-ter de la protéine. L'insertion du peptide de fusion au sein de la membrane plasmique cellulaire est possible par des changements conformationnels qui entrainent le rapprochement puis la fusion de la membrane plasmique cellulaire avec la membrane virale (Moore et Doms 2003; Chaillon 2012; Weiss 2013; Gerbouin et Grellet 2017).

Décapsidation et transcription inverse

Après fusion des membranes, la matrice comprenant la protéine p17 qui est myristylée, s'implante à son tour dans la membrane plasmique (Ganser-Pornillos, Yeager, et Sundquist 2008). La capside virale et la protéase virale sont alors libérées au sein du cytoplasme cellulaire. La capside virale va être digérée afin de permettre à la transcriptase inverse d'entrer en action.

Décapsidation

Il existe plusieurs hypothèses concernant la décapsidation : (i) une décapsidation rapide et totale après l'entrée dans le cytoplasme, (ii) une décapsidation partielle dans le cytoplasme puis totale au niveau du pore nucléaire et enfin (iii) une décapsidation après fixation au niveau du pore nucléaire (*Figure 30*) (Campbell et Hope 2015).

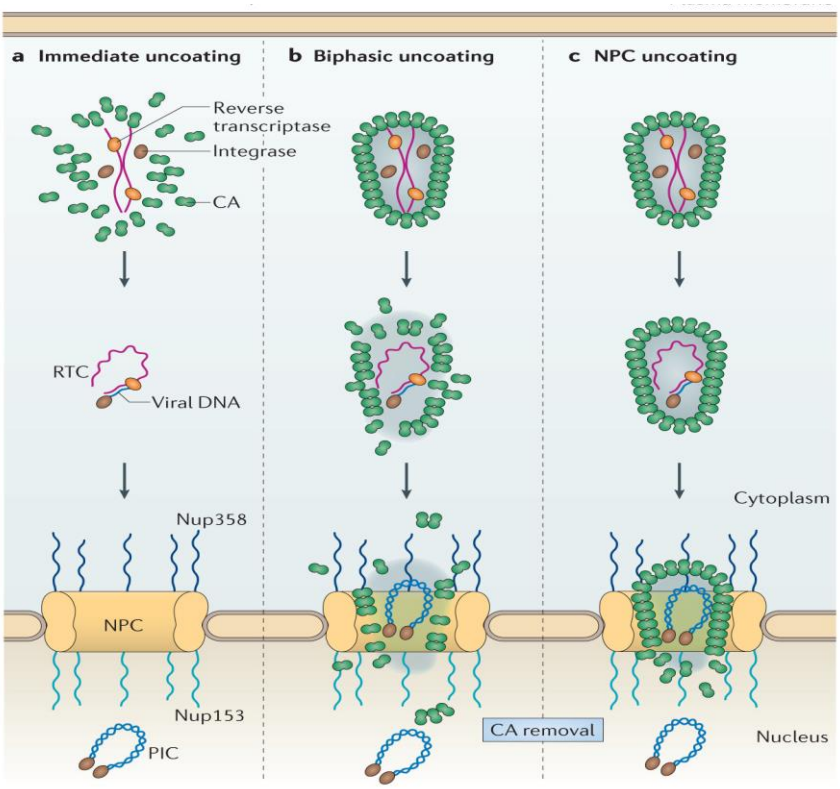


Figure 30 : Mécanisme de décapsidation du cor viral (d'après Campbell et Hope 2015). Trois hypothèses sur les mécanismes de décapsidation du cor viral. (A) Décapsidation immédiate après entrée dans le cytoplasme. (B) Décapsidation partielle au cours du transport vers le pore nucléaire. (C) Décapsidation après ancrage au niveau du pore nucléaire. CA : caspside. NPC : Nuclear Pore Complex. PIC : Pre-Integration Complex. RTC : Reverse Transcription Complex.

La décapsidation fait intervenir différentes protéines soit cellulaires comme la cyclophiline A, soit virales. La cyclophiline A, en se fixant à la protéine p24 induit, un changement conformationnel de cette dernière qui aboutit à la dissociation de la capside. Par ailleurs, l'intégrase virale p32 située au cœur de la capside, est impliquée dans la stabilité du cor viral. Cette stabilité est nécessaire pour assurer la décapsidation correcte du cor après l'entrée dans la cellule hôte (Finzi, Dieffenbach, et Basavappa 2007; Campbell et Hope 2015).

Transcription inverse

Après l'entrée du virus dans la cellule hôte, la transcription inverse s'initie au sein du cor viral. L'ARN viral (ARNv) lié aux nucléocapsides associées à la transcriptase inverse et à l'intégrase, forment le « Reverse Transcription Complex » (RTC) qui permet d'obtenir l'ADN viral. La transcription inverse s'active après hybridation de l'$ARNt^{Lys}_3$ sur l'ARNv, processus hautement régulé par la nucléocapside qui protège l'ARNv (Sleiman et al. 2012).

Au sein du RTC, la transcriptase inverse aboutit à la formation de l'hybride ARN/ADN. L'activité RNase H de l'enzyme dégrade le brin ARN à différents sites de sa séquence nucléotidique. Les fragments d'ARN clivés s'hybrident avec la séquence d'ADN naissante et servent alors d'amorce pour synthétiser le second brin d'ADN. Après la synthèse du second brin, la RNase H élimine les amorces d'ARN, permettant ainsi la formation d'un ADN viral bicaténaire (Sleiman et al. 2012; Campbell et Hope 2015).

Au niveau cytoplasmique, la cellule possède une protéine de la famille des enzymes éditrices d'ARNm APOBEC (« apolipoprotein B mRNA-editing enzyme »), l'isoforme APOBEC3G. Au cours de la transcription inverse, la protéine APOBEC3G transforme les bases cytosine en uracile, introduisant une erreur dans la séquence génique. Ces erreurs provoquent soit des dégradations de l'ADN viral par le système de réparation, soit la production d'ARNv tronqués ou épissés incorrectement, aboutissant *in fine* à un blocage du cycle de réplication (Aguiar et Peterlin 2008). Pour contrer cet effet antiviral, le VIH induit l'expression de sa protéine Vif qui induit l'ubiquitinylation de la protéine APOBEC3G, et donc la dégradation de cette dernière. La transcription inverse peut par conséquent, se dérouler sans changement de base et donc aboutir à la formation d'une nouvelle particule virale (Aguiar et Peterlin 2008).

Après transcription, l'association de l'ADN viral à l'intégrase, à la transcriptase inverse, et aux protéines virales notamment Vpr, forme ce que l'on appelle le Complexe de Pré-Intégration (CPI).

Transport nucléaire et intégration de l'ADN viral au sein du génome de la cellule hôte

Transport nucléaire

Pour transférer l'ADN viral au noyau, le VIH utilise les complexes des pores nucléaires (« Nuclear Pore Complex » [NPC]) (Burdick et al. 2017; Berry et al. 2018), qu'il atteint via le réseau de microtubules grâce aux protéines motrices dynéines (Campbell et Hope 2015; Buffone et al. 2018).

Les séquences de localisation nucléaire (« Nuclear Localization Sequences », [NLS]) retrouvées au niveau de l'intégrase et de la protéine Vpr (Finzi, Dieffenbach, et Basavappa 2007) sont nécessaires à l'import du CPI au noyau.

De plus, l'interaction des protéines p24 de la capside avec les nucléoporines NUP358/RanBP2 et NUP153 ou la transportine TPNO3 assure l'ancrage du cor viral au noyau et permet ainsi le transport du CPI. Cet ancrage est fortement régulé par la cyclophiline A (Campbell et Hope 2015; Burdick et al. 2017; Berry et al. 2018).

Intégration de l'ADN viral au sein du génome cellulaire

Dans le noyau, le CPI s'incorpore au génome cellulaire grâce à son intégrase. L'intégration de l'ADN viral se fait au niveau des séquences transcriptionnellement actives du génome afin d'obtenir rapidement les protéines nécessaires à la réplication du virus (Bushman et al. 2005; Bregnard 2012; Chaillon 2012). Différents facteurs, notamment CPSF6 (« Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor subunit 6 »), LEDGF/p75 (« Lens Epithelium Derived Growth Factor »), ou HRP-2 (« Hepatoma-derived growth factor Related Protein 2 ») ainsi que des nucléoprotéines NUP153 et NUP98 assurent l'intégration de l'ADN viral dans des zones à forte activité transcriptionnelle (Berry et al. 2018).

Formation d'une nouvelle particule virale

Expression génique de l'ADN viral et export nucléaire

Après intégration du génome viral en ADN proviral, ce dernier va être transcrit grâce à l'ARN polymérase II de la cellule hôte à partir des séquences « Long Terminal Region » utilisées comme promoteur. Plusieurs copies d'ARNv vont être produites, certaines vont être maintenues sous forme entière et d'autres seront épissées (Mailler et al. 2016). Les copies d'ARNv épissées vont être exportées du noyau vers le cytoplasme afin d'être traduites en protéines virales permettant la formation d'une nouvelle particule virale. En plus de l'épissage alternatif, le VIH utilise le mécanisme post transcriptionnel, « décalage de phase 1 », pour aboutir à l'expression de protéines différentes à partir d'une même séquence génique (Dulude et Brakier-Gingras 2006). La protéine virale Tat régule l'activité transcriptionnelle de l'ADN viral en liant sa séquence « Transactivation Response Region » (TAR).

Dans un premier temps, le virus par régulation transcriptionnelle, exprime les protéines auxiliaires Rev ou Tat qui modulent la transcription ou l'export nucléaire des copies entières de l'ARNv (Bregnard 2012). Dans un second temps, les protéines structurales (gènes Gag, Pol ou Env) seront exprimées afin de former la nouvelle particule virale (Cullen 2003; Finzi, Dieffenbach, et Basavappa 2007).

A la différence des formes épissées, les copies entières de l'ARNv ne peuvent être exportées. La protéine virale Rev préalablement synthétisée se lie aux copies d'ARNv entières au niveau de leur région « Rev Response Element » (RRE). Le complexe Rev/ARNv interagit alors avec le complexe d'export nucléaire « Chromosomal Maintenance 1 » CRM1/RanGTP afin de libérer l'ARNv entier dans le cytoplasme de la cellule hôte (Finzi, Dieffenbach, et Basavappa 2007; Mailler et al. 2016).

Bourgeonnement de la nouvelle particule virale

L'expression des gènes de structure aboutit à la production des précurseurs Pr55-Gag, Pr160-Gag-Pol et Env. Ce dernier, clivé par une protéase cellulaire, aboutit à la formation des protéines d'enveloppe GP120 et GP41. Grâce aux interactions Gag-Gag, le précurseur Pr160-Gag-Pol est également recruté à la membrane plasmique. On parle alors du bourgeonnement de la nouvelle particule virale (Freed 2001; Chaillon 2012).

II. Physiopathologie de l'Infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Bregnard 2012; Chaillon 2012)

En cas de contamination par le VIH, l'infection va se dérouler en trois phases différentes : la phase de primo-infection, la phase asymptomatique, puis la phase SIDA.

i. Mode de transmission du VIH

Le VIH se transmet par le sang, le liquide séminal/vaginal et le lait maternel lorsque la mère est infectée par le VIH. Les rapports sexuels non protégés, le contact avec le sang contaminé (nouveau-nés à l'accouchement de mère contaminée, aiguilles contaminées...) et l'allaitement maternel sont les principaux modes de transmission du VIH.

ii. *Déroulement de l'infection à VIH*

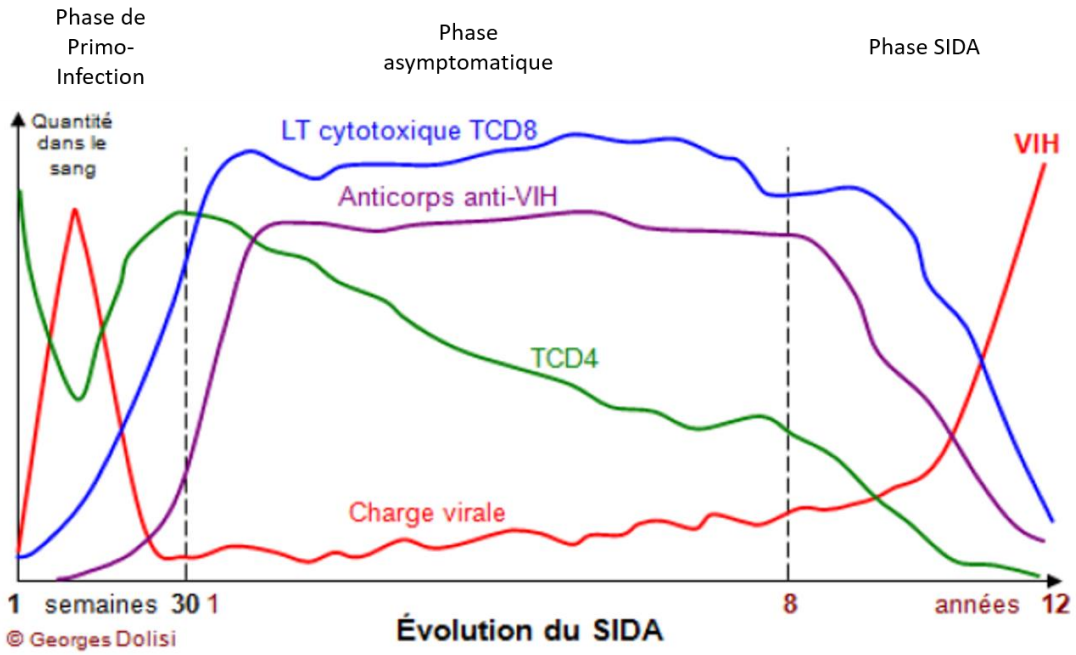


Figure 31 : Physiopathologie de l'infection par le VIH (adapté de Dolisi, Planchet, et Maugenest 2014). Après entrée dans l'organisme, l'infection par le virus se déroule en 3 phases : phase de primo-infection, phase asymptomatique et phase SIDA.

Phase de primo-infection

Cette phase de primo-infection dure entre quelques semaines à quelque mois. Elle passe souvent inaperçue et se présente sous la forme d'un tableau grippal non spécifique.

Durant cette phase, le virus se dissémine dans tout l'organisme et notamment les tissus lymphoïdes. Il peut alors se répliquer et libérer les nouvelles copies dans la circulation sanguine. Par conséquent, la virémie évaluée par la charge virale (quantité de virus dans le sang) est élevée. Consécutivement à l'augmentation de la charge virale, la quantité de lymphocytes CD4 diminue car les CD4 sont détruits par le virus alors que la quantité de CD8 augmente. En effet, afin de combattre le VIH, l'organisme induit la multiplication de ces cellules immunes afin de produire des anticorps contre le VIH (*Figure 31*).

Phase asymptomatique

Cette phase asymptomatique constitue la phase la plus longue de l'infection car elle dure souvent plusieurs années. Le système immunitaire continue de produire de façon constante des anticorps, le taux de lymphocytes CD8 est, lui aussi constant et élevé. La charge virale est basse et

constante mais elle conduit à la dégradation des lymphocytes CD4 et à la diminution progressive de leur taux. Les patients ne présentent alors que peu ou pas de symptômes (*Figure 31*).

Phase SIDA

On observe une chute brutale des taux de CD4 et CD8, ainsi qu'une diminution de la production d'anticorps, ce qui permet une réactivation de la réplication virale. La hausse de la charge virale provoque une chute encore plus rapide des lymphocytes T CD4+ (*Figure 31*).

Durant cette phase SIDA, les maladies opportunistes (sarcome de Kaposi, cancer du système lymphatique, pneumocystose) peuvent entrainer des lésions tissulaires, de la fièvre ou encore des douleurs thoraciques et peuvent conduire à la mort des patients..

iii. Suivi biologique des patients (Morlat et al. 2018)

Durant les 10 premiers jours après une contamination, la réplication du virus n'est pas détectable car les taux d'ARN viral ou les taux de protéine p24 libérée lors de la réplication) sont en dessous du seuil de détection. A partir du 11e jour, l'ARN viral est détectable en circulation.

Le dépistage du VIH repose dans un premier temps sur la recherche de l'antigène p24 décelable à partir du 14e jour post contamination. Dans un second temps, l'organisme va développer des anticorps dirigés contre des protéines du VIH (anticorps anti-GP120 ; anti-GP41) qui seront détectables en circulation après la 3e semaine post contamination. Si ce dépistage est positif, il devra être confirmé par un test diagnostic basé sur la mise en évidence par western blot des différentes protéines virales. Une fois l'infection confirmée, son évolutivité et l'efficacité du traitement sont suivies principalement par la mesure de l'ARN viral circulant ou charge virale et celle du taux de lymphocytes CD4.

Lors du suivi d'un patient VIH+, l'objectif thérapeutique est d'atteindre une virémie ou charge virale indétectable, c'est-à-dire inférieure 50 copies/mL en 6 mois, ainsi qu'un taux de CD4 supérieur à 500 cellules/mL. Des contrôles intermédiaires sont effectués avec l'objectif d'une diminution de la charge virale de 100 copies/mL un mois après la prise en charge, pour atteindre une virémie inférieure à 400 copies/mL 3 mois après le début de prise en charge. Si l'objectif à 6 mois n'est pas atteint, cela suggère un taux de CD4 inférieur à 200 cellules/mL ou un nombre de copies initiales supérieur à 100 000 copies/mL. Dans ce cas, il est possible d'attendre 4 à 6 mois supplémentaires pour atteindre une charge virale indétectable. Si les contrôles intermédiaires ne donnent pas satisfaction, il est possible d'évaluer la bonne observance des patients vis-à-vis des traitements ainsi que la biodisponibilité des médicaments, par dosage de ces derniers, pour faire adapter le protocole thérapeutique.

Une fois la charge virale indétectable atteinte, le suivi des patients repose essentiellement sur le suivi du taux de CD4. Si ce dernier est inférieur à 200 cellules/mL, le patient sera suivi tous les trimestres. Entre 200 et 500 cellules/mL, le suivi se fera réduit à 2 fois par an. A partir d'un taux supérieur à 500 CD4/mL depuis plus d'un an et d'une charge virale indétectable depuis plus de 2 ans, le suivi sera réduit à un suivi semestriel de la charge virale.

III. Traitements anti-Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

Le développement des traitements anti-VIH (molécules synthétiques, Ac neutralisant…) cible les différentes étapes du cycle viral et la réponse de l'organisme : la liaison, la fusion, la transcription inverse, l'intégration de l'ADN viral ou la formation de nouvelles particules virales peuvent être inhibées (*Figure 32*).

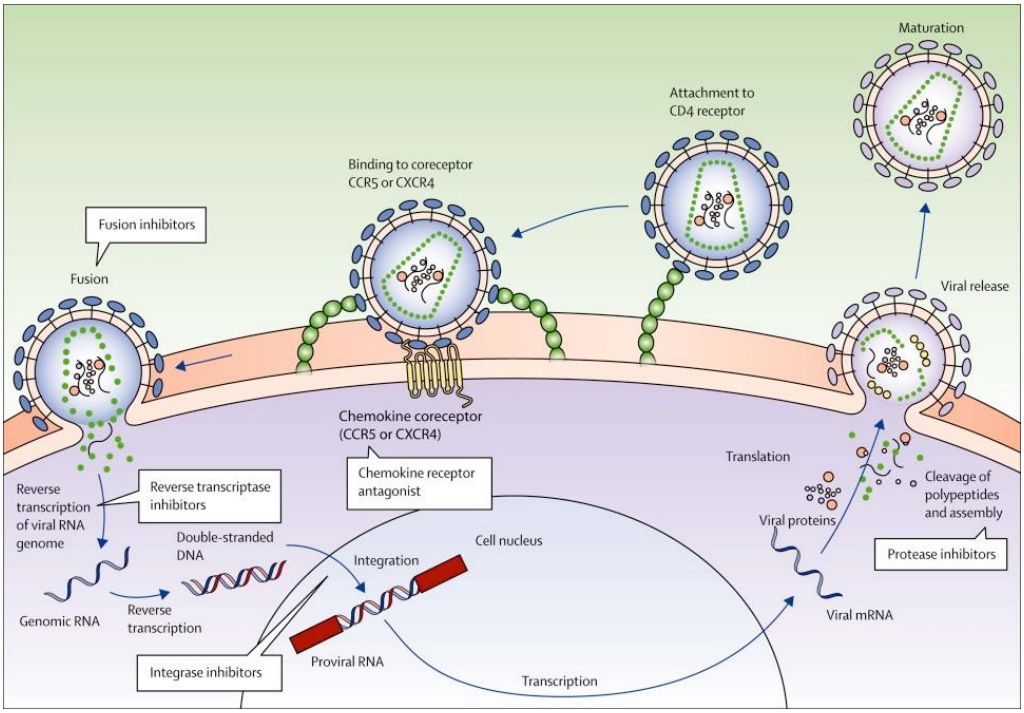


Figure 32 : Cycle de réplication du virus et traitements anti-VIH. La réplication du virus peut être diminuée en empêchant la fixation par des antagonistes des récepteurs et corécepteurs, en inhibant la fusion, la transcription inverse en ADN viral, l'intégration dans le génome cellulaire ou encore la formation de nouveaux virions par les inhibiteurs de protéase.

Selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les patients infectés par le VIH doivent être traités par une association combinant deux Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) et un inhibiteur de protéase (IP) couplé au ritonavir (RTV). De nombreux IP ont été mis sur le marché par l'industrie pharmaceutique depuis le développement de la trithérapie :

Saquinavir (SQV), Lopinavir (LPV), Atazanavir (AZV)… Le dernier et le plus utilisé actuellement est le Darunavir (DRV).

i. Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) (Tableau 1)

Les Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) représentent la classe thérapeutique anti-VIH la plus ancienne. Ils présentent une activité inhibitrice de la transcriptase inverse, mais aussi une activité inhibitrice des ADN polymérase ADN ou ARN dépendantes grâce à leur structure proche des nucléotides cellulaires (*Figure 33*). En effet, ils peuvent bloquer directement la transcriptase inverse par inhibition compétitive. Le plus souvent, les analogues nucléosidiques utilisés se retrouvent à l'extrémité 3'-OH de de l'ARN viral, bloquant l'activité polymérase et empêchant l'élongation de la chaine de ribonucléotides. Ils empêchent donc la formation de l'hybride ADN double brin qui doit être intégré au génome cellulaire (« Nucleoside Analogues » 2012).

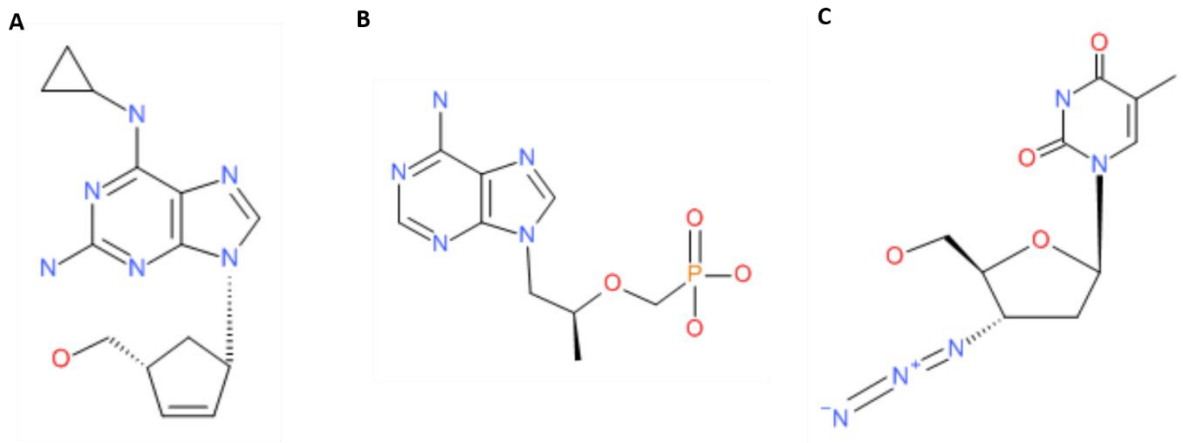


Figure 33 : Structure de certains Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) (d'après (« Abacavir » 2012; « Tenofovir » 2012; « Zidovudine » 2012). (A) Structure de l'Abacavir (ZIAGEN©). (B) Structure du Ténofovir (VIREAD©). (C) Structure du Zidovudine (RETROVIR©).,

Par ailleurs, il existe d'autres antiviraux (Lamivudine [ENPIVIR®] et Emtricitabine [EMTRIVA®]) qui sont des énantiomères des nucléosides naturels et qui par encombrement stérique après liaison à la polymérase ou à l'ADN, interfèrent avec la réplication virale. En parallèle des analogues de la région 3', il existe des analogues pour la région 5'-phosphate, aboutissant à une inhibition de réplication du virus (« Nucleoside Analogues » 2012).

De par leur structure, l'action de ces INTI n'est pas spécifique des enzymes virales. Ils peuvent donc aussi perturber et bloquer les ADN polymérases cellulaires (nucléaires et mitochondriales). Ainsi, lors de la division cellulaire, lors de l'expression génique ou lors de la réparation des dommages causés à l'ADN, l'incorporation cellulaire de nouveaux nucléotides pourra être altérée. Cela explique les

importants effets secondaires observés, notamment les maladies mitochondriales, en cas d'utilisation des INTI. En effet, les INTI étant des analogues des nucléotides, ils peuvent être captés par l'ADN polymérase mitochondriale aboutissant à la formation d'un ADN mitochondrial soit muté, soit en quantité insuffisante. Il résulte de ces mutations des dysfonctionnements mitochondriaux comme une diminution de la production d'ATP ou la production de « Reactive Oxygen Species » (ROS) qui pourrait expliquer les effets secondaires observés (Leclercq, Roudiere, et Viard 2004). En plus de cette toxicité mitochondriale, les INTI induisent de fortes modifications du métabolisme lipidique menant à des lipodystrophies ou des hyperlipidémies (« Inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH » s. d.). Comme pour de nombreux médicaments, les INTI sont métabolisés au niveau hépatique puis éliminés au niveau rénal. Contrairement aux IP, ils sont très peu liés aux protéines plasmatiques.

ii. Inhibiteurs de Protéases (IP) (Tableau 1)

Les IP appartiennent à la famille des inhibiteurs compétitifs. Ils agissent donc en se liant au site actif de l'enzyme, empêchant la liaison du substrat de l'enzyme, ce qui bloque la catalyse enzymatique. Les IP, comme tous les inhibiteurs compétitifs, sont des analogues structuraux du substrat. Au niveau structural, les IP sont donc des peptides mimant la structure des protéines virales, leur permettant de se lier au site actif l'enzyme (*Figure 34*). Du fait de leur liaison au site catalytique, ils bloquent la liaison des polypeptides viraux et empêchent leur clivage. La structure finale des protéines virales ne peut être achevée, celles-ci ne sont donc pas bioactives et les particules virales ne peuvent être produites, aboutissant à une réduction de la charge virale. Les principaux IP utilisés sont : le Lopinavir (LPV), l'Atazanavir (AZT), le Ritonavir (RTV) et le Darunavir (DRV) (« Protease Inhibitors (HIV) » 2012; « Atazanavir » 2012; « Darunavir » 2012; « Lopinavir » 2012; « Ritonavir » 2012).

Les IP sont métabolisés au niveau du foie par les enzymes de la famille CYP P450. Ils ont la capacité d'inhiber une enzyme de cette famille, l'enzyme CYP3A, d'où augmentation de leur demi-vie et taux sériques. Le RTV inhibe de façon très importante cette enzyme. Il est donc couramment utilisé en association avec d'autres IP afin de « booster » leur activité inhibitrice et de faciliter leur biodisponibilité. Du fait de cette inhibition de l'enzyme CYP3A, les IP peuvent induire une hépatotoxicité d'intensité variable (« Protease Inhibitors (HIV) » 2012). Les IP dans le sang sont liés à l'albumine et à l'α-1-glycoprotéine. Ils sont éliminés par voie urinaire ou biliaire (« Inhibiteurs de la protéase du VIH » s. d.).

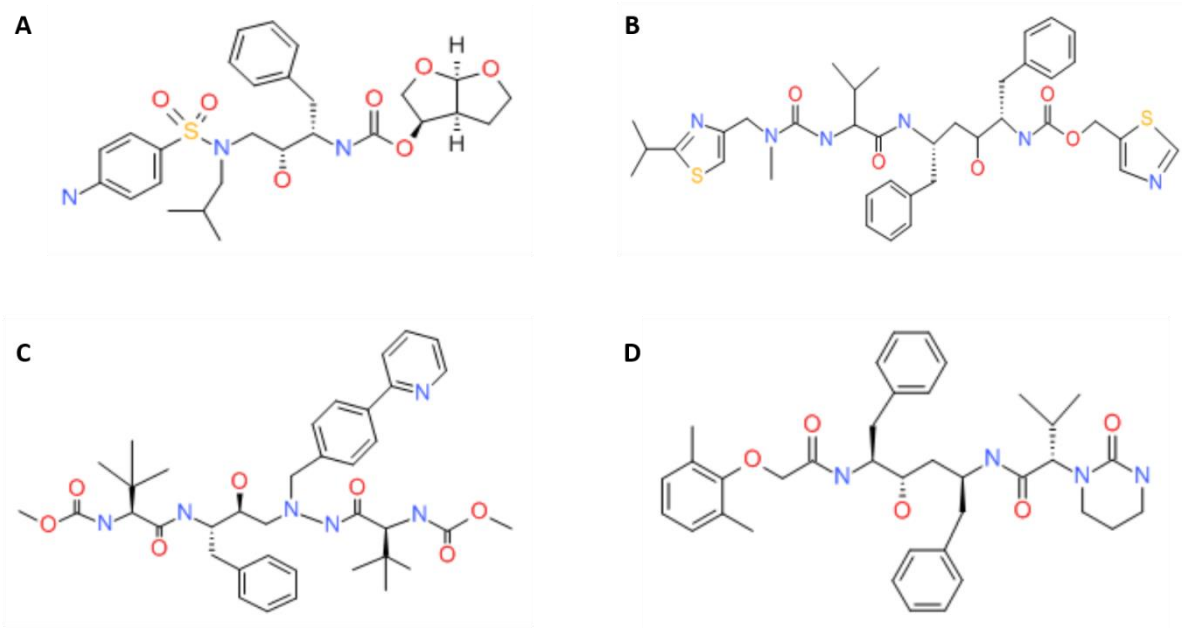


Figure 34 : Structure des inhibiteurs de protéase anti-VIH (d'après « Ritonavir » 2012; « Lopinavir » 2012; « Atazanavir » 2012; « Darunavir » 2012). (A) Structure du ritonavir (RTV, NORVIR®). (B) Structure du lopinavir (LPV, KELATRA®). (C) Structure de l'atazanavir (AZV, REYATAZ®). (D) Structure du darunavir (DRV, PREZISTA®).

Ritonavir (RTV)

Le RTV peut être utilisé comme IP mais il est majoritairement utilisé en association avec un autre IP, comme « booster », afin d'inhiber l'enzyme CYP3A et d'augmenter ainsi, la biodisponibilité de l'IP auquel il est associé. Seul, le RTV est administré à raison de 600 mg, deux fois par jour. La dose utilisée comme « booster » est comprise entre 50 à 100 mg, deux fois par jour (« Ritonavir » 2012).

Lopinavir (LPV)

Il est systématiquement associé avec le RTV. Il existe différents dosages de l'association LPV/RTV. La dose recommandée pour un adulte est de 800 mg de LPV associé à 200 mg de RTV par jour (« Lopinavir » 2012).

Atazanavir (AZV)

L'AZV peut être administré seul avec une posologie de 400 mg par jour chez l'adulte. Mais il est souvent associé au RTV ou au cobicistat (Tybost ®), les inhibiteurs de l'enzyme CYP3A, favorisant sa biodisponibilité au niveau sanguin. La posologie est donc adaptée dans ce cas : 300 mg d'AZV et 100 mg de RTV par jour ou 300 mg d'AZV et 150 mg de cobicistat par jour (« Atazanavir » 2012).

Darunavir (DRV)

Contrairement à l'AZV, le DRV n'est administré ni seul ni en association au cobicistat. En revanche, il est associé au RTV à raison de 800 mg de DRV et 100 ou 150 mg de RTV par jour (« Darunavir » 2012).

iii. Inhibiteurs Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse (INNTI) (Tableau 1)

Comme les INTI, ils ciblent l'intégration de l'ADN proviral mais les INNTI (l'Efavirenz [SUSTIVA®], Névirapine [VIRAMUNE®] ou l'Etravirine [INTELENCE®]) ne sont pas des analogues structuraux des nucléotides. En effet, ils ciblent le site allostérique de régulation de la transcriptase inverse qui se situe à proximité du site catalytique de l'enzyme (De Clercq 2013). La fixation des INNTI entraine une inhibition de l'ADN polymérase suite à différents changements conformationnels de l'enzyme (De Clercq 2013).

Comme les IP, les INNTI sont métabolisés au niveau hépatique par l'enzyme CYP3A. Ils sont éliminés de l'organisme par la voie urinaire majoritairement. Comme les INTI, ils modifient le métabolisme lipidique et glucidique (hyperlipidémie, insulino-résistance). Du fait de leur métabolisme hépatique, ils peuvent provoquer des hépatites ainsi que des troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements…), et peuvent également entrainer des réactions cutanées plus ou moins graves (érythème, prurit ou syndrome de Lyell) (« Inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH » s. d.).

iv. Inhibiteurs d'entrée et Inhibiteurs d'intégration (Tableau 1)

La réplication du VIH peut être diminuée en limitant l'entrée du virus dans la cellule. Les industriels développent actuellement des antagonistes des corécepteurs CXCR4 et/ou CCR5. Le premier inhibiteur d'entrée comme l'Enfuvirtide (FUZEON®) à avoir été développé est un peptide qui se lie à la protéine GP41 et empêche le changement conformationnel de GP41 puis la fusion des membranes (Esté et Telenti 2007). Le virus, ne pouvant fusionner, il ne peut libérer son contenu dans la cellule hôte, et donc ne peut créer une nouvelle particule virale. La fusion des membranes peut également être altérée en bloquant la liaison du virus notamment par des antagonistes des co-récepteurs, dont le co-récepteur CCR5, comme le Maraviroc (CELSENTRI®).

L'intégration de l'ADN proviral au génome est une étape ciblée pour de nouvelles thérapeutiques anti-VIH. A l'heure actuelle, les inhibiteurs d'intégrase comme le Raltégravir (ISENTRESS®) fonctionnent en bloquant le site actif de l'enzyme ou en empêchant le transfert de l'ADN viral à l'intégrase (Gu 2014). L'ADN viral ne peut pas s'intégrer dans le génome cellulaire, les gènes viraux ne peuvent donc pas être exprimés et il ne peut pas y avoir alors de formation de nouveaux virions.

Comme pour les IP, ces antirétroviraux sont majoritairement liés aux protéines sanguines circulantes. Ils ne sont pas uniquement métabolisés au niveau hépatique par l'enzyme CYP3A ou UGT1A1 (Maraviroc et Raltégravir) mais également par des peptidases dans le tube digestif (Enfuvirtide). Ce dernier est par conséquent éliminé sous forme d'acides aminés alors que les autres sont éliminés sous forme de catabolites urinaires principalement. Comme pour les autres antirétroviraux, ces inhibiteurs conduisent à des troubles hépatiques (augmentation des transaminases et de la bilirubine…), des troubles gastro-intestinaux (diarrhées, nausées…) et des troubles cutanées (nodules ou rash) (« *Antiviraux : Les points essentiels » s. d.; « Autres antirétroviraux » s. d.).

		F (p. 100)	T_{max} (h)	Fp (p. 100)	Élimination	$T_{1/2}$ (h)
INTI	Abacavir	75 (S)	1	49	< 5 p. 100 rein + enzymes hépatiques	0,8-1,5 (21 intracell.)
	Didanosine	40 (A)	1	< 5	50 p. 100 rein	1-2 (15-20 intracell.)
	Emtricitabine	90 (S)	1	< 5	80 p. 100 rein	9 (39 intracell.)
	Lamivudine	80 (S)	1	< 5	80 p. 100 rein	2-3 (10-15 intracell.)
	Stavudine	80 (S)	1	< 5	80 p. 100 rein	1-1,5 (3-5 intracell.)
	Zidovudine	60 (S)	1	20	20 p. 100 rein + 80 p. 100 conjugaison	1-1,5 (3-5 intracell.)
	Ténofovir	40 (R)	2-3	< 10	80 p. 100 rein	14 (> 60 intracell.)
INNTI	Efavirenz	50 (S)	2-5	99,5	< 1 p. 100 rein + CYP2B6	50
	Névirapine	90 (S)	4	60	< 15 p. 100 rein + CYP2B6 + 3A4	25-30
	Étravirine (ATU)	ND	4	99,9	< 1 p. 100 rein + CYP3A + CYP2C	30-40
IP	Amprénavir[(1)]	30-90 (S)	2	90	< 5 p. 100 rein + CYP3A	7-12
	Atazanavir	ND (R)	2	86	< 10 p. 100 rein + CYP3A	7
	Darunavir	ND (R)	1-4	94	< 5 p. 100 rein + CYP3A	10-15
	Indinavir	60 (A)	1	60	10 p. 100 rein + CYP3A	1,5-2
	Lopinavir/r	ND (R)	5	99	< 5 p. 100 rein + CYP3A	5-6
	Ritonavir	70 (R)	3	99	< 5 p. 100 rein + CYP3A	3-5
	Saquinavir	4-10 (R)	1-2	97	< 5 p. 100 rein + CYP3A	5
	Tipranavir	ND (R)	3	99	< 5 p. 100 rein + CYP3A	6 (dose unique)
Inhibiteur d'Entrée	Enfuvirtide	70 (voie SC)	7	97	Peptidases → acides aminés	3-8
	Maraviroc	25-35 p. 100 (S)	2	76	25 p. 100 rein + CYP3A	13
Inhibiteur d'Intégration	Raltégravir	ND (R)	3	83	< 5 p. 100 rein + UGT1A1	9

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des données pharmacologiques des antirétroviraux (d'après https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/11_Pharmacologie_des_anti_retroviraux.pdf 2008). F : Biodisponibilité. Tmax : Temps d'obtention du pic plasmatique. Fp : Fraction liée aux protéines plasmatiques. T1/2 : Temps de demi-vie. S : Pas d'effet du repas cliniquement démontré. R : Augmentation de la biodisponibilité par le repas. A : A jeun , diminution de la biodisponibilité par le repas. Intracell : Dérivé triphosphorylé en intracellulaire. ND : Non Déterminé. (1) L'administration de fosamprénavir permet de retrouver l'amprénavir en circulation.

Virus de l'Immunodéficience Humaine et Grossesse

En 2018, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estimait à 1,3 millions le nombre de patientes enceintes infectées par le VIH dont 82% recevaient un traitement antirétroviral pour limiter la transmission mère-enfant (TME) du virus (World Health Organization 2016). Les objectifs biologiques des traitements anti-VIH restent les mêmes que ceux hors grossesse, à savoir une charge virale indétectable donc inférieure à 50 copies/mL. Néanmoins, les mesures de la charge virale et du taux de CD4 sont plus fréquentes lors du suivi de la femme enceinte. De plus, une attention particulière est portée à l'impact à la fois maternel et fœtal que pourraient avoir les traitements. Il n'est cependant pas toujours nécessaire de modifier l'association thérapeutique pré-conceptionnelle si celle-ci est efficace, bien tolérée par la mère et n'est pas contre-indiquée pendant la grossesse. Les recommandations actuelles suggèrent d'utiliser en première intention une association de 2 Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) et d'1 Inhibiteur de Protéase (IP) « boosté » avec le ritonavir (RTV) (Morlat et al. 2018).

I. Transmission mère-enfant du virus et traitements

i. Transmission du virus

La TME peut s'effectuer au cours de la grossesse de manière transplacentaire, au moment de l'accouchement ou encore pendant l'allaitement par différents processus (World Health Organization 2016; Institut 2017).

D'après l'OMS, la TME oscillerait entre 15 et 45% en l'absence de traitements maternels. Avec les progrès des traitements antirétroviraux, ce taux est réduit à 1% (World Health Organization 2016), et 0,3% en France sur les dernières années (Morlat et al. 2018).

Transmission transplacentaire

Transmission indirecte par les lymphocytes infectés

En cours de grossesse, les contacts intercellulaires entre les cellules placentaires et les cellules maternelles infectées par le VIH permettent la trans-endocytose du virus et donc l'infection du fœtus. En effet, des études sur ST humain révèlent que les lymphocytes infectés par le VIH sont capables d'adhérer aux cellules placentaires permettant ainsi au VIH de s'intégrer au trophoblaste (Lewis et al. 1990; Douglas, Fazely, et Hu 1998; Vidricaire et Tremblay 2004). Grâce à l'utilisation d'anticorps bloquants, les auteurs ont démontré que l'intégrine β1 et la protéine « Very Late Antigen-4 » (intégrine α4β1) sont nécessaires à l'adhésion de la cellule immunitaire aux syncytiotrophoblastes en culture (Douglas, Fazely, et Hu 1998). Les cellules immunitaires une fois infectées peuvent ensuite être libérées

au pôle basal du ST et infecter les cellules de Hoffbauer (Vidricaire et Tremblay 2004). En revanche, la réplication virale au sein du ST est faible voire inexistante (Mognetti et al. 2000).

Transmission indirecte par les cellules immunes de Hoffbauer infectées

La transmission transplacentaire du virus peut impliquer et être modulée par les cellules de Hoffbauer et leurs protéines membranaires. En effet, ces cellules sont les seules à exprimer le récepteur CD4 au niveau placentaire (Lairmore et al. 1993). Elles expriment également la lectine DC-SIGN capable de lier le VIH (Arora et al. 2017). Ces macrophages placentaires possèdent les corécepteurs CXCR4 et CCR5 nécessaires à l'entrée du VIH. Le corécepteur CXCR4 est par ailleurs moins exprimé que CCR5 (Torres et al. 2001). L'environnement cytokinique, notamment les interleukines IL-10 ou IL-1 α ou β, régule l'expression de ces corécepteurs, influençant la transmission transplacentaire du VIH (Torres et al. 2001; Chaouat et al. 2003). De façon intéressante, la P4 peut inhiber *in vitro* la réplication du virus à la fois au niveau placentaire et au niveau de cellules sanguines. En effet, l'incubation de cellules placentaires (JEG3 et JAR) infectées par le VIH, avec des concentrations croissantes de P4 conduit à la diminution de l'ARN viral et la diminution de la sécrétion de la protéine p24 synonyme de réplication virale. L'inhibition de cette dernière induite par la P4 est également observée *in vivo* avec une baisse de l'ARN viral dans les cellules sanguines circulantes « Peripheral Blood Mononuclear Cells » (Muñoz et al. 2007).

Transmission directe

Le virus peut également être transmis par contact direct entre la particule virale et le placenta (Evain-Brion et Malassiné 2010). Comme les cellules trophoblastiques n'expriment pas ou peu le récepteur CD4 (Mognetti et al. 2000), le VIH utilise également les voies paracellulaires ou la trans-endocytose pour traverser la barrière placentaire (Lairmore et al. 1993; Vidricaire et Tremblay 2004). L'infection des cellules trophoblastiques résulte de l'interaction entre le virus et la cellule indépendamment du récepteur CD4, grâce à des protéoglycanes présents à la surface du trophoblaste (Vidricaire, Gauthier, et Tremblay 2007). A partir d'un modèle de cellules BeWo exprimant ou non les récepteurs CD4 et corécepteurs, il a été démontré que l'infection de ces cellules n'aboutit pas à un cycle de réplication efficace du virus (Ross et al. 2009). Ce défaut de réplication virale peut résulter d'un environnement cytokinique défavorable, bloquant le cycle de réplication (Zachar et al. 2004). De plus, la P4, hormone fortement sécrétée au niveau trophoblastique, est capable de bloquer le cycle de réplication du VIH (Muñoz et al. 2007). Néanmoins, il est possible de détecter de l'ADN viral au sein des cellules trophoblastiques infectées (Mano et Chermann 1991). De plus, les rétrovirus possèdent une certaine capacité à s'intégrer au génome cellulaire du trophoblaste menant ainsi à l'expression

placentaire de protéines initialement virales comme la syncytine (Dupressoir et al. 2005; Malassiné et al. 2007).

Transmission à l'accouchement

Historiquement, la majorité des cas de TME ont lieu au moment de l'accouchement, même si la proportion d'enfants infectés *in utero* et d'enfants infectés à l'accouchement varie beaucoup en fonction des traitements reçus et des mesures préventives mises en place (Vidricaire et Tremblay 2004; Evain-Brion et Malassiné 2010; World Health Organization 2016; Morlat et al. 2018). Les contractions myométriales entrainent des micro-brèches placentaires permettant la transmission du VIH par contact entre le sang fœtal et le sang maternel. Par ailleurs, lors du passage du fœtus dans le vagin, il peut y avoir contamination fœtale (Chaouat et al. 2003; Evain-Brion et Malassiné 2010). En effet, le virus est présent dans les sécrétions vaginales (Cu-Uvin et al. 2010). Les déchirures vaginales au moment de l'accouchement peuvent également être source d'un contact entre le sang maternel et le fœtus. C'est pour cette raison qu'en cas de charge virale non contrôlée, une césarienne prophylactique est recommandée (Morlat et al. 2018).

Transmission à l'allaitement

Les patientes VIH+ qui allaitent peuvent transmettre le VIH aux nouveau-nés car le virus est présent dans le lait maternel (Ahmad 2000).

ii. Passage des traitements antirétroviraux

Le placenta permet ou empêche le passage de certains médicaments, ce qui peut s'avérer protecteur ou toxique pour le fœtus. Dans le cas du VIH, le passage des traitements antirétroviraux dans le compartiment fœtal est un avantage vis-à-vis du VIH qui permettrait une prophylaxie pré-exposition (PREP) tout au long de la grossesse. Néanmoins, certains traitements antirétroviraux ont des effets tératogènes. C'est le cas de l'inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase inverse, l'Efavirenz, qui n'est donc pas utilisé lors de la grossesse (Morlat et al. 2018). D'autres peuvent altérer les fonctions fœtales, comme les IP qui malgré un faible passage, sont responsables de désordres surrénaliens fœtaux (Kariyawasam et al. 2014). A l'heure actuelle, le traitement initié chez la patiente avant grossesse est conservé s'il ne présente pas de molécules déconseillées comme l'Efavirenz ou le Dolutégravir. De plus, les traitements à base d'inhibiteurs d'intégrase, d'inhibiteurs de fusion ou inhibiteurs d'entrée ne sont pas recommandés car il existe peu de données quant à leur passage transplacentaire et/ou sur leur possible tératogénicité (Rilpivirine, Etravirine, Raltégravir, Dolutégravir et Elvitégravir). Le traitement le plus couramment utilisé repose sur l'association de deux Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI) parmi l'Abacavir, le Ténofovir ou la Zidovudine, et

d'un Inhibiteur de Protéase (IP) parmi l'Atazanavir, le Lopinavir et le Darunavir ; tous « boostés » par le Ritonavir (Morlat et al. 2018). Nous aborderons donc uniquement les effets des INTI et des IP.

Généralités sur le passage des traitements anti-VIH

Le passage côté fœtal de ces molécules est permis par la présence de transporteurs d'influx au niveau placentaire. Peu d'informations sont connues sur ces transporteurs d'influx, dans le cadre du VIH, qui assurent probablement la transmission côté fœtal permettant ainsi la protection du fœtus face au virus. Les transporteurs des nucléosides (ENT1 et ENT2) peuvent aussi être impliqués dans le passage côté fœtal des INTI de par la structure de ces derniers (Evain-Brion et Malassiné 2010). Concernant les IP, un transporteur organique de cation intervient dans le transport de l'atazanavir (Janneh et al. 2009).

A l'inverse, il existe des transporteurs d'efflux qui empêchent le passage côté fœtal, rendant le placenta imperméable à ces traitements. Parmi ces transporteurs, on retrouve la P-glycoprotéine (P-gp) qui appartient à la famille des « ATP Binding Casset transporters » (ABC transporters), codée par le gène « Multi Drug Resistance 1 » (MDR1 ; ou ABCB1). La protéine P-gp est située au pôle apical du ST. Elle régule l'efflux de composés lipophiles et faiblement chargés et peut lier les IP (Srinivas et al. 1998; Washington et al. 1998; Hoggard et Back 2002). Elle limite donc le transport des IP côté fœtal (*Figure 35*). La famille des « ABC transporters » comprend le transporteur « Breast Cancer Resistant Protein » (BCRP) codé par le gène ABCG2. Ce dernier contrôle l'efflux de composés hydrophobes et anioniques et a été démontré comme impliqué dans la résistance vis-à-vis d'un INTI, la zidovudine (Wang et al. 2003). Les composés anioniques peuvent aussi être transportés par des membres de la famille des « Multri Drug Resistance Protein » (MRP). Au niveau placentaire, l'isoforme MRP2 est exprimée au pôle apical du ST, alors que les isoformes MRP1 et MRP3 sont majoritairement présentes au niveau des cellules endothéliales. La protéine MRP1 peut également être présente au pôle basal du ST et comme la P-gp, être capable de fixer les IP (Srinivas et al. 1998; Gulati, Boudinot, et Gerk 2009b) limitant leur passage.

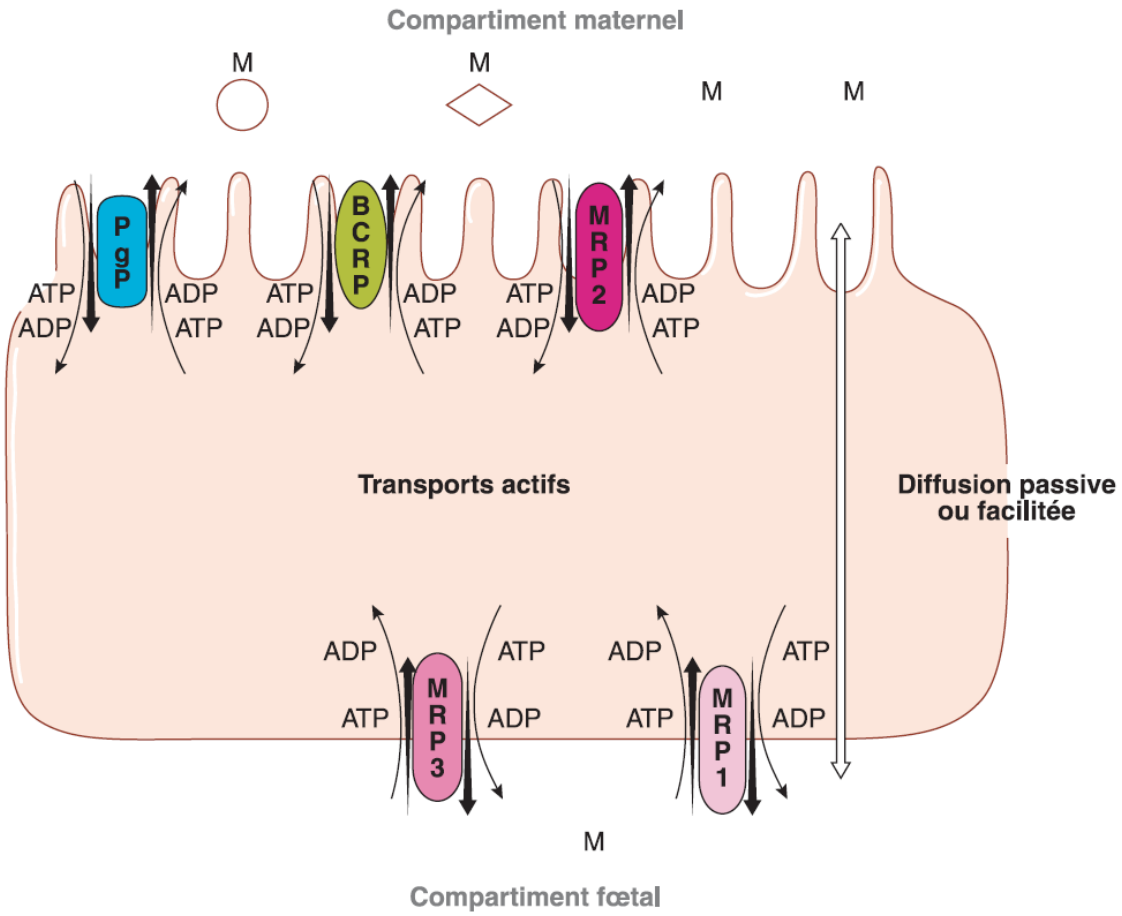


Figure 35 : Schéma représentatif des transporteurs d'efflux présents au niveau du syncytiotrophoblaste (d'après Evain-Brion et Malassiné 2010).

Cas des Inhibiteurs Nucléosidiques de la Transcriptase Inverse (INTI)

Les INTI diffusent facilement à travers le placenta. Les ratios entre la concentration entre sang de cordon et sang maternel varient de 0,38 pour la didanosine à 1,32 pour la stavudine et les taux de transfert vont de 38 à 160 % (Else et al. 2011). Comme ils ne sont pas ou peu substrat des transporteurs d'efflux, ils se retrouvent dans la circulation fœtale (Li et Chan 1999; Chappuy et al. 2004; Else et al. 2011). Leur analogie structurale avec les nucléotides cellulaires associée à leur passage placentaire élevé explique les nombreuses altérations du développement observées chez l'embryon et le fœtus (Leclercq, Roudiere, et Viard 2004). En effet, les INTI bloquent la transcription inverse de la polymérase virale en se fixant à cette dernière mais de façon non spécifique. Ils peuvent donc se fixer aux polymérases nucléaires et mitochondriales des cellules du zygote, altérant les processus de réplication de l'ADN, de transcription ou de réparation génique à l'origine de la toxicité mitochondriale observée chez le nouveau-né (Leclercq, Roudiere, et Viard 2004; « Nucleoside Analogues » 2012).

Cas des Inhibiteurs de Protéase (IP)

Les IP sont des substrats des « ABC transporters » notamment la protéine P-gp (Neumanova et al. 2015). Les études de perfusions placentaires utilisant des inhibiteurs des transporteurs ont permis de mettre en évidence l'implication de la P-gp dans le transport foeto-maternel des IP (Gulati, Boudinot, et Gerk 2009). Ces travaux ont aussi permis d'évaluer les taux de transfert des médicaments côté fœtal. Concernant les IP, à terme avec une concentration d'albumine de 2 g/L, les taux de transfert du LPV et RTV sont respectivement de 30,4% et 12%. En cas d'association des 2 molécules, les taux passent à 23,6% pour le LPV et 18,7% pour le RTV. Ces deux IP étant administrés ensemble au cours de la grossesse, leur taux de transfert dépend de la concentration en albumine. En effet, plus la concentration en albumine est importante, plus le taux de transfert est faible (3% avec une concentration d'albumine à 40 g/L contre 30,4% avec 2 g/L d'albumine). La différence des taux de transfert du LPV selon les concentrations d'albumine suggère que seule la fraction libre du LPV est capable de diffuser. De plus, la diminution du taux de transfert lors de l'association avec le RTV suggère que ce dernier entraine une résistance face au LPV impliquant la P-gp (Gavard et al. 2006). A partir d'un modèle murin, il a été démontré que le LPV peut être le substrat de la P-gp, expliquant son faible transfert côté fœtal. L'expression de la P-gp est sous contrôle du facteur nucléaire PXR capable de lier la progestérone, ce qui expliquerait la diminution de l'expression de la P-gp au cours de la grossesse (Gahir et Piquette-Miller 2017). L'utilisation d'un inhibiteur de la P-gp lors de la perfusion de placenta à terme *in vitro* montre une augmentation du taux de transfert du LPV, confirmant le rôle de transporteur d'efflux vis-à-vis du LPV (Ceccaldi et al. 2009). D'autres études de perfusion placentaire sur placenta à terme montrent que le Darunavir a un taux de transfert de 15%. Le passage des IP est donc globalement faible et son volet protecteur direct vis-à-vis de l'embryon et du fœtus discutable (Mandelbrot et al. 2014). En effet, l'effet protecteur des traitements antirétroviraux contre l'infection du fœtus par le virus résulte principalement la diminution de la charge virale maternelle sous traitement avant et pendant la grossesse.

II. Impact clinique des traitements anti-VIH sur la grossesse

i. Prise en charge maternelle

Le suivi d'une patiente VIH+ en cours de grossesse implique la collaboration de différents médecins : l'obstétricien, l'infectiologue, le biologiste et le pédiatre.

Suivi biologique

En début de grossesse, comme pour toutes femmes enceintes, les patientes VIH+ doivent subir divers examens obligatoires (dosages groupes sanguins, rhésus, recherche d'agglutinines irrégulières)

notamment sérologiques (syphilis, toxoplasmose et rubéole). D'autres examens sont recommandés (sérologie hépatite ; sérologie VIH…). On suit également au cours de la grossesse les fonctions hématologiques (numération formule sanguine et plaquettes), hépatiques (dosages des transaminases) et rénales (créatininémie et bandelette urinaire) qui peuvent être altérées chez patientes enceintes traitées pour HIV.

Concernant le suivi plus spécifique de l'évolution du VIH, la charge virale des patientes est évaluée tous les mois et le taux de lymphocyte CD4 est mesuré tous les trimestres. De plus, des dosages des médicaments antirétroviraux peuvent être réalisés si besoin afin de contrôler la bonne absorption de ces molécules, notamment en cas de ré-ascension de la charge virale ou de mauvaise tolérance des traitements (Morlat et al. 2018).

A la naissance, l'évaluation de l'infection fœtale *in utero* est réalisée par mesure de l'ARN viral circulant chez le nouveau-né. Si le résultat est positif, on cherchera alors à établir ou infirmer l'infection par le VIH qui reste néanmoins difficile à établir dans les premiers temps chez le nouveau-né (Townsend et al. 2008; Morlat et al. 2018; Millar et al. 2019).

Suivi échographique et clinique

Si le suivi biologique de la patiente VIH+ est modulé par rapport à celui d'une patiente non infectée, le suivi échographique et les consultations cliniques sont eux peu impactés. En effet, au minimum 3 échographies sont réalisées au cours de grossesse, la 1ère vers la 12e SA, la 2e vers 22 SA et la dernière vers 32 SA associées à des consultations mensuelles avec un gynécologue-obstétricien (Haute Autorité de Santé 2016).

La patiente bénéficie également de consultations régulières avec l'infectiologue qui la prend en charge, la fréquence dépendant du stade de la maladie et de l'adhésion au traitement. Une prise en charge psychologique par une assistante sociale peut s'avérer nécessaire. Enfin une consultation avec un pédiatre est souvent réalisée avant la naissance pour évoquer le traitement prophylactique de l'enfant. La coordination entre ces différents acteurs doit avoir lieu au cours de réunions de concertation pluridisciplinaire (Morlat et al. 2018).

Prise en charge thérapeutique

En cours de grossesse, le traitement de référence en première intention pour les patientes VIH+ comporte 2 INTI et 1 IP. Parmi les INTI présents sur le marché, les choix s'orientent principalement sur l'Abacavir, le Ténofovir ou la Zidovudine (Morlat et al. 2018). L'IP est choisi parmi le Darunavir, le lopinavir (LPV) ou l'Atazanavir, toujours « boosté » avec le ritonavir (RTV) (Morlat et al. 2018) (*Tableau 2*).

Pour une patiente ayant un traitement efficace et bien toléré avant la grossesse, il n'y a pas lieu d'en modifier la composition ou le dosage si ses molécules sont connues et ne présentent pas de toxicité embryofoetale. Ainsi, l'Efavirenz est contre-indiqué, en France, au 1er trimestre du fait de sa tératogénécité. A partir du 2e trimestre, il peut être utilisé en association avec 2 INTI (Ténofovir et Emtricitabine). Il est aussi préférable de remplacer les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (Rilpivirine et Etravirine) ou les inhibiteurs de l'intégrase (Dolutégravir et Elvitégravir) dont les risques chez la femme enceinte sont peu connus, par le Darunavir « boosté » au RTV (Morlat et al. 2018).

ARV	Problèmes potentiels pendant la grossesse	Rationnel pour l'utilisation	Commentaires
CHOIX PRÉFÉRÉS			
INTI			
Zidovudine	Toxicité mitochondriale chez le NNé (NP-IIa)	ARV de référence depuis 1994 (NP-1),	Traitement ayant le plus de recul pour la prévention de la TME. Encore utilisé pour la prophylaxie dans le contexte de la grossesse, mais en diminution
	Toxicité hématologique (mère et enfant)	Grade A	
Lamivudine	Toxicité mitochondriale chez le NNé (NP-IIb)	Largement utilisé et étudié depuis 1997 (NP-IIa), Grade A bithérapie TME 1 % (NP-IIa)	
Ténofovir	Toxicité osseuse, impact rénale inconnu chez le NNé.	Bonne tolérance chez l'adulte, toxicité mitochondriale moindre que zidovudine. Quelques données de cohortes (NP-IIb), Grade C	Utilisation croissante, nécessité de recherches avec suivi des enfants exposés
	Mortalité-morbidité néonatale TDF/FTC > ZDV/LAM dans un essai randomisé		
Abacavir	Hypersensibilité, typage HLA-B5701 nécessaire	Toxicité mitochondriale moindre que zidovudine, Grade C	Utilisation croissante
		Aucune donnée inquiétante connue à ce jour dans le contexte de la grossesse	
Emtricitabine		Équivalent à lamivudine	
IP/r	Sous-dosage possible (3e trimestre)		
	Intolérance digestive		
	Hépatotoxicité		
Darunavir/r	Tolérance et toxicité peu connues pendant grossesse	Puissance d'action et tolérance hors de la grossesse	Posologie conseillée en 2 prises/j (600/100 mg x 2/j)
	Manque de données au 1er trimestre	Peu de données chez la femme enceinte, Grade C	
Lopinavir/r	Tolérance digestive	IP le plus utilisé et étudié : données d'efficacité et tolérance (NP-IIa), Grade B	Largement validé en trithérapie
		Essai monothérapie pour PTME (NP-IIa)	
Atazanavir/r	Hyperbilirubinémie chez le fœtus et le NNé	Études prospectives pendant grossesse, PK avec ritonavir peu modifiée	Utilisation croissante
			Ne pas prescrire sans ritonavir

Tableau 2 : Récapitulatif des différentes molécules privilégiées dans le traitement du VIH chez la femme enceinte (Morlat et al. 2018).

En cours de grossesse, les posologies des IP restent les mêmes que celles appliquées en dehors de la grossesse. Néanmoins, les changements physiologiques et pharmacologiques observés chez la femme enceinte (augmentation du pH gastrique, augmentation du volume plasmatique ou diminution

des taux d'albumine, induction enzymatique…), influent sur les taux circulants des IP. C'est la raison pour laquelle, les concentrations plasmatiques d'IP chez la mère diminuant au cours de la grossesse, leur posologie peut être augmentée (*Tableau 3*).

Molécule	Posologie	Concentration sérique maximale
Lopinavir	800 mg par jour associé à 200 mg de ritonavir	Cmax = 12,6 µmol/L au 2ème trimestre et Cmax = 11,9 µmol/L au 3ème trimestre
Ritonavir	600 mg par jour en utilisation seule – 100 mg comme « booster »	C = 1,17-15,5 µmol/L lorsqu'il est utilisé seul. Cmax = 4,72 µmol/L lorsqu'il est utilisé comme "booster"
Atazanavir	300 mg par jour associé à 100 mg de ritonavir	Cmax = 5,3 µmol/L au 2ème trimestre et Cmax = 4,47 µmol/L au 3ème trimestre
Darunavir	600 mg 2 fois par jour, associé à 100 mg de ritonavir par jour	Cmax = 7,008 µmol/L

Tableau 3 : Concentration sérique maternelle maximale des IP étudiés au cours de la grossesse (« Inhibiteurs de la protéase du VIH » s. d.).

ii. Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI)

Les INTI prescrits en cours de grossesse passent la barrière placentaire et altèrent les fonctions mitochondriales du nouveau-né, à l'origine de toxicité hématologique ou osseuse (Leclercq, Roudiere, et Viard 2004).

Malgré cette atteinte des mitochondries, organites essentiels à la synthèse des hormones stéroïdes, les taux de progestérone circulants ne sont pas ou peu impactés (Papp et al. 2015). En revanche, chez des patients VIH+ en dehors de grossesse, ils sont responsables de dyslipidémies (Jones et al. 2005).

Les INTI ne semblent pas provoquer de complications obstétricales. Néanmoins, à partir d'une cohorte française de patientes traitées par Zidovudine seule, par l'association de 2 INTI ou l'association 2 INTI et 1 IP, il a été démontré que l'association de 2 INTI présente un risque plus important de prématurité que la Zidovudine seule (Sibiude et al. 2012).

iii. Inhibiteurs de protéases (IP)

Contrairement aux INTI, les IP passent moins facilement et plus faiblement la barrière placentaire (Gavard et al. 2006).

Les IP ne sont pas associés à une augmentation du risque de malformations fœtales. En revanche, ils ont été mis en cause dans l'augmentation des naissances prématurées, et cette prématurité peut avoir un impact important sur la santé du nouveau-né, notamment dans les pays à faibles revenus où l'accès au système de soin est limité. De nombreuses études cliniques, dont deux essais randomisés contrôlés ont démontré un lien entre l'ajout des IP et l'augmentation du nombre naissances prématurées, voire pour certaines études de fausses couches (Powis et al. 2011; Fowler et al. 2016; Mesfin, Kibret, et Taye 2016). En comparant les traitements avec ou sans RTV, une étude a montré que le « boost » par RTV était associé à un risque de prématurité plus important (Sibiude et al. 2012). Par ailleurs, la prématurité associée au traitement par IP pourrait être soit spontanée, soit induite notamment par un RCIU ou la pré-éclampsie (Short et Taylor 2014). Une étude regroupant des patientes de différentes cohortes a mis en évidence que les patientes sous traitements antirétroviraux au moment de la conception ont un risque plus important de naissance prématurée et de complications obstétricales (Stringer et al. 2018).

Malgré leur faible passage placentaire, les IP altèrent la stéroïdogenèse des surrénales fœtales. Une étude chez des nouveau-nés et enfants exposés *in utero* aux IP notamment « boostés » au RTV démontrent que ces nouveaux nés présentent une augmentation des taux circulant de 17-OH-Progestérone, 17-OH-Prégnénolone et DHEA après stimulation par l' « Adreno Cortico Tropic Hormone » (ACTH), signant l'impact des IP sur les enzymes surrénaliennes mais sans manifestations cliniques notables (Kariyawasam et al. 2014). Le traitement au LPV « boosté » au RTV en prophylaxie chez des nouveau-nés de mère VIH+ entraine lui aussi un dysfonctionnement de la stéroïdogenèse surrénalienne marqué par l'augmentation de la production de 17-OH-progestérone et de DHEA. Cette altération de la fonction endocrine est accentuée si les nouveau-nés ont été exposés *in utero* à ces IP, et si la naissance est prématurée (Simon et al. 2011). Pour cette raison, le LPV « boosté » au RTV est désormais formellement contre-indiqué chez l'enfant prématuré.

Associés à ces complications, les traitements contenant des IP entrainent des modifications des taux circulants de P4 et d'E2 maternels, hormones essentielles au bon déroulement de la grossesse. En comparant des patientes traitées par IP à celles traitées par INNTI, Papp E et al ont démontré que les patientes traitées par IP présentent des taux circulants de P4 significativement plus bas (125 ng/mL contre 175 ng/mL). De plus, les taux de P4 observés chez ces patientes seraient associés à un plus petit poids de naissance (Papp et al. 2015). Les taux d'E2 et de P4 ont été mesurés sur des plasmas de patientes VIH+ traitées par trithérapie à base de LPV « boosté » au RTV (LPV/r), de patientes VIH+ traitées à base d'Efavirenz (EFV) ou de patientes non traitées. Les taux de P4 au cours de la grossesse ne varient pas entre le groupe LPV/r et le groupe EFV. En revanche, les taux d'E2 sont diminués par

l'EFV comparativement au LPV/r. De plus, quel que soit le terme, les taux d'E2 sont diminués significativement de 10% par l'EFV et augmentés significativement de 25% par le LPV/r par rapport au groupe non traités (McDonald et al. 2018). Tous ces résultats suggèrent que les IP et notamment le LPV « boosté » au RTV, sont associés à une augmentation des taux d'E2 maternels et une diminution des taux de P4 maternels.

Les mécanismes à l'origine de ces altérations endocrines n'étant pas connus, Papp et al ont réalisé des expérimentations à la fois *in vivo* (sur plasma de patientes VIH+ traitées) et *in vitro* (sur lignée de choriocarcinome). Ils ont confirmé la diminution des taux de P4 chez les patientes VIH+ traitées par trithérapie à base d'IP. De plus, ils ont observé une diminution des taux de prolactine et une augmentation de l'activité de l'enzyme « 20-α-HydroxySteroid Dehydrogenase » (20-α-HSD) au niveau placentaire. Cette enzyme étant responsable de la dégradation de la P4, ils ont regardé si cette dernière était responsable des diminutions de P4 maternelles observées en cas de traitement. Sur un modèle de choriocarcinome BeWo, la diminution de production P4 induite par les traitements anti-VIH est bloquée par l'inhibition de l'activité de la 20-α-HSD. Cette dernière étant inhibée par la prolactine, les auteurs concluent que les traitements anti-VIH pourraient induire une diminution de la synthèse de prolactine, empêchant le blocage de l'activité de l'enzyme 20-α-HSD, ce qui aboutirait à une dégradation de la P4 (Papp et al. 2016).

III. Impact des inhibiteurs de protéase au niveau cellulaire

i. Voies de signalisations intracellulaires et IP

Sur des cellules musculaires, le LPV induit une activation de l' « AMP-activated protein kinase » (AMPK) capable d'activer l'enzyme « Calmoduline Kinase » qui en phosphorylant le facteur d'élongation eEF2, bloque la synthèse protéique (Hong-Brown et al. 2008). Il en résulte que le LPV peut entrainer une diminution globale de la production de protéine par les cellules exposées.

L'activation de la PKC conduit à l'inhibition de la synthèse de P4 (Yang et al. 2006). Cette enzyme est par ailleurs activée par le RTV dans un modèle de macrophages. L'activation de la PKC conduit à la formation de cellules spumeuses et à l'athérosclérose qui est augmentée chez les patients VIH+ (Grunfeld et al. 2009; Xiang et al. 2011).

Contrairement à la PKC, l'enzyme Akt stimule la production de P4 (Wang et al. 2018). Les IP, notamment le RTV, est capable d'inhiber la phosphorylation d'Akt aboutissant à son inactivation. En effet, dans un modèle de lignée cellulaire de rétine, le RTV diminue l'activation d'Akt menant à une diminution de l'expression de HIF-1α et provoquant la diminution de la sécrétion du VEGF (Vadlapatla et al. 2014).

Dans un modèle de macrophages murins, le LPV induit une augmentation de la sécrétion du « Tumor Necrosis Factor α » (TNF-α) et de celle de l'interleukine-6 (IL-6) par activation de la voie MEK/$ERK_{1/2}$. L'invalidation du gène CHOP, acteur de la voie UPR, mène à une inhibition de la voie MEK/$ERK_{1/2}$ et des sécrétions de TNF-α et IL-6. Ces résultats suggèrent que le LPV induit l'activation de la voie UPR qui ensuite active la voie MEK/$ERK_{1/2}$ afin de réguler les sécrétions du TNF-α et de l'IL-6 (Chen et al. 2009).

Les IP, et notamment le LPV, altèrent la voie de l'activine-A connue pour réguler la stéroïdogenèse au niveau placentaire. En effet, le LPV en inhibant la voie MEK/$ERK_{1/2}$ bloque la synthèse de la sous unité βA, aboutissant à un blocage que la voie d'auto-activation de l'activine-A des cellules adipocytaires (Ravaud et al. 2017). Le blocage de cette voie conduit à une diminution du développement du tissu adipeux pouvant expliquer les effets secondaires observés sur le métabolisme lipidique sous IP.

Les IP peuvent également agir au niveau des récepteurs hormonaux. En effet, le RTV est capable d'interagir avec les récepteurs nucléaires aux oestrogènes ER-α et ER-β. Il agit alors comme un antagoniste du récepteur et empêche la régulation de la transcription des gènes cibles des oestrogènes notamment au niveau des macrophages (Xiang et al. 2014).

ii. Mitochondrie et IP

La mitochondrie est un organite intracellulaire indispensable à la synthèse de P4 ainsi qu'à la différenciation des CTV en ST. Le traitement des patientes VIH+ par les IP entrainerait de nombreuses dérégulations de la fonction mitochondriale (Ganta et Chaubey 2019).

Une première étude sur cellules mononucléaires sanguines de patientes VIH+ et traitées par 2 INTI et 1 IP, a mis en évidence une diminution de la synthèse protéique mitochondriale associée à une diminution de l'activité de la chaine respiratoire mitochondriale, notamment de l'activité du complexe III. Ces dysfonctionnements mitochondriaux conduisent à l'augmentation de l'expression de la Caspase 3 clivée reflétant une apoptose cellulaire. Ces observations au niveau maternel se traduisent par une diminution de l'ADN mitochondrial dans les cellules sanguines du cordon ombilical du nouveau-né (Hernàndez et al. 2012; Hernandez et al. 2017). Toujours sur les cellules sanguines, le ratio de l'ADN mitochondriale/ADN nucléaire est plus faible chez des patientes VIH+ traitées par l'association INTI/IP ou INNTI/IP que chez des patientes témoins non infectées. De plus, les patientes traitées avant la conception ont un ratio encore plus faible que les patientes traitées à partir du début de grossesse (Money et al. 2015).

Concernant la dynamique mitochondriale, l'expression des protéines régulatrices Mfn2 et Drp1 est dérégulée dans le placenta des patientes VIH+ et traitées par IP, aboutissant à une augmentation des marqueurs apoptotiques *ex vivo* (Guitart-Mampel et al. 2017).

iii. Voie UPR et IP

Les IP sont à l'origine de nombreux stress cellulaires, notamment le stress du RE marqué par l'activation des voies UPR.

En effet, au niveau des cellules HEK293, l'exposition des cellules au LPV, dès 10 µM, provoque la production de « Reactive Oxygen Species » (ROS) qui induisent l'activation de la voie JNK. Cette activation conduit à l'induction de 2 voies UPR : la voie IRE1α marquée par la phosphorylation de IRE1α et l'augmentation de la forme « spliced » de XBP1 et la voie PERK marquée par l'augmentation de l'expression du facteur ATF4 (Taura et al. 2013). A fortes doses (40 µM), l'induction des voies UPR conduit à la mort cellulaire.

Le RTV peut lui aussi induire un stress cellulaire. Sur modèle hépatocytaire, dès 6h d'incubation avec le RTV à 10 µM, l'expression de GRP78 est augmentée démontrant l'activation des voies UPR. La prolongation de l'incubation jusqu'à 48h mène à l'induction d'un stress mitochondrial marqué par l'augmentation de l'expression de la protéine « Heat Shock Protein 60 » (HSP60), puis aboutit à l'apoptose cellulaire marquée par le recrutement de la protéine « Bcl-2 Associated X protein » (BAX) au niveau mitochondrial (Ganta et Chaubey 2019).

Dans un modèle de macrophages murin, l'exposition des cellules au LPV conduit à l'induction des voies UPR marquée par l'augmentation de l'expression de CHOP. Cette induction provoque l'activation de la voie MEK/$ERK_{1/2}$ qui est responsable de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-6 (Chen et al. 2009).

Au niveau placentaire, l'épissage du facteur XBP1 (sXBP1) est augmenté dans les tissus des patientes traitées par IP. De plus, l'incubation de lignées placentaire (JEG3 et 3A-sub E) avec différents IP (LPV/RTV ou ATZ seul) conduit à l'augmentation de l'expression de sXBP1. Des fortes doses d'IP peuvent également induire l'autophagie de ces cellules (Brüning et al. 2014).

Objectifs

Ce travail de thèse s'est inscrit globalement dans l'objectif premier de poursuivre la caractérisation morphologique et fonctionnelle du trophoblaste villeux humain normal et pathologique (aneuploïdies) initié il y a plusieurs années au sein du laboratoire. Il s'est appuyé sur deux volets : un volet *in vivo* sur prélèvements biologiques maternels (sang et urines) et biopsies de trophoblaste et un volet *in vitro* (culture primaire de trophoblaste villeux et lignées de choriocarcinome). Il s'est focalisé sur la différenciation du cytotrophoblaste villeux (CTV) en syncytiotrophoblaste (ST) sur le plan cyto-morphologique principalement en développant l'aspect mitochondrial, et sur le plan endocrine en élargissant notre panel aux peptides angiogéniques et à leurs récepteurs (PlGF et sFlt-1) et surtout aux hormones stéroïdiennes (P4 et E2). A cet aspect physiologique du développement placentaire, nous avons accolé un volet pharmaco-toxicologique en étudiant *in vitro,* l'effet de certains antirétroviraux prescrits chez les mères VIH+ sur la différenciation morphologique et fonctionnelle du trophoblaste villeux

Les objectifs spécifiques de cette thèse se sont organisés autour de 3 axes distincts :

1) Nous avons tout d'abord voulu caractériser la stéroïdogenèse du trophoblaste villeux isolé à partir de placenta humain normaux à terme, et ce dès le stade cytotrophoblaste. Pour répondre à cet objectif, dans un premier temps, nous avons évalué au cours de la différenciation trophoblastique, la sécrétion des progestatifs en adaptant leurs dosages par immuno-analyse et par spectrométrie de masse aux surnageants de culture. Nous avons concomitamment exploré la synthèse de ces hormones en étudiant, au cours de la différenciation trophoblastique, l'expression des acteurs mitochondriaux et cytoplasmiques impliqués dans la synthèse des progestatifs : le transporteur MLN64, et les enzymes P450SCC et HSD3B1. Dans un second temps, nous avons évalué l'impact de la forskoline (FSK), activateur connu de la différenciation trophoblastique, sur la stéroïdogenèse progestative placentaire. Les résultats obtenus ont abouti à une première publication dans « Molecular and Cellular Endocrinology » en 2020. Parallèlement, nous avons commencé à caractériser, au cours de la différenciation du trophoblaste villeux humain normal à terme, la production des oestrogènes, plus particulièrement l'oestradiol (E2) tant au niveau de la sécrétion dans les surnageants de culture, qu'au niveau de la synthèse en analysant l'expression des enzymes clés: aromatase, STS, HSD3B1 et HSD17B1.

2) Une fois cette stéroïdogenèse villeuse étayée, notre second objectif a été de caractériser l'impact d'IP notamment le RTV et le LPV, sur le développement morphologique et fonctionnel

du trophoblaste villeux humain. En utilisant notre modèle *in vitro* de CTV humain isolés à terme, nous avons déjà évalué l'impact du RTV et du LPV sur la différenciation des CTV en ST. Nous avons concomitamment étudié leur impact sur la fonction endocrine placentaire en mesurant l'hCG, la P4 et l'E2 sécrétés dans les surnageants au cours de la culture. Enfin, concernant la synthèse des hormones stéroïdes, nous avons étudié l'expression des transporteurs et enzymes, impliqués dans la stéroïdogenèse

3) L'objectif final de ce travail de thèse a été de déterminer quels étaient les organites et mécanismes cellulaires ciblés par les IP, pouvant expliquer les altérations de la fonction endocrine du trophoblaste villeux établis précédemment. Nous nous sommes focalisés d'une part sur la mitochondrie et d'autre part sur deux grandes voies de signalisation : la voie UPR et la voie de signalisation AMPc/PKA. A partir de notre modèle de culture *in vitro* de CTV humain à terme incubés ou non avec les IP, nous avons évalué par western-blot et RT-qPCR, l'expression des acteurs intracellulaires (Mfn2 et OPA1 pour l'étude mitochondriale ; et GRP78, sXBP1, ATF4 et ATF6 pour la voie UPR) ainsi que leur activation (mesure de l'activité enzymatique de la PKA pour la voie AMPc/PKA). Après avoir identifié certains mécanismes impliqués, nous avons utilisé des agents pharmacologiques pour vérifier l'implication de ces mécanismes dans la dysrégulation hormonale induite par les IP.

Matériels et Méthodes

I. Culture primaire de Cytotrophoblastes Villeux (CTV) humain

Ce modèle de culture primaire, établi et maitrisé au sein du laboratoire depuis de nombreuses années (Alsat, Haziza, et Evain-Brion 1993), permet de s'approcher au mieux de la physiologie. En effet, il mime, *in vitro* de façon dynamique, la différenciation morphologique (agrégation puis fusion) et la différenciation fonctionnelle des CTV en ST existant *in vivo*. Les lignées de choriocarcinomes (JAR, JEG, BeWo) sont plus faciles à mettre en œuvre mais ne constituent qu'un reflet imparfait de la physiologie. En effet, la majorité de ces lignées fusionne peu ou mal et sécrète souvent des formes particulières d'hCG notamment hyperglycosylées, traduisant un équipement enzymatique modifié par rapport au tissu trophoblastique normal.

i. Recueil des placentas et exclusion

L'extraction des CTV s'effectue à partir de placenta à terme obtenus après accord préalable de la patiente dans une maternité de collaboration et après informations éclairés des patientes, consentement révocable à tout moment. L'étude s'est articulée autour de maternités parisiennes suivantes : Maternité de l'Hôpital Privé d'Antony, Maternité Port-Royal de l'hôpital Cochin, Maternité de l'hôpital Béclère et la Maternité de l'Institut Mutualiste Montsouris.

La participation au projet de recherche n'a pas modifié la prise en charge obstétricale ni la voie d'accouchement. Les placentas recueillis sont exclusivement obtenus à l'issue d'une césarienne programmée. Le placenta est traité dans l'heure qui suit son recueil, acheminé à l'état frais dans des conditions de transports de matériel biologique humain vers l'unité de recherche UMR-S 1139. Le recueil et l'utilisation des placentas ont été validés par le comité d'éthique CPP (2015-mai-13909, en annexe).

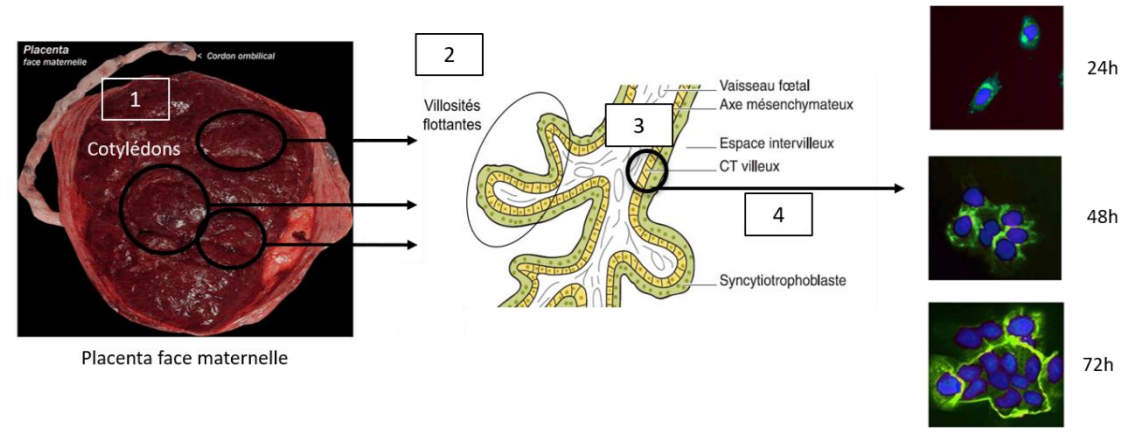


Figure 36 : Schéma général du protocole d'extraction des CTV humains à partir de placenta à terme. 1) A partir d'un placenta à terme disposé face maternel visible, dissection manuelle de la membrane basale et recueillir les cotylédons. 2) Après rinçage de ces cotylédons, dissection manuelle des cotylédons afin de récupérer les villosités choriales flottantes. 3) Par digestion enzymatique de ces villosités, recueil des CTV puis purification de ces derniers sur Percoll. 4) Mise en culture des CTV purifiés pendant 24, 48 et 72h.

Culture primaire de Cytotrophoblastes Villeux (CTV)

Les conditions de culture de CTV humain permettent d'obtenir leur agrégation puis fusion en syncytia en 48-72h. Pour cela, le tissu placentaire doit d'abord être rincé afin d'éliminer un maximum de sang puis disséqué manuellement afin d'isoler et de recueillir les villosités choriales. Ces dernières sont ensuite digérées de façon enzymatique par la trypsine pour libérer les différentes cellules constitutives la villosité (principalement cytotrophoblastes et cellules sanguines). Après avoir récupéré toutes ces cellules, les CTV sont isolés grâce à un gradient de Percoll (Percoll Plus®, GE Healthcare Bio-Sciences, Upswalla, Sweden) avant d'être ensemencés et cultivés à 37°C sous 5% de CO_2 (*Figure 36*).

Première étape : Dissection tissulaire et extraction des villosités choriales

En condition stérile (sous un poste de sécurité microbiologique de classe II), la membrane basale côté maternel est éliminée. Les cotylédons sont isolés puis lavés 3 fois dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich Inc, St-Louis, Missouri, USA) à température ambiante (TA). Dans la solution d'Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 1X (Gibco by Life Technology, Carlsbad, Californie, USA) à TA, ces cotylédons sont disséqués afin d'éliminer un maximum d'axe mésenchymateux et de caillots sanguins. Les villosités choriales ainsi récupérées au sein du surnageant d'HBSS 1X sont alors centrifugées 10 min à 350 x g à température ambiante. Le culot villositaire a ensuite été recueilli et pesé.

Deuxième étape : Digestion enzymatique des villosités choriales

Les villosités choriales sont suspendues dans une solution de trypsine 1 : 250 (Gibco by Life Technology, Carlsbad, Californie, USA) 2% (appelée solution de digestion, composition dans le *tableau 4*) à raison de 5 mL de solution de trypsine/gramme de tissu villeux. La suspension villositaire est ensuite incubée 30 min à 37°C. Le surnageant est éliminé et les villosités choriales sont de nouveau été incubées dans la solution de digestion pendant 10 min à 37°C.

Composé	Volume (mL) ou Masse (g)	Référence
HBSS 1X	500 mL	Ref : 14025092 (Gibco, LifeTechnology)
Tryspine 1:250	1 g	Ref : 27250-018 (Gibco, LifeTechnology)
CaCl2 0,1 mM	0,5 mL d'une solution à 0,1 M	Ref : 1.02820.1000 by Merck
MgSO4 0,1 mM	0,5 mL d'une solution à 0,1 M	Ref : 5886.0500 by Merck
DNase	100 µL	Ref : D5025-375KU (Sigma-Aldrich)
Lait	20 mL	Lait écrémé bio

Tableau 4 : Composition de la solution de trypsine pour la digestion des villosités.

Des digestions séquentielles sont ainsi répétées toutes les 10 min. Entre chaque digestion, la qualité de la digestion est évaluée au microscope optique. Le surnageant de digestion est défini comme médiocre lorsque les globules rouges sont en très grand nombre, lorsque les CTV sont encore présents au cœur des villosités choriales ou lorsque les villosités commencent à se vider et ne contiennent plus que des fibroblastes. Le surnageant est considéré comme satisfaisant lorsque les CTV (petite cellule ronde réfringente à la lumière, souvent en amas de 3 à 4 cellules) commencent à se détacher des villosités et se retrouvent dans le surnageant.

Les surnageants satisfaisants sont collectés au fur et à mesure des digestions et filtrés par un filtre de 40 µm (EASYstrainer, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Autriche) pour éliminer les débris de villosités choriales au-dessus d'un tube de 50 mL contenant 5 mL de Sérum de Veau Fœtal (SVF ; Sigma-Aldrich® Inc., St-Louis, Missouri, USA) qui neutralise l'action de la trypsine. En moyenne, les CTV sont recueillis après 4 digestions de 10 min, et il est possible d'en réaliser au maximum 8 sans relarguer de fibroblastes. Après les différentes incubations de 10 min avec la solution de trypsine, les villosités choriales sont rincées à l'aide d'HBSS 1X préchauffé à 37°C. Les surnageants de ces rinçages satisfaisants sont prélevés puis filtrés sur un tube de 50 mL contenant 5 mL de SVF. Il est possible d'effectuer 4 rinçages. Quand tous les surnageants obtenus après les digestions et les rinçages sont récupérés, ils sont centrifugés 10 min à 350 x g à température ambiante et les culots finaux recueillis.

Troisième étape : Purification des CTV

Les culots finaux sont re-suspendus à température ambiante dans une solution de DMEM + L-Glutamine 1% (Gibco by Life Technology™, Carlsbad, Californie, USA) + Pénicilline-Streptomycine 1% (PS, Gibco by Life Technology™, Carlsbad, Californie, USA) puis regroupés en une seule suspension cellulaire de 4 mL maximum. Ces 4 mL de suspension cellulaire sont déposés à la pipette en une seule fois à la surface du gradient de Percoll. Ce dernier réalisé préalablement dans un tube conique de 50 mL par dépôt de 2,5 mL des différentes concentrations allant de 5 à 70% de Percoll. Ce gradient est alors centrifugé 20 min à 1200 x g à température ambiante avec une vitesse d'accélération et frein réduite. De par leur densité, les CTV localisent au sein de bandes contenant 30 à 45% de Percoll. Ils sont récupérés par aspiration dans une pipette pasteur, remis en suspension dans 50 mL de DMEM + L-Glutamine 1% + PS 1% pour être rincés 10 min à 350 x g à température ambiante.

Quatrième étape : Ensemencement des CTV

Le culot cellulaire est alors repris dans 15 mL de DMEM + SVF 10% + L-Glutamine 1%+ PS 1% (DMEM Complet) à température ambiante. La concentration cellulaire et la viabilité sont évaluées en mettant en suspension V/V de la suspension cellulaire et du bleu trypan (10 µL de suspension cellulaire + 10 µL de bleu trypan) grâce au compteur TC20™ Automated Cell Counter (BIORAD, Hercules, Californie, USA). Enfin, les cellules ont été ensemencées à raison de 1000 cellules/mm² puis cultivées à 37°C sous 5% de CO_2.

Le lendemain de l'ensemencement, la qualité de la culture est évaluée en observant la densité cellulaire et la présence de fibroblaste. Le tapis cellulaire est ensuite lavé 3 fois avec 2 mL DMEM + L-Glutamine 1% + PS 1% pour une boîte de 60 mm de diamètre puis incubées ou non avec diverses agents pharmacologiques d'intérêt (forskoline [FSK ; F6886-10MG, Sigma-Aldrich® Inc, St-Louis, Missouri, USA], cholestérol-sulfate [chol-S ; C9523, Sigma-Aldrich® Inc, St-Louis, Missouri, USA], Lopinavir [LPV ; SML1222, Sigma-Aldrich® Inc, St-Louis, Missouri, USA], Ritonavir [RTV ; SML0491, Sigma-Aldrich® Inc, St-Louis, Missouri, USA]).

ii. Surnageant et culot cellulaire

Au cours de l'incubation des cellules, les surnageants de culture cellulaire sont prélevés, puis conservés à -20°C. Si les cellules ne sont pas destinées à être étudiées en immunocytofluorescence, elles sont lavées 2 fois dans du Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1X (Gibco by Life Technology™, Carlsbad, Californie, USA) froid puis récupérées mécaniquement (grattage à la spatule) dans du PBS 1X froid (4°C). Après avoir été transférées dans un nouveau tube, les cellules sont centrifugées quelques secondes à haute vitesse) et le surnageant éliminé par aspiration. Le culot cellulaire sec est conservé à

-80°C. La figure 37 représente un schéma générale démontrant les différentes techniques réalisées à partir des cultures primaires.

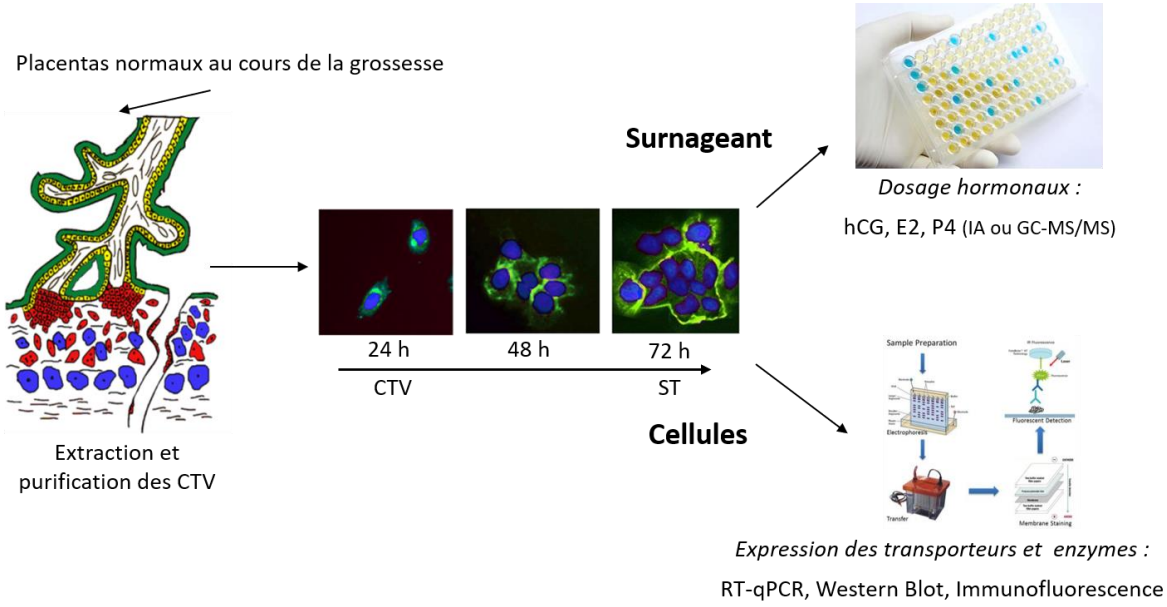


Figure 37 : Schéma général des expérimentations réalisées. A partir de placentas normaux à terme, les CTV ont été isolés puis purifiés avant d'être mis en culture pendant à 24 à 72h. Ils ont été incubés ou non avec différents agents pharmacologiques. A partir des surnageants de culture, les taux d'hCG et d'E2 ont été dosés en immuno-analyse, ceux de P4 dosés en immuno-analyse et spectrométrie de masse et ceux de P5 uniquement en spectrométrie de masse. Les cellules ont été utilisées pour étudier l'expression intracellulaire des partenaires de synthèse des hormones stéroïdes par des techniques de RT-qPCR, western-blot et immunocytofluorescence.

II. Extraction et dosage des protéines

i. Extraction des protéines

A partir de culots cellulaires de 3 millions de cellules contenu dans des tubes eppendorfs, les cellules sont lysées grâce à la re-suspension du culot cellulaire par pipetage dans 50 µL de tampon Lysis Buffer (NP40 Cell Lysis Buffer ; Invitrogen™, Carlsbad, Californie, USA) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase 100X (1X final ; Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem®, EMD Chemicals Inc., Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatase 50X (1X final ; Phosphatase Inhibitor Cocktail 50 X Set V, Calbiochem®, EMD Chemicals Inc., Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne), puis soniquées 60 sec (Branson Ultrasonics™ Sonifier, Emerson Electric Co., Fergusson, Missouri, USA). Le tube eppendorf contenant lysat cellulaire obtenu est centrifugé 10 min à 4°C à 13 000 x g. Le surnageant récupéré est transféré dans un nouveau tube eppendorf puis conservé à -20°C.

ii. Dosage des protéines

La méthode de dosage Bradford est utilisée pour quantifier les protéines des extraits cellulaires. Une gamme étalon de « Bovine Serum Albumine (BSA ; Thermo Scientific™, Thermo Fischer Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) est réalisée dans de l'eau « DNase/RNase/Protease free » allant de 2,5 à 25 µg/mL. Les extraits à doser sont eux préalablement dilués au 1/400e dans cette eau Le dosage s'effectue en mélangeant V/V, 150 µL de chaque échantillon (gamme et extrait dilué) à 150 µL de bleu de Coomassie (Plus Coomassie Pierce Thermo Scientific™, Thermo Fischer Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Un blanc est réalisé avec 150 µL d'eau « DNase/RNase/Protease free ». L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 595 nm sur l'EnSpire™ (2300 Multilabel Reader Perkin Elmer®, Turku, Finlande).

III. Western Blot

i. Préparation des échantillons

Les échantillons pour « Western Blot » sont préparés à partir de 20 ou 40 µg de protéines à déposer par puits. De l'eau « DNase/RNase/Protéase free » est rajoutée afin d'égaliser les volumes à déposer. Les volumes respectifs de Dithiothréitol (DTT) 10X (1X final : 1 µL de DTT pour un volume final de 10 µL) (NuPage Agent Reducter 10X, Novex by Life Technology™ ; Carlsbad, Californie, USA) et de tampon Laemmli 4X (1X final ; 2,5 µL pour un volume final de 10 µL) (BIORAD, Hercules, Californie, USA) ont été ajoutés l'un après l'autre. Les échantillons ont alors été incubés 5 min à 95°C au bain sec puis conservés dans la glace jusqu'au moment du dépôt.

ii. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes : SDS-PAGE

Un marqueur de poids moléculaires (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BIORAD, Hercules, Californie, USA) et les échantillons sont déposés sur gel pré-coulé à gradient de 4 à 15% (Mini-PROTEAN® TGX™, Precast Gels, BIORAD, Hercules, Californie, USA). La migration dans le gel s'effectue dans du tampon de migration Tris-Glycine-SDS (TGS) 10X (1X final) (BIORAD, Hercules, Californie, USA) à 200V pendant 30 min. Les protéines sont ainsi séparées en fonction de leur poids moléculaire pour un marqueur de poids moléculaire allant de 15 à 250 kDa. L'avancée de la migration est visualisé à l'aide du front de migration marqué par le bleu de charge contenu dans le Laemmli ainsi que le par le poids moléculaire allant de 250 à 15 kDa.

iii. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le kit de transfert BIORAD (Trans-Blot Turbo™ Transfer System Transfer Pack, Hercules, Californie, USA) est utilisé pour transférer les protéines séparées dans le gel sur une membrane de nitrocellulose.

Le gel est placé sur la membrane de nitrocellulose encadré par des « wetted transfer stack » qui contiennent le tampon de transfert, puis l'ensemble est placé dans la cassette de transfert. La cassette est fermée puis le transfert débute dans l'appareil de transfert Trans-Blot (BIORAD, Hercules, Californie, USA) sous 25V pendant 3 à 7 min.

Antigène	Espèce	Référence	Fournisseur	Concentration
Actine	Mouse	A5441	Sigma-Aldrich	0,2 µg/mL
Aromatase	Lapin	ab66981	Abcam	1 µg/mL
GRP78	Lapin	G8918	Sigma-Aldrich	1 µg/mL
HSD3B1	Lapin	ab167417	Abcam	0,18 µg/mL
HSD17B1	Lapin	ab51045	Abcam	0,16 µg/mL
Mfn2	Souris	ab56889	Abcam	1 µg/mL
MLN64	Lapin	ab3478	Abcam	1 µg/mL
OPA1	Lapin	ab42364	Abcam	1 µg/mL
P450SCC	Lapin	ab75497	Abcam	1 µg/mL
Phospho-substrat de PKA	Lapin	#9621	Cell Signaling	1 µg/mL
Stéroïde Sufatase	Lapin	ab62219	Abcam	1 µg/mL
Vinculine	Mouse	V9131	Sigma-Aldrich	1 µg/mL

Tableau 5 : Références et concentration des anticorps primaires utilisés pour le western-blot

iv. Immuno-détection

Après transfert, la membrane de nitrocellulose est saturée pendant 1h à température ambiante dans une solution de Tris-Buffered Saline (TBS) 1X-Tween20 0,1%-lait écrémé 5%-azide de sodium 0,1%. Elle est ensuite incubée sur la nuit à 4°C sous agitation avec la solution d'anticorps primaires adéquate (référence et dilution des anticorps dans le *tableau 5*). L'actine ou la vinculine ont été utilisées comme témoin de charge. Après 3 lavages de 10 min avec du TBS 1X-Tween20 0,1%, la membrane est incubée 1h à température ambiante sous agitation à l'obscurité avec une solution adéquate d'anticorps secondaires couplés à un Dylight dilués au 1/10 000e dans du TBS 1X-Tween20 0,1% (référence des anticorps dans le *tableau 6*). De nouveau 3 lavages de 10 min sous agitation à température ambiante, à l'obscurité dans du TBS 1X-Tween20 0,1% sont effectués. Le marquage est alors révélé grâce au système Odyssey Infrared Imager (Li-COR® Inc., Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) qui détectent la fluorescence infrarouge à la fois du Dylight et du marqueur de poids moléculaire qui est marqué. L'intensité de l'émission ainsi que la sensibilité à la réception du signal sont réglables

afin d'éviter la saturation de celui-ci. Par ailleurs, l'intensité du signal correspondant aux protéines d'intérêts rapportés à celui des protéines témoins de charges (actine ou vinculine) nous permet d'obtenir un niveau d'expression relatif. Le résultat est donc semi-quantitatif.

Antigène	Espèce	Référence	Fournisseur	Dilution	DyLight couplé
Anti-Lapin	Chèvre	SA5-35571	ThermoFischer Scientific	1/10 000ème	DyLight800 (Vert)
Anti-Lapin	Chèvre	35568	ThermoFischer Scientific	1/10 000ème	DyLight680 (Rouge)
Anti-Souris	Chèvre	SA5-35521	ThermoFischer Scientific	1/10 000ème	DyLight800 (Vert)
Anti-Souris	Chèvre	35518	ThermoFischer Scientific	1/10 000ème	DyLight680 (Rouge)

Tableau 6 : Références et dilutions des anticorps secondaires utilisés pour le western-blot.

IV. Immunocytofluorescence

Les techniques de fluorescence sur cellules nous ont servi à étudier l'expression protéique des acteurs de la stéroïdogenèse par un immunomarquage ciblant chacune des protéines, à mesurer l'index de fusion des CTV en ST par un immunomarquage ciblant une protéine membranaire, la desmoplakine, et enfin évaluer les mitochondries à l'aide d'une sonde fluorescente et d'un immunomarquage ciblant la desmoplakine.

i. Fixation des cellules

Le tapis cellulaire est lavé 3 fois au PBS 1X à température ambiante avant d'être fixé par incubation de 8 min à -20°C avec du méthanol pur froid (-20°C). 3 nouveaux lavages sont effectués avec du PBS 1X à température ambiante. Les cellules fixées sont alors stockées à 4°C dans du PBS 1X (2 mL pour une boite de 35 mm de diamètre) jusqu'à l'immunomarquage.

ii. Immunomarquage et coloration des noyaux

Les cellules fixées sont incubées 1h à température ambiante dans une solution de PBS 1X-BSA 1%-Tween20 0,1%. Ensuite, elles ont incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires adéquates (référence et dilution dans le *tableau 7*) en condition humide (présence d'un papier absorbant à proximité des boites afin d'éviter l'assèchement des boites). Le lendemain, après 3 lavages par du PBS

1X à température ambiante, elles sont incubées 1h à température ambiante à l'obscurité avec des anticorps secondaires adéquates couplés à des AlexaFluors (référence et dilution dans le *tableau 7*). Après 3 lavages au PBS 1X TA, les noyaux sont marqués à l'aide d'un intercalant de l'ADN, le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) dilué au 1/10 000e dans du PBS 1X. Enfin, après 3 lavages au PBS 1X, les cellules sont montées sous lamelle et observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence BX60 (Olympus) muni d'un objectif à immersion 40X (Olympus 1.00), une lampe à mercure et une caméra Hamamatsu (C4742-95).

Antigène	Espèce	Référence	Fournisseur	Concentration
Desmoplakine (DSP)	Lapin	ab71690	Abcam	2 µg/mL
Desmoplakine (DSP)	Souris	ab16434	Abcam	5 µg/mL
HSD3B1	Lapin	ab167417	Abcam	0,18 µg/mL
MLN64	Lapin	ab3478	Abcam	1 µg/mL
P450SCC	Lapin	ab75497	Abcam	1 µg/mL
Anti-lapin couplé AlexaFluor488 (vert)	Chèvre	A-11008	LifeTechnologies	4 µg/mL
Anti-Mouse couplé AlexaFluor546 (rouge)	Chèvre	A-11003	LifeTechnologies	4 µg/mL

Tableau 7 : Références et concentrations des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunocytofluorescence.

iii. Index de fusion

Les CTV isolés à partir de placenta humain sont incubés pendant 48h avec du LPV à 10 µM ou le contrôle DMSO (Diméthylsulfoxyde). Après avoir fixé les cellules au méthanol puis réalisé l'immunomarquage fluorescent de la desmoplakine, l'index de fusion est calculé grâce à la formule : [nombre de noyaux dans les ST – nombre de ST]/nombre total de noyaux. Un ST est défini par la présence de 2 noyaux non séparés par une membrane plasmique. Cette dernière est visualisée en vert grâce l'immunomarquage de la desmoplakine.

iv. Analyse des mitochondries par la sonde CMX Ros

La sonde « MitoTracker Red CMX Ros » (M7512, Invitrogen^{TM,} Carlsbad, Californie, USA), qui fluoresce en rouge, s'incorpore dans les mitochondries actives ayant un potentiel transmembranaire élevé. Les CTV isolés à partir de placentas humains à terme sont cultivés pendant 24h ou 72h, puis incubés pendant 45 min à 37°C avec la sonde « MitoTracker Red CMX Ros » (diluée à 50 nM dans du DMEM + 1% PS + 1% L-Glutamine). Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde 4%

pendant 20 min à température ambiante à l'abri de la lumière. L'effet du paraformaldéhyde est neutralisé par incubation avec du NH_4Cl (50 mM) pendant 10 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Après fixation des cellules au paraformaldéhyde, les membranes plasmiques sont marquées par un immunomarquage vert ciblant la desmoplakine.

V. Extraction des ARN totaux : kit Acturus® Picopure®

Les culots secs de 1 millions de cellules sont utilisés pour extraire les ARN totaux à l'aide du kit d'extraction Acturus™ Picopure™ (Acturus™ Picopure™ RNA Isolation Kit, Applied Biosystems by Thermo Fischer Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) qui repose sur le principe d'une extraction sur colonne de silice qui retient les ARN totaux. Grâce à un traitement par la DNase et différents lavages, les ARN contenus dans la colonne sont élués à la dernière étape. Les cellules sont d'abord lysées avec 100 µL d' « Extraction Buffer »pour 1,5 millions de cellules. Après homogénéisation à la micropipette, le lysat cellulaire est incubé 30 min à 42°C avant d'être congelé 1h à -80°C. Ce kit d'extraction est composé d'une colonne qui doit être préalablement équilibrée par incubation de 5 min avec 250 µL « Conditionning Buffer » puis par centrifugation d'1 min à 16 000 x g. Les acides nucléiques de l'extrait cellulaires sont ensuite précipités après ajout de 100 µL d'éthanol 70% au 100 µL de lysat. La totalité du précipité est déposée par pipetage sur la colonne qui est mise à centrifuger 2 min à 100 x g puis 40 sec à 16 000 x g afin de lier les ARN à la colonne. Deux lavages de la colonne sont effectués avant de dégrader l'ADN grâce à une incubation de 15 min à température ambiante avec une solution de DNase à 12,5% (45 µL de DNase par colonne). De nouveaux lavages sont effectués puis les ARN totaux sont élués grâce à l' « Elution Buffer » (13 µL par colonne). La concentration en ARN de l'éluât a été évaluée par mesure de l'absorbance à λ=260 nm sur le NanoDrop One (Thermo Fischer Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) avant de stocker les ARN à -80°C.

VI. Transcription Inverse

L'étape de Transcription Inverse (« Reverse Transcription » [RT]) permet de créer un hybride ARN/ADN qui va servir de matrice lors de la Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR). La RT a été effectuée à partir de 500 ng d'ARN totaux auxquels sont ajoutés 3 µg d'amorce aléatoire (Random Primers, Invitrogen™, Carlsbad, Californie, USA) et des dNTP (0,5 mM de chaque dNTP final, Invitrogen™, Carlsbad, Californie, USA) dans un volume final de 13 µL. Ce mélange est incubé 5 min à 65°C. Du tampon « First Strand 5X » (SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit, Invitrogen™, Carlsbad, Californie, USA) contenant des sels et des ions Mg^{2+} (Invitrogen™, Carlsbad, Californie, USA), du DTT (5 mM final, SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit, Invitrogen™, Carlsbad, Californie, USA) ainsi

que 40 unités d'inhibiteur de RNase (RNaseOut™, Invitrogen™, Carlsbad, Californie, USA) sont ajoutés dans un volume final de 20 µL. La réaction de transcription inverse est réalisée après l'ajout de l'enzyme Superscript III d'abord par une première étape de 50 min à 50°C puis une seconde étape de 15 min à 70°C.

VII. Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR)

La qPCR nécessite des amorces sens et antisens spécifiques des gènes d'intérêt (séquences dans *tableau 8*). Pour normaliser les résultats, 4 gènes de référence sont utilisés : la sous unité 18S du ribosome (18S), SDHA, RPLO et HPRT dont l'expression varie peu au cours de la différenciation trophoblastique. Les échantillons d'hybride ARN/ADN sont dilués au 1/5e dans de l'eau « DNase-RNase-Protease free ». Le kit « Takyon™ ROX SYBR® MasterMix blue dTTP » (Eurogentec, Kaneka, Liège, Belgique) a été utilisé pour réaliser la qPCR. Le tampon MasterMix 2X dans lequel sont placés l'ADNc et les amorces, contient les dNTP, l'ADN polymérase (Takyon™ DNA polymerase), du $MgCl_2$ et le SYBR Green®. Ce dernier est un agent fluorescent, intercalant de l'ADN. L'intensité de fluorescence émise mesurée, par l'appareil « CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System » (BIORAD, Hercules, Californie, USA) ou par l'appareil « StepOne Instrument » (Applied Biosystems by Thermo Fischer Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), rend compte de la quantité d'ADN des gènes d'intérêt présente dans chaque échantillon. Dans une plaque de 384 puits, le mélange contenant les amorces sens et antisens (à 100 nM chacune) et le tampon MasterMix 2X dans un volume final de 8 µL est déposé. Ensuite, 2 µL des échantillons contenant les hybrides ARN/ADN (issus de la RT), dilués au 1/5ème dans l'eau « DNase-RNase-Protease free » sont ajoutés dans un volume final de 10 µL. La plaque es ensuite centrifugée à 1000 rpm pendant 3 min à température ambiante. Puis l'amplification de l'ADNc ainsi que la lecture de la fluorescence sont réalisées avec les appareils qPCR (« CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System » ou « StepOne Instrument ». La plaque a d'abord été incubée 10 min à 95°C. L'amplification a ensuite été effectuée sur 40 cycles comprenant chacun une phase de dénaturation (10 sec à 95°C), d'hybridation (10 sec à 60°C) et d'élongation (10 sec à 72°C).

mRNA ciblé	Nom du gène	Séquences	
MLN64	*STARD3*	Forward	GAGCGATGGTATCTTGCCGC
		Reverse	CTGCAAAGGATTCTGGGGGT
HSD3B1	*HSD3B1*	Forward	AGTACGTCCACTCTTCTGTCCA
		Reverse	TTCTCCTTCACCAAGAGGCG
P450SCC	*CYP11A1*	Forward	TTTTTGCCCCTGTTGGATGCA
		Reverse	CCCTGGCGCTCCCCAAAAAT
GRP78	*GRP78*	Forward	CGTGGAGATCATCGCCAAC
		Reverse	ACATAGGACGGCGTGATGC
sXBP1	*sXBP1*	Forward	CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG
		Reverse	ATCCATGGGGAGATGTTCTGG
ATF4	*ATF4*	Forward	GTTCTCCAGCGACAAGGCTA
		Reverse	ATCCTGCTTGCTGTTGTTGG
ATF6	*ATF6*	Forward	GAGTATTTTGTCCGCCTGCC
		Reverse	CGGGCTAAAAGGTGACTCCA
18S	*18S*	Forward	TCCCCCAACTTCTTAGAGG
		Reverse	CTTATGACCCGCACTTACTG
SDHA	*SDHA*	Forward	CCACCACTGCATCAAATTCATG
		Reverse	TGGGAACAAGAGGGCATCTG
RPLO	*RPLO*	Forward	AACATCTCCCCCTTCTCCT
		Reverse	ACTCGTTTGTACCCGTTGAT
HPRT	*HPRT*	Forward	GGCGTCGTGATTAGTGATG
		Reverse	CAGAGGGCTACAATGTGATG

Tableau 8 : Séquences « Forward » et « Reverse » des amorces utilisées pour la qPCR

VIII. Microscopie Electronique à Transmission : en collaboration avec le Plateau Technique d'Imagerie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté de Pharmacie (M. René Lai-Kuen)

La microscopie électronique à transmission (MET) nous permet d'observer l'ultrastructure des cellules témoins ou incubées avec les IPs. Les CTV préalablement isolés sont ensemencés (1000 cellules/mm²) pendant 15h en milieu simple avant d'être incubés avec le LPV (à 10 µM) et RTV (5 µM) ou le DMSO (contrôle) pendant 6, 24 ou 48h. Après chaque temps d'incubation, les cellules sont collectées grâce à la tryspine-EDTA 0,05% (Gibco by Life Technology™, Carlsbad, Californie, USA) centrifugées 5 min à 1400 x g, lavées 2 fois pendant 10 min avec du tampon PB (0,05 M PIPES [piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)], 5 mM $CaCl_2$, pH 7,3), puis à nouveau centrifugées 5 min à 1400 x g à température ambiante. Chaque culot cellulaire est fixé pendant 45 min température ambiante à l'obscurité dans du tampon PB contenant 2,5% de glutaraldéhyde et 2% de paraformaldéhyde). Après 5 min de centrifugation à 1400 x g, les échantillons sont lavés 2 fois pendant

10 min avec du tampon PB à température ambiante puis incubés 45 min à 4°C dans une solution PB-tetroxide d'osmium 1% puis 2h à température ambiante dans une solution aqueuse d'acétate d'uranyl. Les échantillons sont alors déshydratés en les incubant de façon séquentielle dans des solutions de concentration croissante éthanol (30%, 50%, 70%, 95% et 100%) puis dans des solutions éthanol/oxyde de propylène (1/1 [vol/vol]) et enfin oxyde de propylène avant d'être inclus dans une résine Epon/Epoxy. Des sections ultrafines (80 nm d'épaisseurs) sont réalisées grâce à un microtome « Leica Ultracut S » associé avec une lame en diamant « Diatome histoknife Jumbo » ou « Diathome ultrafine ». Ces coupes ultrafines sont colorées avec du citrate de plomb (solution) et placées sur des grilles de cuivre. Les coupes sont analysées à 80 kV avec un microscope électronique à transmission Jeol (microscope électronique à transmission JEM-100S, Croisy sur Seine, France). Les acquisitions sont effectuées avec le logiciel Gatan (Gatan Inc, AMETEK®, Berwyn, Pennsylvanie, USA).

IX. Dosages hormonaux

i. *Dosages par Immuno-Analyse : collaboration avec le service d'Hormonologie de l'hôpital Cochin (Pr J. Guibourdenche)*

Les concentrations d'hCG total et d'oestradiol (E2) et de progestérone (P4) ont été mesurées dans les surnageants après 24 et 72h de culture, par adaptation des tests ECLIA (automate Liaison, DiaSorin). Les mesures s'effectuent pour des concentrations comprises entre 1,5 à 10 000 UI/L pour l'hCG, 0,7 à 190 nmol/L pour la P4 et 10 à 1000 pmol/L pour l'E2. L'imprécision définie par le coefficient de variation sur la mesure est inférieure à 5% pour l'hCG, 11% pour la P4 et 10,7% pour l'E2. Les limites de détections sont de 0,3 UI/L pour l'hCG, 0,4 nmol/L pour la P4 et 16,2 pmol/L pour l'E2. Les dosages de PlGF et sFlt-1 sont réalisés sur un automate Cobas (Roche) avec une détection par électro-chimi-luminescence. Les mesures s'effectuent pour des concentrations allant de 3 à 10 000 pg/mL pour le PlGF et 10 à 85 000 pg/mL pour le sFlt-1. L'imprécision est inférieure à 5% pour ces 2 molécules et les limites de détections sont fixées à 10 pg/mL pour le PlGF et 15 pg/mL pour le sFlt-1.

ii. *Dosages par spectrométrie de masse GC-MS/MS : collaboration avec le service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie de l'hôpital Bicêtre (Dr S. Trabado et Dr A. Garnier A)*

Réactifs

Progestérone (P4), 17-hydroxyprogestérone (17OHP4) et prégnénolone (P5) ont été analysés simultanément après extraction comme décrit par Giton et *al.* (Giton F et *al.,* 2015). 1 ng de Δ4-androstenedione-d7 et progestérone-d9 deutérié standard ont été ajouté à chaque échantillon de surnageant (CDN Isotopes, Inc., Point-Claire, Quebec, Canada).

Extraction et purification

Brièvement, chaque échantillon (1 mL de milieu de culture, standard de calibration et contrôle qualité) ont été placés dans des tubes borosilicate (Kimble, DURAN Group, USA). 50 µL de solution standard de stéroïdes deutérié et 3 mL de 1-Chlorobutane ont été ajoutés. Après mélange, les échantillons ont été centrifugés à 3000 x g pendant 10 min à 20°C. La phase organique a été déposée sur des colonnes de silice préalablement activée (c18, SPE 500 mg/3 mL, Fischer Scientific, USA), conditionnées successivement avec 2,5 mL d'hexane et 2,5 mL de 1-Chlorobutane. Après avoir passé les échantillons et rincé les colonnes avec (3 x 2 mL) de solution ethyl acetate/hexane (ratio 1:9), la fraction contenant les stéroïdes a été éluée avec (2 x 2 mL) de solution ethyl acetate/hexane (ratio 1:1), a été évaporée à 60°C puis a été dissoute avec 200 µL de solution ethyl acetate avant la réaction de dérivation.

Réaction de dérivation

Après évaporation de l'azote, la fraction contenant les stéroïdes a été dérivatisée avec 50 µL de solution heptafluorobutyrique anhydre (HFBA, Regis Technologies, USA)/acetone anhydre (ratio 1:1) pendant 1h à température ambiante.

Analyse GC-MS/MS

Les extraits finaux ont été reconstitués dans de l'hexane, puis transféré dans une fiole conique pour l'injection dans le système de chromatographie gazeuse (GC) (Waters, Milford, Mass., USA). Les stéroïdes ont été analysés dans un spectromètre de masse triple quadrupole GCMS/MS TQ8040 (Shimadzu, Japan), équipé avec une source impact d'électrons (EI), utilisant une colonne de chromatographie (5% phenyl / 95% dimethylpolysiloxane ZB-5MSi [30 m x 0,25 mm, diamètre interne, 0,25 µm épaisseur de film, Phenomenex, Torrance, California, USA]) pour la séparation des différents stéroïdes grâce au vecteur gaz hélium (MESSER, Allemagne). Valeurs de transition m/z de 465,20>109,10, 510,25>510,25 et 298,30>213,30 ont été suivies pour l'analyse quantitative de 17-hydroxyprogestérone, progestérone et prégnénolone, respectivement, et les valeurs de transition m/z de 465,20>465,20, 510,25>147,20 et 298,30>145,10 ont été appliqué pour l'analyse quantitative des mêmes molécules. Le processus de données a été réalisé avec GC-MS/MS browser software (V 4.2). La linéarité des mesures a été confirmé par le graphe du ratio Pic de Réponse des stéroïdes/Pic de Réponse des standard en fonction de la concentration des stéroïdes pour chaque standard de calibration.

X. Culture cellulaire de la lignée de choriocarcinome BeWo

La lignée cellulaire BeWo est issue de choriocarcinome de trophoblastes humains. Le clone B30 obtenu par le laboratoire du Dr Alan Schwartz est capable de former une monocouche confluente en 4 à 6 jours. Les cellules BeWo sont maintenues dans des conditions de culture standards en atmosphère humide avec 5% de CO_2, à 37°C. Elles sont cultivées dans un milieu complet F-12K (Gibco by Life Technology™, Carlsbad, Californie, USA) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio), de la L-glutamine à 2 mM (Sigma-Aldrich® Inc, St-Louis, Missouri, USA), de la pénicilline à 100 U/mL final (Gibco by Life Technology™, Carlsbad, Californie, USA), de la streptomycine à 100 µg/mL final (Gibco by Life Technology™, Carlsbad, Californie, USA). Une fois par semaine, les cellules subissent un passage au 1/6e en condition stérile sous un poste de sécurité microbiologique de classe II. Pour ce faire, le milieu de culture est aspiré, les cellules sont rincées avec 10 mL de PBS 1X avant d'être « individualisées » dans 3 mL de trypsine-EDTA 0,05% (Gibco by Life Technology™, Carlsbad, Californie, USA) pendant 4 à 5 min à 37°C jusqu'au détachement des cellules du support. La trypsine est neutralisée par ajout de 6 mL de milieu de culture complet. Après homogénéisation, 1,5 mL de solution cellulaire sont repris dans une flasque aérée de 75 cm2 contenant 13,5 mL de milieu de culture complet, puis incubée à 37 °C.

Les cellules sont ensemencées à une densité de 7,5.10^{5} cellules/boîte de culture de 60 mm², ces dernières sont placées en incubateur pendant 24h pour permettre une adhérence au support. Le lendemain les cellules sont rincées avec du PBS 1X puis placées pendant 24h avec du milieu complet.

XI. Analyse de l'activité PKA : collaboration avec l'unité UMR-S 8104 (Dr Bruno Ragazzon et Dr Marthe Rizk)

L'activité PKA a été analysée grâce au kit « PepTag® Nonradioactive Protein Kinase Assay » (Promega Corporation, Madison, WI, USA) à partir de protéines extraites de CTV incubés pendant 6h ou 24h avec du LPV (10 µM) ou du DMSO. 15 µg de protéines sont diluées dans de l'eau « DNase/RNase/Protease free » pour un volume final de 9 µL puis conservées à 4°C. Le mix contenant le « PepTag® A1 Peptide » (2 µg final), le tampon de réaction 5X (1X final ; « PepTag® PKA Reaction 5X Buffer »), la solution d'activation 5X (1X final, « PKA Activator 5X solution ») et la solution protectrice (1 µL ; « Peptide Protection Solution ») est préparé à raison de 16 µL de mix par extrait protéique. Ce mix est incubé 1 min à 30°C à l'abri de la lumière, avant d'être ajouté aux extraits préalablement dilués (soit un volume final de réaction de 25 µL [16 µL de mix + 9 µL d'extrait protéique] ; exemple en *tableau 9*). Le mélange réactionnel est alors incubé 40 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par une incubation de 10 à 95°C à l'abri de la lumière. Les mélanges réactionnels

sont alors conservés à 4°C avant d'être déposés sur un gel d'agarose à 0,8%. Au moment de la migration, 2 µL de glycérol à 80% sont ajoutés pour chaque mélange réactionnel avant le dépôt afin de le densifier. La migration est réalisée à 100V pendant 30 min à l'abri de la lumière. Le gel est ensuite révélé sous infrarouge. Un contrôle négatif « - PKA + Act » est réalisé en absence d'extrait protéique, sans sous-unité catalytique de la PKA mais avec un activateur de la PKA. Un contrôle positif « + PKA + Act » est réalisé en absence d'extrait protéique mais en ajoutant à la place la sous-unité catalytique de la PKA (2 µg/mL) ainsi que son activateur. Un dernier contrôle « + PKA + Inh » est réalisé en présence de la sous-unité catalytique de la PKA à la place des extraits protéique et en présence d'un inhibiteur de la sous-unité catalytique.

Réactif	Volume (µL)
PepTag® A1 Peptide (Ci = 0,4 µg/µL)	5
PepTag® PKA Reaction 5X Buffer	5
PKA Activator 5X solution	5
Peptide Protection Solution	1
15 µg de protéines diluées	9
Volume total	25

Tableau 9 : Exemple de mélange réactionnel pour 1 extrait protéique

XII. Etudes statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel « GraphPad Prism software package ® » (California, USA). Les résultats sont présentés soit sous forme de valeurs brutes, soit sous forme de moyennes +/- SD. Les tests statistiques utilisés sont des tests non paramétriques pour données appariées, test de Wilcoxon. Une différence est définie comme significative pour une p-value < 0,05.

Résultats Partie I : Caractérisation de la production placentaire in vitro de progestérone par le trophoblaste villeux humain

I. Introduction

La fonction endocrine placentaire est essentielle au bon déroulement de la grossesse et au développement fœtal. L'étude de cette fonction s'est longtemps focalisée d'une part sur l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) considérée comme « l'hormone de la grossesse » et d'autre part sur le syncytiotrophoblaste (ST) considéré comme « le tissu endocrine placentaire » car exprimant fortement l'hCG et ses sous unités tant en terme de protéines que de transcrits (Gaspard et al. 1980; Wide et al. 1988; Ogren et Talamantes 1994; Cocquebert et al. 2012). La production d'autres hormones placentaires moins spécifiques de la grossesse, notamment des hormones stéroïdes comme les oestrogènes et les progestatifs a été caractérisée mais essentiellement au niveau du ST, confirmant son rôle endocrine clé (Alsat et al. 1997; Guibourdenche et al. 2000; Li et al. 2005; Malassiné et Cronier 2002). Des travaux plus récents de notre équipe ont montré que le ST n'est pas le seul tissu endocrine du placenta. Ainsi, les cytotrophoblastes villeux (CTV) et extra-villeux (CTEV) expriment eux aussi les sous unités α et β de l'hCG et le récepteur LH-CG. *In vitro*, l'incubation des CTEV avec de l'hCG induit à la production de progestérone (P4) (Handschuh et al. 2007). Nous avons montré à l'aide du modèle de culture primaire de CTV que cette production d'hCG augmente avec la différenciation morphologique des CTV en ST (Handschuh et al. 2009). Par contre, concernant les hormones stéroïdes, très peu d'études ont évalué *in vitro*, la production des progestatifs ou des oestrogènes par les CTV d'une part et leur variation avec la formation du ST d'autre part.

Nous avons voulu, dans ce premier travail, caractériser de façon exhaustive toutes les étapes de la synthèse principalement des progestatifs par le CTV humain et au cours de sa différenciation en ST, en valorisant notre modèle *in vitro* de culture primaire. Nous avons parallèlement voulu établir le profil de sécrétion *in vitro* de ces hormones en profitant du développement de leur dosage en spectrométrie de masse (travail effectué en collaboration avec le service de génétique moléculaire, pharmacogénétique et hormonologie du CHU Bicêtre et avec le service d'hormonologie du CHU Cochin).

II. Résumé des matériels et méthodes utilisés

Brièvement, à partir de placentas humains normaux à terme, les CTV ont été isolés puis mis en culture pendant 72h afin de permettre la différenciation des CTV en ST. Nous avons alors étudié

l'évolution de la mitochondrie, organite essentiel à la synthèse de progestérone, au cours de la différenciation trophoblastique grâce à une sonde fluorescente CMX Ros marquant les mitochondries avec un potentiel transmembranaire positif. Les sécrétions d'hCG, P4 et prégnénolone (P5) ont été analysées dans les surnageants de culture à la fois en immuno-analyse et spectrométrie de masse GC-MS/MS. Concernant la synthèse des hormones stéroïdes, l'expression du transporteur mitochondrial MLN64 et celle des enzymes P450SCC et HSD3B1 ont été évaluées par immunofluorescence, RT-qPCR et western-blot. La modulation de la stéroïdogenèse par la forskoline (FSK), un activateur connu de la différenciation trophoblastique, ou par le cholestérol-sulfate (chol-S) substrat princeps de la synthèse de P4 a été étudiée.

III. Résultats

i. *Article 1 : "Placental production of progestins is fully effective in villous cytotrophoblasts and increases with the syncytiotrophoblast formation"*

Molecular and Cellular Endocrinology 499 (2020) 110586

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce



Placental production of progestins is fully effective in villous cytotrophoblasts and increases with the syncytiotrophoblast formation

C. Fraichard[a], F. Bonnet[b], A. Garnier[c,d,1], M. Hébert-Schuster[a,b,1], A. Bouzerara[a,b], P. Gerbaud[e], I. Ferecatu[a], T. Fournier[a], I. Hernandez[a], S. Trabado[c,d], J. Guibourdenche[a,b,*]

[a] UMR-S 1139, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Paris, France
[b] Service d' Hormonologie, CHU Cochin, HUPC, AP-HP, Paris, France
[c] Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, CHU de Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin Bicêtre, France
[d] UMR-S U1185, Faculté de Médecine Paris-Sud, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, France
[e] UMR-S 1180, Faculté de Pharmacie, 5 Rue JB Clément, 92296, Châtenay-Malabry, France

Keywords : Human placenta, Villous trophoblast, Mitochondria, Steroidogenic enzymes, Mass spectrometry, Progesterone

Abstract :

Placental syncytiotrophoblast (ST) is considered as the main placental endocrine tissue secreting progesterone, a steroid essential for maintenance of pregnancy. However, each step of progestins production has been poorly investigated in villous cytotrophoblast (VCT) regarding ST formation. We aimed to characterize progestins production during human differentiation of VCT into ST. VCTs were

isolated from term placenta and cultivated, with or without forskolin (FSK), to stimulate trophoblast differentiation. Secreted progestins concentrations were determined by immuno-assay and Gas Chromatography-tandem mass spectrometry. Intracellular expression of cholesterol transporter and enzymes involved in steroidogenesis were studied by immunofluorescence, western-blot, and RT-qPCR. Progesterone and pregnenolone are produced by VCT and their secretion increases with VCT differentiation while 17-hydroxyprogesterone concentration remains undetectable. HSD3B1 enzyme expression increases whereas MLN64, the cholesterol placental mitochondrial transporter and P450SCC expressions do not. FSK induces progestins production. Progestins placental synthesis is effective since VCT and increases with ST formation thanks to mitochondria.

1. Introduction :

Human placenta is an endocrine organ that produces both protein hormones such as human chorionic gonadotropin (hCG) or placental growth hormone, and steroid hormones such as progesterone (P4) and estrogens, including estradiol (E2) and estriol (E3) (Miller, 1998; Guibourdenche et al., 2009; Chatuphonprasert et al., 2018). Its structural and functional unit is the chorionic villus and its specific tissue is the trophoblast. The syncytiotrophoblast (ST) arises from the aggregation and fusion of villous cytotrophoblasts (VCT) and is considered as the main endocrine placental tissue (Benirschke et al., 2012). It covers the entire surface of the villi bathing into maternal blood where it secretes most of the produced hormones. Placental hormones are required for maintenance of pregnancy, adaptation of maternal organism to pregnancy, and for fetal growth. P4 is indeed mandatory for pregnancy continuation as it modulates maternal immuno-tolerance and maintains myometrium quiescence. Its production starts in the mitochondria. Indeed, after entering the mitochondria via the MLN64 transporter, cytoplasmic cholesterol is transformed by P450SCC enzyme in pregnenolone (P5), that is further converted in P4 via HSD3B1 enzyme (Pasqualini, 2005). There is now growing evidence that maternal treatments as well as maternal environment can alter placental endocrine functions, thus being able to affect fetal development and pregnancy outcome. Fungicides such as tributylin decrease P4 and E2 production in JEG-3 choriocarcinoma cell lines *in vitro* (Cao et al., 2017) and in pregnant rats *in vivo* (Feng et al., 2016). Triclosan, an antimicrobial agent, and bisphenol A, a well known endocrine disruptor, alter the endocrine pathway of P4 and the decidualization of endometrial stroma cells (Forte et al., 2016). More precisely, triclosan induces spontaneous abortion in mice and decreases estrogen sulfotransferase in both mice and humans (Wang et al., 2015). However, most of these studies on placental steroidogenesis have been performed either on cell lines models *in vitro* or on mice and rats *in vivo*, but scarcely on human primary trophoblast cells. This is particularly important in the context of steroidogenesis study as cell enzymatic equipment may vary between species (e.g. rodent, equine,

human), endocrine tissues (e.g. adrenal, ovary, placenta) and trophoblast derived cell lines (Rothbauer et al., 2017; Legacki et al., 2017), thus limiting conclusions generalization. In human, P4 production has been mainly described *in vivo* in maternal blood and *in vitro* in ST fragments but only few studies focused on trophoblast differentiation (Tuckey, 2005; Morel et al., 2016). We aimed, in this study, to fully characterize the synthesis and secretion of progestins during the differentiation of VCT into ST and their regulation in human normal trophoblast.

2. Materials and methods

2.1. Placental tissue collection and isolation of villous cytotrophoblasts

Placental tissues from patients delivering by cesarean section at full term were obtained from Beaujon Hospital (Clichy, France), Antony Hospital (Antony, France), Port-Royal Maternity (Paris, France) and Montsouris Mutual Institute (Paris, France). These biological samples were collected following informed patient written consent and approval from our local ethics committee (CPP 2015-mai-13909).

Placentas included came from monofetal non-complicated pregnancies thus considered as normal. Indeed, no fetal and no placental abnormalities had been detected on ultrasound during pregnancy follow-up. The mother also had no associated pathology or specific treatment (i.e; diabetes, thyroid disorder, hypertension, preeclampsia). Maternal biological investigations were normal with serum markers of Trisomy 21 placing the patient in a non-risk group and serological assessments excluding any major infection during pregnancy. The probability of chorioamnionitis was excluded on both clinical examination (absence of maternal fever) and biological investigations (no increase either in white blood cells count or in CRP when measured). Cesarean sections were performed at a mean gestational age of 39 + 1 WG. Indications for cesarean sections were: maternal uterus abnormalities (uterus scar, myomectomy), maternal wish, breech presentation, narrow maternal pelvis. Placentas included were all weighed and macroscopically examined. They all had normal weight and appearance i.e. a basal plate and chorion without particularities (no calcifications, no hematomas, no thrombosis detectable), a parenchyma with normal appearance (no congestion, no calcification, no edema, no detectable infarction). Membranes and cord also had no particularities.

Chorionic villi were obtained by manual dissection of placental tissues from term placentas as previously described about 1 h after delivery (Kliman et al., 1986; Alsat et al., 1993). Villous tissue was dissected free of membranes, rinsed and minced in HBSS 1X (Gibco™, Fisher Scientific, France). The villous sample was then subjected to sequential enzymatic digestion in HBSS 1X containing 0,2% trypsin (w/v), 25 IU/mL DNAse I, 0,1mM $MgSO_4$, 0,1mM $CaCl_2$ and 7% milk (v/v). Cell dissociation was

monitored by light microscopy. The first three digests were discarded to eliminate residual ST fragments. The cell suspensions resulting from the following four or five sequential digestions were pooled. The cells were then purified on a discontinuous Percoll gradient (5%‑70% in 14 steps). Cells viability was determined in v/v solution with trypan blue. The isolated cells were plated in DMEM containing 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% L-Glutamin and were incubated at 37 °C with 5% CO_2. Purified VCTs aggregate and fuse to form ST at 72 h of culture (Leguy et al., 2014). Cells were incubated or not with FSK (10 µM) for 6 h/24 h of culture or for 48 h/72 h of culture to stimulate cytotrophoblasts fusion. Cell culture media were collected every 24 h, centrifuged at 1000 × g for 20 min at 4°C ; supernatants were kept frozen at -80 °C as part of the Equipex 10-PhC/SC-11/243 project « Perinatcollection » until used. Cells were either fixed in methanol for immunofluorescence or snap-frozen for RNA/Protein extraction and stored at -80 °C until use.

2.2. Immunofluorescence microscopy

Immunocytofluorescence staining was performed at 24 and 72 h of culture. Cells were washed in PBS 1X, then fixed and permeabilized in methanol for 8 min at -20 °C and blocked in PBS 1X-1% BSA-Tween 0,1% for 1 h at room temperature. Cells were first incubated overnight at 4°C with primary polyclonal rabbit antibodies to P450SCC (1 µg/mL, ab75497 abcam®) and to MLN64 (5 µg/mL, ab3478 abcam®) or primary monoclonal rabbit antibody to HSD3B1 (3 µg/mL, ab167417 abcam®) and primary monoclonal mouse antibody to desmoplakin (5 µg/mL, ab16434 abcam®), prepared in PBS 1X with BSA 1%-Tween 0,1%. They were then incubated for 1 h at room temperature and protected from light, with secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (1/500, A-11008 LifeTechnologies) and secondary goat antimouse antibody conjugated with Alexa Fluor 546 (1/500, A-11003 LifeTechnologies) diluted in PBS 1X with BSA 1%-Tween 0,1%. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted in PBS 1X for 10 min at room temperature and protected from light. Samples were conserved in mounted-medium and pictures were taken using a BX60 epifluorescence microscope (Olympus) equipped with a 40X oil objective (Olympus 1.00), an ultrahigh-vacuum mercury lamp and a Hamamatsu camera (C4742-95). Pictures were analyzed with VisionStage Orca® software (v 1.6), associated with Hamamatsu camera. The « control immunoglobulin without antigen » conditions were used to select parameters « time of integration of trame » for each antibody concentration. The signal value retained has been selected when no staining is observed. Then, these parameters were conserved to take pictures in the presence of each antibody at 24 h and 72 h of culture. For nuclei staining, fluorescence intensity was selected with « Shutter Electric » and further conserved for all culture conditions. ImageJ® software was used to colorize and merge grey scale pictures. Three different channels: green, red and blue were associated to the grey scale pictures

obtained respectively with Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 546 conjugated antibodies and with DAPI. Adjusting the « color balance » allowed us to optimize the signal-to-background ratio of the different fluorochromes. The value of « color balance » for each channel was conserved for pictures taken at both 24 h and 72 h of culture.

2.3. Mitochondria analysis

Mitochondria were observed at 24 and 72 h of culture with a MitoTracker Red CMXRos (M7512, Invitrogen™), a dye staining active mitochondria in living cells (Ferecatu et al., 2018). Trophoblastic cells were incubated at 24 and 72 h with MitoTracker Red CMXRos (50 nM, diluted in DMEM containing 1% Penicillin-Streptomycin and 1% L-Glutamin) for 45 min at 37 °C. Then, cells were fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% for 20 min at room temperature, protected from light. PFA were neutralized with NH_4Cl (50 mM) for 10 min at room temperature, protected from light. Cells were blocked for 1 h in PBS 1X-1% BSA-Tween 0,1%, protected from light. Cells were first incubated overnight at 4°C, protected from light with primary polyclonal rabbit antibody to desmoplakin (2 µg/mL, ab71690 abcam®) prepared in PBS 1X with BSA 1%-Tween 0,1%. Then incubated for 1 h at room temperature protected from light with secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor® 488 (1/500, A-11008 LifeTechnologies) diluted in PBS 1X with BSA 1%-Tween 0,1%. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted in PBS 1X for 10 min at room temperature and protected from light. Samples were conserved in mounted-medium and pictures were taken with Leica® SP2 confocal microscope. Pictures were analyzed with Fiji® software. The Fiji® software is used to colorize and merge grey scale pictures obtained from Leica® SP2 confocal microscope. Three different channels: green, red and blue were associated to grey scale pictures obtained respectively with Alexa Fluor 488 conjugated antibody, with MitoTracker Red CMXRos and with DAPI. The pictures of « conditions without MitoTracker Red CMXRos » were used to adjust « color balance » in order to obtain no red signal. These « color balance » value was conserved to adjust « color balance » of pictures of « conditions with MitoTracker Red CMX Ros ». Adjusting « color balance » of other channels allowed us to optimize the signal-to-background ratio. These values of « color balance » for each channel were conserved for picture of each condition.

2.4. Real-time PCR

Total RNA was purified from cultured VCT and ST on RNeasy Mini Kit columns (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription (500 ng total RNA) was performed using Superscript III (200 U) (Invitrogen) with random primer (3 µg), dNTP (0,5mM of each dNTP), RNase Out (40 U) and DTT (0,5mM in final). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was carried

out on a StepOne instrument (Applied Biosystems) thanks to qPCR MasterMix Plus for SYBR® Green I w/fluorescein kit (Eurogentec) with cDNA diluted 1/5 in RNase-DNase free H2O, forward and reverse primers (100 nM) and MasterMix 2X buffer. Normalization of the results was based on the use of 18S, RPL0, SDHA and HPRT as endogenous controls. Used primers are described in *Table 1*.

Target mRNA	Gene name	Sequence
MLN64	*STARD3*	Forward GAGCGATGGTATCTTGCCGC Reverse CTGCAAAGGATTCTGGGGGT
P450SCC	*CYP11A1*	Forward TTTTTGCCCCTGTTGGATGCA Reverse CCCTGGCGCTCCCCAAAAAT
HSD3B1	*HSD3B1*	Forward AGTACGTCCACTCTTCTGTCCA Reverse TTCTCCTTCACCAAGAGGCG

Table 1. Primer data used for RT-qPCR analysis.

2.5. Hormones immuno assays

Total hCG and P4 concentrations were determined in supernatants after 24 and 72 h of culture using ECLIA immuno-assay (Liaison®, DiaSorin). Measuring ranges of both assays were respectively of 1.5‑10 000 UI/L and of 0.7‑190 nmol/L. Between assay precision illustrated by the coefficient of variation (CV %) were respectively < 5% and< 11%. Detection limits were respectively of 0.3 UI/L and 0.4 nmol/L.

2.6. Progestins profile of secretion determination by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) (Giton et al., 2015)

-Reagents: Progesterone (P4), 17-hydroxyprogesterone (17OHP4) and pregnenolone (P5) were assayed simultaneously after extraction and derivatization as previously described (Giton et al., 2015). One ng of deuterated internal standard of Δ4-androstenedione-d7 and progesterone-d9 were added to each supernatant samples (CDN Isotopes, Inc., Point-Claire, Quebec, Canada) before extraction.

-Plasma sample extraction and purification: Briefly, each sample (1 mL of culture medium sample, calibration standards and quality controls) was collected in borosilicate tube (Kimble, DURAN Group, USA). A volume of 50 µL of a solution of deuterated internal standard steroids and of 3 mL of 1-Chlorobutane were added. After mixing, samples were centrifugated at 3000 g for 10 min at 20 °C.

Organic phase was deposited on silica columns (c18, SPE 500 mg/3 mL, Fischer Scientific, USA), previously activated and conditioned successively with 2.5 mL of ethyl acetate, 2.5 mL of hexane and 2.5 mL of 1-Chlorobutane. After sample deposition, columns were washed with (3×2 mL) of ethyl acetate/hexane solution (ratio 1:9). Steroids fraction was then eluted with (2×2 mL) of ethyl acetate/hexane solution (ratio 1:1). Solvents were further evaporated to dryness at 60 °C and the dry residue was then dissolved again in 200 µL of ethyl acetate before derivatization reaction.

-Derivatization reaction: After azote evaporation, steroids fraction was derivatized with 50 µL of heptafluorobutyric anhydrous (HFBA, Regis Technologies, USA)/acetone anhydrous solution (ratio 1:1) for 1 h at room temperature.

-GC-MS/MS analysis: The resulting derivatized extracts were reconstituted in hexane, and then transferred into conical vials for injection into the GC system (Waters, Milford, Mass., USA). Steroids were analyzed by a GC-MS/MS TQ8040 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Japan), equipped with an electron impact source (EI), using a 5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane ZB-5MSi (30m×0.25 mm, internal diameter, 0.25 µm film thickness, Phenomenex, Torrance, California, USA) chromatography column with helium vector gaz (MESSER, Germany). Two transitions (m/z values) were determined by steroid molecule, the most intense fragment ion being used for quantification and the second one being used as confirming ion. Thus, transitions 465.20 > 109.10/465.20, 510.25 > 510.25/147.20 and 298.30 > 213.30/145.10 were respectively monitored for analysis of the 3 steroid molecules 17-OHP4, P4 and P5 (molecular ion > quantifying ion/confirming ion). Data were processed using GC-MS/MS browser software (V 4.2). Linearity of each steroid measurement method was confirmed by plotting the response ratio (peak area) of the steroid molecule/internal standard (IS) to the known concentration of steroid for each calibration standard.

2.7. Western blots

Total proteins were isolated from VCT and ST using commercial reagents (Lysis Buffer, Invitrogen™ ; Carlsbad, California, USA). Proteins (20 µg) were loaded on 4‑15% gradient gel (Mini-PROTEAN® TGX ™ Precast Gels, BIORAD®; Hercules, California, USA) and the resulting proteins blots were probed with polyclonal rabbit anti-MLN64 (1 µg/mL, ab3478 abcam®), polyclonal rabbit anti-P450SCC (1 µg/mL, ab75497 abcam®), monoclonal rabbit anti-HSD3B1 (0,18 µg/mL, ab167417 abcam®) or monoclonal mouse anti-actin (0,2 µg/mL, A5441 Sigma-Aldrich) antibodies. Actin was used as loading control. Addition of secondary goat anti-mouse antibody conjugated with DyLight 680 (1/15 000, #35518 Thermo Fisher Scientific) or secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with DyLight800 4X PEG

(1/15 000, SA5-35571 Thermo Fischer Scientific) allowed blots revelation using Odyssey infrared fluorescent system (LI-COR, France).

2.8. Data analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software package ® (California, USA). Results are expressed as crude values or mean +/- SD. Significant differences ($p < 0,05$) were identified using non parametric student *t*-test (n=5 ou 6).

3. Results

3.1. In vitro differentiation of the placental villous trophoblast

Isolated VCT spontaneously aggregated after 24 h‑48 h of culture and then fused to form a ST after 72 h of culture as assessed by the decrease of desmoplakin involved in intercellular junctions between different nuclei (Fig. 1).

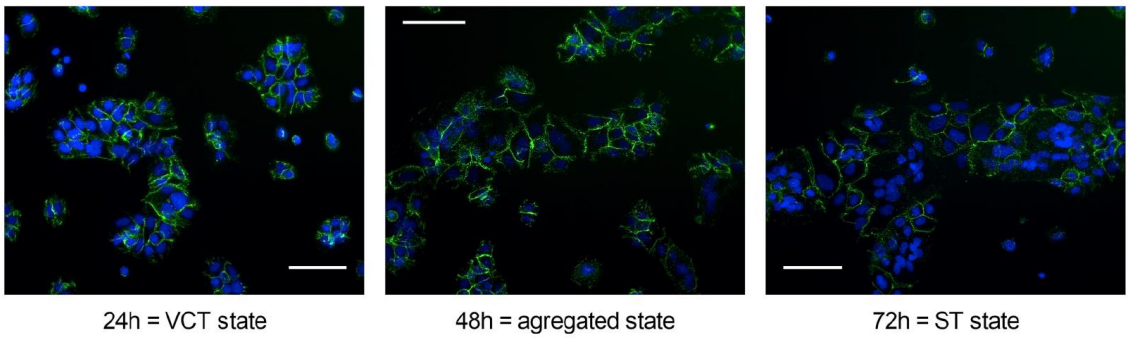


Fig.1. Differentiation of VCTs into ST. *Immunofluorescent pictures of trophoblastic cells after 24 h, 48 h and 72 h of primary VCT cells culture from human term placenta. Plasma membranes were immunostained with anti-desmoplakin (green). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2 phenylindole (DAPI). 400X magnification. Scale bar = 50 µm.*

In freshly isolated VCT, most of the mitochondria were intact, being stained by the CMX Ros probe and organized in a tubular network (Fig. 2). In contrast, in ST, less mitochondria were stained by the CMX Ros probe and their network seemed more fragmented with a punctiform aspect.

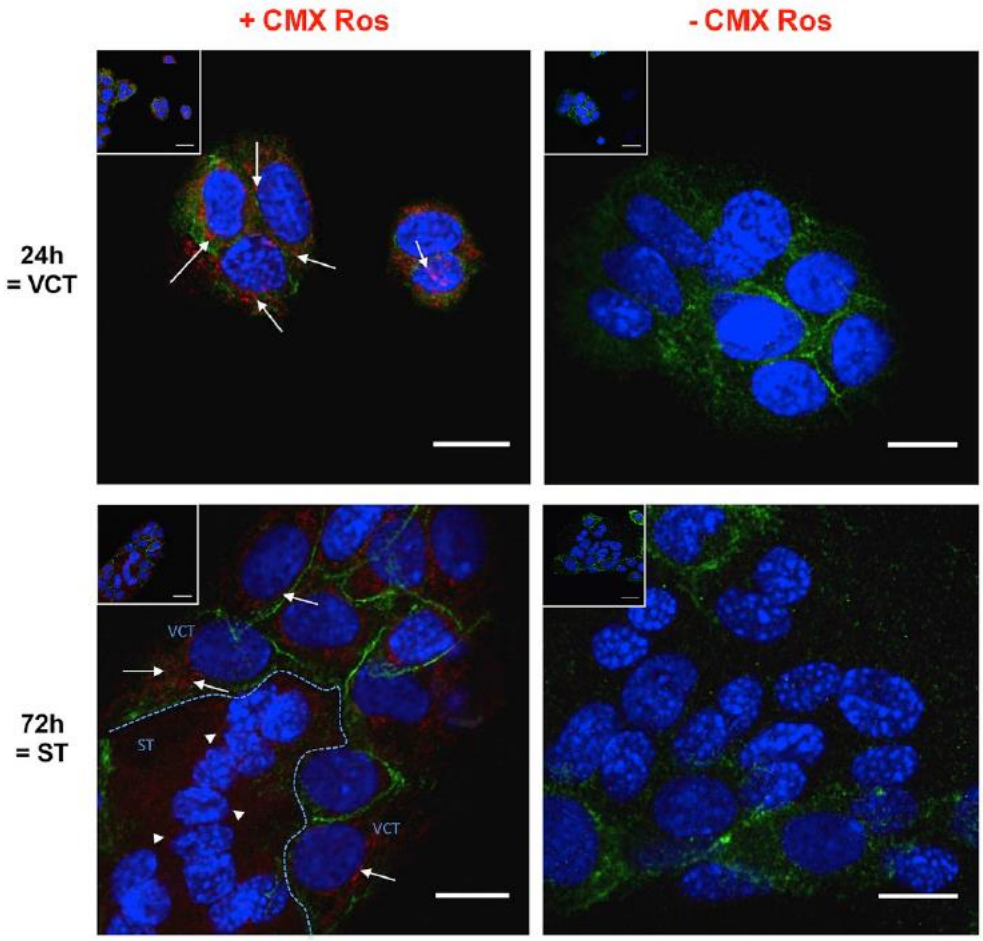


Fig. 2. Mitochondria and Trophoblastic Differentiation. *Immunofluorescent pictures of trophoblastic cells after 24 h and 72 h of primary VCT cells culture from human term placenta. Cells were incubated with or without CMX Ros (50 nM) for 45 min at 37°C protected from light. Mitochondria with intact transmembrane potential were stained in red and indicated with white arrow. Plasma membranes were immunostained with anti-desmoplakin antibody (green) after cell fixation with paraformaldehyde (PFA). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue). 800X magnification for picture at upper left (scale bar = 20 µm). Zoom in X2 for principal picture (scale bar = 10 µm).*

3.2. Secretion of P4 and hCG during the VCT differentiation

Morphological differentiation of VCT into ST was associated with a functional trophoblastic differentiation. Indeed, isolated VCTs carried on an endocrine activity secreting not only hCG but also P4 at low levels, respectively 7,7 +/- 1,6 UI/L and 26,9 +/- 17,1 nmol/L (Fig. 3A and 3B). ST formation was associated with a significant increase in both P4 and hCG secretion by respectively 8,5 folds and 25 folds. There was a positive correlation between P4 and hCG secretion (log P4 = 0,6361 log hCG + 0,9413; R2=0,7; Pearson coefficient=0,82 ; $p=5.10^{-14}$) (Fig. 3C).

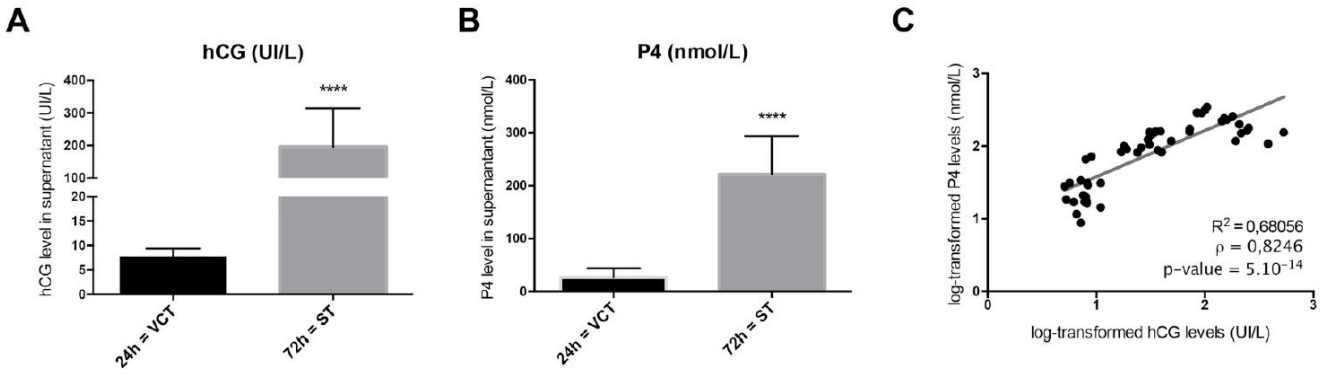


Fig. 3. Secretions of hCG and P4 during VCT differentiation into ST. *hCG (UI/L)* ***(A)*** *and progesterone (P4) (nmol/L)* ***(B)*** *levels in culture supernatants from primary VCT cells culture from human term placenta after 24 h or 72 h of culture. Concentrations were determined by immuno-assays (Liaison®, DiaSorin). Data are presented as mean +/- SD from eleven independent experiments. ****: p < 0,0001 VS 24 h. Fig. 3C represents the correlation between Progesterone (P4) and hCG levels. Correlation was assessed by Pearson correlation test (ρ).*

3.3. Progestins profile of secretion

GC-MS/MS analysis confirmed our findings on P4. Indeed, GC-MS/MS allowed us to fully characterize progestins trophoblastic secretion profile (Fig. 4A). P4 was the main progestin secreted in both VCT and ST. Among steroidogenic precursors and metabolites, we observed a significant increase in P5 secretion by 5,7 folds ($p < 0,05$) during the formation of ST whereas 17-OHP4 remained undetectable in both VCT and ST (Fig. 4B). These findings pointed out a global increase in the trophoblastic progestins pathway accompanying ST formation. P5 levels were not correlated neither with P4 nor with hCG levels (data not shown).

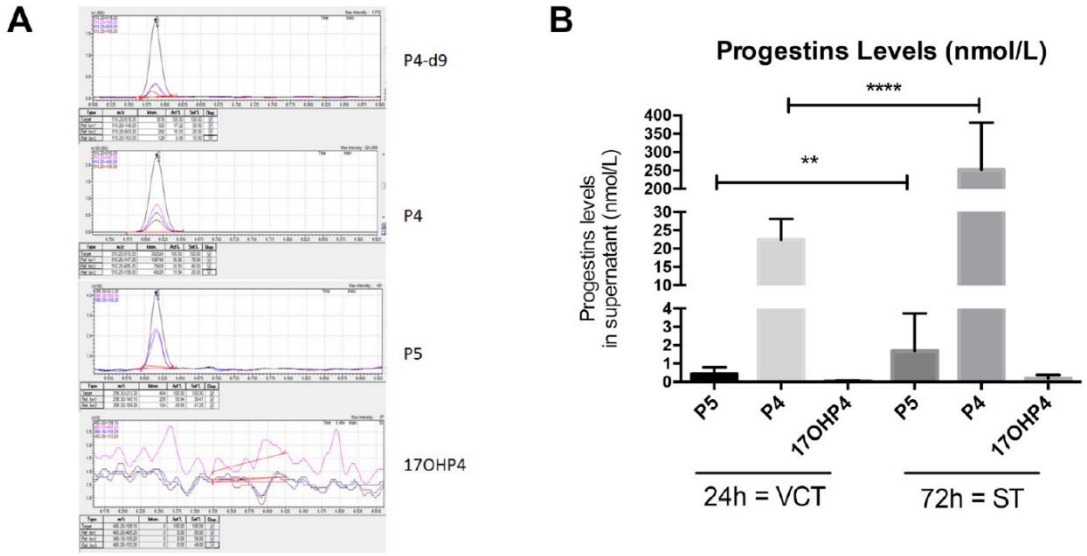


Fig. 4. Progestins trophoblastic secretion profile during VCT differentiation into ST*. A) Steroid profile of deuterated Progesterone (P4-d9), Progesterone (P4), Pregnenolone (P5) and 17-hydroxyprogesterone (17OHP4). B) Pregnenolone (P5), Progesterone (P4) and 17-hydroxyprogesterone (17OHP4) levels (nmol/L) in culture supernatant from primary cell culture of VCT (24 h) and during ST differentiation (72 h). P5, P4 and 17OHP4 levels were measured using gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Data are presented as mean +/- SD from eleven independent experiments. *: p < 0,05, ****: p < 0,001 VS 24 h.*

3.4. Expression of transporters and enzymes involved in P4 production

We investigated each step of progestins secretion, i.e expression of the cholesterol mitochondrial transporter (MLN64) and of steroidogenic enzymes (P450SCC and HSD3B1). Immunocytofluorescence showed that MLN64, P450SCC and HSD3B1 were expressed in the cytoplasm of both VCT and ST (Fig. 5). As expected, no staining was observed in the nuclei but a weak staining was observed in the perinuclear region.

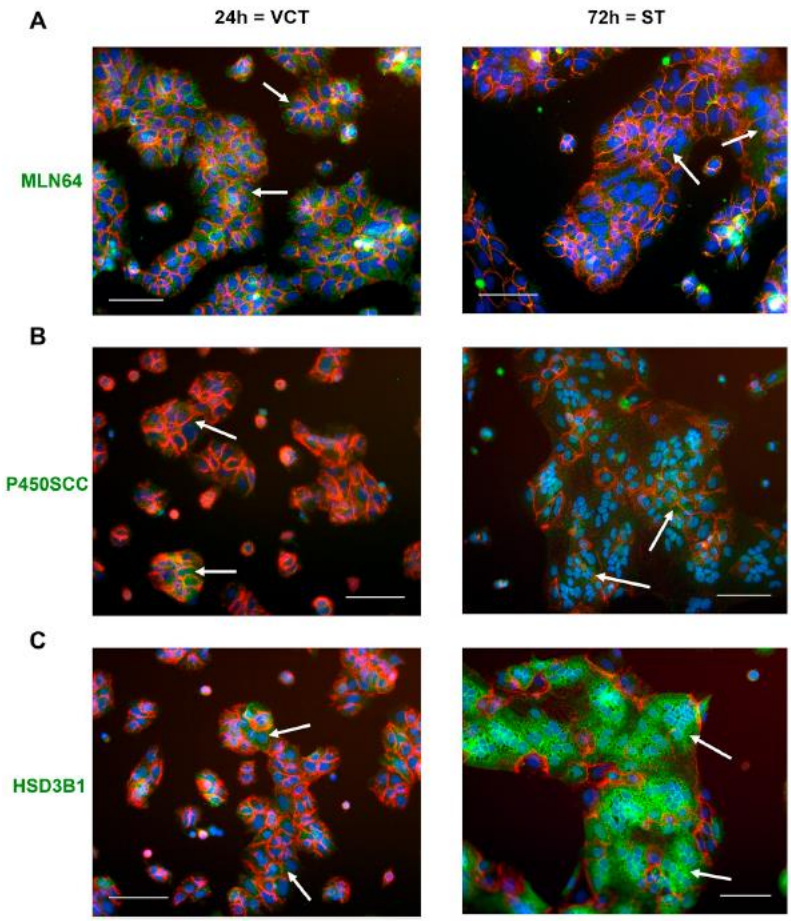


Fig. 5. Localization of MLN64 transporter and P450SCC and HSD3B1 enzymes in VCT and ST. *Immunocytofluorescent pictures of trophoblastic cells after 24 h and 72 h of primary VCT cells culture from human term placenta. Cells were immunostained with anti-MLN64 (A, green), anti-P450SCC (B, green) and anti-HSD3B1 (C, green). Plasma membranes were immunostained with anti-desmoplakine antibody (A, B and C, red). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, A, B and C, blue). 400× magnification. Scale bar = 50 µm.*

Western blot analysis showed that MLN64, P450SCC and HSD3B1 were expressed at the protein level in both VCT and ST (Fig. 6). During ST formation, expression of HSD3B1 significantly increased by 4,1 +/- 1,9 folds while MLN64 and P450SCC protein expression did not change.

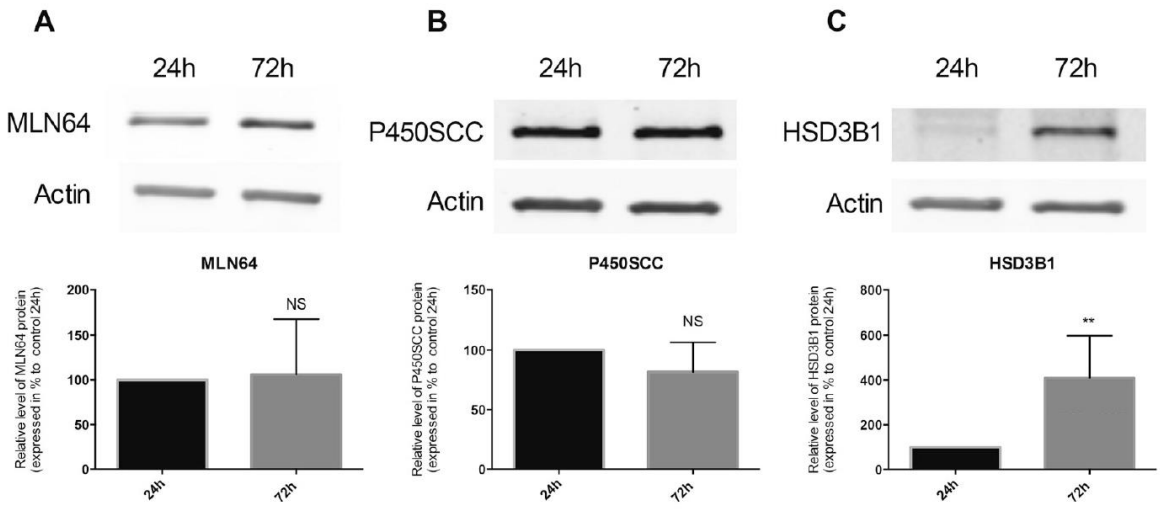


Fig. 6. Protein expression of MLN64 transporter and P450SCC and HSD3B1 enzymes involved in progesterone synthesis in VCT and ST*. Human VCTs were isolated from term placenta and then kept in culture for 24 or 72 h. MLN64 (A), P450SCC (B) and HSD3B1 (C) protein expressions were determined using immunoblotting with anti-MLN64, anti-P450SCC and anti-HSD3B1 antibodies. Actin protein expression was determined with anti-actin antibody, used as loading control. Lanes intensity was measured with ImageJ program. Data are presented as percentage of the 24 h control and are expressed as mean +/- SD from five independent experiments. NS: not significant; *: p < 0,05; ***: p < 0,001 VS 24 h two-tailed paired t-test.*

RT-qPCR experiments demonstrated that MLN64, P450SCC and HSD3B1 were expressed at mRNA level in both VCT and ST (Fig. 7). Confirming the results obtained at the protein level, HSD3B1 mRNA increased significantly by 2,5 +/- 0,8 folds during ST formation while MLN64 and P450SCC mRNA levels did not change during VCT differentiation.

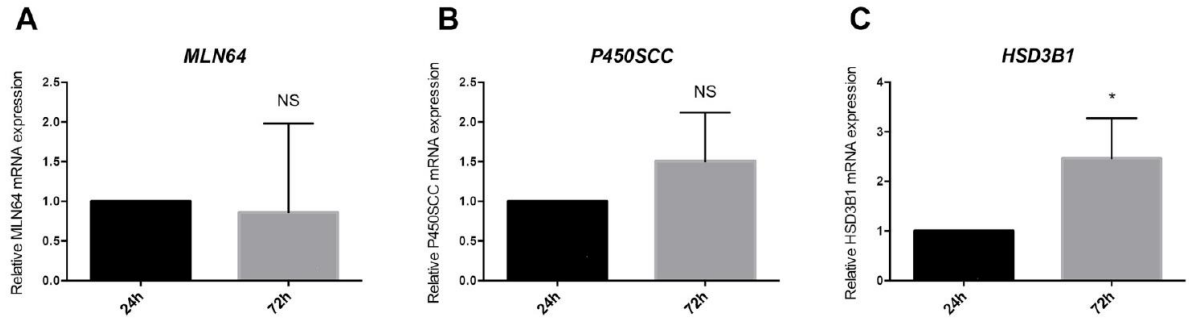


Fig. 7. mRNA expression of MLN64 transporter and P450SCC and HSD3B1 enzymes in VCT and ST. *Human VCTs were isolated from term placenta and kept in culture for 24 or 72 h. MLN64 (A), P450SCC (B) and HSD3B1 (C) mRNA expressions were determined using real-time quantitative PCR method and were normalized using 18S, RPLO, HPRT and SDHA mRNA expressions. Data are presented as mRNA expression ratio to the 24 h control and are expressed as mean +/- SD from four independent experiments. NS: not significant; *: p < 0,05 VS 24 h, two-tailed paired t-test.*

3.5. Modulation of VCT differentiation and progestins pathway under FSK

Forskolin (FSK), an adenylate cyclase activator was used to stimulate VCT differentiation. As expected, FSK drastically stimulated hCG secretion by 3,5 folds after 6 h of incubation and by 5,1 folds after 48 h of stimulation (Fig. 8A). Furthermore, FSK induced an increase in P4 secretion but to a smaller extend (1,5 folds, $p < 0,05$) and also in P5 secretion by 1,5 folds- P4 and P5 concentrations being assessed by GC-MS/MS. The increase in P4 secretion became significant after 72 h of culture and 48 h of incubation with FSK (Fig. 8B and C). Under FSK stimulation, P4 increase was positively correlated with hCG increase as demonstrated by Pearson correlation test (Log P4 = 0,3665 × Log hCG + 1,2837 ; R2=0,78 ; Pearson Coefficient=0,86; $p=1,96.10^{-7}$) (Fig. 8D).

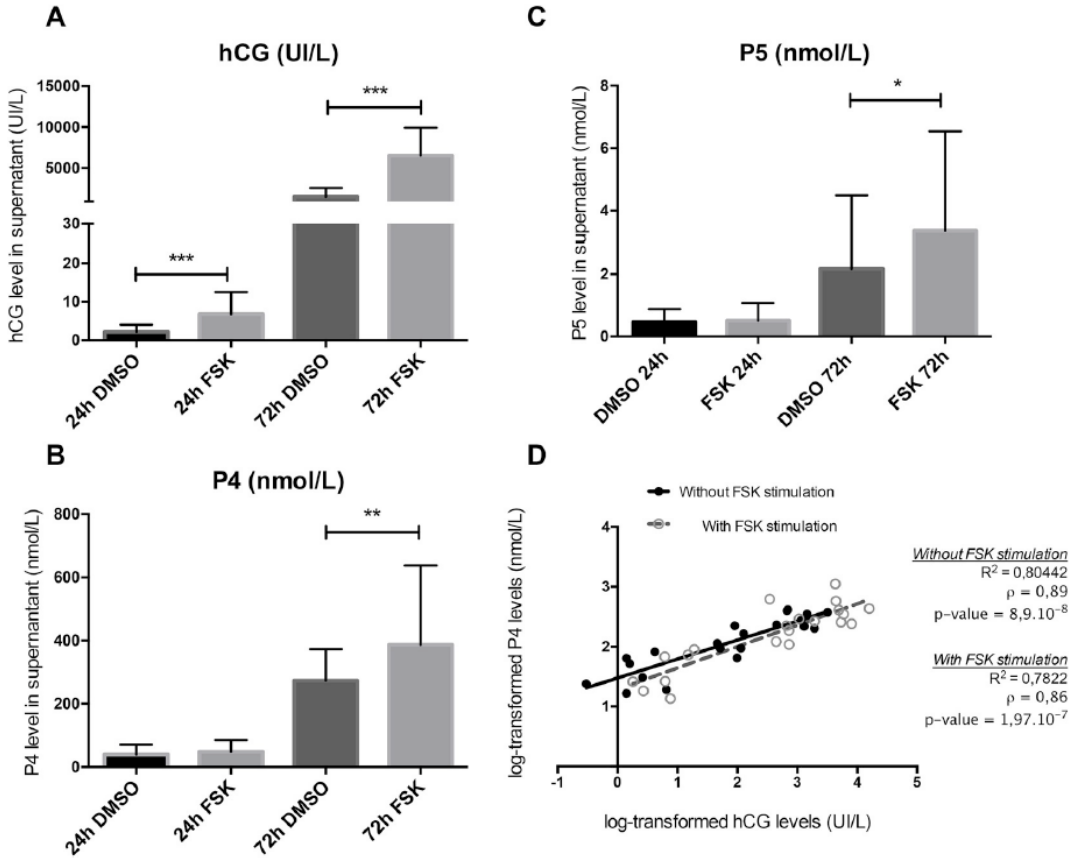


Fig. 8. Secretions of hCG, P4 and Pregnenolone under FSK stimulation. *hCG (UI/L) (A), Progesterone (P4) (nmol/L) (B) and Pregnenolone (P5) (nmol/L) (C) levels in culture supernatants from primary cell culture of VCT incubated with or without FSK (10 µM) after 24 h or 72 h of culture. DMSO is used as vehicle control of FSK. hCG concentrations were measured using immuno-assay (Liaison®, DiaSorin). P4 and P5 levels were determined using mass spectrometry (GC-MS/MS). Data are presented as mean +/- SD from seven independent experiments. *: p < 0,05 in comparison to DMSO control at the same culture time. Fig. 8. D represents the correlation between Progesterone (P4) and hCG levels with or without FSK stimulation. Correlation was assessed by Pearson correlation test (ρ).*

FSK stimulated the expression of all the partners but only at the proteic level (Fig. 9). After 72 h of culture and 48 h of incubation with FSK, protein levels of MLN64, P450SCC and HSD3B1 were respectively increased by 2,1 folds, 1,8 folds and 1,2 folds in comparison to 48 h incubation with DMSO.

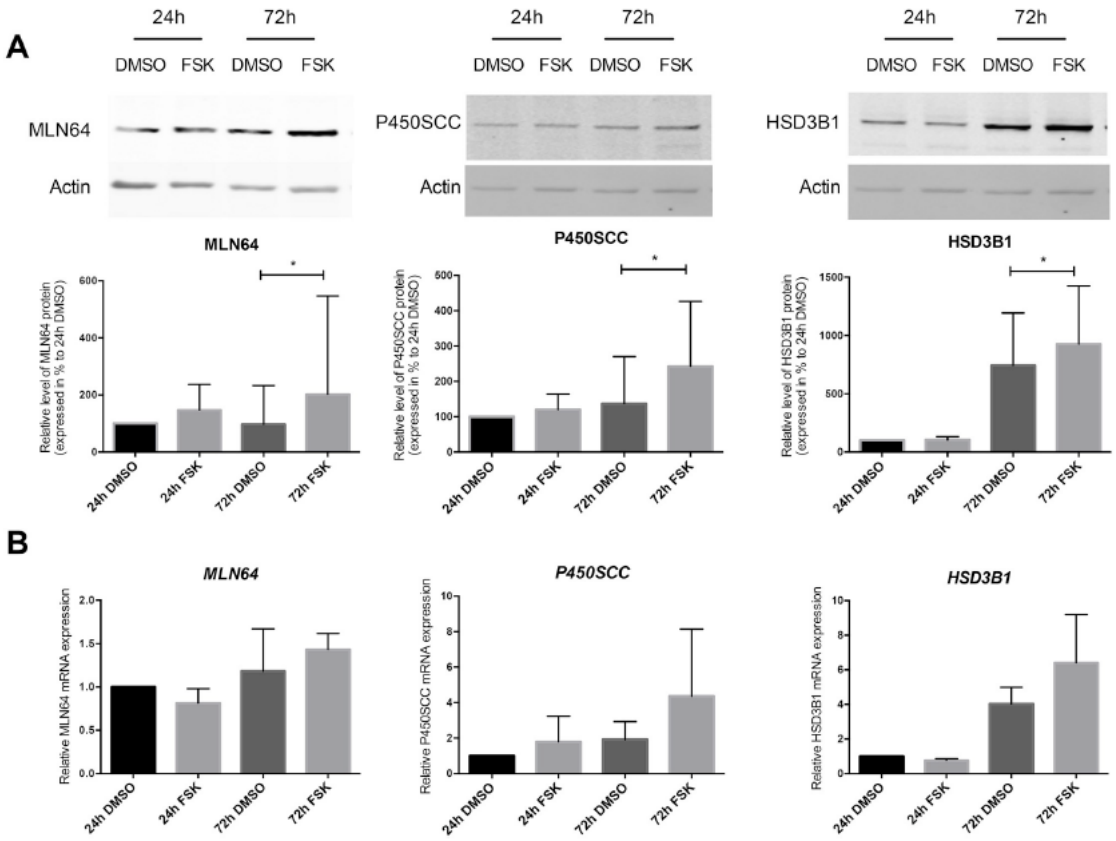


Fig. 9. Expression of MLN64transporter and P450SCC and HSD3B1 enzymes under FSK stimulation. *Human VCTs were isolated from term placenta and then cultivated for 24 or 72 h with or without FSK (10 µM). (A) MLN64, P450SC and HSD3B1 protein expressions of were determined using immunoblotting with anti-MLN64, anti-P450SCC and anti-HSD3B1 antibodies. Actin protein expression was determined with anti-actin antibody, used as loading control. Lanes intensity was measured with ImageJ program. Data are presented as percentage of the 24 h control DMSO and are expressed as mean +/- SD from six independent experiments. NS: not significant; *: p < 0,05 in comparison to DMSO at the same time of culture, two-tailed paired t-test. (B) MLN64, P450SCC and HSD3B1 mRNA expressions were determined using real-time quantitative PCR method and were normalized using 18S, RPLO, HPRT and SDHA mRNA expressions. Data are presented as mRNA expression ratio to the 24 h control DMSO and are expressed as mean +/- SD from four independent experiments. NS: not significant in comparison to DMSO at the same culture time, two-tailed paired t-test.*

4. Discussion

For many years, ST has been considered as the only endocrine tissue of the human placenta secreting both protein hormones such as hCG, and steroidogenic hormones such as P4 in maternal circulation (Miller, 1998; Guibourdenche et al., 2009; Bernischke et al., 2012; Chatuphonprasert et al., 2018). However, we had previously shown that this endocrine production is not restricted to ST as hCG is also produced by VCT and even by the extravillous cytotrophoblast (EVCT) (Handschuh et al., 2007). In this work, we aimed to investigate progestins production by the VCT *in vitro,* using new tools such as mass spectrometry.

In our *in vitro* culture model, VCTs isolated from human placenta aggregate and fuse to form ST within 72 h of culture mimicking their *in vivo* physiological differentiation (Kliman et al., 1986; Alsat et al., 1993). This morphological differentiation is associated with a functional differentiation as stated by the significant increase in hCG secretion (Kudo et al., 2003; Leguy et al., 2014). In this work, we showed that VCT secretes significant amounts of P4 increasing as it turns into ST. We confirmed that ST is a major source of P4 *in vitro* (Zosmer et al., 1997; Tuckey, 2005). Interestingly, we showed that this increase in steroidogenesis is not restricted to P4, as P5 is also secreted.

Like in ovaries and adrenals, progestins production requires cholesterol as initial substrate (Winkel et al., 1981; Miller and Auchus, 2011). As human placenta does not synthetize cholesterol, ST catches maternal cholesterol carried by LDL and HDL in maternal circulation (Winkel et al., 1980; Palinski, 2009; Chatuphonprasert et al., 2018). Thus, cholesterol availability can be a limiting factor of steroidogenesis. The stability of cholesterol levels in our culture medium all along culture duration (data not shown) ruled out this possibility. This observation is in line with previous studies showing that placental mitochondria are able to synthesize P4 without addition of exogenous cholesterol in culture medium (Martinez et al., 1997, 2015). Cholesterol has then to enter the mitochondria to undergo the first step of the cascade of reactions leading to progestins production (Miller and Auchus, 2011; Miller, 2013). We showed that *in vitro*, mitochondria functionality and organization changes with ST formation using CMX Ros staining. Indeed, in VCT, most of the mitochondria have an intact transmembrane potential and are organized in tubular network. In contrast, in ST, few mitochondria are stained by CMX Ros and mitochondrial network seems to be fragmented. Our results are in favor of an alteration of mitochondrial membrane potential during VCT differentiation in agreement with previous studies (De Los Rios Castillo et al., 2011; Bustamante et al., 2014). Thus, we showed that mitochondrial network morphology, harboring either typical lamellar or tubular or vesicular aspect, is coupled with endocrine activity VCT differentiation.

In contrast with other endocrine steroidogenic tissues, human placental mitochondria do not express StAR, the common transporter of cholesterol (Tuckey, 2005), this function being ensured by MLN64 (Bose et al., 2000; Olvera-Sanchez et al., 2011). Our study shows that MLN64 is not only expressed in ST but also in VCT and at the same level. The increase in P4 secretion observed during ST formation is not associated with an increase in MLN64, suggesting that cholesterol entry in the mitochondria is not a limiting step of P4 synthesis. Indeed, it has been shown *in vitro* that a decrease in MLN64 expression by 90% is responsible for a decrease in P4 synthesis of only 30% (Charman et al., 2010). Then, we focused on two major enzymes known to be expressed in placenta and involved in cholesterol transformation into P4 (Tuckey et al., 1994; Pasqualini, 2005; Chatuphonprasert et al., 2018). Cholesterol is converted into P5 by P450SCC type 1 (CYP11A1) and P5 is then converted in P4 by HSD3B type 1. We showed at both mRNA and protein levels that those two enzymes are not only expressed in ST but also in VCT. HSD3B1 expression significantly increases during VCT differentiation into ST while P450SCC expression remains stable. This is in contradiction with a previous study that described an increase in P450SCC concentration in human placenta during gestation (Simpson and Miller, 1978). However, this increase probably only reflected the growth of placental mass as P450SCC concentration in trophoblast only represented 20% of the concentration measured in placental homogenate (Tuckey et al., 1994). The increase in P4 production concomitant with the stability of MLN64 and P450SCC expressions, suggests a lack of saturation of both MLN64 transporter and steroidogenic enzymes. This is important since the degree of P450SCC saturation with cholesterol may limit P4 synthesis as observed in choriocarcinoma cell lines (Martinez et al., 1997). The increase in HSD3B1 expression could explain the discrepancy between the drastic increase in P4 and the small increase in P5 on our MS profile, P5 being quickly converted in P4. Indeed, it has previously been shown that HSD3B1 activity is higher than P450SCC activity, thus not representing a rate-limiting step in P4 synthesis (Tuckey, 2005). The absence of any detectable 17OHP4 on this steroids profile also confirms the lack of CYP17A1 expression in the trophoblast (Voutilainen and Miller, 1986).

As the differentiation of VCT into ST is associated with an increased secretion of P4, we investigated the link between this morphological differentiation and steroidogenesis. Regulation of this fusion process and of steroidogenesis is complex involving both hormones and their second messengers (Stocco et al., 2005; Gauster and Huppertz, 2008; Gauster et al., 2009). Among them, cAMP produced by adenylate cyclase (AC) is known to induce VCT fusion, and also to regulate steroidogenic tissues activity (Azar et al., 2018). cAMP has pleiotropic effects such as PKA activation, leading to the phosphorylation of proteins such as SF-1 and CREB. We used forskolin (FSK), an AC/PKA pathway activator stimulating VCT differentiation and fusion (Wice et al., 1990). FSK stimulation induced an increase in the secretion of all hormones (i.e. hCG, P5, P4) and in the expression of MLN64, HSD3B1,

P450SCC, suggesting a relationship between fusion and steroidogenesis. Indeed, in choriocarcinoma cell lines, cAMP analogs increase P4 synthesis while PKA inhibitors decrease P4 synthesis and increase mitochondrial proteins phosphorylation (Maldonado-Mercado et al., 2008). However, cAMP modifies neither P4 synthesis nor protein phosphorylation in normal placental mitochondria (Gomez-Chang et al., 2014). In fact, several isoforms of AC can be expressed and differentially regulated in choriocarcinoma cells and normal placenta (Bernatchez et al., 2003). Several proteins being critical for this fusion process, such as syncytins, can be modulated by cAMP/PKA pathway (Gerbaud and Pidoux, 2015) and P450SCC and HSD3B1 promoters harbor binding sites for CRE (Simard et al., 2005; Shih et al., 2011).

The positive correlation between hCG and P4 increase suggests a potential implication of hCG which plays a key role in trophoblast fusion and functions (Saleh et al., 2007; Guibourdenche et al., 2009). BeWo cells are responsive to signals inducing cell fusion and FSK or 8-br-cAMP are known to enhance ST formation and hormonal differentiation (Wice et al., 1990; Orendi et al., 2010; Rothbauer et al., 2017; Azar et al., 2018). hCG addition in BeWo cells culture medium increased P4 synthesis through PKA pathway (Manna et al., 2006). This suggests that placental steroidogenesis could be regulated by hCG and its receptors, whose expression changes between VCT and ST states (Weedon-Fekjaer and Tasken, 2012). P4 and its receptors could also be involved in the same way. In Bewo cells, syncytialisation is associated with changes in P4 receptors expression which is globally decreased by FSK (Zachariades et al., 2012). Other hormones could be implied and a paracrine regulation is also possible via Aldo Keto Reductase (AKR) (Pepe and Albrecht, 1999; Byrns, 2012). P4 production by human placenta occurs in the villous tissue since VCT stage. VCT functions and differentiation are complex involving both hCG and cAMP. Further investigations would be required as these pathways can be altered in pathological pregnancies or by endocrine disruptors (Byrns, 2014; Berkane et al., 2018; Shan et al., 2019).

Acknowledgments

This work was supported by PRINCEPS and ANRS (PhD Grant n°17198) (Paris, France). The authors thank Dr Jeanne Sibiude, the consenting patients and the clinical staff midwives of Cochin Port-Royal, Antony, Beaujon and Montsouris hospitals for providing placental tissues, and Cellular and Molecular Imaging facility, (INSERM UMS 025 – CNRS UMS 3612, Faculty of Pharmacy of Paris, Paris Descartes University, France).

References

Alsat, E., Haziza, J., Evain-Brion, D., 1993. Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human trophoblast cells in culture. J. Cell. Physiol. 154, 122–128.

Azar, C., Valentine, M., Trausch-Azar, J., Druley, T., Michael Nelson, D., Schwartz, A.L., 2018. RNA-Seq identifies genes whose proteins are transformative in the differentiation of cytotrophoblast to syncytiotrophoblast, in human primary villous and BeWo trophoblasts. Sci. Rep. 8, 5142. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23379-2.

Benirschke, K., Burton, G., Baergen, R., 2012. In: heidelberg, Bernischke K. (Ed.), Pathology of the Human Placenta. Springer doi10.1007.

Berkane, N., Liere, P., Lefevre, G., Alfaidy, N., Nahed, R.A., Vincent, J., Oudinet, J.P., Pianos, A., Cambourg, A., Rozenberg, P., Galichon, P., Rousseau, A., Simon, T., Schumacher, M., Chabbert-Buffet, N., Hertig, A., 2018. Abnormal steroidogenesis and aromatase activity in preeclampsia. Placenta 69, 40–49. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.07.004.

Bernatchez, R., Belkacemi, L., Rassart, E., Daoud, G., Simoneau, L., Lafond, J., 2003. Differential expression of membrane and soluble adenylyl cyclase isoforms in cytotrophoblast cells and syncytiotrophoblasts of human placenta. Placenta 24, 648–657.

Bose, H.S., Whittal, R.M., Huang, M.C., Baldwin, M.A., Miller, W.L., 2000. N-218MLN64, a protein with StAR-like steroidogenic activity is folded and cleaved similarly to StAR. Biochemistry 39, 11722–11731.

Bustamante, J., Ramirez-Velez, R., Czerniczyniec, A., Cicerchia, D., Aguilar de Plata, A.C., Lores-Arnaiz, S., 2014. Oxygen metabolism in human placenta mitochondria. J. Bioenerg. Biomembr. 46, 459–469. https://doi.org/10.1007/s10863-014-9572-x.

Byrns, M.C., 2012. Role of aldo-keto reductase enzymes in mediating the timing of parturition. Front. Pharmacol. 2. https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00092.

Byrns, M.C., 2014. Regulation of progesterone signaling during pregnancy: implications for the use of progestins for the prevention of preterm birth. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 139, 173–181. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.01.015.

Cao, S., Ye, L., Wu, Y., Mao, B., Chen, L., Wang, X., Huang, P., Su, Y., Ge, R.S., 2017. The effects of fungicides on human 3b-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and aromatase in human placental cell line JEG-3. Pharmacology 100, 139–147. https://doi.org/10.1159/000475531.

Charman, M., Kennedy, B.E., Osborne, N., Karten, B., 2010. MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick type C1 protein. JLR (J. Lipid Res.) 51, 1023‑1034. https://doi.org/10.1194/jlr.M002345.

Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K., Ellinger, I., 2018. Physiology and pathophysiology of steroid biosynthesis, transport and metabolism in the human placenta. Front. Pharmacol. 9, 1027. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01027.

De Los Rios Castillo, D., Zarco-Zavala, M., Olvera-Sanchez, S., Pardo, J.P., Juarez, O., Martinez, F., Mendoza-Hernandez, G., Garcia-Trejo, J.J., Flores-Herrera, O., 2011. Atypical cristae morphology of human syncytiotrophoblast mitochondria: role for complex V. J. Biol. Chem. 286, 23911‑23919. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252056.

Feng, Y., Zhang, P., Zhang, Z., Shi, J., Jiao, Z., Shao, B., 2016. Endocrine Disrupting Effects of Triclosan on the Placenta in Pregnant Rats. Plos One 11, e0154758. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154758.

Ferecatu, I., Canal, F., Fabbri, L., Mazure, N.M., Bouton, C., Golinelli-Cohen, M.P., 2018. Dysfunction in the mitochondrial Fe-S assembly machinery leads to formation of the chemoresistant truncated VDAC1 isoform without HIF-1 α activation. PLoS One 13, e0194782. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194782.

Forte, M., Mita, L., Cobellis, L., Merafina, V., Specchio, R., Rossi, S., Mita, D.G., Mosca, L., Castaldi, M.A., De Falco, M., Laforgia, V., Crispi, S., 2016. Triclosan and bisphenol a affect decidualization of human endometrial stromal cells. Mol. Cell. Endocrinol. 422, 74‑83. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.11.017.

Gauster, M., Huppertz, B., 2008. Fusion of cytotrophoblast with syncytiotrophoblast in the human placenta : factors involved in syncytialization. J. Reprod. Med. Endocrinol. 5, 76‑82.

Gauster, M., Moser, G., Orendi, K., Huppertz, B., 2009. Factors involved in regulating trophoblast fusion : potential role in the development of preeclampsia. Placenta 30, S49‑S54. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.10.011.

Gerbaud, P., Pidoux, G., 2015. An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. Placenta 29, S35‑S42. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.12.015.

Giton, F., Trabado, S., Maione, L., Sarfati, J., Le Bouc, Y., Brailly-Tabard, S., Fiet, J., Young, J., 2015. Sex steroids, precursors, and metabolite deficiencies in men with isolated hypogonadotropic

hypogonadism and panhypopituitarism: a GCMS-based comparative study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 100, E292‑E296. https://doi.org/10.1210/jc.2014-2658.

Gomez-Chang, E., Espinosa-Garcia, M.T., Olvera-Sanchez, S., Flores-Herrera, O., Martinez, F., 2014. PKA tightly bound to human placental mitochondria participates in steroidogenesis is not modified by cAMP. Placenta 35, 748‑762. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.06.005.

Guibourdenche, J., Fournier, T., Malassine, A., Evain-Brion, D., 2009. Development and hormonal functions of the human placenta. Folia Histochem. Cytobiol. 47, S35‑S40. https://doi.org/10.2478/v10042-009-0110-3.

Handschuh, K., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., Fournier, T., 2007. Human chrorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. Placenta 28, 175‑184.

Kliman, H.J., Nestler, J.E., Sermasi, E., Sanger, J.M., Strauss, J.F., 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. Endocrinology 118, 1567‑1582.

Kudo, Y., Boyd, C.A., Kimura, H., Cook, P.R., Redman, C.W., Sargent, I.L., 2003. Quantifying the syncytialisation of human placental trophoblast BeWo cells grown in vitro. Biochim. Biophys. Acta 1640, 25‑31.

Legacki, E., Ball, A., Corbin, C., Loux, S., Scoggin, K., Stanley, S., Conley, A., 2017. Equine fetal adrenal, gonadal and placental steroidogenesis. Reproduction 154, 445‑454. https://doi.org/10.1530/REP-17-0239.

Leguy, M.C., Brun, S., Pidoux, G., Salhi, H., Choiset, A., Menet, M.C., Gil, S., Tsatsaris, V., Guibourdenche, J., 2014. Pattern of secretion of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) during pregnancies complicated by fetal aneuploidy, in vivo and in vitro. Reprod. Biol. Endocrinol. 12, 129. https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-129.

Maldonado-Mercado, M.G., Espinosa-Garcia, M.T., Gomez-Concha, C., Monreal-Flores, J., Martinez, F., 2008. Steroidogenesis in Bewo cells: role of protein kinase A and benzodiazepines. Int. J. Biochem. Cell Biol. 40, 901‑908.

Manna, P.R., Chandrala, S.P., Jo, Y., Stocco, D.M., 2006. cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. J. Mol. Endocrinol. 37, 81‑95.

Martinez, F., Kiriakidou, M., Strauss, J.F., 1997. Structural and functional changes in mitochondria associated with trophoblast differentiation: methods to isolate enriched preparations of syncytiotrophoblast mitochondria. Endocrinology 138, 2172‐2183.

Martinez, F., Olvera-Sanchez, S., Esparza-Perusquia, M., Gomez-Chang, E., Flores-Herrera, O., 2015. Multiple functions of syncytiotrophoblast mitochondria. Steroids 103, 11‐22. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.09.006.

Miller, W.L., 1998. Steroid hormone biosynthesis and actions in the materno-feto-placental unit. Clin. Perinatol. 25, 799‐817.

Miller, W.L., 2013. Steroid hormone synthesis in mitochondria. Mol. Cell. Endocrinol. 379, 62‐73. https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.014.

Miller, W.L., Auchus, R.J., 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endocr. Rev. 32, 81‐151. https://doi.org/10.1210/er.2010-0013.

Morel, Y., Roucher, F., Plotton, I., Goursaud, C., Tardy, V., Mallet, D., 2016. Evolution of steroids during pregnancy: maternal, placental and fetal synthesis. Ann. Endocrinol. 77, 82‐89. https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.023.

Olvera-Sanchez, S., Espinosa-Garcia, M.T., Monreal, J., Flores-Herrera, G., Martinez, F., 2011. Mitochondrial heat shock protein participates in placental steroidogenesis. Placenta 32, 222‐229. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.12.018.

Orendi, K., Gauster, M., Moser, G., Meiri, H., Hupperts, B., 2010. The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium specific proteins. Reproduction 140, 759‐766. https://doi.org/10.1530/REP-10-0221.

Palinski, W., 2009. Maternal-fetal cholesterol transport in the placenta: good, bad and target for modulation. Circ. Res. 104, 569‐571. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.

Pasqualini, J.R., 2005. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 97, 401‐415.

Pepe, G.J., Albrecht, E.D., 1999. Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. Steroids 64, 624‐627.

Rothbauer, M., Patel, N., Gondola, H., Siwetz, M., Huppertz, B., Ertl, P., 2017. A comparative study of five physiological key parameters between four different human trophosblast-derived cell lines. Sci. Rep. 7, 5892. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06364-z.

Saleh, L., Prast, J., Haslinger, P., Husslein, P., Helmer, H., Knofler, M., 2007. Effects of different human chorionic gonadotrophin preparations on trophoblast differentiation. Placenta 28, 199–203.

Shan, A., Li, M., Li, X., Yan, M., Chang, Y., Chen, X., Tang, N.J., 2019. BDE-47 decreases progesterone levels in BeWo cells by interfering with mitochondrial functions and genes related to cholesterol transport. Chem. Res. Toxicol. 32, 621–628. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00312.

Shih, M.C., Chiu, Y.N., Hu, M.C., Guo, I.C., Chung, B.C., 2011. Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. Mol. Cell. Endocrinol. 336, 80–84. https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.12.017.

Simard, J., Ricketts, M.L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, A., Melner, M.H., 2005. Molecular biology of the 3-b-hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ5-Δ4 isomerase gene family. Endocr. Rev. 26, 525–582.

Simpson, E.R., Miller, D.A., 1978. Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450, and iron-sulfur protein in human placental mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 190, 800–808.

Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y., Manna, P.R., 2005. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. Mol. Endocrinol. 19, 2647–2659.

Tuckey, R.C., 2005. Progesterone synthesis by the human placenta. Placenta 26, 273–281.

Tuckey, R.C., Kostadinovic, Z., Cameron, K.J., 1994. Cytochrome P450scc activity and substrate supply in human placental trophoblasts. Mol. Cell. Endocrinol. 105, 103–109.

Voutilainen, R., Miller, W.L., 1986. Developmental expression of genes for the stereoidogenic enzymes P450scc (20,22-Desmolase), P450cl7 (17a-Hydroxylase/17,20-Lyase), and P450c21 (21-Hydroxylase) in the human fetus. J. Clin. Endocrinol. Metab. 63, 1145–1150.

Wang, X., Chen, X., Feng, X., Chang, F., Chen, M., Xia, Y., Chen, L., 2015. Triclosan causes spontaneous abortion accompanied by decline of estrogen sulfotranferase activity in humans and mice. Sci. Rep. 5, 18252. https://doi.org/10.1038/srep18252.

Weedon-Fekjaer, M.S., Tasken, K., 2012. Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. Placenta 33, S87–S91. https://doi.org/ 10.1016/j.placenta.2011.11.003.

Wice, B., Menton, D., Geuze, H., Schwartz, A.L., 1990. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. Exp. Cell Res. 186, 306‑316.

Winkel, C.A., Snyder, J.M., MacDonald, P.C., Simpson, E.R., 1980. Regulation of cholesterol and progesterone synthesis in human placental cells in culture by serum lipoproteins. Endocrinology 106, 1054‑1060.

Winkel, C.A., MacDonald, P.C., Hemsell, P.G., Simpson, E.R., 1981. Regulation of cholesterol metabolism by human trophoblastic cells in primary culture. Endocrinology 109, 1084‑1090.

Zachariades, E., Mparmpakas, D., Pang, Y., Rand-Weaver, M., Thomas, P., Karteris, E., 2012. Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour. Placenta 33, 367‑372. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.002.

Zosmer, A., Elder, M.G., Sullivan, M.H.F., 1997. Second messengers and the control of progesterone production from first trimester trophoblast. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 62, 201‑205

Synthèse des principaux résultats obtenus

L'étude des mitochondries à l'aide de la sonde CMX Ros met en évidence une diminution de l'intensité de fluorescence au cours de la différenciation des CTV en ST, signifiant que le potentiel transmembranaire mitochondrial est plus faible au niveau ST qu'au niveau CTV.

Concernant la sécrétion hormonale, le dosage des hormones sécrétées dans les surnageants de culture, montre que la sécrétion de P4 est effective dès le stade CTV. Elle augmente significativement avec de la différenciation trophoblastique et la sécrétion d'hCG.

Cette augmentation est confirmée par spectrométrie de masse GC-MS/MS tant pour la P4 que la P5. De plus, la spectrométrie de masse démontre qu'il n'y a pas de sécrétion de 17-OH-progestérone.

Concernant la synthèse des hormones stéroïdes, l'analyse par western-blot et RT-qPCR de l'expression du transporteur et des enzymes impliqués révèle que l'expression de l'enzyme HSD3B1 augmente avec la différenciation trophoblastique, tant au niveau transcriptionnel que protéique, alors que celles de MLN64 et P450SCC ne varie pas avec la formation du ST.

Concernant la régulation de production des progestatifs, nous observons que la forskoline (FSK), un activateur de l'adéynlate cyclase, stimule comme attendu la différenciation trophoblastique

et la sécrétion d'hCG dès 6h d'incubation. Les sécrétions de P4 et P5 augmentent mais plus tardivement après 48h d'incubation.

L'expression de tous les partenaires de synthèse est augmentée après 48h d'incubation avec la FSK.

ii. Résultats complémentaires : Effet du cholestérol sulfate

Nous avons voulu étudier l'effet potentiellement limitant du principal substrat de la synthèse des progestatifs, le cholestérol. Nous avons déjà caractérisé l'expression de la stéroïde sulfatase (STS) dans les CTV et le ST. Les CTV ont alors été incubés avec du cholestérol-sulfate (chol-S) à 50 µM pendant 6h, 24h ou 48h. Les sécrétions hormonales d'hCG, de P4 et de P5 ainsi que l'expression des partenaires de synthèse (MLN64, P450SCC et HSD3B1) a été analysées.

Les CTV et le ST expriment la protéine STS et cette expression augmente au cours de la différenciation des CTV en ST (*Figure 38*).

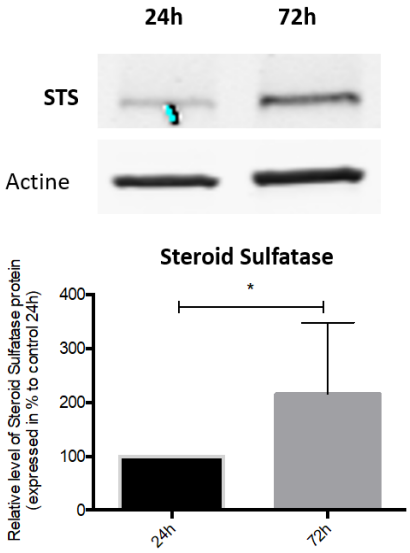


*Figure 38 : Expression de l'enzyme Stéroïde Sulfatase (STS). Les CTV humains isolés à partir de placenta à terme ont été cultivés pendant 24h ou 72h. L'expression protéiques de l'enzyme STS a été déterminée par western-blot avec un anticorps anti-STS. L'expression protéique de l'actine déterminée avec un anticorps anti-actine a été utilisé comme contrôle de charge. L'intensité des bandes a été déterminée grâce au logiciel ImageJ. Les données sont présentées comme le pourcentage du contrôle 24h et sont exprimées comme la moyenne +/- SD de 6 expériences indépendantes. * : p < 0,05 par comparaison au contrôle 24h. Test t non paramétrique de student pour données appariées.*

L'incubation des CTV avec le chol-S augmente significativement ($p < 0,05$) la sécrétion de P5 d'un facteur 3 et de P4 d'un facteur 2 dès 6h d'incubation (*Figure 39.B* et *39.C*). Cette augmentation devient plus importante avec le temps d'incubation.

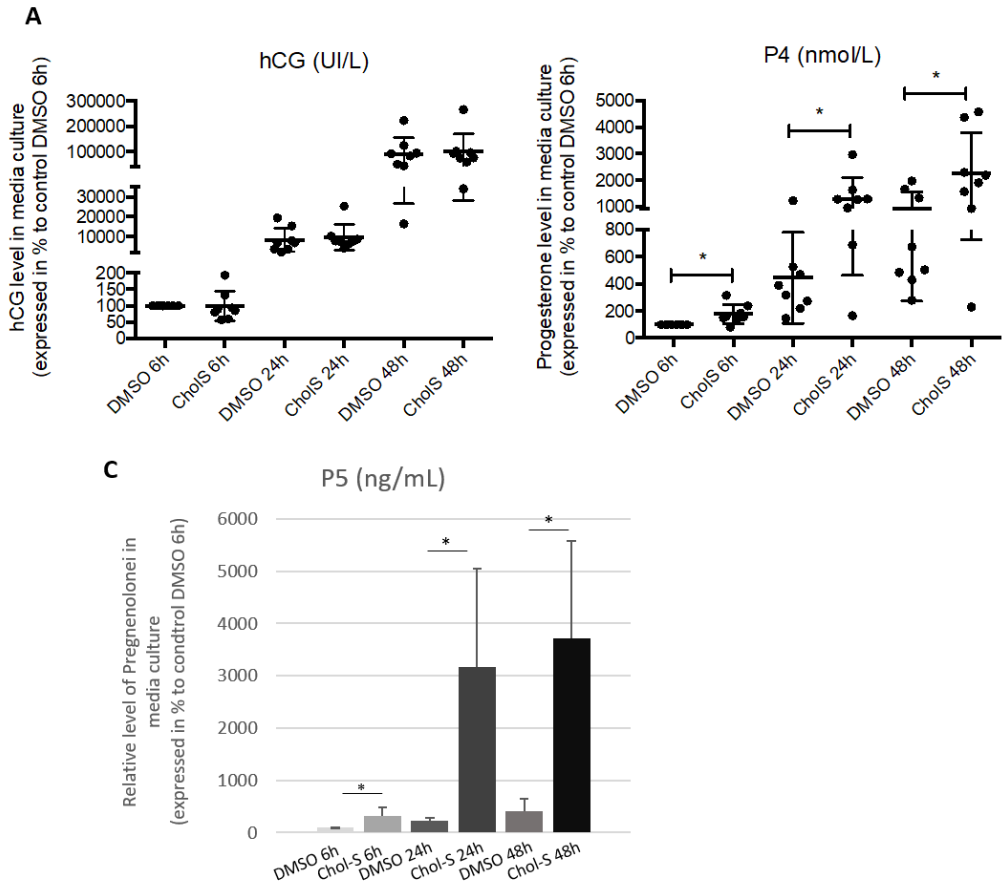
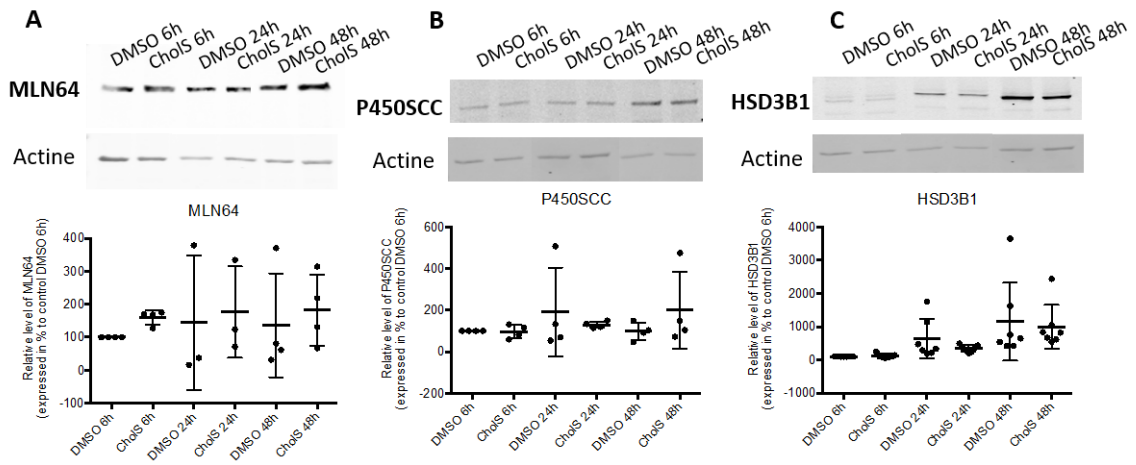


*Figure 39 : Augmentation de la sécrétion de prégnénolone (P5) et de progestérone (P4) par le cholestérol-sulfate (Chol-S). Les CTV humain isolés à partir de placenta à terme ont été mis en culture pendant 15h avec du milieu complet, puis incubés pendant 6h, 24h ou 48h avec du cholestérol-sulfate (Chol-S ; 50 µM) ou le contrôle DMSO. Dans les surnageants de culture, les niveaux d'hCG (A) et de P4 (B) ont été dosés en immuno-analyse et ceux de P5 en spectrométrie GC-MS/MS. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SD de n = 6 expériences indépendantes. * : p < 0,05 VS DMSO au même temps d'incubation, test t de student apparié non paramétrique bilatéral.*

En western blot, l'expression protéique des partenaires de synthèse est stable au cours de la culture en présence de chol-S, *Figure 40*)



*<u>Figure 40 :</u> Le substrat de la synthèse de progestérone (cholestérol-sulfate) n'influence pas l'expression des partenaires de synthèse. Les CTV humain isolés à partir de placenta à terme ont été mis en culture pendant 15h avec du milieu complet, puis incubés pendant 6h, 24h ou 48h avec du cholestérol-sulfate (Chol-S ; 50 µM) ou le contrôle DMSO. Les niveaux d'expression protéique du transporteur mitochondrial MLN64 (A), de l'enzyme P450SCC (B) et de l'enzyme HSD3B1 (C) ont été analysés par western-blot à l'aide d'anticorps anti-MLN64, anti-P450SCC et anti-HSD3B1. Le niveau d'expression de l'actine obtenu à l'aide d'anticorps anti-actine sert de contrôle de charge et permet la normalisation des résultats. Ces derniers sont représentés par la moyenne +/- SD de n = 6 expériences indépendantes. * : p < 0,05 VS DMSO au même temps d'incubation, test t de student apparié non paramétrique bilatéral.*

IV. <u>Conclusion et discussion</u>

Ce premier travail nous a permis de valider d'une part notre modèle, et d'autre part nos outils, pour explorer la stéroïdogenèse placentaire. Nous avons pu établir pour la première fois, que dans le placenta humain, la production de P4 est effective dès le stade CTV comme celle de l'hCG et qu'elle n'est donc pas l'apanage du seul ST .

Nous avons confirmé que la sécrétion de P4 augmente en parallèle de celle de l'hCG au cours de la différenciation trophoblastique (Zosmer, Elder, et Sullivan 1997; Tuckey 2005). Grâce à la spectrométrie de masse, nous avons montré que cette augmentation de porte essentiellement sur la P4 et dans une moindre proportion sur la P5. L'absence de 17-OH-progestérone dans nos surnageants confirme l'absence d'expression de l'enzyme CYP17 au niveau placentaire (Pasqualini 2005; Tuckey 2005).

Cette augmentation de la sécrétion résulte d'une augmentation de la synthèse des progestatifs. Nous observons en effet, l'augmentation de l'expression de l'enzyme HSD3B1 en terme de transcrits

et de protéines, mais pas celle du transporteur mitochondrial MLN64 et ni celle de l'enzyme P450SCC. L'absence de variation de l'expression de MLN64 suggère que le transfert du cholestérol dans la mitochondrie n'est vraisemblablement pas une étape limitante à la production de P4 comme cela a déjà été démontré dans l'ovaire (Charman et al. 2010). L'absence d'augmentation de l'expression de l'enzyme P450SCC au cours de la différenciation trophoblastique suggère que la transformation du cholestérol en P5 n'est pas non plus une étape limitante dans la synthèse de P4. Ni le transporteur et ni l'enzyme P450SCC ne semblent pas être saturés dans notre modèle puisque l'on observe une augmentation de la sécrétion de P4 sans augmentation de leur expression. L'augmentation de l'expression de l'enzyme HSD3B1 suggère une rapide conversion de P5 en P4, ce qui permet d'expliquer la différence d'augmentation relative entre P5 et P4 dans les surnageants.

Nos travaux confirment que, la mitochondrie et sa fonctionnalité évoluent au cours de la différenciation trophoblastique. En effet, le potentiel de membrane diminue avec la fusion des CTV en ST. De plus, l'aspect du réseau mitochondrial semble être plus fragmenté dans les cellules différenciées que dans les CTV. Des travaux antérieurs sur mitochondries isolées de ST montraient d'ailleurs que la structure mitochondriale (aspect des crêtes, densité de la matrice) est différente entre CTV et ST (De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014). Nos résultats associés à ces études suggèrent que ce changement de structure mitochondriale est associé à une diminution de la fonction énergétique et une augmentation de la fonction endocrine mitochondriale lors de la différenciation du CTV en ST.

Pour explorer plus avant la relation entre la différentiation morphologique du CTV en ST avec sa différenciation fonctionnelle (augmentation de la production hormonale), nous avons incubé les cellules avec un activateur de l'adénylate cyclase et de la différenciation trophoblastique, la forskoline (FSK) (Pidoux et al. 2007; Gerbaud, Taskén, et Pidoux 2015; Azar et al. 2018). Nos résultats montent une augmentation de la sécrétion à la fois de P4 et de P5 après 48h d'incubation, associée à une augmentation de l'expression du transporteur MLN64 et des enzymes P450SCC et HSD3B1. En culture primaire, la production placentaire de P4 est augmentée par la voie AMPc, confirmant les résultats obtenus sur lignée de choriocarcinome (Maldonado-Mercado et al. 2008). L'AMPc agirait pour partie, directement via le promoteur des gènes codant pour l'enzyme P450SCC et HSD3B1 qui possède des éléments de réponse au facteur « cAMP Response Element Protein » (CREB) qui est activé par la voie AMPc/PKA.

Cette régulation peut aussi être indirecte car au niveau placentaire, la voie de signalisation AMPc/PKA régule de nombreux processus comme l'expression des syncytines et de la connexine-43, impliquées dans la fusion des CTV en ST (Dupressoir et al. 2005; Knerr et al. 2005; Pidoux et al. 2014). Cette voie intervient aussi dans la régulation de la sécrétion des hormones placentaires, notamment

hCG et hPL (Rodway et al. 1988; Wice et al. 1990; Orendi et al. 2010; Rothbauer et al. 2017; Azar et al. 2018). En retour, elle est elle-même activée par de nombreux facteurs dont l'hCG (Pidoux et al. 2007; Tsampalas et al. 2010). La corrélation positive que nous observons entre l'hCG et la P4 suggère une inter-régulation entre ces deux hormones. En effet, sur un modèle de choriocarcinome BeWo, l'ajout d'hCG conduit à l'augmentation de la synthèse de P4 par activation de la voie AMPc/PKA (Manna et al. 2006). L'hCG régule également l'expression des récepteurs à la P4 (PR-A et PR-B) et toute la production de la P4 dans un modèle de cellules endométriale (Tapia-Pizarro et al. 2017). Néanmoins, sur notre modèle, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'expression protéique des récepteurs à la P4, que ce soit par western-blot ou immunocytofluorescence tant dans le CTV que dans le ST. La P4, elle aussi, est impliquée dans la régulation de l'hCG. En effet, sur un modèle ovarien, un antagoniste du récepteur à la P4 régule négativement l'expression du récepteur de l'hCG et inactive les voies de signalisation induites par ce récepteur (Yung et al. 2014). Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour évaluer l'intrication de l'hCG et de la P4 au cours de la différenciation trophoblastique.

L'ajout du substrat de la synthèse de P4 dans le milieu de culture entraine une augmentation de la sécrétion à la fois de P5 et de P4, sans influencer l'expression des partenaires de synthèse. Cela atteste de l'absence de saturation du transporteur et des enzymes impliquées ainsi que d'un effet stimulateur du substrat leurs activités dans notre modèle.

Ainsi, le CTV produit physiologiquement de la progestérone. Cette production augmente avec la différenciation du CTV en ST, sous contrôle probable de l'AMPc et de l'hCG. *In vivo*, hCG et P4 qui sont deux hormones indispensables au bon déroulement de la grossesse, voient leurs concentrations sériques maternelles être perturbées en cas d'affections maternelles traitées au long cours, ce qui peut retentir sur l'évolution de la grossesse. C'est le cas notamment des patientes traitées pour l'infection par le VIH (Powis et al. 2011; Sibiude et al. 2012; McDonald et al. 2018).

Résultats Partie II : Altération de la fonction endocrine placentaire *in vitro* par les inhibiteurs de protéase anti-VIH

I. Introduction

Actuellement, le nombre de grossesses nécessitant un traitement maternel au long cours, notamment dans le cadre d'une infection maternelle par le VIH est de plus en plus important(World Health Organization 2016). En France, les recommandations pour traiter la mère et éviter la transmission mère-enfant du virus incitent à prescrire un traitement contenant deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) et un IP (lopinavir [LPV], atazanavir [AZV] ou darunavir [DRV]) « boosté » au ritonavir (RTV) (Morlat et al. 2018). *In vivo*, des études cliniques ont observé une augmentation du risque de fausse couche spontanée et de prématurité chez les mères traitées par IP pour une infection au VIH (Powis et al. 2011; Sibiude et al. 2012). D'une part, les IP perturberaient les concentrations des principales hormones stéroïdes placentaires avec une diminution de la progestérone (P4) et une augmentation de l'oestradiol (E2) dans le sang des mères traitées par IP (Papp et al. 2015; McDonald et al. 2018). D'autre part, il a été montré que les IP étaient capables d'altérer la stéroïdogenèse surrénalienne chez les nouveau-nés exposés *in utero* aux IP (Kariyawasam et al. 2014). Peu de chose a été étudié au niveau placentaire. *In vitro* sur lignée cellulaire, Papp E. et *al.* ont montré que les IP (RTV et LPV) étaient capables d'augmenter l'expression de la 20-α hydroxystéroïde déshydrogénase (20-α HSD), enzyme catabolisant la progestérone (P4) (Papp et al. 2016).

Après avoir caractérisé la stéroïdogenèse trophoblastique lors de la formation du ST *in vitro*, le second volet de notre projet a été d'étudier les effets potentiels de deux principaux IP utilisés au cours de la grossesse, le RTV et le LPV en regardant (i) si ces IP perturbent la différenciation morphologique du CTV, (ii) s'ils perturbent la différenciation fonctionnelle du tissu trophoblastique tant au niveau de la synthèse que de la sécrétion hormonale, (iii) quels organites et voies intracellulaires sont potentiellement impactés par ces IP, (iv) s'ils altèrent directement le ST formé et (v) quels sont les effets potentiels de l'association RTV/LPV, en utilisant notre modèle de culture primaire de CTV humain.

II. Résumé des matériels et méthodes utilisés

A partir de placentas humains normaux à terme, les CTV ont été isolés puis mis en culture afin de permettre la différenciation spontanée des CTV en ST. Ils ont été incubés pendant 6, 24 ou 48h avec du RTV à des concentrations allant de 5 à 20 µM ou du LPV à 10 µM. La différenciation morphologique

des CTV (24h de culture) en ST (72h de culture) a été analysée par mesure de l'index de fusion grâce à une immunomarquage fluorescent ciblant la desmoplakine, ainsi qu'à l'aide de microscopie électronique à transmission qui nous a permis de caractériser la structure des mitochondries et du réticulum endoplasmique. La différenciation fonctionnelle a été évaluée d'une part en mesurant par immuno-analyse les hormones (hCG, P4, E2) sécrétées dans les surnageants de culture et d'autre part, en étudiant l'expression en terme de protéines du transporteur MLN64 et des enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse (P450SCC, HSD3B1, stéroïde sulfatase, aromatase). Nous avons également exploré les grandes voies intracellulaires connues pour intervenir dans la différenciation du trophoblaste (Pidoux et al. 2007; 2014; Gerbaud, Taskén, et Pidoux 2015; Bastida-Ruiz et al. 2019) à savoir la voie AMPc/PKA, la dynamique (fission/fusion) et structure des mitochondries ainsi que les 3 branches de la voie UPR (voie PERK, ATF6 et IRE1α). En effet, ces branches sont décrites comme étant des cibles des IP dans d'autres modèles cellulaires (adipocytes, macrophages, hEK293…) (Chen et al. 2009; Taura et al. 2013; Guitart-Mampel et al. 2017; Ravaud et al. 2017; Ganta et Chaubey 2019). La voie AMPc/PKA a été étudiée en évaluant l'activité PKA à l'aide du kit « PepTag nonradioactive Protein Kinase Assay » et en évaluant la phosphorylation des substrats de cet enzyme. La microscopie électronique à transmission associée à la mesure de l'expression des facteurs pro-fusion Mfn2 et OPA1 nous ont permis d'analyser la structure et la dynamique des mitochondries avec ou sans IP. Enfin, la voie UPR a été analysé par RT-qPCR en ciblant les facteurs GRP78, ATF6, ATF4 et sXBP1. De plus, nous avons utilisé l'inhibiteur de IRE1α, STF-083010, afin d'évaluer l'implication de cette branche de la voie UPR.

III. Résultats

i. Article 2 : « Protease Inhibitor anti-HIV, Lopinavir, Impaires Placental Endocrine Function »

Protease Inhibitor anti-HIV, Lopinavir, Impairs Placental Endocrine Function

Camille FRAICHARD[a], Fidéline BONNET-SERRANO[b], Christelle LAGUILLIER-MORIZOT[a,b], Marylise HEBERT-SCHUSTER[c], René Lai-Kuen[d], Jeanne SIBIUDE[e], Thierry FOURNIER[a], Marie COHEN[c] and Jean GUIBOURDENCHE[a,b].

[a] INSERM UMR-S 1139, Faculté de Pharmacie, Université de Paris, Paris, France

[b] Service d'Hormonologie, CHU Cochin, HUPC, AP-HP, Paris, France

[c] Service de Gynécologie-Obstétrique, Faculté de Médecine, Université de Genève, Genève, Suisse

[d] INSERM UMS 025 - CNRS UMS 3612, Faculté de Pharmacie, Université de Paris, Paris, France

[e] Service de Gynécologie-Obstétrique, CHU Louis Mourier, HUPN, AP-HP, Paris, France

Key words: Human Placenta, Lopinavir, UPR, Progesterone, Mitochondria, Mfn2

Abstract

Introduction: Mothers infected by Human Immunodeficience Virus (HIV) are commonly treated by protease inhibitors (PI) during pregnancy to avoid fetal contamination. However, PI are known to induce pre-term birth and to disturb the adrenal progestins steroidogenesis of these neonates. As the maintenance of pregnancy relies on the production of progesterone (P4) by human placenta, we postulated that PI may disturb placental endocrine functions. Those functions are ensured by the trophoblast that produces hCG, estrogens and P4 under the control of different pathways such as the Unfolded Protein Response (UPR) pathway and some mitochondrial functions, which are known to be impacted by PI in other endocrine tissues.

Objectifs: We aimed to evaluate the effect of PI on the production of hCG and P4 and on the intracellular regulation pathways impacted *in vitro* in the human villous trophoblast.

Materiel and methods: Villous cytotrophoblast (VCT) were isolated from human term placenta and cultured with or without PI i.e ritonavir (RTV) and lopinavir (LPV). The differentiation of VCT into ST was evaluated by measuring hCG and P4 secretion. We used western-blot and/or RT-qPCR to evaluate the expression of partners involved in P4 synthesis (MLN64, P450SCC and HSD3B1), of mitochondrial pro-fusion factors (Mfn2 and OPA1) and of UPR factors (GRP78, ATF4, ATF6, sXBP1).

Results: RTV exposition from 6 to 48 hours and at a concentration from 5 to 20 µM had no significant effect either on hCG or on P4 secretion whereas LPV significantly decreased the secretion of both molecules by 40% after 6 hours of incubation at a concentration of 10 µM. This decrease was associated with a decrease in P450SCC and HSD3B1 expression in ST. Protein expression of Mfn2, of GRP78 (a protein inducing UPR pathway activation after dissociation from IRE1α protein), and of sXBP1 (a spliced transcription factor activated after IRE1α activation), were increased under LPV exposition. Inhibition of IRE1α, a membrane factor regulating sXBP1 formation, by STF-083010, had no effect on hCG and P4 secretion.

Conclusion: RTV has no effect on the endocrine placenta. LPV impairs the villous trophoblast secretion of hCG and P4. LPV also induces an increase in mitochondrial fusion demonstrated by the increase in Mfn2 expression, and ER stress attested by the increase in GRP78 and sXBP1 expression. These

trophoblastic alterations may end in decreased P4 levels in maternal circulation inducing premature births.

Introduction

To prevent mother-to-fetus transmission of Human Immunodeficiency Virus (HIV), World Organization of Health (WHO) recommends to continue or initiate antiretroviral therapy (ART) during pregnancy regardless the clinical stage or CD4 cell count (World Health Organization 2016). ART consists in the association of two NRTI (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor) with a Protease Inhibitor (PI) such as Lopinavir (LPV) or Ritonavir (RTV). However, the use of PI during pregnancy increases the risk of preterm birth and obstetric complications (e.g. pre-eclampsia, diabetes or intra uterine growth restriction) (Powis et al. 2011; Sibiude et al. 2012; Short et Taylor 2014). Those treatments have been shown to alter both adrenal and placental steroidogenesis. Indeed, neonates exposed *in utero* to PI, exhibit adrenal dysfunction with an increase in 17-OH progesterone (Kariyawasam et al. 2014). Anti-HIV treatment during pregnancy also induces a decrease in maternal serum progesterone (P4), especially when using PI (McDonald et al. 2018).

From the end of the first month of pregnancy, P4 hormone, like human chorionic gonadotrophin (hCG), is produced by the villous trophoblast in the chorionic villi, mainly the syncytiotrophoblast (ST) (Rodway et al. 1988; Tuckey 2005). We recently showed that the villous cytotrophoblast (VCT) which will differentiate into ST, is also able to produce placental glycoproteic hormones such as hCG and steroids such as P4 *in vitro* (Rodway et al. 1988; Lacroix et al. 2002; Fournier, Guibourdenche, et Evain-Brion 2015; Fraichard et al. 2020).

In placenta, P4 is synthesized from maternal serum cholesterol which is captured by the trophoblast and enters the mitochondria via Metastatic Lymph Node 64 (MLN64) protein. The cholesterol molecule is then converted by cholesterol side-chain cleavage (P450SCC) enzyme in pregnenolone (P5), which is further converted in P4 by Hydroxy-delta-5-Steroid Dehydrogenase and 3 Beta-and steroid delta-isomerase 1 (HSD3B1) (Tuckey 2005; Pasqualini 2005).

The production of hCG and P4 relies on the good functionality of the trophoblast. This functionality is regulated by numerous factors including cAMP/PKA pathway, oxidative stress and stress of the Endoplasmic Reticulum (ER). ER stress involves different organelles (mitochondria, ER) and pathways such as the UPR pathway (Pidoux et al. 2007; 2014; Gerbaud, Taskén, et Pidoux 2015; Poidatz et al. 2015; Bastida-Ruiz et al. 2019; Walker et al. 2020).

Mitochondria are essential to ensure energy regulation and steroid hormones production. We previously confirmed a change in mitochondrial function associated with structural modifications

during VCT differentiation (Fraichard et al. 2020). Different studies demonstrated that the structural modifications observed between VCT and ST mitochondria, are related to mitochondria dynamics, relying on fusion/fission process (Martinez, Kiriakidou, et Strauss 1997; De Los Rios Castillo et al. 2011; Meyer, Leuthner, et Luz 2017; Holland et al. 2017; Fisher et al. 2019). The fusion is regulated by different factors such as Mitofusin 2 (Mfn2) and OPA1 (Frank et al. 2001; Rojo et al. 2002; Chen et al. 2003; Wasilewski et al. 2012). In the placenta, mitochondrial dynamics are known to change with trophoblast differentiation but the mechanisms and factors involved remain controversial (Walker et al. 2020; Wasilewski et al. 2012; H. Cai et al. 2018). Any disruption in the fusion/fission process may lead to mitochondrial dysfunction, particularly steroidogenesis alteration (Dal Yontem et al. 2019; Shan et al. 2019).

ER and Golgi apparatus are key organelles involved in the production of peptide hormones such as hCG (Bielinska et Boime, s. d.). In case of ER stress, an accumulation of unfolded proteins in ER lumen is observed. In response, GRP78 protein dissociates from the ER membrane activating the UPR pathway. This pathway involves (i) « Inositol-Requiring Enzyme 1α » (IRE1α) which induces the splice of XBP1 transcription factor controlling the expression of IRE1α target genes, (ii) « Activating Transcription Factor 6 » (ATF6) which is cleaved in its active form to control the transcription of its target genes and (iii) « Protein kinase RNA-like ER protein Kinase » (PERK) which induces activation of ATF4 transcription factor to control the expression of PERK target genes (Bastida-Ruiz et al. 2017). These UPR pathways are known to regulate trophoblast differentiation, hCG secretion and the steroidogenesis (Bastida-Ruiz et al. 2019; Park et al. 2014).

It has been established that anti-HIV treatment by PI alters adrenal steroidogenesis both in the mothers and in their neonates exposed *in utero* (Kariyawasam et al. 2014; McDonald et al. 2018; Papp et al. 2015). As little is known about the effect of PI on the human placenta, we aimed to investigate the effect of two wide used PI (RTV and LPV) on the villous trophoblast differentiation *in vitro*, its endocrine function, and to identify their potential targets focusing on the mitochondria and the UPR pathway.

Materiels and methods

Placental tissue collection

Placental tissues from patients delivering by cesarean section at full term (mean gestational age 39±1 WG) were obtained from Antoine Béclère Hospital (Clamart, France), Antony Hospital (Antony, France), Port-Royal Maternity (Paris, France) and Montsouris Mutual Institute (Paris, France). Indications for cesarean sections were: maternal uterus abnormalities (uterus scar, myomectomy),

maternal wish, breech presentation, narrow maternal pelvis. Placentas were collected following informed patient written consent and approval from our local ethics committee (CPP 2015-mai-13909). All the collected placentas resulted from monofetal non-complicated pregnancies, i.e. with no fetal abnormalities, no maternal diseases or treatment (i.e; diabetes, thyroid disorder, hypertension, pre-eclampsia). Placentas included were all macroscopically normal (weight and macroscopic examination).

Isolation and *in vitro* culture of VCT

Chorionic villi were obtained by manual dissection of placental tissues from term placentas as previously described about one hour after delivery (Fraichard et al. 2020; Alsat, Haziza, et Evain-Brion 1993). Villous tissue was dissected free of membranes, rinsed and minced in HBSS 1X. The villous sample was then subjected to sequential enzymatic digestion in HBSS 1X containing 0,2% trypsin (w/v), 25 IU/mL DNAse I, 0,1 mM $MgSO_4$, 0,1 mM $CaCl_2$ and 4% milk (v/v). Cell dissociation was monitored by light microscopy. The first three digests were discarded to eliminate residual ST fragments and erythrocytes. Cell suspensions resulting from the following four or five sequential digestions were pooled. Cells were then purified on a discontinuous Percoll gradient (5% to 70% in 14 steps) and their viability was determined in v/v solution with trypan blue.

Isolated cells were seeded in DMEM containing 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% L-Glutamin (complete DMEM) at 1000 cells/mm² during 15h at 37°C with 5% CO_2. After plating, cells were incubated with RTV, LPV or DMSO control during 6h, 24h or 48h (time necessary to allow fusion process). RTV concentrations used ranged from 5 to 20 µM. LPV chosen concentration was 10 µM (= 6,288 µg/mL or 6288 ng/mL) corresponding to the mean LPV blood concentration measured in mothers treated for HIV infection. RTV (SML-0491, Sigma-Aldrich® Inc, St-Louis, Missouri, USA) or LPV (SML-1222, Sigma-Aldrich® Inc, St-Louis, Missouri, USA) were dissolved in DMSO. Consequently, control DMSO was equivalent to the percentage of DMSO necessary to dissolve LPV.

Cell culture media were collected at different times of culture, supernatants were kept frozen at -80°C as part of the Equipex 10-PhC/SC-11/243 project "Perinatcollection" until use. Cells were either fixed or snap-frozen for RNA/Protein extraction and stored at -80°C until use.

Immunofluorescence microscopy

Immunocytofluorescence staining was performed after 48h of incubation with LPV or control DMSO, which corresponds to the time required for ST formation, as previously described (Fraichard et al. 2020). Briefly, cells were fixed and permeabilized in methanol and blocked in PBS 1X-BSA 1%-Tween 0,1%. Cells were first incubated overnight at 4°C with primary polyclonal rabbit antibody to

desmoplakin (5 µg/mL, ab16434 abcam®, Cambridge, UK). They were then incubated for 1h at room temperature and protected from light, with secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (1/500, A-11008 LifeTechnologies, Carlsbad, Californie, USA). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and samples were conserved in mounted-medium. Pictures were taken using a BX60 epifluorescence microscope (Olympus) equipped with a 40X oil objective (Olympus 1.00), an ultrahigh-vacuum mercury lamp and a Hamamatsu camera (C4742-95) and analyzed with VisionStage Orca software (v 1.6). The "control immunoglobulin without specific epitope" conditions were used to evaluate the background signal and to set up the acquisition and colorization of pictures. Resulting pictures allowed us to calculate fusion index i.e. [nuclei number in ST-ST number]/total nuclei number. ST was considered when at least two nuclei were not separated by plasmic membrane, observed thanks to desmoplakin staining in green.

Transmission electronic microscopy

Trophoblastic cells were seeded for 15h post isolation and incubated with LPV or control DMSO for 6, 24 or 48h. Cells were collected after each time by trypsin-EDTA, centrifuged 5 min at 1400 x g, and washed twice in PB (0,05 M PIPES [piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)] buffer, 5 mM CaCl2, pH 7.3) for 10 min, then centrifuged 5 min at 1400 x g. Each sample was fixed during 45 min at room temperature protected from light in PB containing 2,5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde. After 5 min of centrifugation at 1400 x g, samples were washed twice for 10 min in PB and then post-fixed first in PB–1% osmium tetroxide (45 min at 4°C) and then in 1% aqueous uranyl acetate solution for 2 h at room temperature. Samples were then dehydrated in increasing concentrations of ethanol (30%, 50%, 70%, 95%, and 100%) followed by ethanol/propylene oxide (1/1 [vol/vol]) and propylene oxide and were finally embedded in Epon epoxy resin. Ultrathin sections (80 nm of thickness) were performed with a Leica ultracut S microtome fitted with a diamond knife (Diatome histoknife Jumbo or Diathome ultrathin). Theses sections were stained with lead citrate and placed on copper grids. The sections were analyzed at 80 kV with a Jeol electron transmission microscope (JEM-100S transmission electron microscope, Croisy sur Seine, France). Acquisitions were made with Gatan software (Gatan Microscopy Suite ®, Gatan Inc., AMETEK, Pleasanton, CA, USA).

Hormones immuno assays

As previously described (Fraichard et al. 2020), total hCG and P4 concentrations were determined in supernatants of culture using ECLIA immuno-assay (Liaison®, DiaSorin), Italy). Measuring ranges of both assays were respectively of 1.5-10 000 UI/L and of 0.7-190 nmol/L. Between assay precision expressed by the coefficient of variation (CV %) were < 5% and < 11% and detection limits were 0.3 UI/L and 0.4 nmol/L respectively.

Western blots

Total proteins were isolated from cells incubated with RTV, LPV or DMSO using Lysis Buffer (NP40 Cell Lysis Buffer ; Invitrogen™, Carlsbad, Californie, USA) combined with a protease inhibitor cocktail 100X (1X final ; Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem®, EMD Chemicals Inc., Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) and a phosphatase inhibitor cocktail 50X (1X final ; Phosphatase Inhibitor Cocktail 50 X Set V, Calbiochem®, EMD Chemicals Inc., Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne). Proteins (20 µg) were loaded on 4-15% gradient gel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, BIORAD®, Hercules, Californie, USA), and were then transferred on nitrocellulose membrane which was blocked with TBS 1X-Milk 5%-Tween 0,1% solution. The resulting proteins blots were probed with anti-MLN64, anti-P450SCC, anti-HSD3B1, anti-OPA1, anti-Mfn2, anti-GRP78, monoclonal mouse anti-actine or anti-vinculine antibodies (references and concentration in Table 1) (Fraichard et al. 2020; Bastida-Ruiz et al. 2019). Actin or vinculin were used as loading control. Addition of secondary goat anti-mouse antibody conjugated with DyLight 680 (1/15 000, #35518 Thermo Fisher Scientific) or secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with DyLight800 4X PEG (1/15 000, SA5-35571 Thermo Fischer Scientific) allowed blots revelation using Odyssey infrared fluorescent system (LI-COR).

Target Protein	Concentration	Species	Clonality	Reference
MLN64	1 µg/mL	Rabbit	Polyclonal	ab3478 abcam®
P450SCC	1 µg/mL	Rabbit	Polyclonal	ab75497 abcam®
HSD3B1	0,18 µg/mL	Rabbit	Monoclonal	ab167417 abcam®
OPA1	1 µg/mL	Rabbit	Polyclonal	ab42364 abcam®
Mfn2	1 µg/mL	Mouse	Monoclonal	ab56889 abcam®),
GRP78	1 µg/mL	Rabbit	Polyclonal	G8918 Sigma-Aldrich
Actine	0,2 µg/mL	Mouse	Monoclonal	A5441 Sigma-Aldrich
Vinculine	1 µg/mL	Mouse	Monoclonal	V9131, Sigma-Aldrich

Table 1: References and concentrations of primary antibodies

Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction

Total RNA from human term trophoblast previously transfected with siRNA against IRE1α, ATF6 and PERK were used (Bastida-Ruiz et al. 2019). RNA extracted from trophoblast cells incubated with LPV or DMSO control with or without IRE1α inhibitor (STF-083010) was also analyzed. 500 ng of total RNA were reversed transcript with SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen™, Carlsbad, Californie, USA). The qPCR was performed using cDNA diluted 1/5 in RNase-DNase free water using

the the Takyon™ ROX SYBR® MasterMix blue dTTP (Eurogentec, Kaneka, Liège, Belgique. Data were normalized using SDHA, 18S and HPRT as endogenous controls. Used primers are described in Table 2.

Target mRNA	Gene name	Sequences	
MLN64	*STARD3*	Forward	GAGCGATGGTATCTTGCCGC
		Reverse	CTGCAAAGGATTCTGGGGGT
HSD3B1	*HSD3B1*	Forward	AGTACGTCCACTCTTCTGTCCA
		Reverse	TTCTCCTTCACCAAGAGGCG
P450SCC	*CYP11A1*	Forward	TTTTTGCCCCTGTTGGATGCA
		Reverse	CCCTGGCGCTCCCCAAAAAT
GRP78	*GRP78*	Forward	CGTGGAGATCATCGCCAAC
		Reverse	ACATAGGACGGCGTGATGC
sXBP1	*sXBP1*	Forward	CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG
		Reverse	ATCCATGGGGAGATGTTCTGG
ATF4	*ATF4*	Forward	GTTCTCCAGCGACAAGGCTA
		Reverse	ATCCTGCTTGCTGTTGTTGG
ATF6	*ATF6*	Forward	GAGTATTTTGTCCGCCTGCC
		Reverse	CGGGCTAAAAGGTGACTCCA

Table 2: Sequences of primers used for RT-qPCR

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software package® (San Diego, CA, USA). Results were expressed as raw values or mean ± SD. Significant differences ($p<0,05$) were identified using paired non parametric student t test.

Results

Effect of RTV on the villous trophoblast

hCG and P4 levels were measured in supernatants of trophoblast cells incubated with RTV or control DMSO. Neither hCG nor P4 secretion was disrupted during differentiation of VCT into ST whatever the incubation time (6 to 48h) or RTV concentration (5 to 20 µM) *(Figure 1.A and 1.B).* On western blot, the expression of P450SCC and HSD3B1, two enzymes involved in P4 synthesis, was not affected during RTV exposition (*Figure 1.C*).

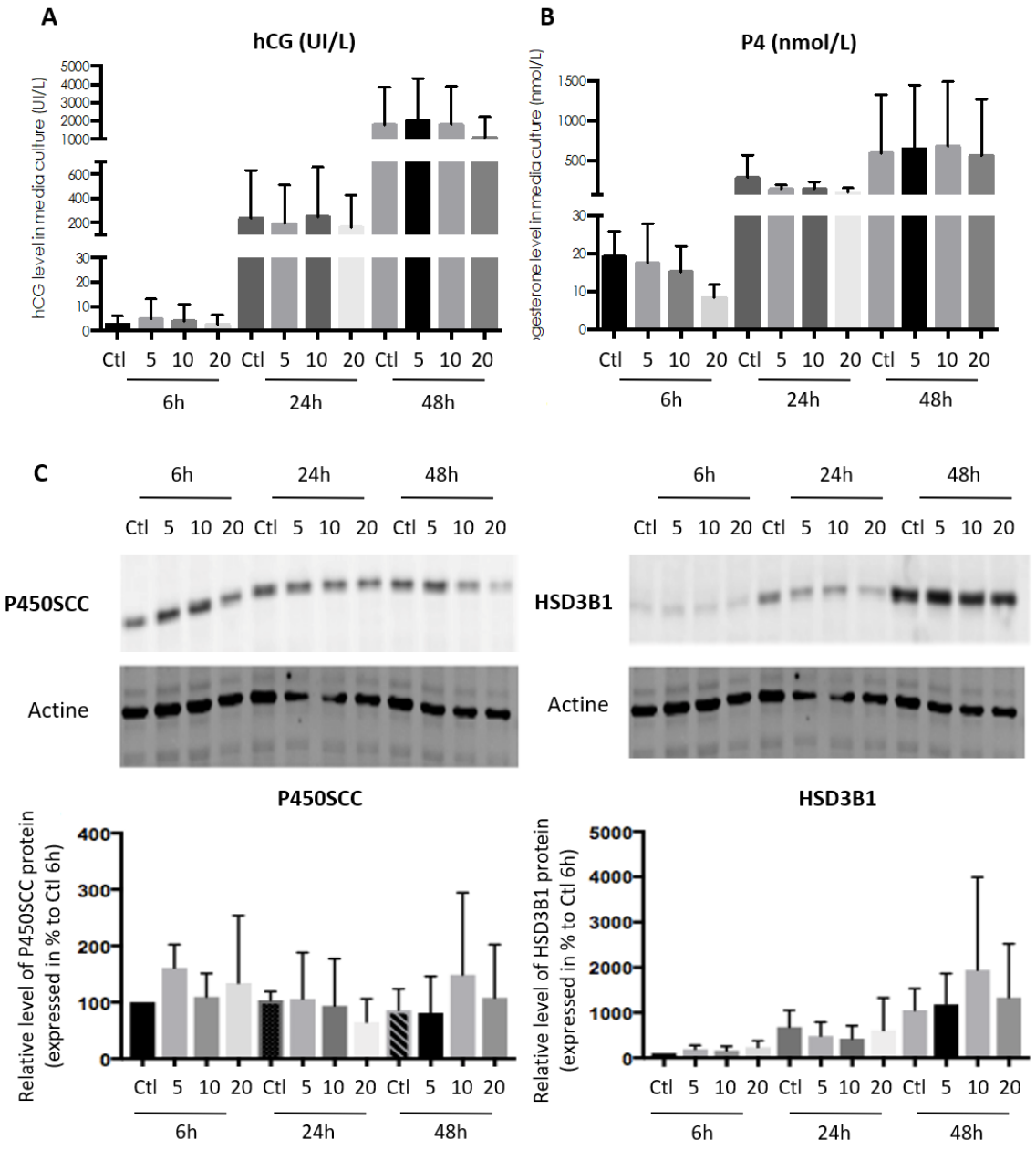


Figure 1: Ritonavir has no effect on hCG and P4 production during trophoblast differentiation. Cytotrophoblasts isolated and purified from term placenta were cultured for 15h and then incubated with RTV at 5, 10 or 20 µM or DMSO for 6h, 24h or 48h to allow fusion process. hCG concentration (A) and progesterone concentration (B) were measured by immuno-analysis in culture supernatant. (C) The protein expression of P450SCC and HSD3B1 were evaluated using immunoblotting with anti-P450SCC and anti-HSD3B1 antibodies. The protein expression of actin was determined with anti-actin antibody, used as a loading control. The lanes intensity was measured with ImageJ program. Results are expressed as the mean +/- SEM of n=6 independent experiments. Two-tailed paired no parametric student t-tests were performed to compare RTV to DMSO exposition at the same incubation time.

Effect of LPV on the villous trophoblast

In controls, VCT spontaneously fuses to form a ST at 72h of culture. After 48h of incubation with LPV at 10 µM, ST formation was decreased as demonstrated with desmoplakin staining distribution (*Figure 2.A*). The fusion index calculation points out a significant decrease ($p < 0,05$) of 20% in VCT fusion into ST after 48h of incubation with LPV at 10 µM (*Figure 2.B*).

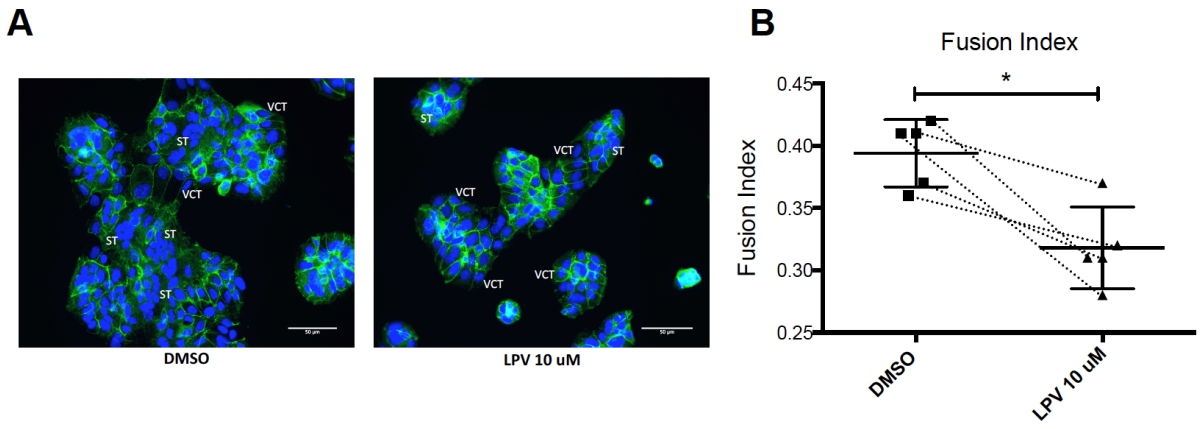


Figure 2: Lopinavir decreases VCTs fusion. VCT isolated and purified from term placenta were cultured for 15h and then incubated with LPV 10 µM or DMSO for 48h to allow fusion process. A) Picture of cytotrophoblast fusion process by fixing and immunostaining of cells for the distribution of desmoplakin (green) and nuclei (4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI] staining). 400x magnification. Scale bar: 50 µm. B) Representation of syncytium formation as a fusion index graph. Results are expressed as the mean +/- SD of n=5 independent experiments. * : $p < 0,05$ vs DMSO, Mann-Whitney t-test.

As expected, VCT fusion into ST was associated with an increase in hCG (by 1000 folds) and P4 (by 10 folds) secretion in controls. LPV at 10 µM significantly ($p < 0,001$) decreased hCG secretion by 35% in average after 6 hours of incubation, reaching 84% of decrease at 48h of incubation (*Figure 3.A*). LPV also induced an early significant ($p < 0,01$) decrease in P4 secretion by 41% in average that tended to disappear thereafter (*Figure 3.B*).

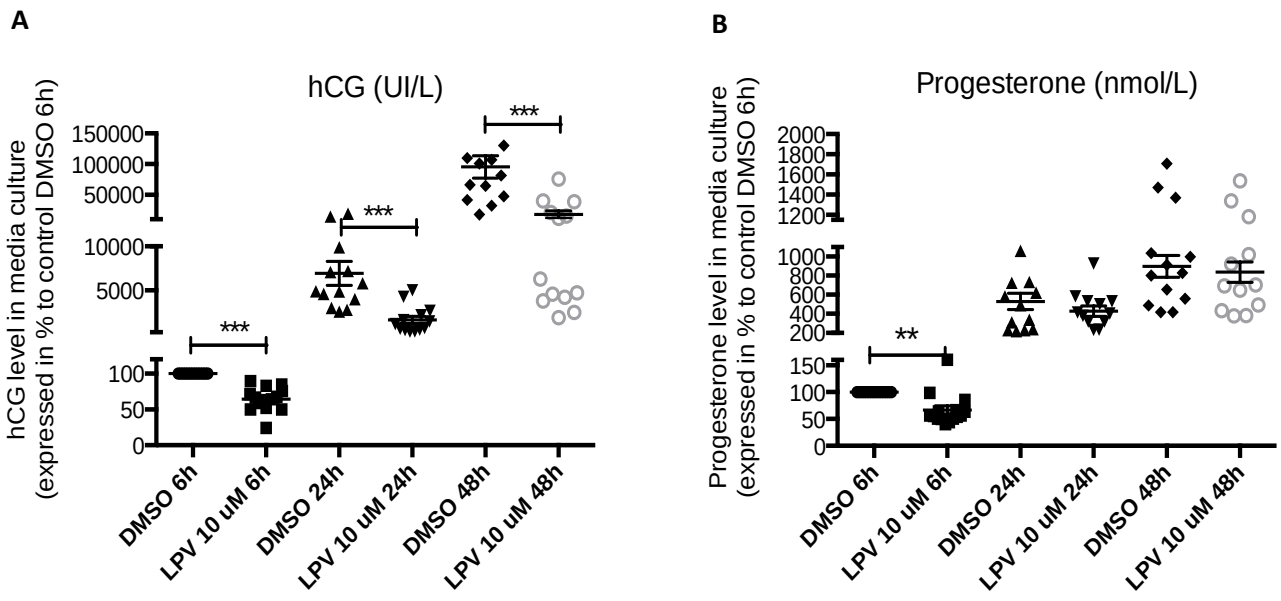


Figure 3: Lopinavir decreases hCG and progesterone secretion during differentiation of VCT into ST. Cytotrophoblasts isolated and purified from term placenta were cultured for 15h and then incubated with LPV 10 uM or DMSO for 6h, 24h or 48h to allow fusion process. hCG concentrations (A) and progesterone concentrations (B) were measured by immuno-analysis in culture supernatant. Results are expressed as the mean +/- SEM of n=11 independent experiments. * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$ vs DMSO at the same incubation time, two-tailed paired no parametric student t-test.

Expression of trophoblastic enzymes involved in P4 synthesis during LPV exposition

As only LPV decreases both ST formation and P4 secretion, P4 synthesis partners were further investigated. On western blots, LPV significantly ($p < 0,05$) decreased expression of P450SCC enzyme by 58% in average and HSD3B1 enzyme by 62% in average after 48h of incubation (*Figure 4.B and 4.C*). However, LPV did not affect expression of mitochondrial cholesterol transporter MLN64 whatever the incubation time (*Figure 4.A*).

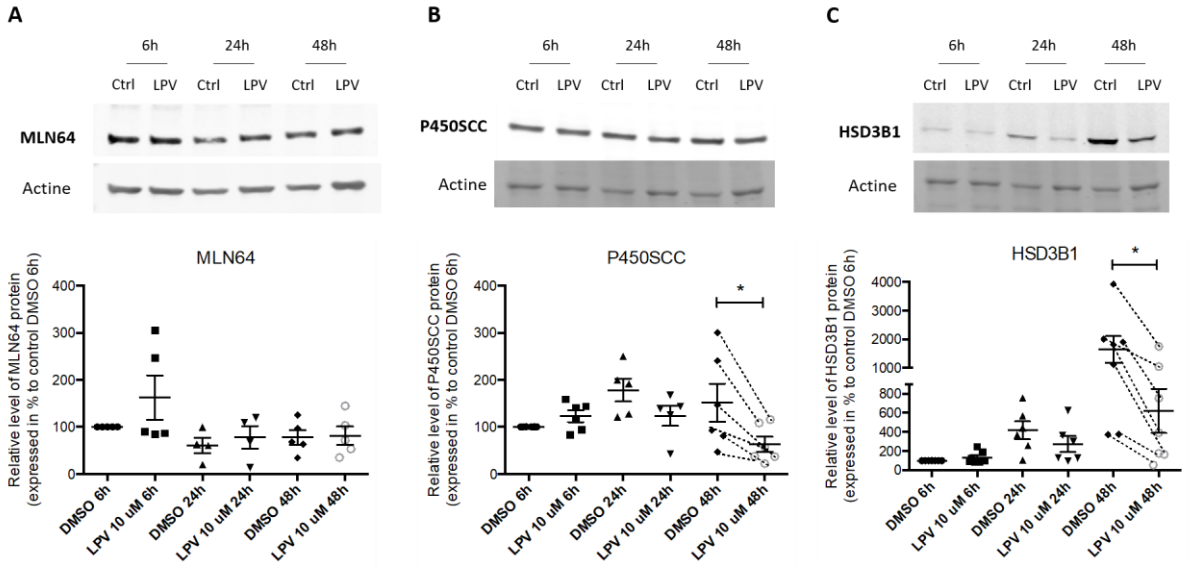


Figure 4: **Lopinavir decreases protein expression of enzymes P450SCC and HSD3B1 involved in progesterone synthesis during differentiation of VCT into ST.** Human VCT isolated and purified from term placenta were cultured for 15h and then incubated with LPV 10 µM or DMSO for 6h, 24h or 48h. MLN64 (A), P450SCC (B) and HSD3B1 (C) protein expression was determined using immunoblotting with anti-MLN64, anti-P450SCC and anti-HSD3B1 antibodies. Actin protein was determined with anti-actin antibody, used as a loading control. The lanes intensity was measured with ImageJ program. Results are expressed as a percentage of the control DMSO 6h conditions and are shown as mean -/+ SEM from six independent experiments. * : p<0,05 vs DMSO at the same incubation time, two-tailed paired no parametric paired t-test.

Trophoblastic nuclei, mitochondria and endoplasmic reticulum under LPV treatment

We then analyzed by electron microscopy two main organelles involved in P4 and hCG synthesis respectively. In controls, at 6h, i.e. when VCT are still predominant and ST not yet formed, mitochondria present a dense matrix with clearly defined cristae (*Figure 5*). On the contrary, at 48h, i.e when the vast majority of VCT has differentiated into ST, mitochondria present a clearly denser matrix with a less defined and more atypical cristae structure than in VCT (*Figure 5*). Moreover, we observed an increase in nuclei chromatin condensation with differentiation of VCT into ST (*Figure 5*). In VCT cells (i.e. 6h of incubation), ER is thin, while in ST (i.e. 48h of incubation), ER is larger (*Figure 5*).

These physiological changes were not modified under LPV treatment in VCT (6h). On the contrary, in ST (48h), chromatin was less condensed than in controls and ER was thinner and rather empty. Mitochondria presented a less dense matrix with clearly defined cristae (*Figure 5.B*). In cells incubated with LPV for 24h, the results were less significant as some VCT had not already started their differentiation.

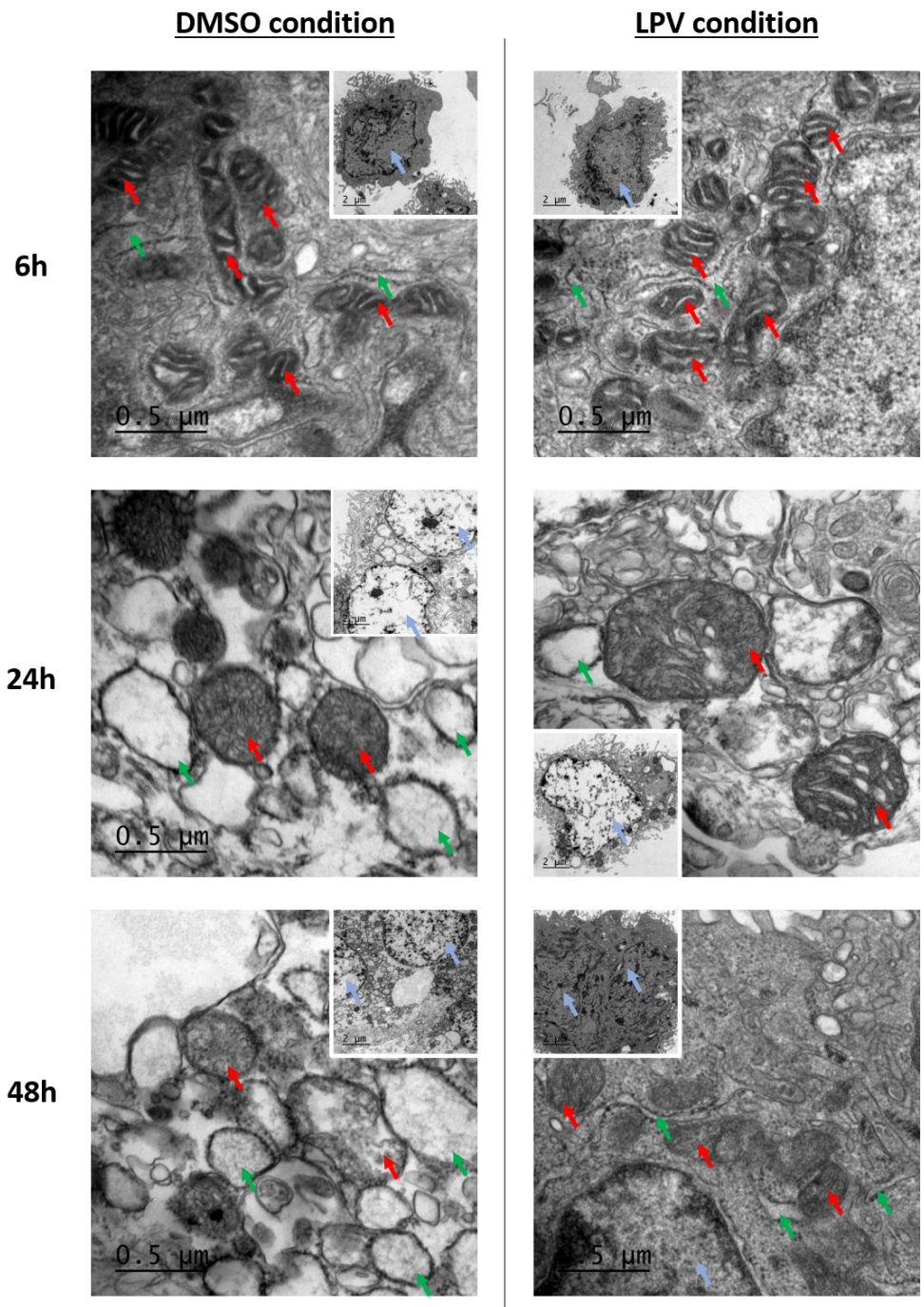
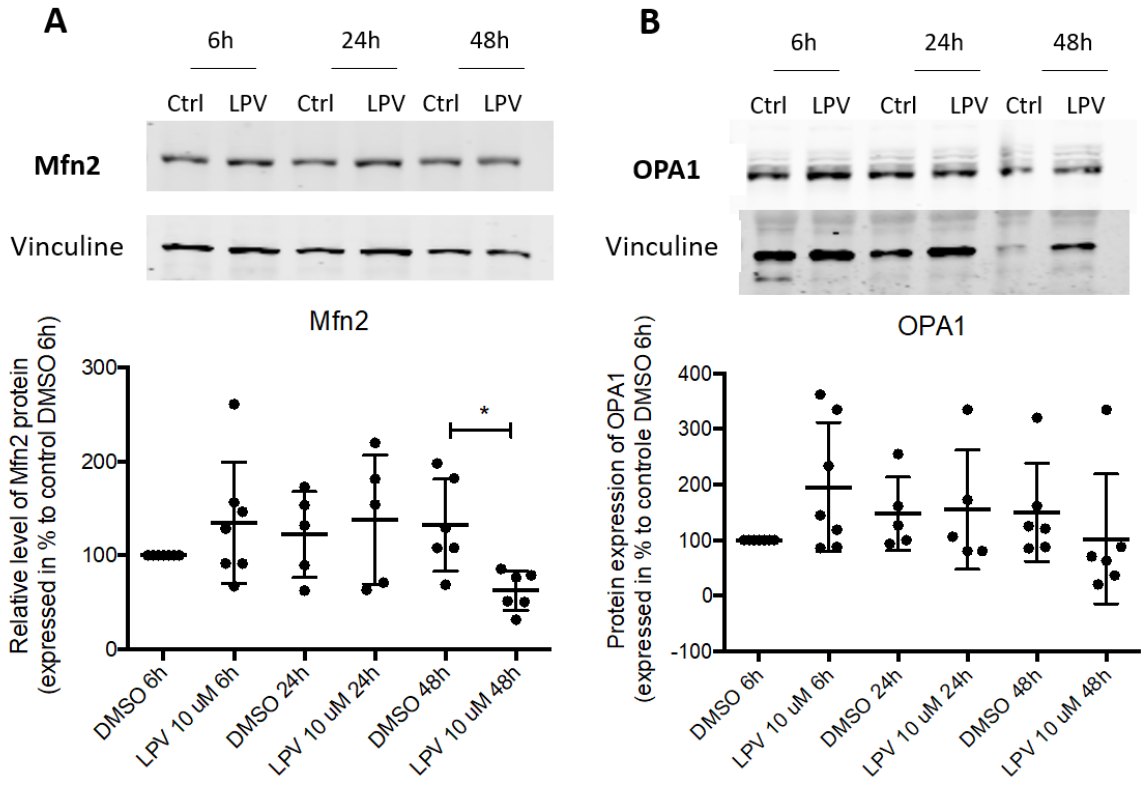


Figure 5: Lopinavir alters mitochondria and endoplasmic reticulum structure during trophoblast differentiation. Cytotrophoblasts isolated and purified from term placenta were cultured for 15h and then incubated with LPV 10 µM or DMSO for 6h, 24h or 48h. Cells have been fixed and prepared for transmission electronic microscopy. The blue, red and green arrows indicate respectively the nuclei, mitochondria and endoplasmic reticulum (ER). X1000 magnification was used for the small pictures ; scale bar : 2 µm. Zoom in X5000 magnification was used for the principal pictures. Scale bar : 0,5 µm. These pictures are representative of 3 independent experiments.

Mitochondrial dynamics in villous trophoblast under LPV

The mitochondrial structure relies on the fusion and fission process regulated by several proteins (OPA1, Mfn2). LPV induced a significant decrease ($p < 0,05$) in Mfn2 protein expression after 48h incubation (*Figure 6.A*), while OPA1 protein expression was not affected (*Figure 6.B*)..



<u>Figure 6:</u> Impairment in mitochondrial dynamics during trophoblast differentiation under LPV exposition. Cytotrophoblast cells isolated from human term placentas were cultured for 15h before to the incubation with LPV 10 µM or DMSO for 6h, 24h or 48h. Mfn2 (A) or OPA1 (B) protein expression were evaluated by immunoblotting with anti-Mfn2 and anti-OPA1 antibodies. Vinculin protein expression determined with anti-vinculin antibody was used as loading control. Results are expressed as the mean +/- SD of n=7 independent experiments. * : $p < 0,05$ vs DMSO at the same incubation time, two-tailed paired no parametric student t-test.

ER stress in villous trophoblast under LPV.

We first checked whether UPR pathways are involved in steroidogenesis regulation in our *in vitro* model. We evaluated mRNA expression of P450SCC and HSD3B1 by RT-qPCR on VCT cells transfected with 3 siRNA against IRE1α, PERK and ATF6 respectively. Inhibition of UPR pathway tended to induce an increase in HSD3B1 and P450SCC expression in the same proportion (50% and 55% respectively) (*Figure 7*).

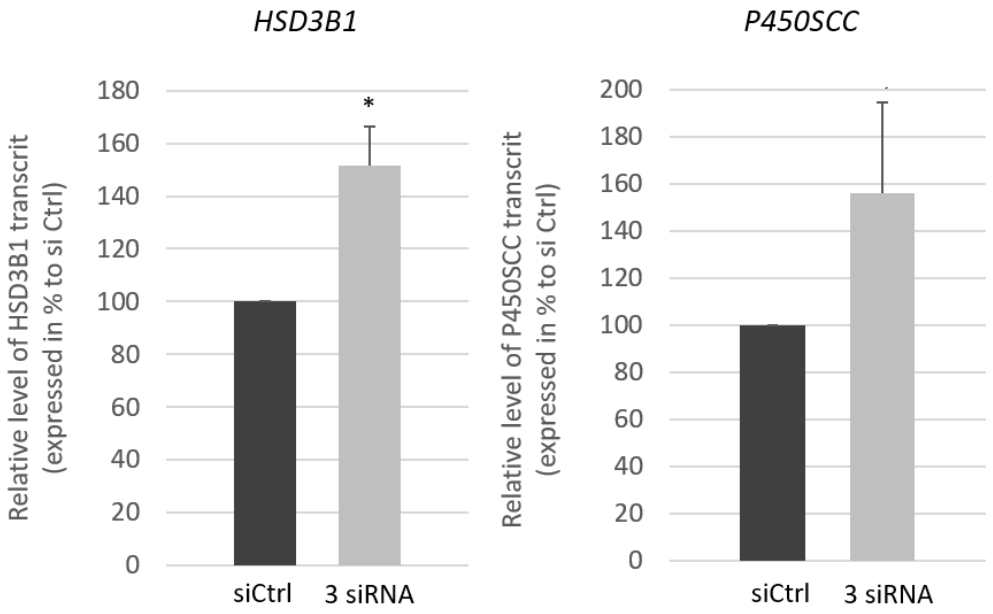
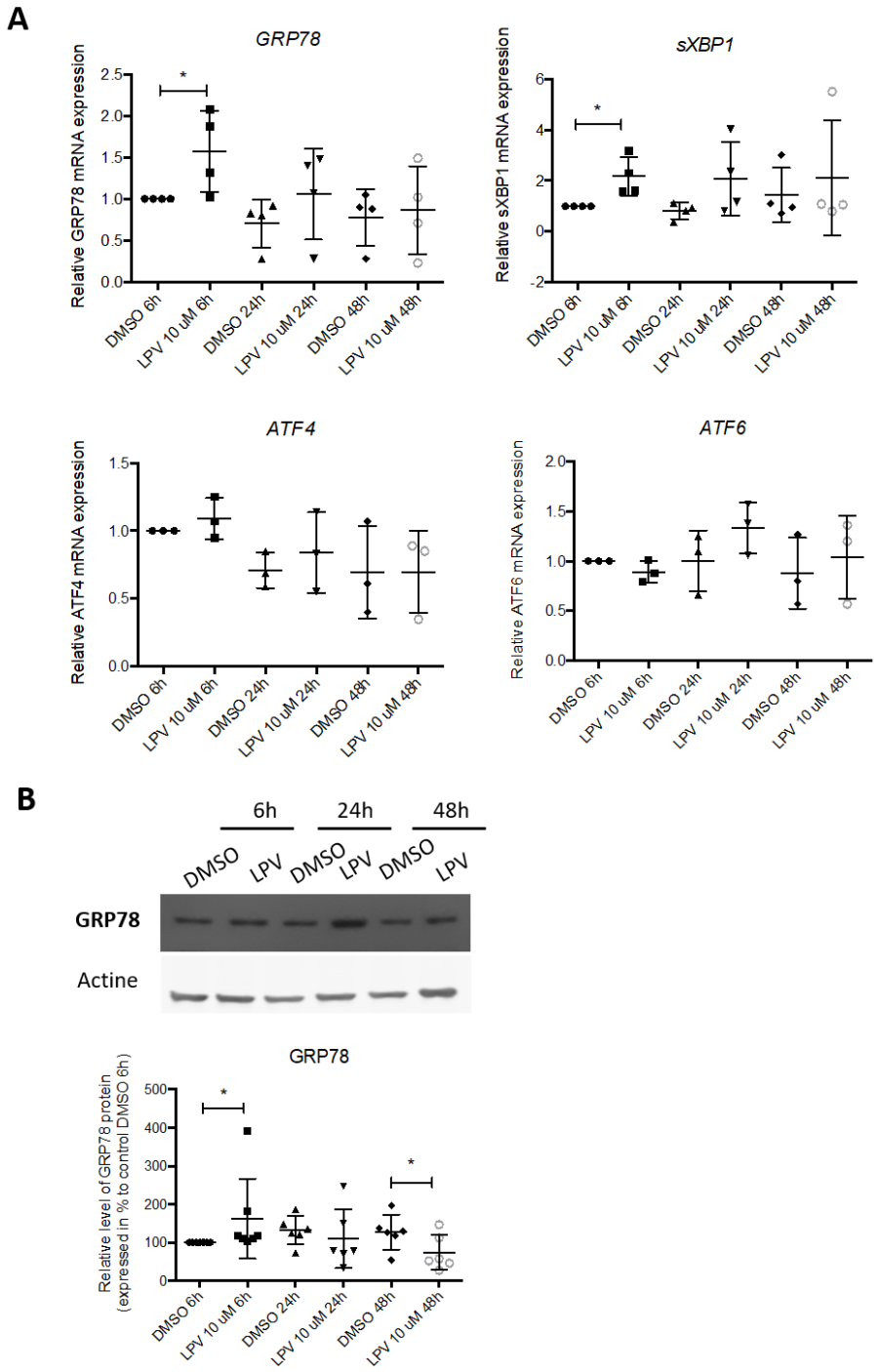


Figure 7: UPR pathways are involved in transcriptional regulation of enzymes involved in P4 synthesis. VCT cells isolated from human term placenta were transfected with siRNA against IRE1α, PERK and ATF6 (3 siRNA) or si RNA control (siCtrl). Total RNA was extracted and HSD3B1 and P450SCC expression were evaluated by RT-qPCR. The results are presented as mean +/- SD of 3 independent experiments. * : $p < 0,05$ vs si Ctrl, two-tailed paired no parametric t-test.

We then investigated whether LPV activates UPR pathways measuring mRNA expression of UPR markers : GRP78, ATF6, ATF4 and sXBP1 by qPCR. In VCT (i.e. 6h incubation with LPV), GRP78 and sXBP1 expression significantly increased by 1,5 and 2 folds ($p < 0,05$) (*Figure 8.A*). During trophoblast differentiation, GRP78 protein expression under LPV increased by 1,5 folds in VCT cells, after 6h of incubation but decreased by 0,65 folds in ST, after 48h of incubation (*Figure 8.B).*



<u>Figure 8:</u> LPV induces activation of IRE1α pathway from 6h of incubation in trophoblasts cells. VCT cells were isolated from human term placenta. After 15h of culture, cells were incubated for 6h, 24h or 48h with 10 µM LPV. (A) Transcriptional expression of GRP78, s XBP1, AFT4 and AFT6 were measured by RT-qPCR. (B) Protein expression of GRP78 was evaluated by immunoblotting with anti-GRP78 antibody. Actin protein expression determined with anti-actin antibody was used as loading control The results are expressed as mean +/- SD of n=4 independent experiments. * : $p < 0,05$ vs DMSO at the same incubation time, two-tailed paired no parametric t-test.

Effects of LPV on preformed ST

As ST is trophoblastic tissue in direct contact with maternal blood, we analyzed the impact of LPV directly on ST (i.e when VCT differentiation is already performed). VCT were cultured in complete DMEM for 72h forming the ST. The resulting ST was further exposed to LPV at 10 µM for 6h. Exposition to LPV induced a significant decrease in hCG and P4 secretion by 20 % and 40 % respectively ($p < 0,05$) (*Figure 9*).

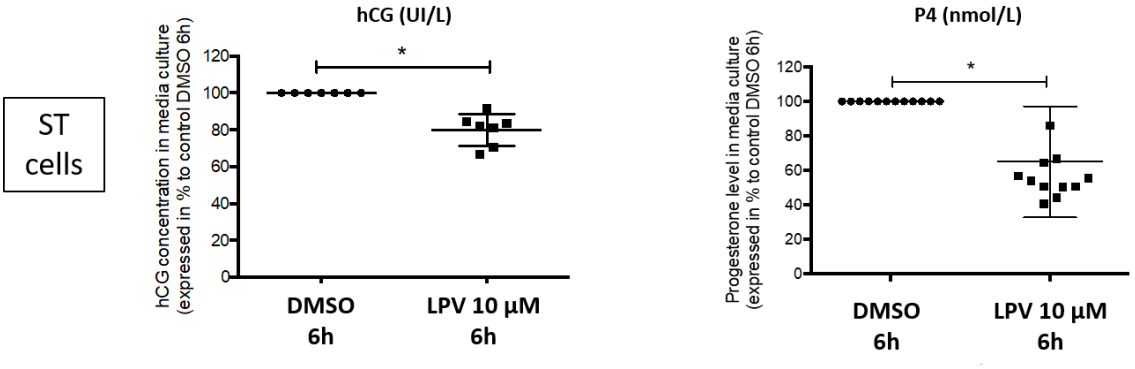
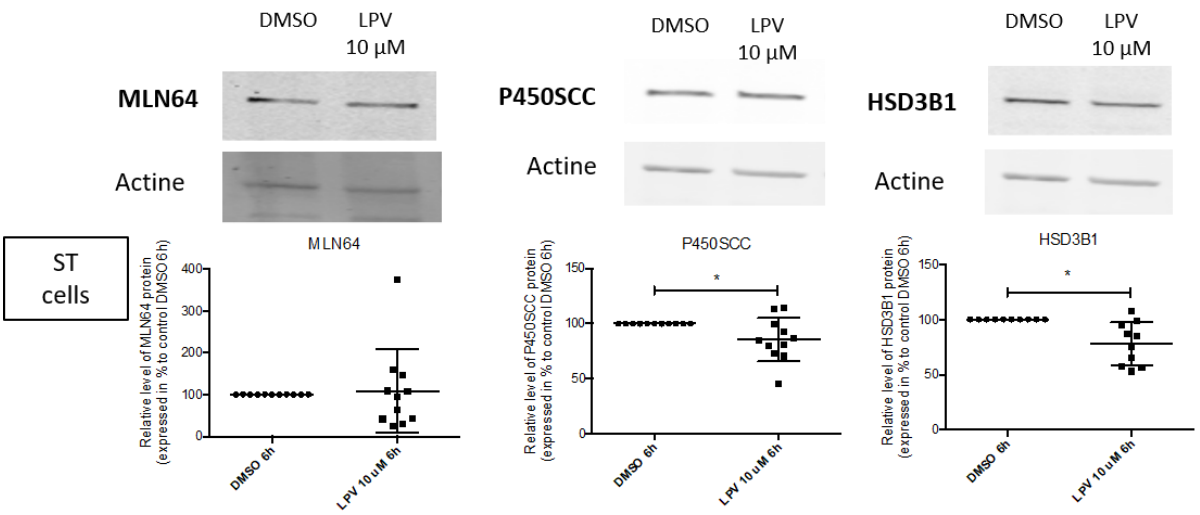


Figure 9: Brief incubation with Lopinavir decreases hCG and progesterone secretion both in VCT and ST cells. Cytotrophoblasts isolated and purified from term placenta were cultured for 72h in complete DMEM to allow ST formation before incubation for 6h with LPV 10 µM or DMSO. hCG and progesterone concentrations were measured by immuno-analysis in culture supernatant. Results are expressed as the mean +/- SEM of n=11 independent experiments. * : $p < 0,05$ vs DMSO, two-tailed paired no parametric student t-test.

P450SCC and HSD3B1 protein expression was also significantly decreased by 20% in ST exposed to LPV for 6h ($p < 0,05$) (*Figure 10*).



<u>Figure 10:</u> Decrease in enzymes protein expression in ST cells under brief LPV exposition. Cytotrophoblast cells isolated from human term placentas were cultured for 72h before incubation with LPV 10 µM or DMSO for 6h. MLN64, P450SCC and HSD3B1 protein expression was evaluated by immunoblotting with anti-MLN64, anti-P450SCC and anti-HSD3B1 antibodies. Actin protein expression determined with anti-actin antibody was used as loading control. Results are expressed as the mean +/- SD of n=8 independent experiments. * : $p < 0,05$ vs DMSO, two-tailed paired no parametric student t-test.

Exposition of ST to LPV for 6h also induced a significant increase by 20% in Mfn2 mitochondrial protein expression ($p < 0,05$) (*Figure 11.A*) while, OPA1 mitochondrial protein expression was unchanged (*Figure 11.B*).

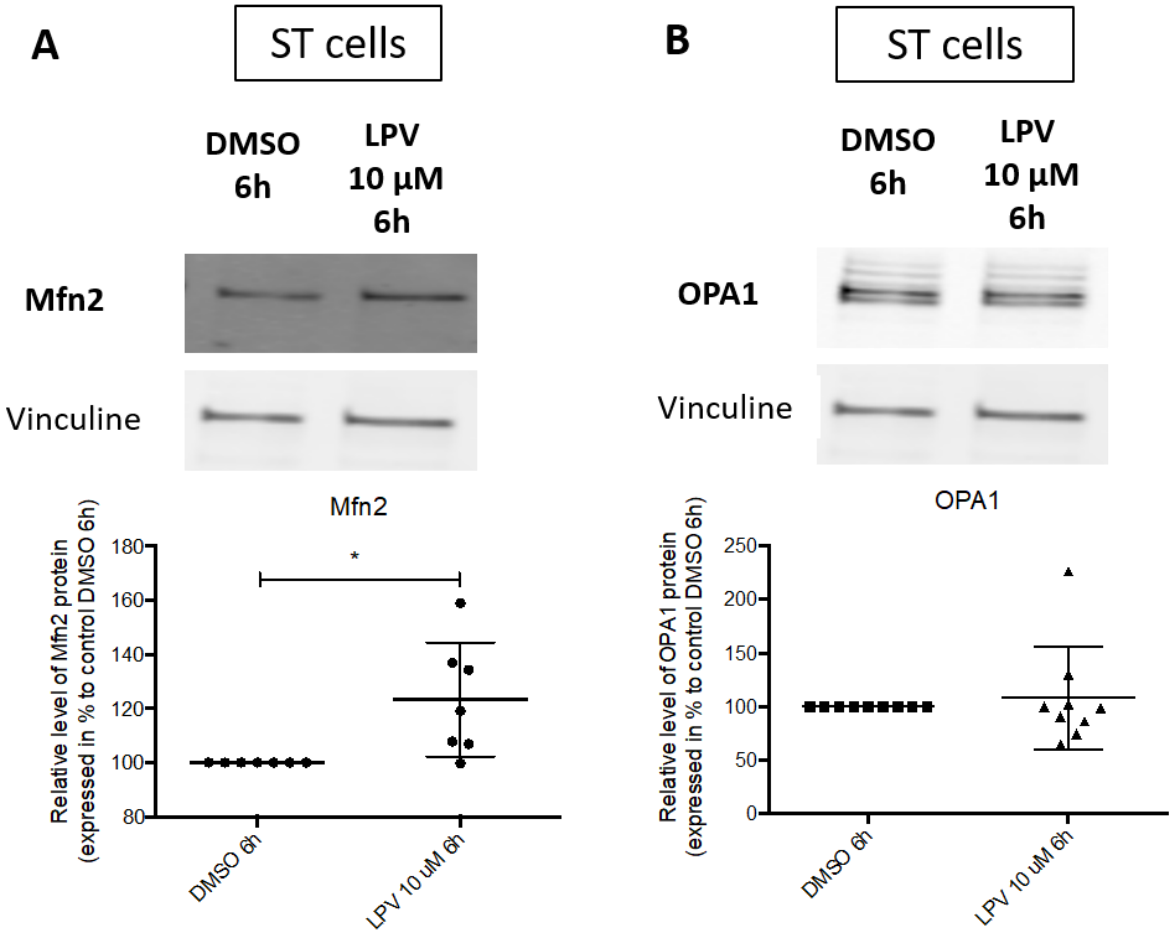


Figure 11: Impairment in mitochondrial dynamics in ST cells under LPV exposition. Cytotrophoblast cells isolated from human term placentas were cultured for 72h before incubation with LPV 10 µM or DMSO for 6h. Mfn2 (A) and OPA1 (B) protein expression was evaluated by immunoblotting with anti-Mfn2 and anti-OPA1 antibodies. Vinculin protein expression determined with anti-vinculin antibody was used as loading control. Results are expressed as the mean +/- SD of n=7 independent experiments. * : $p < 0,05$ vs DMSO, two-tailed paired no parametric student t-test.

Exposition of ST to LPV tended to activate UPR pathway as attested by the increase in GRP78 and sXBP1 transcripts (*Figure 12.A).*

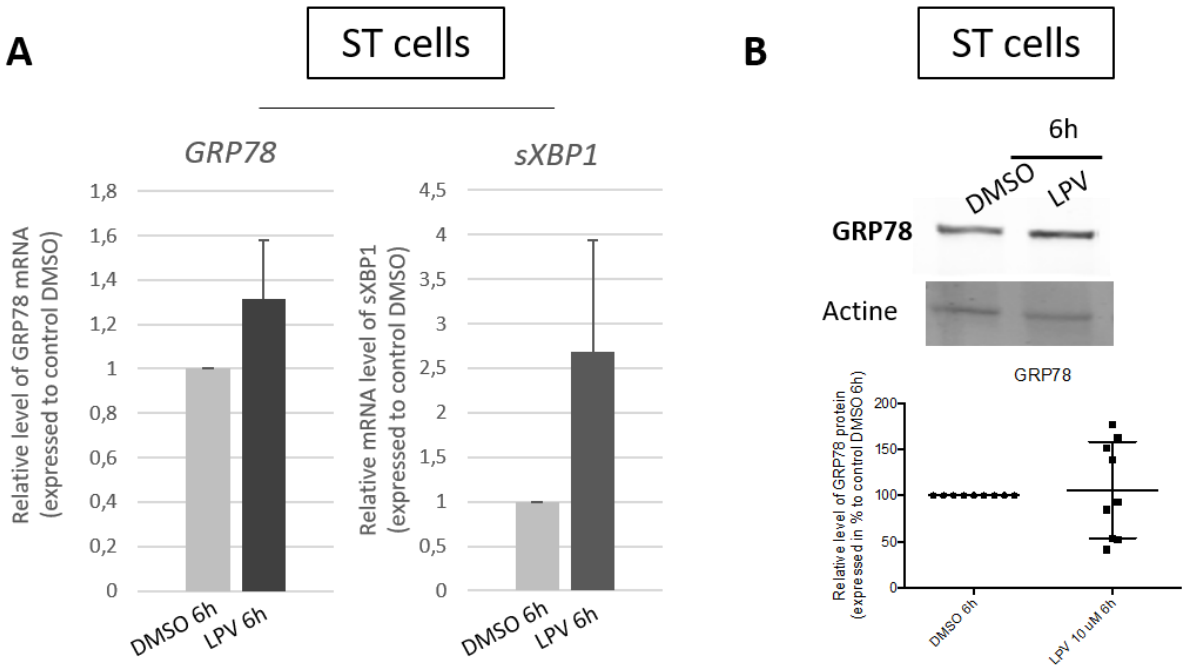


Figure 12: Activation of UPR pathway in VCT cells under LPV exposition. Cytotrophoblast cells isolated from human term placentas were cultured for 72h before incubation with LPV 10 µM or DMSO for 6h. (A) mRNA expression of sXBP1 and GRP78 were measured by RT-qPCR. (B). GRP78 protein expression was evaluated by immunoblotting with anti-GRP78 antibody. Actin protein determined with anti-actin antibody was used as loading control. The results are expressed as mean +/- SD of n=6 independent experiments. p value vs DMSO obtained from two-tailed paired no parametric t-test are presented on the graph.

We investigated whether the IRE1α-pathway was targeted by LPV. Using an IRE1α inhibitor (STF-083010, STF), we checked that IRE1α inhibition led to a decrease in LPV effects on UPR pathway, quantifying sXBP1 and GRP78 gene expression by RT-qPCR (*Figure 13*). We then evaluated the effect of IRE1α inhibition on hCG and P4 production by ST under LPV exposition. Pre-incubation with IRE1α inhibitor (STF) did not restore hCG and P4 secretion, decreased by LPV in ST (*Figure 14*). In addition, this pre-incubation did not modify the expression of either P450SCC or HSD3B1 (*Figure 15*) at both mRNA and protein levels.

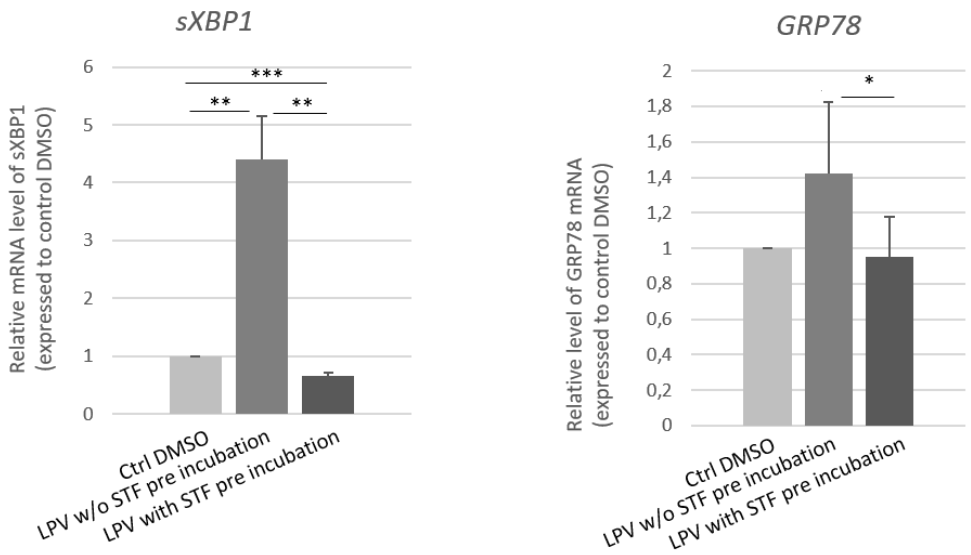


Figure 13: Inhibition of IRE1α pathway partially prevents the UPR pathway activation Cytotrophoblast cells isolated from human term placentas were cultured for 72h. Cells were then incubated for 2h with STF (100 µM) (LPV with STF preincubation) or DMSO control (LPV without [w/o] STF preincubation) before incubation for 4h with LPV (10 µM). (A) mRNA expression of sXBP1 and GRP78 were measured by RT-qPCR. The results are expressed as mean +/- SD of n=3 independent experiments. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ vs DMSO, two-tailed paired no parametric t-test.

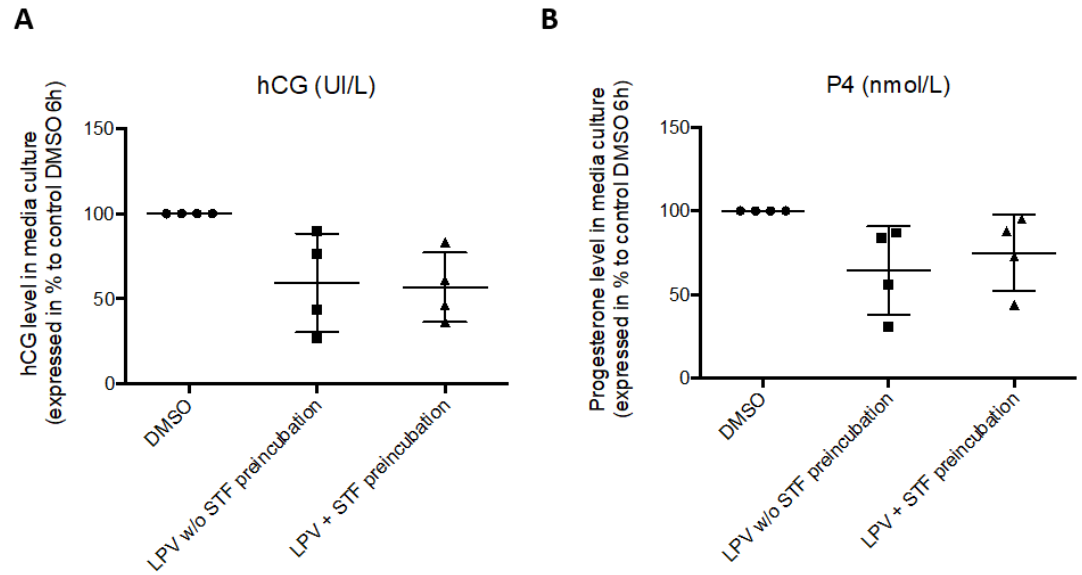
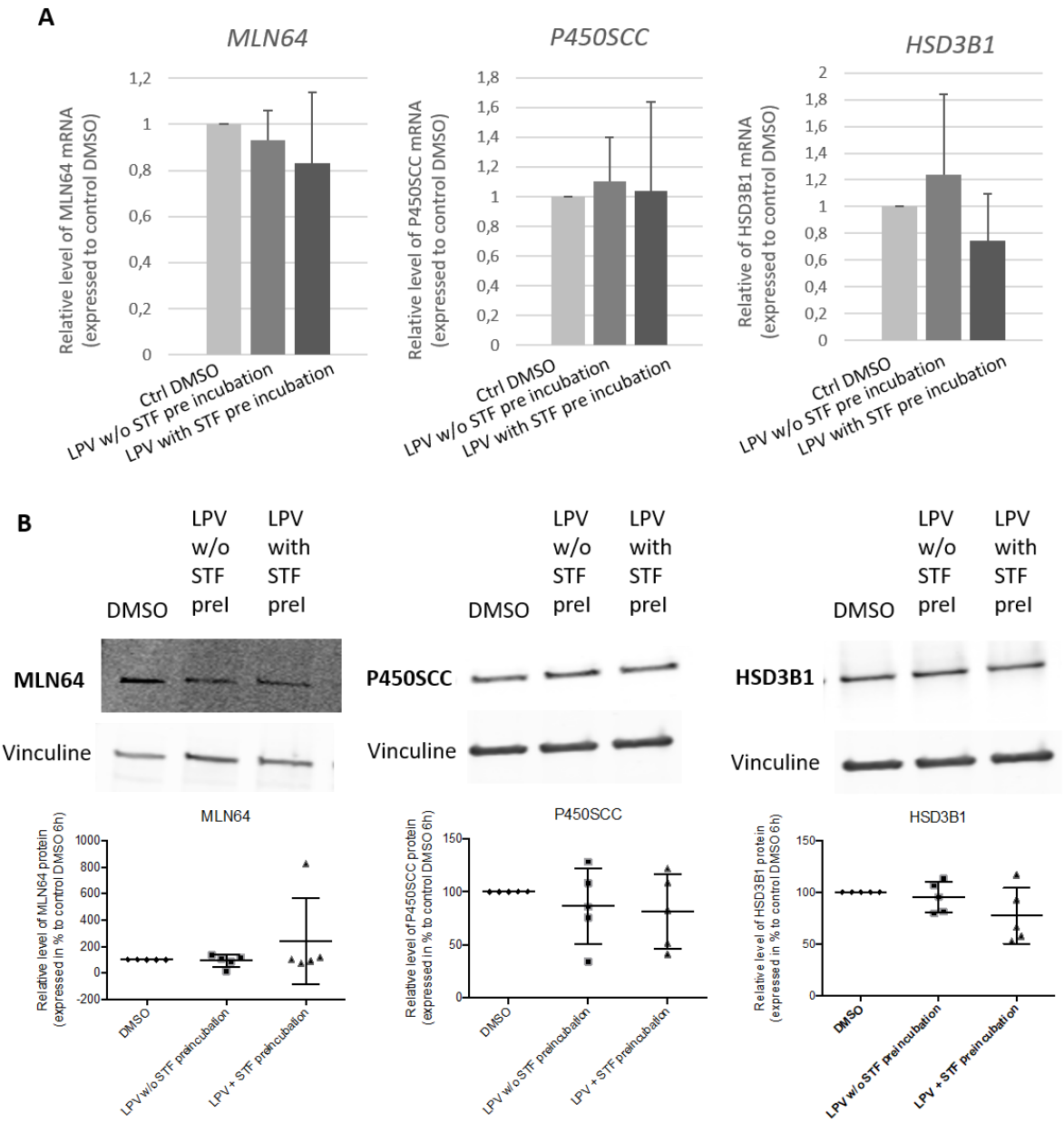


Figure 14: Inhibition of IRE1α pathway does not prevent the inhibitory effect of LPV on hCG and P4 secretions. VCT cells isolated from human term placenta were cultured for 72h. Cells were further incubated for 2h with STF (100 µM) (LPV + STF preincubation) or DMSO control (LPV without STF preincubation) before incubation for 4h with LPV (10 µM). hCG (A) and P4 (B) levels were measured in supernatant. The results are presented as the mean +/- SD from 4 independent experiments.



<u>Figure 15:</u> Inhibition of IRE1α pathway does not prevent the inhibitory effect of LPV on P4 synthesis partners expression. VCT cells isolated from human term placenta were cultured for 72h. Cells were further incubated for 2h with STF (100 µM) (LPV + STF preincubation) or DMSO control (LPV without STF preincubation) before incubation for 4h with LPV (10 µM). MLN64, P450SCC and HSD3B1 expression was evaluated by RT-qPCR (A) and western-blot using anti-MLN64, anti-P450SCC and anti-HSD3B1 antibodies (B). Vinculin protein expression determined by western-blot using anti-vinculin antibody was used as loading control. The results are presented as the mean +/- SD from n = 3 independent experiments for RT-qPCR and n = 5 independent experiments for western-blot.

Discussion and conclusion

It has been well established that ARV against HIV during pregnancy is beneficial for HIV infected mothers and prevents the viral transmission to the fetus (World Health Organization 2016). The treatment aims for an indetectable viral load in maternal blood. It combines 2 nucleosidic reverse transcriptase inhibitors (NRTI) with 1 protease inhibitor (PI) (World Health Organization 2016). This strategy has greatly improved the management of the disease. However, secondary effects may appear under PI treatments such as pre-term birth, pre-eclampsia, and intra uterine growth restriction (Sibiude et al. 2012; Short et Taylor 2014). Moreover, PI have been shown to impair steroidogenesis in different endocrine organs including adrenals, leading to a decreased P4 level in maternal blood and impaired adrenal function in neonates exposed *in utero* (Sibiude et al. 2012; Kariyawasam et al. 2014; McDonald et al. 2018). However, very little is known about the placenta which produces progesterone, a steroid hormone mandatory for the maintenance of pregnancy (Rodway et al. 1988; Tuckey 2005; Wilson et Mesiano 2020). Our aim was to investigate *in vitro* whether PI such as ritonavir and lopinavir, disturb human placental steroidogenesis focusing on the progestins, mitochondria, and main intracellular pathways potentially targeted.

For many years, the syncytiotrophoblast (ST) has been considered as the main endocrine tissue of the placenta as it is in direct contact with maternal blood in the intervilli chamber (Benirschke, Burton, et Baergen 2013). As in the chorionic villi the ST arises from the differentiation of the villous cytotrophoblast (VCT), we used our *in vitro* model to extensively characterize progestin production in human villous placenta. In our previous study (Fraichard et al. 2020), we established that placental steroidogenesis is not restricted to ST only but starts early in the VCT which expresses the cholesterol transporter MLN64 and the key enzymes P450SCC and HSD3B1 required for P4 synthesis and secretes significant levels of P4. We confirmed these findings in this work pointing out that the whole trophoblast is able to produce placental steroid and protein hormones. This is in agreement with previous studies showing that VCT and also extravillous cytotrophoblast (EVCT) produce significant amounts of hCG and its subunits (Handschuh et al. 2007). We confirmed in this *in vitro* study that the endocrine production increases with the morphological differentiation of VCT into ST, hCG secretion increase being associated with ST formation. We also established that this increase in hCG secretion is correlated with an increase in P4 synthesis and secretion (Fraichard et al. 2020).

The mitochondria is a key organelle involved both in steroidogenesis and in trophoblast differentiation(Dorothée Poidatz et al. 2015; Wasilewski et al. 2012; Shan et al. 2019). We have previously demonstrated that the differentiation of VCT into ST is associated with a decrease in mitochondrial transmembrane potential. This functional change in mitochondria could explain the observed changes in P4 synthesis (Fraichard et al. 2020). Indeed, a previous study on placental tissue demonstrated that a decrease in transmembrane potential in mitochondrial fraction is associated with a high steroidogenesis activity (Bustamante et al. 2014). In addition, we showed that *in vitro* differentiation of VCT into ST is associated with morphological changes in mitochondria using transmission electronic microscopy. Indeed, in our *in vitro* model, VCT are predominant at 24h of culture whereas ST is formed at 72h of culture. In VCT, mitochondria are larger than in ST. Moreover, mitochondria in VCT present cristae with typical structure, whereas they present in ST an atypical structure of cristae and a denser matrix than in VCT, in agreement with previous histological studies (De Los Rios Castillo et al. 2011). These structural modifications are known to be related to fusion/fission dynamics of mitochondria (Meyer, Leuthner, et Luz 2017). However, in our model, we observed no modification in the expression of two main fusion proteins Mfn2 and OPA1 during differentiation of VCT into ST. These results are not consistent with a previous study in BeWo cells that demonstrated a decrease in Mfn2 and OPA1 expression but under forskolin induced differentiation (Wasilewski et al. 2012). This suggests that the observed changes in mitochondria depend on the model used, i.e. primary trophoblast culture in our model compared to choriocarcinoma cell lines and on experimental conditions, i.e basal or stimulated by FSK. Mitochondrial dynamics are known to be involved in the regulation of steroidogenesis. Some studies demonstrated that fission process is necessary for steroidogenesis (Holland et al. 2017; Wasilewski et al. 2012), while others reported on the contrary that steroidogenesis relies on fusion process (Shan et al. 2019; Duarte et al. 2012). In our model, it is likely that fusion process is not necessary for P4 synthesis as we found no change in Mfn2 and OPA1 expression during the ST formation. It would thus be of interest to evaluate the expression of other factors such as fission factors Drp1 and Fiss1. An increase in PGC1-α expression induced by P4 could lead to an increase in mitochondria biogenesis allowing an increase in P4 synthesis itself (Ruiz et al. 2012).

We also found morphological changes in nuclei and ER during VCT differentiation into ST. In ST, we observed that the nuclei present a denser chromatin compared to VCT confirming previous placental histological findings (Benirschke, Burton, et Baergen 2013). The ER is also thinner in VCT than in ST cells. The presence of large ER in ST is associated with an intense protein synthesis (Guzel et al. 2017; G.J. Burton, Yung, et Murray 2017), consistent with the observed increase in hCG secretion. It is also in agreement with the UPR activation during VCT differentiation into ST (Bastida-Ruiz et al. 2019). To

conclude, the use of transmission electronic microscopy allowed us to fully characterize the differentiation of VCT into ST at cellular level pointing out a membrane fusion, a nuclear high-condensed chromatin, small and dense mitochondria and large ER. This is in agreement with *in vivo* findings showing a release of syncytial knots containing ST DNA and UPR activation and an increased hormonal production.

We tested the impact of PI, notably the LPV, at a concentration of 10 µM, which corresponds to maternal blood concentration. Higher concentrations are likely to induce apoptosis as observed in HEK293 cells (Taura et al. 2013). LPV at 10 µM induced an early decrease in P4 production in VCT that could be in part responsible for the decrease in P4 level in treated mother serum (Sibiude et al. 2012; McDonald et al. 2018). However, it would be of interest to investigate the effect of LPV/RTV as RTV is often associated to LPV as a booster (Sibiude et al. 2012). Surprisingly, the decrease in P4 secretion under LPV was not associated with a decrease in expression of P450SCC and HSD3B1 enzymes in VCT. LPV could act rather indirectly by modulating P4 catabolism or transport. Indeed, LPV could activate CYP family enzymes (Yeh et al. 2006) and could modulate ATP-Binding Cassette transporter activity (Besse et al. 2018). In ST, after 48h of incubation with LPV, we also noted a discrepancy between the decreased expression of P450SCC and HSD3B1 enzymes, and the level of P4 secretion. The decrease in enzyme expression could be due to a global alteration in protein synthesis involving the eEF2 traduction factor. Indeed, it has previously been shown in the myocyte that LPV induces a decrease in protein synthesis (Hong-Brown et al. 2008).

LPV did not only induce an early decrease in P4 but also in hCG secretion in VCT. However, the decrease in hCG also persisted in ST after 48h of incubation. This could be due to the fact that LPV affects rather ER and protein pathway than mitochondria and steroidogenesis. During ST formation, dynamic changes in some mitochondria could overlap the initial effect of LPV observed on VCT. On the contrary, as far as hormone production is concerned, we observed that LPV leads to a decrease in plasma membrane fusion as demonstrated by the decrease in fusion index associated with a decreased nuclei chromatin condensation and a thinner ER. Consequently, the 48h incubation with LPV may prevent the morphological changes physiologically associated with functional differentiation. However, it is possible that the early decrease in P4 and hCG secretion induced by LPV from 6h of incubation in VCT, is responsible for the reduced morphological differentiation as both hormones are involved in autocrine an paracrine regulation of the trophoblast differentiation. As a matter of fact, hCG receptors are more expressed in VCT cells than in ST (Pidoux et al. 2007) and could be regulated by P4 (Yung et al. 2014) in order to control plasma membrane fusion (Pidoux et al. 2014). Consequently, the decrease

in P4 observed in VCT cells could impair hCG receptor expression. The decrease in hCG receptors expression and hCG secretion would lead to a decrease in plasma membrane fusion, preventing the global differentiation of VCT into ST.

Several intracellular mechanisms are involved in trophoblast differentiation (Pidoux et al. 2007; 2014) such as mitochondria dynamics and UPR pathways (Poidatz et al. 2015; Bastida-Ruiz et al. 2019). It is known that PI, notably LPV, alter both mitochondria DNA content and dynamics (Guitart-Mampel et al. 2017). We analyzed the protein expression of two mitochondrial pro-fusion factors Mfn2 and OPA1. We demonstrated that LPV induced a decrease in Mfn2 expression after 48h of incubation while OPA1 expression remained unchanged. The decrease in at least one fusion factor could result in a decrease in fusion process. These results are consistent with previous studies demonstrating that mitochondrial fusion is necessary for steroidogenesis (Shan et al. 2019; Duarte et al. 2012). However, they are inconsistent with the observed P4 secretion in ST after 48h of incubation. This discrepancy could be explained by a global decrease in protein synthesis including Mfn2. It could be induced by a global cellular stress targeting rather the ER and the proteins than the mitochondria and the steroidogenesis (Hong-Brown et al. 2008).

In collaboration with Dr Marie Cohen, we previously demonstrated that UPR pathway regulates the expression of enzymes involved in P4 synthesis. Marie Cohen and al. also previously demonstrated that trophoblast differentiation and hCG secretion are under the control of UPR pathway (Bastida-Ruiz et al. 2019). Interestingly, several studies showed an activation of UPR, especially the IRE1α pathways under LPV exposition (Taura et al. 2013; Ganta et Chaubey 2019; L. Chen et al. 2009; Zha et al. 2013). We established in our model that LPV induces an early increase in sXBP1 and GRP78 expression in VCT pointing out an activation of IRE1α pathway in agreement with previous studies (Taura et al. 2013; Ganta et Chaubey 2019; L. Chen et al. 2009; Zha et al. 2013; Brüning et al. 2014). The activation of IRE1α is not maintained in ST, where GRP78 expression is on the contrary decreased. All these findings under LPV exposition i.e. UPR activation, and decrease in GRP78, P450SCC, HSD3B1 and Mfn2 are likely to reflect an uncontrolled global cellular stress. Physiologically, UPR activation allows the maintenance of cellular homeostasis in case of stress. During a stress which cannot be controlled by UPR pathways activation, other processes take place, including particularly a general decrease in protein synthesis (Bastida-Ruiz et al. 2017). Thus, LPV could induce a stress activating IRE1α pathways. This stress could become uncontrollable after 48h incubation with LPV ending in a global cell alteration and decreased protein synthesis as previously demonstrated in myocytes cells (Hong-Brown et al. 2008).

In comparison to other PI, we demonstrated that RTV has no effect either on the ST formation or on hCG and P4 secretion *in vitro*, whatever the used concentration.

LPV exposition could not only disrupt VCT and its functional differentiation into ST. It could also directly damage the ST covering the villi in direct contact with maternal blood and thus with PI. Indeed, on preexisting ST, we showed that LPV induces a decrease in both hCG and P4 secretion. In ST, on the contrary of VCT, this decreased secretion is associated with a decrease in P450SCC and HSD3B1 expression. LPV induces an increase in Mfn2 expression in ST. Consequently, the mitochondria in ST are more fused under LPV exposition. The increase in mitochondrial fusion induced by LPV could explain the decrease in P4 secretion by ST. We also investigated the effect on UPR pathways. In the preexisting ST, LPV induces an increase in sXBP1 expression demonstrating the activation of IRE1α pathway. To investigate whether this activation is responsible for the disruption in hCG and P4 secretion, we used an IRE1α inhibitor. We showed that the IRE1α inhibitor does not prevent either the decrease in hCG and P4 secretion or the decrease in P450SCC and HSD3B1 expression induced by LPV. The absence of effect of the IRE1α inhibitor may be explained by compensatory mechanisms of other UPR pathways. Indeed, the use of chemical UPR inhibitors is known to lead to compensatory mechanisms via the activation of the other UPR pathways (Gallagher et al. 2016). It will thus be of interest to perform additional experiments combining different chemical inhibitors or siRNA targeting the 3 UPR pathways. Further investigation would also be necessary to check whether LPV directly activates UPR pathways or not. As a matter of fact, in HEK293 cells, Taura and al (Taura et al. 2013) demonstrated that LPV is able to produce Reactive Oxygen Species (ROS), leading to an activation of JUNK kinase pathway, further activating UPR pathways. Consequently, ROS production could be involved in the indirect effect of LPV on UPR activation in trophoblast.

The treatment of HIV infection uses a combination of two NRTI combined with a PI. In our study, we have demonstrated for the first time that RTV has no significant effects on endocrine function in trophoblast cells. On the contrary, LPV induces alteration of trophoblast morphological differentiation related to a decrease in plasma membrane fusion and in nuclei chromatin condensation, larger mitochondria and a thinner ER. These morphological alterations are associated with a decrease in P4 and hCG secretions. LPV also impairs mitochondrial dynamics as attested by an increase in Mfn2 expression and an induction of ER stress. ER stress leads to IRE1α activation marked by an increase in sXBP1 and GRP78 expression. These findings give the beginning of an explanation for the PI *in vivo* toxicity as they are known to induce preterm birth especially when they are “boosted” with RTV.

References

Alsat E, Haziza J, Evain-Brion D. Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human trophoblast cells in culture. J Cell Physiol. 1993;154(1):122-128. doi:10.1002/jcp.1041540115

Bastida-Ruiz D, Aguilar E, Ditisheim A, Yart L, Cohen M. Endoplasmic reticulum stress responses in placentation - A true balancing act. Placenta. 2017;57:163-169. doi:10.1016/j.placenta.2017.07.004

Bastida-Ruiz D, Yart L, Wuillemin C, et al. The fine-tuning of endoplasmic reticulum stress response and autophagy activation during trophoblast syncytialization. Cell Death Dis. 2019;10(9):651. doi:10.1038/s41419-019-1905-6

Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Pathology of the Human Placenta 6th. Springer.; 2013.

Besse A, Stolze SC, Rasche L, et al. Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma. Leukemia. 2018;32(2):391-401. doi:10.1038/leu.2017.212

Bielinska M, Boime I. The glycoprotein hormone family: structure and function of the carbohydrate chains. :23.

Brüning A, Kimmich T, Brem GJ, et al. Analysis of endoplasmic reticulum stress in placentas of HIV-infected women treated with protease inhibitors. Reprod Toxicol. 2014;50:122-128. doi:10.1016/j.reprotox.2014.10.012

Burton GJ, Yung HW, Murray AJ. Mitochondrial – Endoplasmic reticulum interactions in the trophoblast: Stress and senescence. Placenta. 2017;52:146-155. doi:10.1016/j.placenta.2016.04.001

Bustamante J, Ramírez-Vélez R, Czerniczyniec A, Cicerchia D, Aguilar de Plata AC, Lores-Arnaiz S. Oxygen metabolism in human placenta mitochondria. J Bioenerg Biomembr. 2014;46(6):459-469. doi:10.1007/s10863-014-9572-x

Cai H, Chen L, Zhang M, Xiang W, Su P. Low expression of MFN2 is associated with early unexplained miscarriage by regulating autophagy of trophoblast cells. Placenta. 2018;70:34-40. doi:10.1016/j.placenta.2018.08.005

Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. J Cell Biol. 2003;160(2):189-200. doi:10.1083/jcb.200211046

Chen L, Jarujaron S, Wu X, et al. HIV Protease Inhibitor Lopinavir-induced TNF-a and IL-6 Expression is Coupled to the Unfolded Protein Response and ERK Signaling Pathways in Macrophages. Biochem Pharmacol. 2009;78(1):70-77. doi:10.1016/j.bcp.2009.03.022

Dal Yontem F, Kim S, Ding Z, Grimm E, Ekmekcioglu S, Akcakaya H. Mitochondrial dynamic alterations regulate melanoma cell progression. J Cell Biochem. 2019;120(2):2098-2108. doi:10.1002/jcb.27518

De Los Rios Castillo D, Zarco-Zavala M, Olvera-Sanchez S, et al. Atypical Cristae Morphology of Human Syncytiotrophoblast Mitochondria. J Biol Chem. 2011;286(27):23911-23919. doi:10.1074/jbc.M111.252056

Duarte A, Poderoso C, Cooke M, et al. Mitochondrial Fusion Is Essential for Steroid Biosynthesis. Vanacker J-M, ed. PLoS ONE. 2012;7(9):e45829. doi:10.1371/journal.pone.0045829

Fisher JJ, McKeating DR, Cuffe JS, Bianco-Miotto T, Holland OJ, Perkins AV. Proteomic Analysis of Placental Mitochondria Following Trophoblast Differentiation. Front Physiol. 2019;10:1536. doi:10.3389/fphys.2019.01536

Fournier T, Guibourdenche J, Evain-Brion D. Review: hCGs: Different sources of production, different glycoforms and functions. Placenta. 2015;36:S60-S65. doi:10.1016/j.placenta.2015.02.002

Fraichard C, Bonnet F, Garnier A, et al. Placental production of progestins is fully effective in villous cytotrophoblasts and increases with the syncytiotrophoblast formation. Mol Cell Endocrinol. 2020;499:110586. doi:10.1016/j.mce.2019.110586

Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, et al. The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis. Dev Cell. 2001;1(4):515-525. doi:10.1016/S1534-5807(01)00055-7

Gallagher CM, Garri C, Cain EL, et al. Ceapins are a new class of unfolded protein response inhibitors, selectively targeting the ATF6α branch. Ng D, ed. eLife.2016;5:e11878. doi:10.7554/eLife.11878

Ganta KK, Chaubey B. Endoplasmic reticulum stress leads to mitochondria-mediated apoptosis in cells treated with anti-HIV protease inhibitor ritonavir. Cell Biol Toxicol. 2019;35(3):189-204. doi:10.1007/s10565-018-09451-7

Gerbaud P, Taskén K, Pidoux G. Spatiotemporal regulation of cAMP signaling controls the human trophoblast fusion. Front Pharmacol. 2015;6. doi:10.3389/fphar.2015.00202

Guitart-Mampel M, Hernandez AS, Moren C, et al. Imbalance in mitochondrial dynamics and apoptosis in pregnancies among HIV-infected women on HAART with obstetric complications. J Antimicrob Chemother. Published online July 4, 2017. doi:10.1093/jac/dkx187

Guzel E, Arlier S, Guzeloglu-Kayisli O, et al. Endoplasmic Reticulum Stress and Homeostasis in Reproductive Physiology and Pathology. Int J Mol Sci. 2017;18(4). doi:10.3390/ijms18040792

Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, et al. Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Endocrinology. 2007;148(10):5011-5019. doi:10.1210/en.2007-0286

Holland O, Dekker Nitert M, Gallo LA, Vejzovic M, Fisher JJ, Perkins AV. Review: Placental mitochondrial function and structure in gestational disorders. Placenta. 2017;54:2-9. doi:10.1016/j.placenta.2016.12.012

Hong-Brown LQ, Brown CR, Huber DS, Lang CH. Lopinavir impairs protein synthesis and induces eEF2 phosphorylation via the activation of AMP-activated protein kinase. J Cell Biochem. 2008;105(3):814-823. doi:10.1002/jcb.21882

Kariyawasam D, Simon A, Laborde K, et al. Adrenal Enzyme Impairment in Neonates and Adolescents Treated with Ritonavir and Protease Inhibitors for HIV Exposure or Infection. Horm Res Paediatr. 2014;81(4):226-231. doi:10.1159/000356916

Lacroix MC, Guibourdenche J, Frendo JL, Muller F, Evain-Brion D. Human Placental Growth Hormone—A Review. Placenta. 2002;23:S87-S94. doi:10.1053/plac.2002.0811

Martinez F, Kiriakidou M, Strauss JF. Structural and Functional Changes in Mitochondria Associated with Trophoblast Differentiation: Methods to Isolate Enriched Preparations of Syncytiotrophoblast Mitochondria. 1997;138(5):12.

McDonald CR, Conroy AL, Gamble JL, et al. Estradiol Levels Are Altered in Human Immunodeficiency Virus-Infected Pregnant Women Randomized to Efavirenz-Versus Lopinavir/Ritonavir-Based Antiretroviral Therapy. Clin Infect Dis. 2018;66(3):428.

Meyer JN, Leuthner TC, Luz AL. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. Toxicology. 2017;391:42-53. doi:10.1016/j.tox.2017.07.019

Papp E, Mohammadi H, Loutfy MR, et al. HIV protease inhibitor use during pregnancy is associated with decreased progesterone levels, suggesting a potential mechanism contributing to fetal growth restriction. J Infect Dis. 2015;211(1):10-18. doi:10.1093/infdis/jiu393

Park H-J, Park S-J, Koo D-B, et al. Progesterone production is affected by unfolded protein response (UPR) signaling during the luteal phase in mice. Life Sci. 2014;113(1-2):60-67. doi:10.1016/j.lfs.2014.07.033

Pasqualini JR. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005;97(5):401-415. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.08.004

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(1):26-35. doi:10.1002/jcp.20995

Pidoux G, Gerbaud P, Dompierre J, et al. A PKA–ezrin–Cx43 signaling complex controls gap junction communication and thereby trophoblast cell fusion. J Cell Sci. 2014;127(19):4172-4185. doi:10.1242/jcs.149609

Poidatz D, Dos Santos E, Gronier H, et al. Trophoblast syncytialisation necessitates mitochondrial function through estrogen-related receptor-γ activation. Mol Hum Reprod. 2015;21(2):206-216. doi:10.1093/molehr/gau102

Powis KM, Kitch D, Ogwu A, et al. Increased Risk of Preterm Delivery Among HIV-Infected Women Randomized to Protease Versus Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Based HAART During Pregnancy. J Infect Dis. 2011;204(4):506-514. doi:10.1093/infdis/jir307

Rodway M, Zhou F, Benoit J, Basil Ho Yuen, Leung PCK. Differential effects of 8-bromo-cyclic AMP on human chorionic gonadotropin (hCG), progesterone and estrogen production by term placental cells. Life Sci. 1988;43(18):1451-1458. doi:10.1016/0024-3205(88)90256-1

Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombès A. Characterization of mammalian mitofusins. J Cell Sci. 2002;115:163-1674.

Ruiz M, Courilleau D, Jullian J-C, et al. A Cardiac-Specific Robotized Cellular Assay Identified Families of Human Ligands as Inducers of PGC-1α Expression and Mitochondrial Biogenesis. PLOS ONE. 2012;7(10):e46753. doi:10.1371/journal.pone.0046753

Shan A, Li M, Li X, et al. BDE-47 Decreases Progesterone Levels in BeWo Cells by Interfering with Mitochondrial Functions and Genes Related to Cholesterol Transport. Chem Res Toxicol. 2019;32(4):621-628. doi:10.1021/acs.chemrestox.8b00312

Short C-ES, Taylor GP. Antiretroviral therapy and preterm birth in HIV-infected women. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014;12(3):293-306. doi:10.1586/14787210.2014.885837

Sibiude J, Warszawski J, Tubiana R, et al. Premature Delivery in HIV-Infected Women Starting Protease Inhibitor Therapy During Pregnancy: Role of the Ritonavir Boost? Clin Infect Dis. 2012;54(9):1348-1360. doi:10.1093/cid/cis198

Taura M, Kariya R, Kudo E, et al. Comparative analysis of ER stress response into HIV protease inhibitors: Lopinavir but not darunavir induces potent ER stress response via ROS/JNK pathway. Free Radic Biol Med. 2013;65:778-788. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.161

Tuckey RC. Progesterone synthesis by the human placenta. Placenta. 2005;26(4):273-281. doi:10.1016/j.placenta.2004.06.012

Walker OS, Ragos R, Wong MK, Adam M, Cheung A, Raha S. Reactive oxygen species from mitochondria impacts trophoblast fusion and the production of endocrine hormones by syncytiotrophoblasts. Sun K, ed. PLOS ONE. 2020;15(2):e0229332. doi:10.1371/journal.pone.0229332

Wasilewski M, Semenzato M, Rafelski SM, Robbins J, Bakardjiev AI, Scorrano L. Optic Atrophy 1-Dependent Mitochondrial Remodeling Controls Steroidogenesis in Trophoblasts. Curr Biol. 2012;22(13):1228-1234. doi:10.1016/j.cub.2012.04.054

Wilson RA, Mesiano SA. Progesterone signaling in myometrial cells: role in human pregnancy and parturition. Curr Opin Physiol. 2020;13:117-122. doi:10.1016/j.cophys.2019.09.007

World Health Organization. Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach.; 2016. Accessed March 20, 2020. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208825/1/9789241549684_eng.pdf

Yeh RF, Gaver VE, Patterson KB, et al. Lopinavir/Ritonavir Induces the Hepatic Activity of Cytochrome P450 Enzymes CYP2C9, CYP2C19, and CYP1A2 But Inhibits the Hepatic and Intestinal Activity of CYP3A as Measured by a Phenotyping Drug Cocktail in Healthy Volunteers. JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr. 2006;42(1):52–60. doi:10.1097/01.qai.0000219774.20174.64

Yung Y, Maman E, Ophir L, et al. Progesterone antagonist, RU486, represses LHCGR expression and LH/hCG signaling in cultured luteinized human mural granulosa cells. Gynecol Endocrinol. 2014;30(1):42-47. doi:10.3109/09513590.2013.848426

Zha BS, Wan X, Zhang X, et al. HIV Protease Inhibitors Disrupt Lipid Metabolism by Activating Endoplasmic Reticulum Stress and Inhibiting Autophagy Activity in Adipocytes. Yang H, ed. PLoS ONE. 2013;8(3):e59514. doi:10.1371/journal.pone.0059514

Synthèse des résultats obtenus

Nous avons déjà étudié l'impact du RTV, inhibiteur connu de l'enzyme CYP3A. Les cellules ont été incubées pendant 6, 24 ou 48h avec des concentrations de RTV allant de 5 à 20 µM. Quelques soient les concentrations ou le temps d'incubation, le RTV n'impacte ni les sécrétions d'hCG ou de P4, ni l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des progestatifs.

Nous avons ensuite étudié l'effet du LPV, autre IP couramment utilisé dans le traitement du VIH en cours de grossesse. Les CTV ont été incubés pendant 6, 24 ou 48h avec une concentrations de LPV de 10 µM. Les résultats montrent que le LPV altère à la fois la différenciation morphologique et la différenciation fonctionnelle des CTV. En effet, il diminue la capacité de fusion des CTV en ST ainsi que la sécrétion d'hCG et de P4. Il entraine également une diminution de l'expression syncytiale des enzymes P450SCC et HSD3B1 .

La différenciation des CTV en ST s'accompagne d'une modification structurale des mitochondries, les mitochondries du ST étant sont plus petites avec des crêtes de structure atypique, spécifique d'une activité stéroïdogène. Sous LPV, les mitochondries du ST ne présentent plus cette structure atypique, mais ont une structure semblable à celle des mitochondries des CTV et caractéristique d'une activité métabolique. Le LPV diminue aussi l'expression syncytiale du facteur pro-fusion Mfn2 impliqué mais pas celle du facteur pro-fusion OPA1.

L'étude de l'expression des facteurs de la voie UPR révèle que le LPV est capable d'induire l'activation de la branche IRE1α marquée par une augmentation de l'expression de GRP78 et de sXBP1 au cours de la différenciation trophoblastique dès 6h d'incubation.

Le ST étant le tissu en contact direct avec le sang maternel, il est le premier à être au contact des IP. Nous avons donc évalué l'impact du LPV sur ce tissu déjà formé. Après 6h d'incubation, le LPV diminue la sécrétion d'hCG et de P4 du ST. Cette diminution de P4 est associée à une diminution de l'expression protéique des enzymes P450SCC et HSD3B1. Le LPV perturbe également la dynamique

mitochondriale en augmentant l'expression protéique du facteur Mfn2, sans influencer celle du facteur OPA1. Le LPV est également capable d'induire l'activation de la branche IRE1α marquée par l'augmentation de l'expression de sXBP1 et GRP78. En revanche, l'inhibition de cette branche IRE1α par co-incubation du STF-083010 (STF) avec le LPV ne permet pas de bloquer l'effet inhibiteur du LPV ni sur les sécrétions d'hCG et de P4, ni sur l'expression des enzymes P450SCC et HSD3B1.

ii. Résultats complémentaires

Oestrogènes et IP

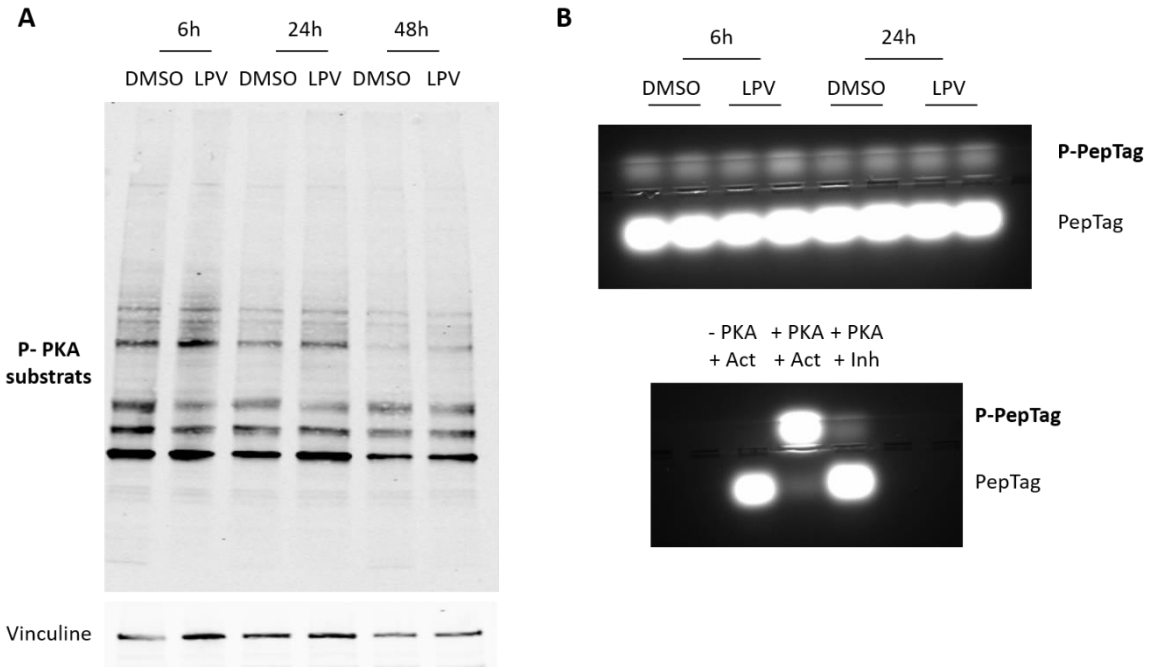
Les résultats concernant l'impact des IP sur la production des oestrogènes sont détaillés dans le paragraphe « Résultats partie III ». Brièvement, le RTV n'influence ni la sécrétion ni la synthèse d'E2. Par contre, le LPV induit une augmentation de la sécrétion d'E2 mais une diminution de l'expression des enzymes spécifiques de sa synthèse (stéroïde sulfatase et aromatase).

Voie AMPc/PKA et lopinavir (LPV)

Nous avons étudié l'impact du LPV sur la voie AMPc/PKA, qui est un carrefour majeur de la qualité fonctionnelle du tissu trophoblastique (Pidoux et al. 2014; Gerbaud, Taskén, et Pidoux 2015).

Nous avons évalué l'activité indirecte de la PKA en évaluant l'état de phosphorylation de ses cibles en western blot. La variation d'intensité des bandes ne nous permet pas de mettre en évidence un effet significatif du LPV sur la phosphorylation des cibles de la PKA (*Figure 41.A*).

Parallèlement, nous avons étudié l'activité intracellulaire de la PKA à l'aide d'un kit « PepTag nonradioactive Protein Kinase Assay ». Ce kit est composé d'un PepTag phosphorylable par la PKA, visible sous UV, dont la charge change lorsqu'il est phosphorylé. Par conséquent, en présence d'enzyme PKA active, le PepTag phosphorylé va migrer dans le sens inverse au PepTag non phosphorylé permettant leur identification respective. Les résultats des expériences ne permettent pas de mettre en évidence une modification de l'activité PKA lorsque les cellules sont incubées avec du LPV (*Figure 41.B*).



<u>Figure 41 :</u> Le LPV ne semble pas altérer la voie de signalisation AMPc/PKA. Les CTV isolés à partir de placentas humains à terme ont été cultivés pendant 15h avant d'être incubé avec du LPV à 10 µM ou le contrôle DMSO pendant 6h, 24h ou 48h. (A) La phosphorylation des substrats de PKA ont été évalué western-blot avec un anticorps anti-substrat-P de PKA. L'expression protéique de la vinculine déterminé avec un anticorps anti-vinculine a été utilisé comme contrôle de charge. Cette image représente les résultats globaux obtenus à partir de 3 expériences indépendantes. (B) L'activité PKA a été étudiée par un kit « PepTag nonradioactive Protein Kinase Assay » (Promega). Les conditions « -PKA+Act », « +PKA+Act » and « +PKA+Inh » sont des expériences contrôles. Cette image représente les résultats globaux obtenus à partir de 2 expériences indépendantes.

<u>*Effet de l'association lopinavir/ritonavir sur le syncytium*</u>

Lors du traitement anti VIH chez les patientes en cours de grossesse, le LPV est « boosté » au RTV afin d'augmenter sa biodisponibilité et sa demi-vie. Nous avons donc testé l'association LPV/RTV afin de voir si les effets observés avec le LPV seul peuvent être accentués par le RTV. Le ST a donc été incubé avec le LPV à 10 µM, le RTV à 5 µM ou l'association du LPV à 10 µM avec le RTV à 5 µM (LPV/RTV). L'analyse des surnageants de ces cultures révèle que les effets du LPV observés sur les sécrétions d'hCG et de P4 tendent à être accentués par le RTV (*Figure 42*).

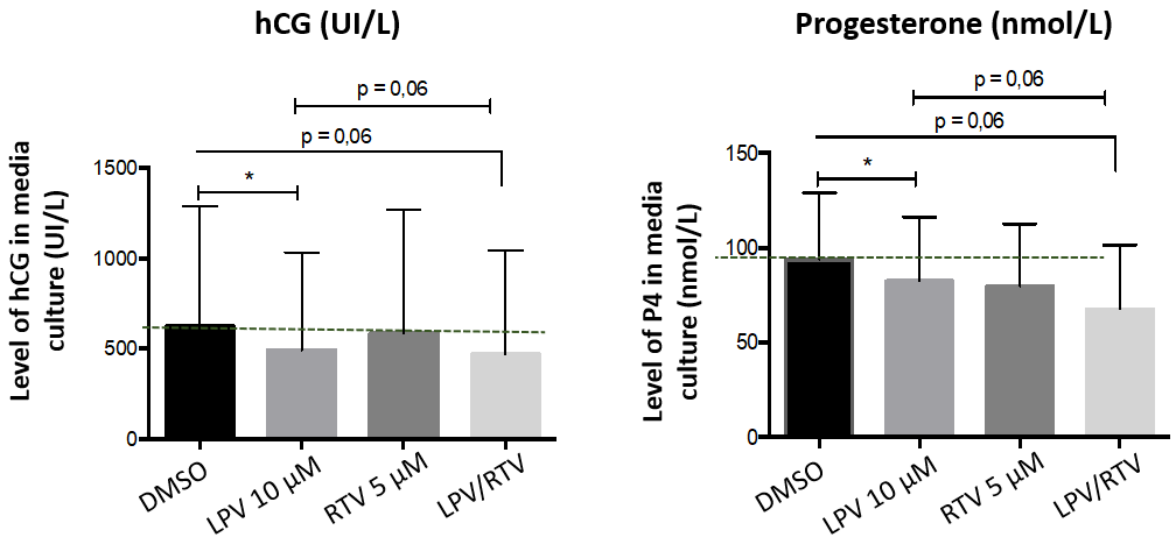


*Figure 42 : Effet potentialisateur du RTV sur le LPV. Les CTV isolés à partir de placentas humains à terme ont été cultivés pendant 72h afin de former le ST. Puis ils ont été incubés pendant 6h avec du LPV à 10 µM, du RTV à 5 µM, l'association du LPV et RTV ou le contrôle DMSO. Les niveaux d'hCG et de P4 ont été mesurés dans les surnageants de culture par immuno-analyse. Les résultats sont présentée comme la moyenne +/- SD de 4 expériences indépendantes. * : p < 0,05 VS DMSO. Test t non paramétrique de student pour données appariées.*

IV. Conclusion

Dans notre modèle, le RTV seul n'a pas d'effets sur le trophoblaste villeux. Les altérations induites par le LPV sont à la fois morphologiques avec une diminution de la capacité des CTV à fusionner en ST et fonctionnelles avec une diminution de la sécrétion d'hCG et de P4 associée à une diminution de l'expression des enzymes P450SCC et HSD3B1.

Ces altérations fonctionnelles peuvent résulter de l'impact du LPV sur des mécanismes et organites intracellulaires. Sous LPV, les mitochondries syncytiales conservent majoritairement la structure classique qu'elles ont dans le CTV et qui est associée à une activité métabolique, au détriment de leur structure atypique caractéristique d'une activité stéroïdogène, ce qui expliquerait la diminution de l'expression de certaines enzymes impliquées dans la synthèse de P4 (Martinez, Kiriakidou, et Strauss 1997; De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014; Martinez et al. 2015; Holland et al. 2017).

Le changement de structure des mitochondries est contrôlé par divers facteurs dont le facteur Mfn2 Ce facteur régule la fusion des mitochondries entrainant une hausse du potentiel mitochondrial transmembranaire (De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014; Martinez et al. 2015a;

Holland et al. 2017; Fisher et al. 2019). Notre étude révèle qu'au niveau du ST pré-formé, le LPV induit l'augmentation de l'expression du facteur Mfn2. Cette augmentation accroit la fusion des mitochondries associées à un haut potentiel transmembranaire, ce qui pourrait expliquer la diminution de P4 observée sous LPV. En effet, la P4 est majoritairement synthétisée dans des mitochondries à faible potentiel transmembranaire.

Le LPV provoque un stress du RE dans les CTV qui aboutit à l'activation de la voie IRE1α marquée par une augmentation de l'expression de la protéine GRP78 et de l'épissage du facteur IRE1α menant à l'augmentation de l'expression de sXBP1. L'activation de la voie UPR étant nécessaire pour la différenciation trophoblastique ainsi que l'augmentation de la sécrétion d'hCG (Bastida-Ruiz et al. 2019), la suractivation de cette voie induite pas le LPV pourrait être responsable de la diminution de la fusion des CTV ainsi que la diminution de la sécrétion d'hCG. De plus, au niveau ovarien (Park et al. 2014), l'induction d'un stress du RE conduit à la diminution de la stéroïdogenèse, ce qui pourrait expliquer l'effet inhibiteur observé en cas d'exposition au LPV. Au niveau de ST pré-formé, le LPV est également capable d'induire l'activation de la voie IRE1α marquée par une augmentation de l'expression de la protéine GRP78 et du facteur sXBP1. En revanche, l'inhibition de la voie IRE1α ne permet pas de bloquer l'effet inhibiteur du LPV que ce soit sur la sécrétion d'hCG ou de P4. Cette absence de blocage pourrait être expliquer par un effet compensatoire sur l'une ou les 2 autres branches de la voie UPR (Gallagher et al. 2016).

La voie AMPc/PKA, qui est centrale au niveau placentaire, ne semble en revanche pas être impactée par le LPV. Néanmoins, il serait intéressant d'étudier les autres voies de signalisations canoniques, comme la voie MEK/$ERK_{1/2}$ qui peuvent être des cibles des IP (Chen et al. 2009; Ravaud et al. 2017).

Enfin, nous avons testé l'association entre le LPV et le RTV utilisé pour augmenter la biodisponibilité de l'IP auquel il est associé, chez les patientes lors du traitement du VIH. Les études cliniques *in vivo* démontre que l'effet « booster » du RTV augmenterait le risque de prématurité. *In vitro*, sur notre modèle de culture primaire, l'ajout du RTV semble potentialiser l'effet inhibiteur du LPV à la fois sur la sécrétion d'hCG et de P4.

Dans ce travail, nous avons donc montré que le LPV, à la différence du RTV, altère le tissu trophoblastique humain *in vitro*. La diminution des taux sanguins de P4 observée chez les patientes VIH+ traitées par IP pourrait ainsi résulter de l'impact direct des IP sur le trophoblaste villeux ou indirect via la diminution de l'hCG. Des expériences supplémentaires sont nécessaires en préciser toutes les voies et mécanismes intracellulaires sous-jacents.

Résultats partie III : Résultats complémentaires

I. Oestrogènes placentaires et Inhibiteurs de Protéase (IP)

i. Caractérisation de la production des oestrogènes par le trophoblaste villeux

Les oestrogènes (oestradiol [E2], oestrone [E1], oestriol [E3]) constituent à côté des progestatifs la seconde grande catégorie d'hormones stéroïdes placentaires. Ils sont eux aussi essentiels au bon déroulement de la grossesse tant au niveau de l'adaptation maternelle que de la qualité du placenta. Au niveau placentaire ils sont synthétisés à partir du sulfate de Déhydroépiandrostérone (DHEA-S), androgène spécifique de la surrénale maternelle ou fœtale. Le DHEA-S est alors désulfaté par la Stéroïde Sulfatase (STS) puis converti en Δ4-androstènedione (Δ4A) en sous l'action de l'enzyme HSD3B1. Cet androgène peut être soit aromatisé directement en E1 sous l'action de l'aromatase soit transformé en testostérone sous l'action de la HSD17B1 puis aromatisé en E2 (en équilibre avec E1). Nous avons donc étudié l'évolution de la sécrétion d'E2 et l'expression de ces 4 enzymes au cours de la différenciation trophoblastique sur notre modèle de culture primaire de CTV isolés à partir de placentas normaux à terme.

Alors que nous avons montré dans notre modèle *in vitro*, que la différenciation du CTV en ST s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion d'hCG et de P4, nous observons au contraire une diminution significative de la sécrétion d'E2 de 50% en moyenne avec la formation du ST (*Figure 43*).

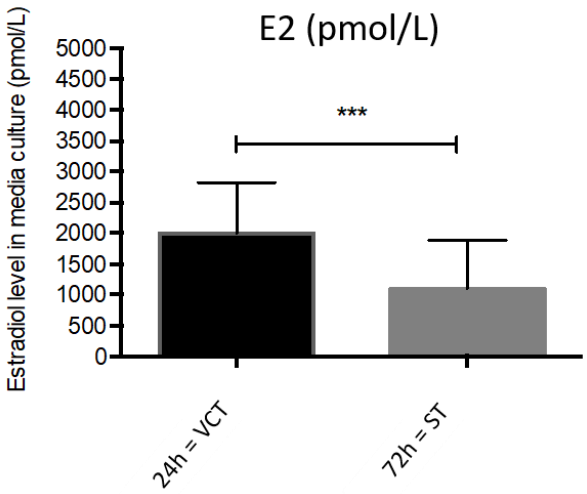


*Figure 43 : Diminution de la sécrétion d'oestradiol (E2) au cours de la différenciation trophoblastique. Les CTV humain isolés à partir de placenta à terme ont été mis en culture pendant 24h (stade CTV) ou 72h (ST) avec du milieu complet. Dans les surnageants de culture, les niveaux d'E2 ont été dosés en immuno-analyse. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SD de n = 11 expériences indépendantes. *** : p < 0,001 VS temps 24h de culture, test t de student apparié non paramétrique bilatéral.*

L'expression des enzymes spécifiques (STS, HSD17B1 et aromatase) ou non (HSD3B1) impliquées dans la synthèse d'E2, augmentent au cours de la différenciation trophoblastique (*Figure 44*). Il y a donc une discordance entre la sécrétion et la synthèse hormonale qui résulte vraisemblablement du manque dans notre milieu de culture, du DHEA-S, substrat spécifique des oestrogènes. En effet, certaines équipes travaillant sur la production d'oestrogènes sur lignées cellulaires de choriocarcinome ont eu recours à une co-culture entre des cellules BeWo et des cellules de lignées de carcinomes des surrénales permettant de pallier le manque de ce substrat (Murthi et al. 2017; Yancu, Vaillancourt, et Sanderson 2019).

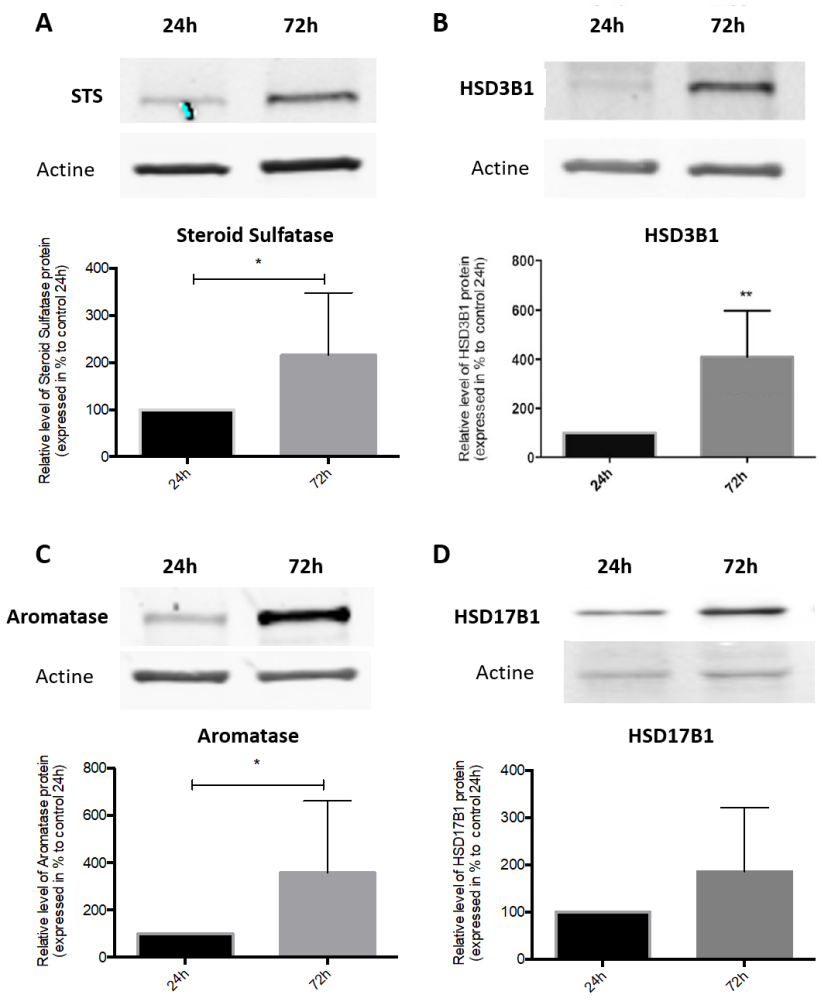


Figure 44 : Expression protéique des enzymes Stéroïdes Sulfatase (STS), HSD3B1, Aromatase et HSD17B1 impliquées dans la synthèse d'oestradiol dans les CTV et ST. Les CTV humain isolés à partir de placentas à terme ont été mis en culture pendant 24h (stade CTV) ou 72h (stade ST). Les expressions protéiques des enzymes STS (A), HSD3B1 (B), Aromatase (C) et HSD17B1 (D) ont été déterminées par western-blot avec des anticorps anti-STS, anti-HSD3B1, anti-Aromatase et anti-HSD17B1. L'expression protéique de l'actine déterminée avec un anticorps anti-actine, sert de contrôle de charge. Les données sont présentée comme le pourcentage du contrôle

*24 h et sont exprimées par la moyenne +/- SD de n = 5 expériences indépendantes. *: p < 0,05; **: p < 0,01 VS 24h contrôle, test t de student bilatéral non paramétrique pour données appariées.*

En présence de forskoline (FSK) 10 µM, un activateur de l'adénylate cyclase, qui stimule la différenciation des CTV en ST, nous observons une augmentation significative (p < 0,05) de la sécrétion d'E2 qui augmente de 25% à 6h et de 50% à 48h (*Figure 45*).

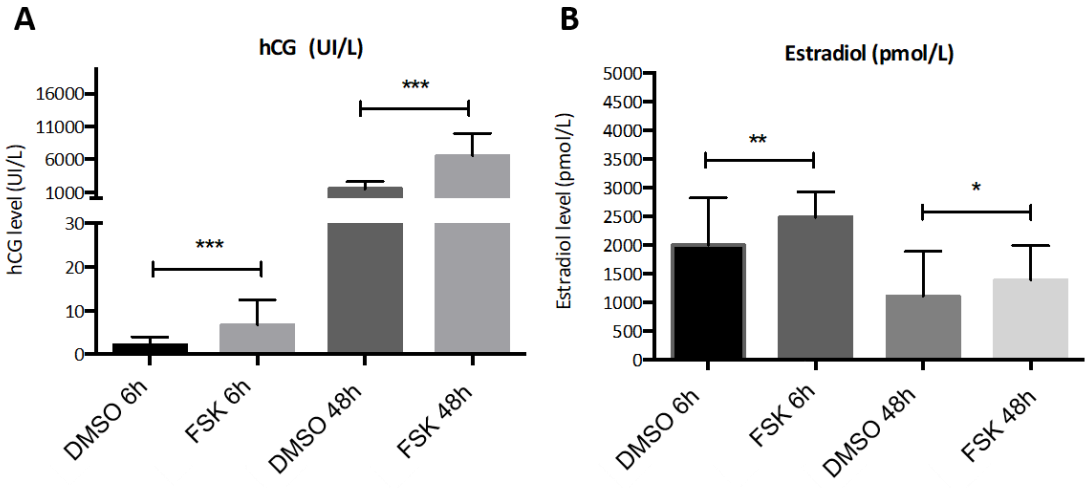


*Figure 45 : Augmentation de la sécrétion d'oestradiol (E2) par la FSK à la fois au niveau CTV et ST. Les CTV humain isolés à partir de placenta à terme ont été mis en culture pendant 15h avec du milieu complet. Puis ils ont été incubés pendant 6h ou 48h avec la FSK (10 µM) ou le contrôle DMSO. Dans les surnageants de culture, les niveaux d'hCG (A) et d'E2 (B) ont été dosés en immuno-analyse. Les résultats sont représentés par la moyenne +/- SD de n = 11 expériences indépendantes. * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001 VS temps contrôle DMSO au même temps de culture, test t de student apparié non paramétrique bilatéral.*

L'augmentation de la sécrétion d'E2 induite par la FSK est associée pour partie à une augmentation de la synthèse puisque l'on observe une augmentation significative (p < 0,05) précoce de l'expression protéique de l'aromatase dès 6h d'incubation (*Figure 46.C*), et plus tardive de celle de la STS et l'HSD3B1 après 48h d'incubation (p < 0,05) (*Figure 46.A* et *46.B*)

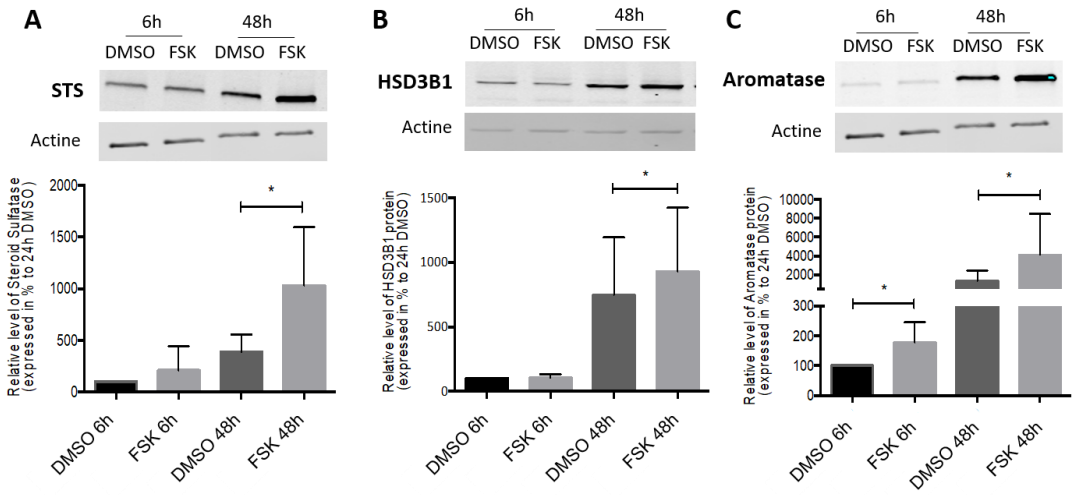


*Figure 46 : Augmentation de l'expression protéique des enzymes Stéroïdes Sulfatase (STS), HSD3B1 et Aromatase par la FSK. Les CTV humain isolés à partir de placentas à terme ont été mis en culture pendant 15h avec du milieu complet puis incubés pendant 6h ou 48h avec la FSK (10 µM), activateur de l'adénylate cyclase. Les expressions protéiques des enzymes STS (A), HSD3B1 (B) et Aromatase (C) ont été déterminées par western-blot avec des anticorps anti-STS, anti-HSD3B1 et anti-Aromatase. L'expression protéique de l'actine déterminée avec un anticorps anti-actine, sert de contrôle de charge. Les données sont présentée comme le pourcentage du contrôle DMSO 6h et sont exprimées par la moyenne +/- SD de n = 5 expériences indépendantes. *: p < 0,05 VS DMSO 6h, test t de student bilatéral non paramétrique pour données appariées.*

Ces résultats montrent que physiologiquement la différenciation morphologique des CTV en ST n'est pas associée à une différenciation fonctionnelle en terme de production d'oestrogènes, contrairement à celle de P4 et d'hCG. Ils démontrent que même si le DHEA-S est en faible quantité dans le milieu de culture pour permettre une augmentation physiologique de la sécrétion d'oestrogènes avec la formation du ST, l'activation pharmacologique par la FSK de cette différenciation s'accompagne d'une induction enzymatique. Cette activation enzymatique pourrait permettre de convertir le peu de substrat disponible et expliquer ainsi la faible augmentation de sécrétion d'E2 comparativement à celle de P4. Il pourrait également y avoir une régulation différentielle des enzymes impliquées notamment via l'AMPc/PKA que l'on pourrait caractériser en établissant le profil stéroïdien complet (oestrogènes, précurseurs et métabolites) dans nos surnageants de culture. Cette régulation différentielle pourrait aussi relever de mécanismes paracrines ou autocrines différents au niveau du trophoblaste villeux qui expriment les récepteurs de toutes ces hormones. En effet, les sécrétions d'hCG et d'E2 ($\rho = -0,43$, $R^2 = 0,159$ et $p < 0,05$) et celle de P4 et d'E2 ($\rho = -0,56$, $R^2 = 0,157$ et $p < 0,01$) tendent à être négativement corrélées au cours de la différenciation des CTV en ST (*Figure 47*). Ces corrélations négatives sont maintenues lors de la stimulation par la FSK : $\rho = -0,51$, $R^2 = 0,223$ et $p < 0,05$ pour la corrélation E2/hCG et $\rho = -0,59$, $R^2 = 0,294$ et $p < 0,001$ pour la corrélation E2/P4 (*Figure*

47). Ces corrélations négatives entre ces 3 hormones suggèrent une inhibition de la synthèse d'E2 par l'hCG et la P4 indépendante de l'activation de la voie AMPc/PKA au cours de la différenciation des CTV en ST.

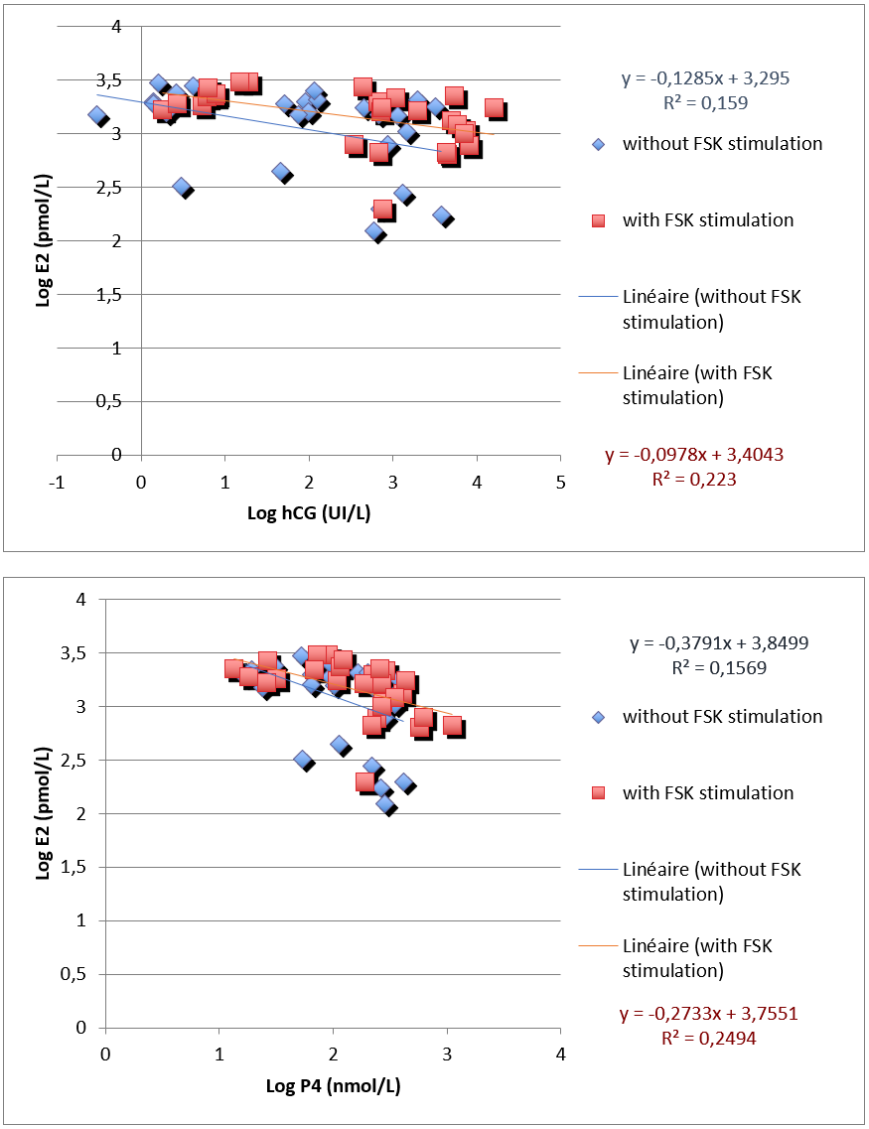


Figure 47 : Corrélation négative entre les sécrétions d'hCG et d'E2 et entre celles de P4 et d'E2. Les CTV humain isolés à partir de placentas à terme ont été mis en culture pendant 15h avec du milieu complet puis incubés pendant 6h, 24h ou 48h avec la FSK (10 µM) ou le contrôle DMSO. Les niveaux de sécrétions d'hCG, de P4 et d'E2 ont été mesuré dans les surnageants de culture par immuno-analyse. Les figures représentent les corrélations entre le log d'E2 et log d'hCG (panel du haut) et entre le log d'E2 et log de P4 (panel du bas). Les corrélations ont été établies à l'aide d'un test de corrélation de Pearson (ρ).

ii. Impact des IP (LPV et RTV) sur la synthèse d'oestradiol

Dans le cadre de l'infection maternelle par le VIH, les patientes enceintes traitées par IP présentent une augmentation de leurs taux d'E2 circulant (McDonald et al. 2018). Nous avons donc étudié l'impact des IP (Ritonavir [RTV] et Lopinavir [LPV]) sur la production d'E2 par le trophoblaste villeux.

Dans un premier temps, à partir de notre modèle de culture primaire, nous avons évaluer l'impact du RTV à différentes concentrations (5, 10 et 20 µM) ou LPV (10 µM) et différents temps d'exposition (6, 24 et 48h). Nous avons étudié la sécrétion d'E2 dans les surnageants de culture par immuno-analyse et la synthèse via l'analyse en western-blot de l'expression des enzymes impliquées.

Le ritonavir

Le RTV, quelques soit la concentration ou le temps d'exposition n'influence pas la sécrétion d'E2 par les CTV et ST (*Figure 48*).

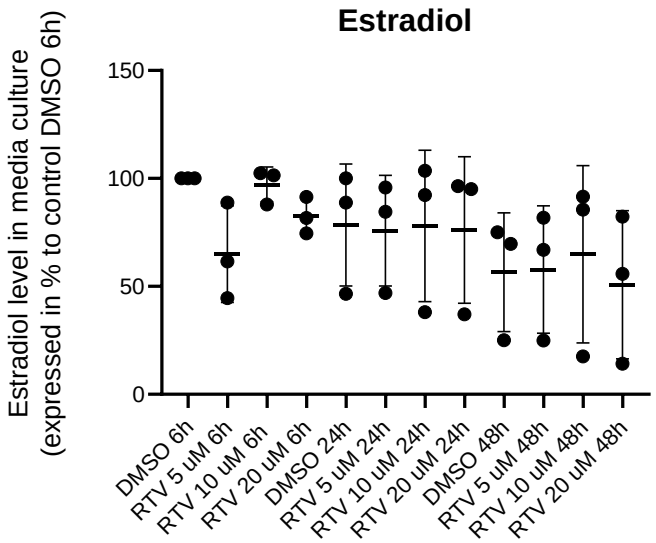


Figure 48 : Le RTV n'impacte pas la sécrétion d'oestradiol. Les CTV isolés à partir de placenta humain à terme, ont été ensemencés pendant 15h en milieu complet, puis incubés pendant 6h, 24h ou 48h avec des concentrations de RTV de 5, 10 et 20 µM. Les taux d'oestradiol ont été mesuré par immuno-analyse dans les surnageants de ces cellules. Les résultats sont exprimés en % du contrôle DMSO 6h de 3 expériences indépendantes.

Il n'influence pas l'expression des enzymes Aromatase et Stéroïde Sulfatase (STS), impliquées spécifiquement dans la synthèse de l'E2, ni celle de l'enzyme HSD3B1 commune à la synthèse d'E2 et de P4 ou non (*Figure 49.A , 49.B* et *49.C*).

Le RTV n'a donc, comme pour la P4, pas d'effet significatif ni sur la sécrétion, ni sur la synthèse de E2.

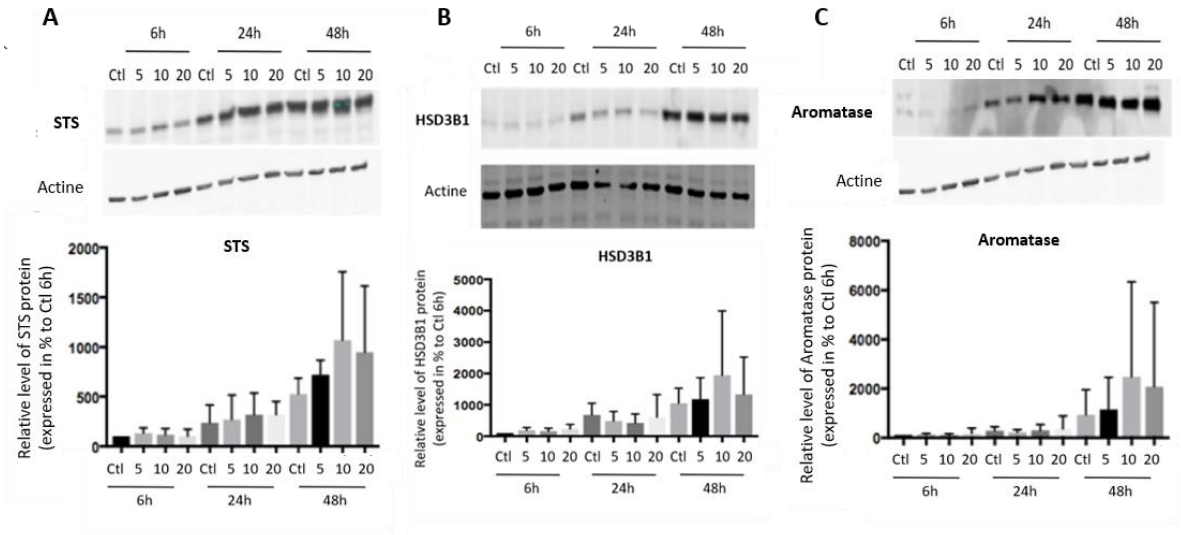


Figure 49 : Le RTV n'impacte pas l'expression des enzymes spécifiques de la synthèse de l'oestradiol. Les CTV isolés à partir de placenta humain à terme, ont été ensemencés pendant 15h en milieu complet, puis incubés pendant 6h, 24h ou 48h avec des concentrations de RTV de 5, 10 et 20 µM. Les niveaux d'expression protéique ont été évalué par western-blot avec des anticorps anti-Aromatase et anti-Stéroïde Sulfatase. L'actine est utilisé comme contrôle de charge. Les résultats sont exprimés en % du contrôle DMSO 6h et présentés par la moyenne +/- SD de 6 expériences indépendantes.

Le RTV n'ayant pas d'influence sur la stéroïdogenèse placentaire, à la fois oestrogénique et progestatif. Nous avons testé l'impact du LPV, autre IP utilisé par les patientes dans le traitement du VIH, sur la capacité des cellules trophoblastiques à synthétiser les oestrogènes, notamment l'E2.

Le lopinavir

A la dose de 10 µM, le LPV induit une augmentation significative de la sécrétion d'E2 de 50% dès 6h d'incubation (*Figure 50*). Cette augmentation se maintient au cours de la culture alors que le LPV diminue la formation du ST. Ils corroborent les données *in vivo* qui démontrent une augmentation des taux circulants d'E2 associés à une diminution des taux circulants de P4 chez des patientes VIH+ traitées par IP (McDonald et al. 2018).

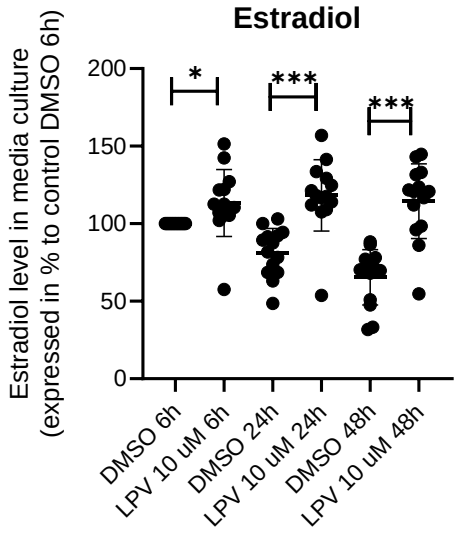


Figure 50 : Le LPV augmente la sécrétion d'oestradiol. Les CTV isolés à partir de placenta humain à terme, ont été ensemencés pendant 15h en milieu complet, puis incubés pendant 6h, 24h ou 48h avec des concentrations du LPV à 10 µM ou le DMSO comme contrôle « vehicule ». Les taux d'oestradiol ont été mesuré par immuno-analyse dans les surnageants de ces cellules. Les résultats sont exprimés en % du contrôle DMSO 6h et sont présentés par la moyenne +/- SD de 10 expériences indépendantes ; test bilatéral non paramétrique t de student pour données appariées.

Au contraire de la sécrétion, la synthèse d'E2 est diminuée puisque l'on observe une diminution significative de l'expression protéique des enzymes impliquées spécifiquement (Aromatase et STS) ou non (HSD3B1) dans la synthèse d'E2 à l'exception de la HSD17B1 (*Figure 51.D*). En effet, l'expression de la STS est diminuée dès 6h d'incubation avec le LPV (*Figure 51.A*), celles de l'aromatase et de l'HSD3B1 sont diminuées plus tardivement, respectivement 24h et 48h (*Figure 51.B* et *51.C*). Cette diminution pourrait être transitoire pour l'aromatase car elle n'est plus significative à 48h (*Figure 51.C*). Il semble exister des effets différents du LPV sur les enzymes de la stéroïdogenèse comme il existe des effets différents sur les sécrétions d'E2 et de P4. Le LPV pourrait induire une modulation différentielle de la synthèse protéique, comme démontré dans un modèle de myocyte (Hong-Brown et al. 2008). Il serait donc intéressant d'évaluer l'activité de chacune de ces enzymes dans des cellules incubées avec le LPV notamment via le profil complet des oestrogènes, précurseurs et métabolites secrétés

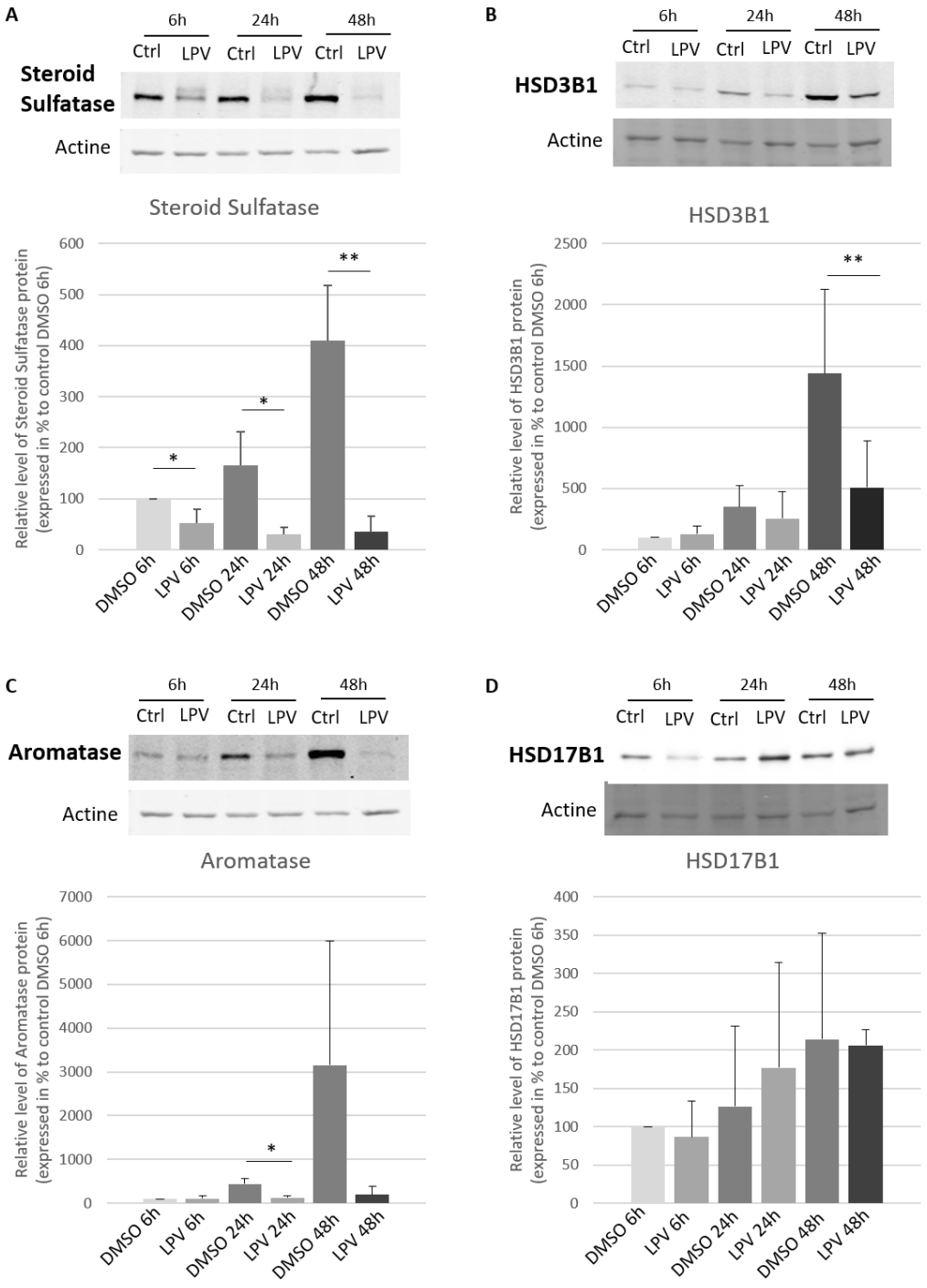


Figure 51 : Le LPV diminue l'expression des enzymes STS, HSD3B1 et aromatase impliquées de la synthèse de l'oestradiol. Les CTV isolés à partir de placenta humain à terme, ont été ensemencés pendant 15h en milieu complet, puis incubés pendant 6h, 24h ou 48h avec du LPV (10 µM) ou le contrôle « vehicule » DMSO. Les niveaux d'expression protéique de la STS (A), de l'HSD3B1 (B), de l'aromatase (C) et de l'HSD17B1 (D) ont été évalué par western-blot avec des anticorps anti-STS, anti-HSD3B1, anti-aromatase et anti-HSD17B1. L'actine est utilisé comme contrôle de charge. Les résultats sont exprimés en % du contrôle DMSO 6h et présentés par la moyenne +/- SD de n= 6 expériences indépendantes ; test bilatéral non paramétrique t de student pour données appariées.

II. Stéroïdogenèse dans un modèle de lignée cellulaire trophoblastique BeWo

Pour explorer plus avant la stéroïdogenèse trophoblastiques et étayer notamment nos résultats relatifs aux oestrogènes placentaires, nous avons développé un modèle plus aisé que la culture primaire de CTV, à l'occasion du master 2 de Marie-Delphine Song. Les cellules BeWo sont issues d'un choriocarcinome humain, tumeur maligne du trophoblaste. Elles ont été cultivées pendant 24h dans un milieu F12-K supplémenté en sérum de veau fœtal, antibiotiques et L-glutamine. Les taux d'oestradiol (E2) et de progestérone (P4) sécrétés ont été dosés par immuno-analyse dans les surnageants de culture. L'expression protéique des enzymes Stéroïde Sulfatase (STS), aromatase, P450SCC, HSD3B1 a été mise au point et analysée par western-blot.

Les BeWo *in vitro* s'agrègent mais ne fusionnent pas ou peu. Elles ne sont donc comparables qu'au CTV. Elles sont capables de sécréter de la P4 et de l'E2 (*Figure 52*).

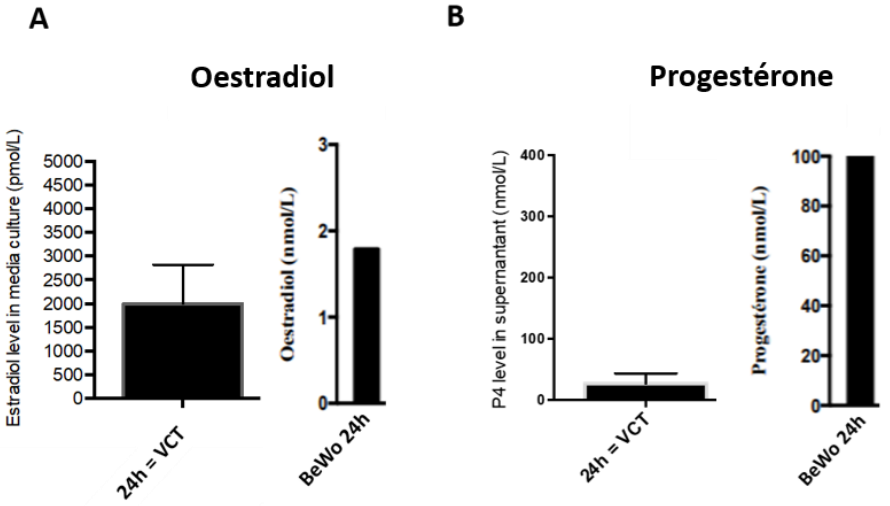


Figure 52 : Sécrétion d'oestradiol et de progestérone par les cellules BeWo. Les CTV isolés à partir de placenta humain à terme, ont été cultivés pendant 24h (stade CTV) en milieu complet. Les cellules BeWo ont été cultivées pendant 24h en milieu complet F12K. Les taux d'oestradiol (A) et de progestérone (B) ont été mesurés par immuno-analyse dans les surnageants de ces cellules. Les résultats sont présentés par moyenne +/- SD de n = 10 expériences indépendantes pour les CTV ; test bilatéral non paramétrique t de student pour données appariées. Pour les cellules BeWo, les résultats sont présentés par la valeur brute de n = 1 expérience.

L'analyse en western-blot de l'expression des enzymes de la stéroïdogenèse révèle que les cellules BeWo à 24h de culture expriment ces enzymes mais à des niveaux plus faibles que les CTV, notamment pour la STS (*Figure 53*).

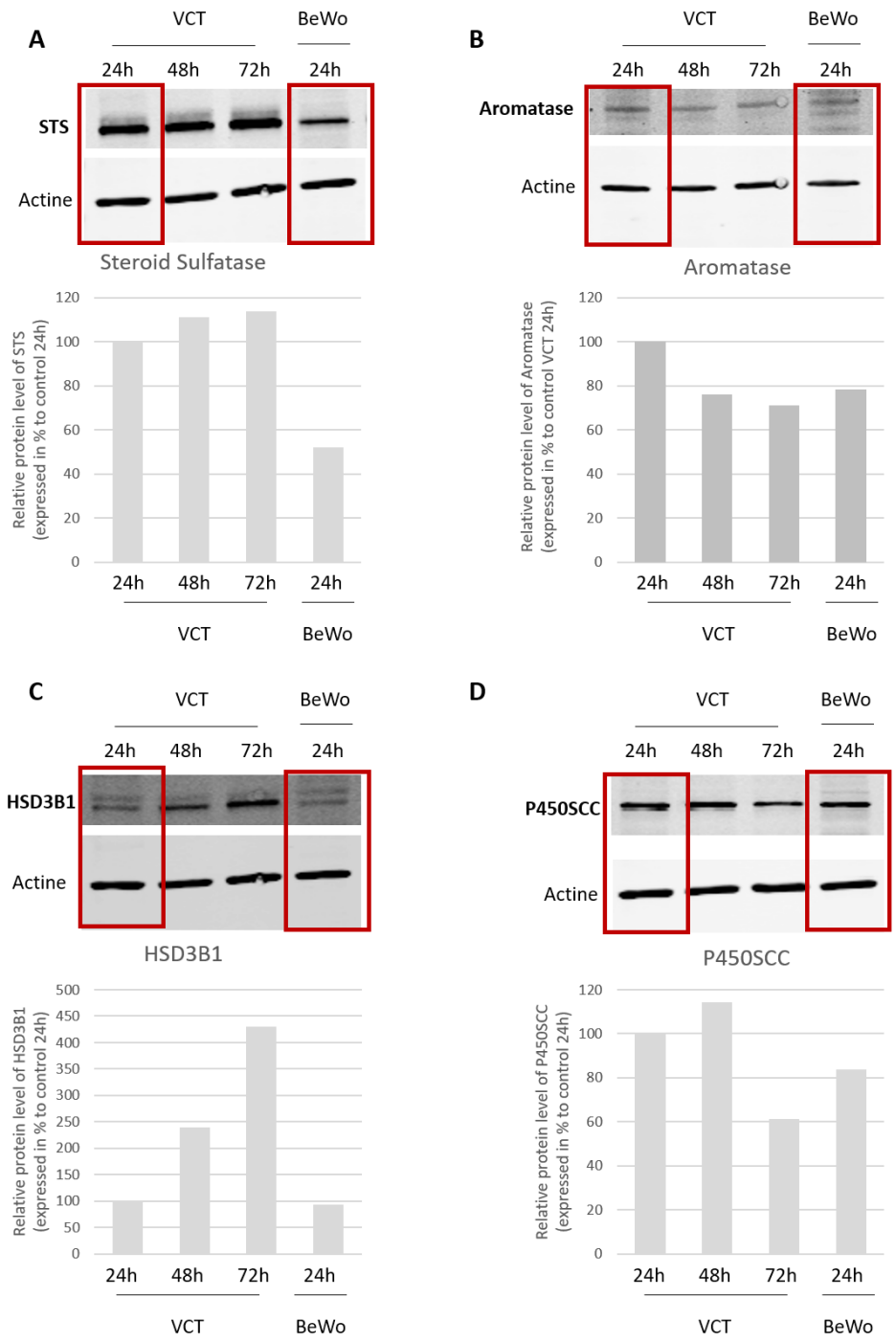


Figure 53 : Les cellules BeWo expriment les enzymes clefs, Stéroïdes Sulfatase, Aromatase, HSD3B1 et P450SCC de la stéroïdogenèse placentaire. Les CTV isolés à partir de placenta humain à terme, ont été ensemencés pendant 24, 48 ou 72h en milieu complet. Les cellules BeWo ont été cultivées pendant 24h en milieu complet F12K.Les niveaux d'expression protéique de la STS (A), de l'aromatase (B), de l'HSD3B1 (C) et de la P450SCC (D) ont été évalué par western-blot avec des anticorps anti-STS, anti-aromatase, anti-HSD3B1 et anti-P450SCC. L'actine est utilisé comme contrôle de charge. Les résultats sont exprimés en % du contrôle 24h et présentés par la valeur brute de n= 1 expérience.

Résultats partie IV : Résultats annexes

La pré-éclampsie (PE) est une maladie de la grossesse qui associe dès le second trimestre une protéinurie et une augmentation de la pression artérielle. Elle traduit une souffrance placentaire qui dans les formes précoces provient d'un défaut d'invasion et de remodelage des artères spiralées au cours du 1er trimestre. Il en résulte des phénomènes d'hypoxie/reperfusion au niveau de la chambre intervilleuse entrainant de nombreux stress cellulaire du tissu trophoblastique. Ces désordres sont associés à une altération de la fonction angiogénique marquée par une diminution précoce des taux sanguins de « Placental Growth Factor » (PlGF), facteur pro-angiogénique d'origine placentaire, et une augmentation plus tardive des taux sanguins de son récepteur soluble de type 1 , le « soluble Fms-like tyrosine kinase 1 » (sFlt-1), facteur anti-angiogénique d'origine placentaire (Maynard et al. 2003; Levine et al. 2004; Karumanchi et Granger 2016; Burton et al. 2019; Phipps et al. 2019). Le déséquilibre entre ces facteurs angiogénique est à la source des principales manifestations et complications cliniques et biologiques. Le dosage du PlGF sérique est proposé dans le cadre du dépistage de la maladie à la fin du premier trimestre de grossesse et le ratio sFlt-1/PlGF dès le second trimestre, principalement pour exclure la survenue rapide de la maladie. Nous avons contribué dans le cadre de notre thématique des grossesses pathologiques d'origine placentaire à adapter le dosage de ces marqueurs sériques à d'autres milieux biologiques (surnageants de culture, urines…) et à en évaluer l'intérêt pour améliorer la prise en charge de la maladie.

Les deux articles suivants s'inscrivent dans le cadre du projet APHERESE qui porte sur le développement d'une nouvelle stratégie pour le traitement de la PE basée sur la restauration de la balance angiogénique physiologique par épuration extracorporelle spécifique du sFlt-1 et par libération de PlGF libre. La maitrise du modèle de culture cellulaire primaire de cytotrophoblaste villeux a permis de fournir des surnageants de culture (matrice proche du milieu urinaire) dans lesquelles le ratio sFlt-1/PlGF est quantifiable et variable, permettant ainsi de travailler *in vitro* en mimant les conditions physiologiques ou pathologiques observées *in vivo*.

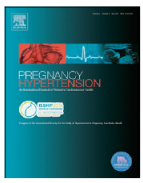
I. Article 3 : « Urinary sFlt-1 and PlGF levels are strongly correlated to serum sFlt-1/PlGF ratio and serum PlGF in women with preeclampsia »

Pregnancy Hypertension 12 (2018) 82–83

Contents lists available at ScienceDirect

Pregnancy Hypertension

journal homepage: www.elsevier.com/locate/preghy



Urinary sFlt-1 and PlGF levels are strongly correlated to serum sFlt-1/PlGF ratio and serum PlGF in women with preeclampsia

Marylise Hebert-Schuster[a,b,*] , Thimali Ranaweera[a], Camille Fraichard[b], Antoine Gaudet-Chardonnet[c], Vassilis Tsatsaris[b,c], Jean Guibourdenche[a,b], Edouard Lecarpentier[b,c]

[a] Department of Automated Biology and Hormonology, Cochin Hospital, GH Hôpitaux Universitaires Paris Centre, AP-HP, Paris, France

[b] INSERM UMR-S 1139, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, Paris, France

[c] Department of Obstetrics and Gynecology, Port-Royal Maternity, GH Hôpitaux Universitaires Paris Centre, AP-HP, Paris, France

*E-mail address: marylise.hebert-schuster@parisdescartes.fr

Dear Editor, due to mortality rate of preeclampsia (PE), many recent researches aimed to validate a biological test able to predict PE risk. In the daily practice, a rapid test is still lacking to improve the daily monitoring of women with PE risk factors. In this preliminary study, we found that urinary angiogenic factors levels are strongly correlated to their serum levels in women suspected for preeclampsia. Many studies have assessed the predictive, diagnostic and prognostic value of serum angiogenic factors, mainly the soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) and the placental growth factor (PlGF). Some authors showed that low serum PlGF has high sensitivity and high negative predictive value for PE [1,2]. The excellent negative predictive value of a low serum ratio sFlt-1/PlGF has been recently demonstrated [3]. Interestingly some studies showed that severe PE is associated with increased excretion of sFlt-1 and a decreased excretion of PlGF in urines [4,5]. We aimed to evaluate if sFlt-1 and/or PlGF could be eligible for the design of a rapid urinary test of PE risk, and therefore we studied their concentrations in urines and the relation between serum and urinary levels.

We included twenty-five patients suspected for PE followed at the Port-Royal maternity (ANR APHERESE 2016-A00983-48) [mean maternal age ± SD 36.5 ± 4.6 years; term of pregnancy range 24–38 WG; all systolic blood pressures > 140 mmHg and/or diastolic blood pressures > 90 mmHg]. Urinary and serum samples were collected simultaneously (n=35, stored as part of Perinat collection® ANR-10-EQPX-0010). We first checked the analytical performances of the measurement of sFlt-1 and PlGF in urines using the serum assay developed on the COBAS 8000 analyzer (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). Then we measured sFlt-1 and PlGF serum and urinary values, total proteinuria and creatininuria. Statistical analysis (Pearson test for correlation) was performed using the PASW statistics software (SPSS Inc., Chicago (IL), USA).

sFlt-1 and PlGF serum assays were suitable in urine. Intra-assay CVs were < 2.8% and < 2.5%, inter-assay CVs were < 3.9% and < 3.6% for concentrations ranging from 26.3 to 60.9 pg/ml for sFlt-1 and 24.4 to 236.6 pg/ml for PlGF. The accuracy evaluated by sequential dilutions and overload (range 21.5–312.7 pg/mL for sFlt-1 and 19.4–173.0 pg/ mL for PlGF) was acceptable, fluctuating between 100.4% and 108.3% for sFlt-1 and 100.6% and 108.7% for PlGF. In urines samples from women suspected for PE, mean total proteinuria was 222 mg/24 h (range 23–1442 mg/24 h). Mean serum sFlt-1/PlGF ratio was 294.7 (range 0.3–1888). Mean urinary sFlt-1 and PlGF concentrations were respectively 64.4 and 102.4 pg/mL (range 28.14–228.7 and 4.59–1597 pg/ml). Urinary sFlt-1 levels were more strongly correlated with the serum sFlt-1/PlGF ratios (p-value = $1.23.10^{-11}$ $\rho = 0.870$) (Fig. 1) than urinary PlGF levels were (p-value = 0.072 $\rho = -0.313$). Urinary PlGF levels were strongly correlated with serum levels (Fig. 1, Table 1), at a less extend for sFlt1 (Table 1). The results were not influenced by adjustment using creatininuria or proteinuriua (Table 1). Only urinary sFlt1 level was correlated to proteinuria (p-value = $< 10^{-3}$ $\rho = 0.495$), not urinary PlGF. Notably, correlation of serum vs urinary PlGF for the population with PlGF serum levels < 100 pg/ml was not significant (n=27 p-value = 0.874 $\rho = 0.0325$), but highly significant for the population with PlGF serum levels > 100 pg/ml (n=8 p-value < 10^{-5} $\rho = 0.971$). Dispersion rates were different for the two tests (Fig. 1), and serum sFlt-1/PlGF ratio explained only 75.6% of the variance of urinary sFlt1, whereas the variance of urinary PlGF was explained at 97.7% by serum PlGF.

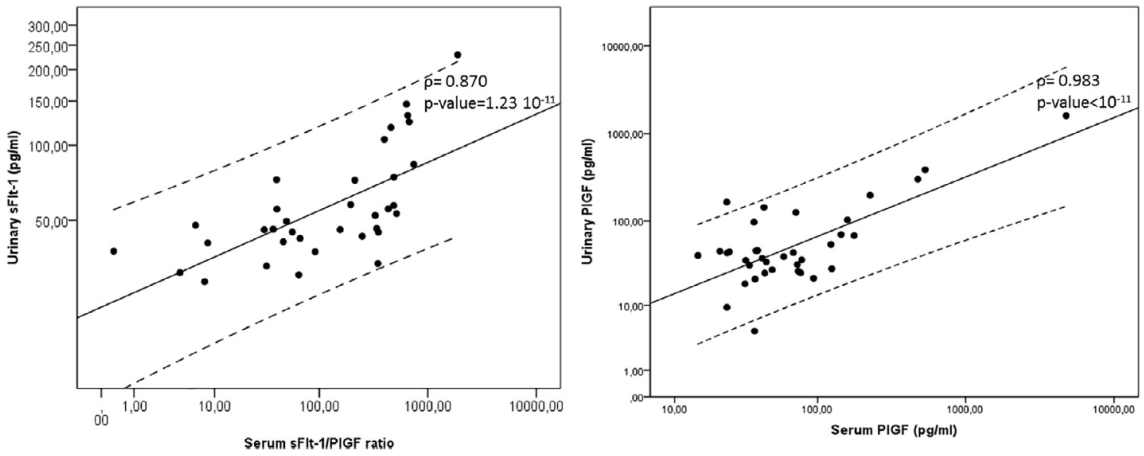


Fig. 1. Correlation of serum sFlt-1/PlGF ratio versus urinary sFlt-1 level (pg/ml) and urinary PLGF versus serum PlGF. Statistical analysis by Pearson test (dot plots limit 95% CI).

Correlation	ρ	p value
Urinary PlGF VS serum PlGF	0.983	$< 10^{-11}$
Urinary PlGF /creatininuria VS serum PlGF	0.808	$< 10^{-7}$
Urinary PlGF /proteinuria VS serum PlGF	0.810	$< 10^{-7}$
Urinary sflt1 VS serum sFlt1	0.679	$< 10^{-5}$
Urinary sflt1/creatininuria VS serum sFlt1	0.672	$< 10^{-4}$
Urinary sflt1/proteinuria VS serum sFlt1	−0.068	0.704

Table 1. Pearson correlation tests for urinary VS serum parameters.

We highlight a strong positive correlation between high urinary PlGF levels (above 100 pg/ml) and the serum PlGF level, with a tight dispersion compatible with clinical use. The differences between PlGF and sFlt1 dispersion rates could be explained by their differences in glomerular filtration properties linked to their respective sizes [5]. This pilot study lacks some power with only eight patients with serum PlGF levels above 100 pg/mL but these results encourage us to plan a prospective study with a larger number of patients. These works are stages in the development of a semi-quantitative urinary test that would allow to monitor every month the urinary PlGF during pregnancy.

Conflicts of interest

J. Guibourdenche and V. Tsatsaris are occasional consultants for Roche Diagnostics. The other authors report no conflicts.

Funding

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) (grant : APHERESE 2016-A00983-48).

References

[1] J. Sibiude, J. Guibourdenche, M.D. Dionne, C. Le Ray, O. Anselem, R. Serreau, F. Goffinet, V. Tsatsaris, Placental growth factor for the prediction of adverse outcomes in patients with suspected preeclampsia or intrauterine growth restriction, PLoS One 7 (11) (2012) e50208.

[2] L.C. Chappell, S. Duckworth, P.T. Seed, M. Griffin, J. Myers, L. Mackillop, N. Simpson, J. Waugh, D. Anumba, L.C. Kenny, C.W. Redman, A.H. Shennan, Diagnostic accuracy of placental growth factor in women with suspected preeclampsia: a prospective multicenter study, Circulation 128 (19) (2013) 2121–2131.

[3] H. Zeisler, E. Llurba, F. Chantraine, M. Vatish, A.C. Staff, M. Sennstrom, M. Olovsson, S.P. Brennecke, H. Stepan, D. Allegranza, P. Dilba, M. Schoedl, M. Hund, S. Verlohren, Predictive value of the sFlt-1:PlGF ratio in women with suspected preeclampsia, N. Engl. J. Med. 374 (1) (2016) 13–22.

[4] R.J. Levine, R. Thadhani, C. Qian, C. Lam, K.H. Lim, K.F. Yu, A.L. Blink, B.P. Sachs, F.H. Epstein, B.M. Sibai, V.P. Sukhatme, S.A. Karumanchi, Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia, JAMA 293 (1) (2005) 77–85.

[5] C.S. Buhimschi, L. Magloire, E. Funai, E.R. Norwitz, E. Kuczynski, R. Martin, S. Richman, S. Guller, C.J. Lockwood, I.A. Buhimschi, Fractional excretion of angiogenic factors in women with severe preeclampsia, Obstet. Gynecol. 107 (5) (2006) 1103–1113.

II. Article 4 : « VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Functionalized Magnetic Beads in a Microfluidic Device to Improve the Angiogenic Balance in Preeclampsia »

Preeclampsia

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Functionalized Magnetic Beads in a Microfluidic Device to Improve the Angiogenic Balance in Preeclampsia

Laura Trapiella-Alfonso,* Lucile Alexandre,* Camille Fraichard, Kelly Pons, Simon Dumas, Lucie Huart, Jean-François Gaucher, Marylise Hebert-Schuster, Jean Guibourdenche, Thierry Fournier, Michel Vidal, Isabelle Broutin, Laurence Lecomte-Raclet, Laurent Malaquin, Stéphanie Descroix, Vassilis Tsatsaris, Nathalie Gagey-Eilstein,† Edouard Lecarpentier†

ABSTRACT

Preeclampsia is a hypertensive pregnancy disease associated with a massive increase in sFlt-1 (soluble form of the vascular endothelial growth factor 1) in the maternal circulation, responsible for angiogenic imbalance and endothelial dysfunction. Pilot studies suggest that extracorporeal apheresis may reduce circulating sFlt-1 and prolong pregnancy. Nonspecific apheresis systems have potential adverse effects because of the capture of many other molecules. Our concept is based on a specific and competitive apheresis approach using VEGF (vascular endothelial growth factor) functionalized magnetic beads to capture sFlt-1 while releasing endogenous PlGF (placental growth factor) to restore a physiological angiogenic balance. Magnetic beads were functionalized with VEGF to capture sFlt-1. Experiments were performed using PBS, conditioned media from human trophoblastic cells, and human plasma. The proof of concept was validated in dynamic conditions in a microfluidic device as an approach mimicking real apheresis. Magnetic beads were functionalized with VEGF and characterized to evaluate their surface ligand density and recognition capabilities. VEGF-coated magnetic beads proved to be an efficient support in capturing sFlt-1 and releasing PlGF. In static conditions, sFlt-1 concentration decreased by 33±13%, whereas PlGF concentration increased by 27±10%. In dynamic conditions, the performances were improved, with 40% reduction of sFlt-1 and up to 2-fold increase of free PlGF. The sFlt-1/PlGF ratio was reduced by 63% in the plasma of preeclamptic patients. Apheresis was also associated with VEGF release. A ligand-based approach using VEGF-coated beads is an effective approach to the capture of sFlt-1 and the release of endogenous PlGF. It offers new perspectives for the treatment of preeclampsia.

Keys words : endothelium, morbidity, preeclampsia, placenta, pregnancy

INTRODUCTION

Preeclampsia is a hypertensive disorder of pregnancy associated with substantive maternal and perinatal mortality and morbidity.[1] There is currently no curative treatment for preeclampsia, and only childbirth and delivery of the placenta alleviate maternal symptoms. The development of therapeutic strategies for preeclampsia is one of the highest priorities in perinatal medicine.

During preeclampsia, a massive amount of a sVEGFR1 (soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor 1), also named sFlt-1, is released by the placenta into the maternal circulation, resulting in inhibition of the proangiogenic effects of its ligands, VEGF (vascular endothelial growth factor)-A, and PlGF (placental growth factor) on the maternal endothelium.[2] These angiogenic factors are essential for the survival of endothelium, thus explaining the endothelial dysfunction during preeclampsia.[3,4]

On the basis of compelling evidence that circulating sFlt-1 is a critical and potentially rate-limiting step in the pathobiology of preeclampsia, it is supposed that by reducing its circulating concentrations with an extracorporeal device the disease progression could be limited. Based on the positive charge of sFlt-1, dextran sulfate columns have been used to remove excess circulating maternal sFlt-1 during preeclampsia.[5] Thadhani et al[6] have shown that this nonspecific method of apheresis for women with preterm preeclampsia can reduce sFlt-1 concentrations by 18%. A proof-of-concept trial on selective removal of sFlt-1 in healthy volunteers and preeclamptic women using an sFlt-1 antibody-specific adsorption column is ongoing to test the safety and efficacy of this procedure.[7]

The objective of this study was to develop and provide the proof of concept of a selective and competitive apheresis approach to reduce circulating sFlt-1 while increasing free PlGF to restore the physiological angiogenic balance in the maternal circulation. To shift the equilibrium of sFlt-1/PlGF binding, we grafted magnetic beads with ligands of sFlt-1 which competes with PlGF. To increase sFlt-1 capture and optimize equilibrium displacement, we chose to use VEGF as a competitive ligand, which has a >10× greater affinity for sFlt-1 than does PlGF.[8] This competitive biomimetic binding approach captures circulating sFlt-1 while releasing endogenous PlGF, thereby increasing the bioavailability of PlGF and potentiating its proangiogenic effects on maternal endothelial function. To go one step further in validating the potential of our approach, it was integrated in a microfluidic device mimicking a miniaturized extracorporeal circulation system (Figure S1 in the online-only Data Supplement).

MATERIAL AND METHODS

Data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request. Magnetic beads Dynabeads M-280 streptavidin, magnetic support Dynal Dynabeads MPC-DynaMag-96 Side Skirted Magnet, and DynaMag-5 Magnet were from Invitrogen. BSA fraction IV (BSA) and PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} were from Eurobio. Tween 20 was from Sigma-Aldrich. Human recombinant sFlt-1 with an antibody constant fraction (rhVEGFR1/Fc Chimera, Ser27-His687) and human recombinant PlGF (rh PlGF) were from R&D Systems. Kits from R&D systems (Quantikine) or from Roche Diagnostics (Elecsys) were used for the assay of free VEGF, free PlGF, sFlt-1, and sVEGFR-2 (soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor 2).

i) Bead Functionalization and Characterization

Dynabeads M-280 streptavidin were functionalized with homemade bt-VEGF (biotinylated VEGF, see online-only Data Supplement for $VEGF_{95}$-AVI-biotin expression and purification, AVI being a C-terminus tag sequence of 15 amino acids) or with human anti–Flt-1 biotinylated antibody (R&D Systems). The functionalization was performed following the supplier's information with slight modifications (see SI).

After bead functionalization, 2 tests were performed for their characterization: one to assess the ligand surface density and the other to ensure the ability of the grafted ligand to bind sFlt-1 (see SI).

ii) Proof of Concept With Recombinant Protein

Formation and Assay of sFlt-1/PlGF Complexes

Increasing concentrations of rhVEGFR1/Fc (from 0 to 1000 ng/mL) in PBS/0.1% BSA were added to the same volume of a solution at 4 ng/mL of rhPlGF in PBS/0.1% BSA and the mixture was incubated for 1 hour at 37°C. Complex formation was quantified after assay of free rhPlGF with Quantikine kits. The maximum absorbance signal (S_{max}) was given by the solution of rhPlGF without rhVEGFR1/Fc. The amounts of free and complexed rhPlGF were obtained using equations 1 and 2:

$$\%rhPlGF_{free} = \frac{S}{S_{max}} \times 100 \quad (1)$$

$$\%rhPlGF_{complexed} = \frac{S_{max} - S}{S_{max}} \times 100 \quad (2)$$

Capture of rhVEGFR1/Fc and Release of rhPlGF With VEGF-Beads

Two hundred microliters of the solution of rhVEGFR1/Fc/rhPlGF complexes (see Formation and Assay of sFlt-1/PlGF Complexes) was incubated in a tube with 5 µL (50 µg) of VEGF-coated beads (V-beads) at 105 pmol of bt-VEGF/mg beads. For the negative control, nonfunctionalized beads (C-beads) were used. After 1-hour incubation at 37°C with stirring, the concentrations of free rhPlGF and rhVEGFR1/Fc were measured with Quantikine kits.

iii) Ethical Statements and Biological Samples

The local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile de France 3) approved the studies of cultures of human primary cells from placenta tissue (Perinat Collection ANR-10-EQPX-0010) and the human plasma sample from the Angiogenic switch to Physiological state by Extracorporeal Removal of sFlt1 and release of free PlGF case/control prospective study (http://www.clinicaltrials.gov. Unique identifier: NCT03188900). All patients gave written consent for participation in these studies. For the primary cell culture, cytotrophoblasts were isolated as previously described,[9] and the conditioned media (CM) were collected after 72 hours of culture and then stored at −80°C.

iv) Microfluidic Experiments

The characteristics and procedures for the chip fabrication and the microfluidic set-up were previously described and are summarized in the SI.[10] PBS containing 1% BSA (Sigma-Aldrich) was used for the conditioning of the chip.

Sample Treatment

The chip and tubing system was initially filled with washing buffer, and the temperature was adjusted to 37°C using an indium tin oxide glass slide with feedback regulation from a voltage controller (Eurotherm 3508) via a thermocouple gauge installed inside a slot in the polydimethylsiloxane chip. When using plasma samples, preliminary 3-minute spin centrifugation was used to remove any solid aggregates, and only supernatant was then collected.

The sample (150 µL) flow in the chip chamber was 1 µL/min. A Tygon tube (Saint Gobain AAD04103 Tygon Non-DEHP Medical Microbore Tubing, 0.020” ID, 0.060” OD) connected at the outlet was used to collect the emerging solution.

RESULTS

i) Functionalization and Characterization of Streptavidin Magnetic Beads

Functionalization

To study the impact of VEGF density on the capacity of the beads to bind sFlt-1, it was necessary to estimate precisely the surface saturation of the magnetic beads because steric hindrance, repulsion, or interactions may play a role in protein recognition.[11,12] Based on previous work,[13] 4 different grafted V-beads with ligand densities between $11.7 \cdot 10^3$ and $158 \cdot 10^3$ VEGF/µm^2 were prepared by changing the initial quantity of VEGF, and then characterized (Table S1).

Binding of sFlt-1

To evaluate how the VEGF grafted on the beads was still able to recognize human recombinant sFlt-1 with good affinity, a binding assay was developed that yielded the dissociation constant of the immobilized VEGF/rhVEGFR1/Fc complex (Figure S2). The binding assay was performed with the 35% saturated beads (105 pmol VEGF/mg of beads) and revealed a K_d value of 1.0±0.4 nmol/L (n=5). This value is in good agreement with the value obtained when VEGF is coated in a plate for a classical ELISA test[14] and confirms the high ligand-receptor affinity.

ii) Proof of Concept

Capture and Release of Recombinant Proteins

The ability of V-beads simultaneously to capture sFlt-1 and release PlGF was first demonstrated in static conditions with recombinant proteins.

Formation of rhVEGFR1/Fc /rhPlGF Complexes

The first step was to produce artificial samples of varying compositions of complexed and free proteins. To do so, it was necessary to control the formation of recombinant rhVEGFR1/Fc/rhPlGF complexes (Figure 1A). To estimate the initial amount of each protein required to form the complex, a theoretical study was performed (see SI). Taking into account these calculations, the initial concentration of *rh*PlGF was kept constant at 6.9 pmol/L, and the selected initial *rh*VEGFR1/Fc concentrations ranged from 0 to 500 pmol/L. The estimated K_d value for the *rh*PlGF/*rh*VEGFR1/Fc complex was 22±3 pmol/L (n=3; Figure S3).

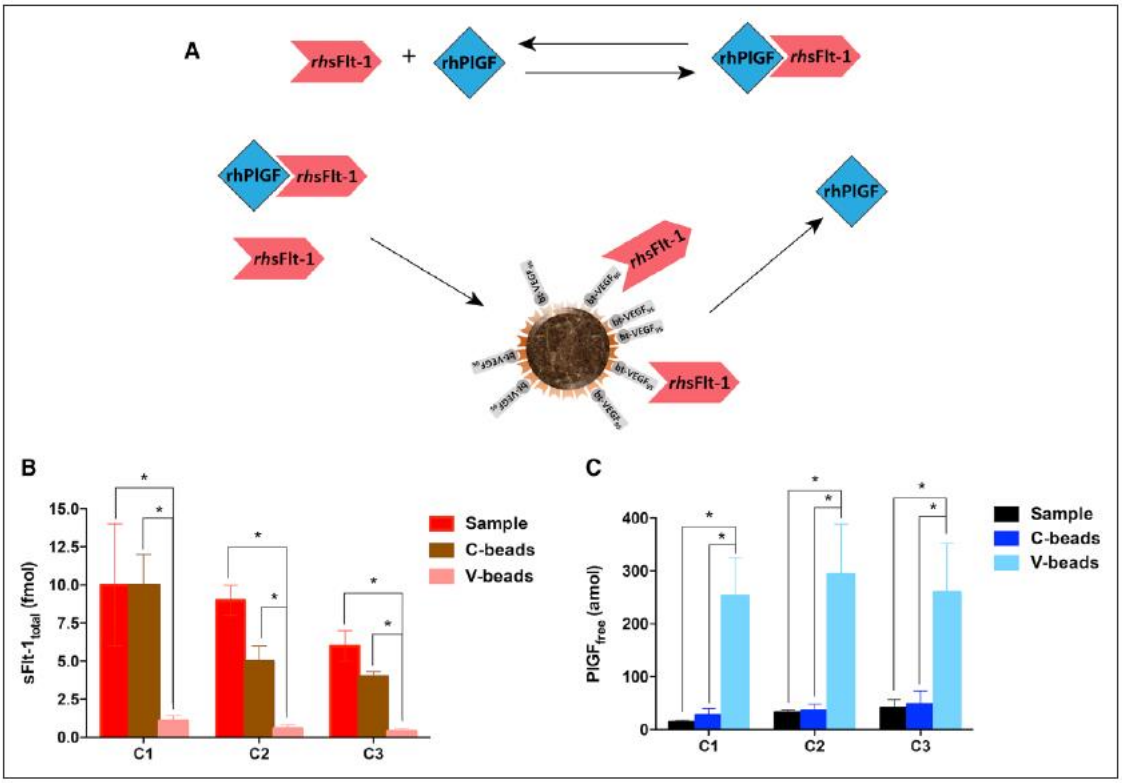


Figure 1. Proof of concept of the specific and competitive apheresis approach using recombinant proteins in physiological buffer medium (PBS at pH 7.4). **A**, Schematic representation of the rhVEGFR1/Fc/rhPlGF (recombinant human sFlt-1 with an antibody constant fraction) complex formation and its interaction with VEGF (vascular endothelial growth factor)-coated beads (V-beads), showing the hypothesis of our work (the ability to displace the PlGF complexed to sFlt-1); **B**, Evolution of the concentration of *rhs*Flt-1 after being incubated with V-beads; **C**, Evolution of the concentration of *rh*PlGF after incubation with V-beads. Please note that in **B** and **C**, i, C1, C2, and C3 are 3 solutions of complexes with different initial concentrations of *rh*VEGFR1/Fc (ie, 52.3; 43.7; and 29.2 pmol/L, respectively); obtained after 1 h incubation at 37°C of rhVEGFR1/Fc in PBS/0.1% BSA to the same volume of 4 ng/mL rhPlGF solution in PBS/0.1% BSA. Complex formation was quantified after assay of free rhPlGF with Quantikine kits. **B** and **C**, ii, Two hundred microliters of the solution of rhVEGFR1/Fc/rhPlGF complexes was incubated with 5 µL (50 µg) of V-beads at 105 pmol of bt-VEGF (biotinylated VEGF)/mg beads. Nonfunctionalized beads (C-beads) were used for negative control; concentrations of free rhPlGF and rhVEGFR1/Fc were measured with Quantikine kits. Sample denotes initial rhVEGFR1/Fc/rhPlGF formed complexes. rhsFlt-1 indicates recombinant human sFlt-1. **P*<0.001.

sFlt-1 Capture and PlGF Release

The second step of the proof of concept was to evaluate the ability of V-beads to capture rhsFlt-1 and to disrupt the rhVEGFR1/Fc/*rh*PlGF complex (Figure 1A). Thus, 3 different complex solutions (C1, C2, and C3) obtained from 3 different initial concentrations of rhVEGFR1/Fc (ranging from 52.3 to 29.2 pmol/L), were incubated with C-beads as the negative control and V-beads. The final concentrations

of rhVEGFR1/Fc and rhPlGF were thus determined in the supernatants. Figure 1B and 1C show the molar quantity of total rhVEGFR1/Fc and free rhPlGF in each solution before (sample bar) and after incubation (C- and V-beads bars). No significant effects were observed when C-beads were used, showing that the nonspecific interactions were minimized. In contrast, a significant decrease in rhVEGFR1/Fc concentration accompanied by an increase of PlGF concentration in the presence of V-beads was observed in all the samples tested. In addition, because the total amount of rhPlGF used to form the complexes is known (6.9 pmol/L), the % of PlGF initially and finally complexed could be calculated. Although around 90% of initial rhVEGFR1/Fc was captured, only 20% of initial rhPlGF complexed to rhVEGFR1/Fc was released. This could be explained by the great difference in the amounts of proteins used to form the complexes (Table S2). Note that, in this study, we chose conditions where almost all the rhPlGF was complexed (>90%) and rhVEGFR1/Fc was in high excess, which is the case during severe preeclampsia.

These results with recombinant proteins demonstrate our competitive approach for the capture of sFlt-1 and the release of PlGF and allow us to move on to more complex media to validate the strategy.

Impact of the Saturation Rate on the Capture of sFlt-1 and Release of PlGF

The efficiency of sFlt-1 capture and PlGF release was assessed according to the surface ligand density of the V-beads. The amount of bt-VEGF coated on streptavidin Dynabeads was evaluated from 30 to 259 pmol/mg of beads corresponding to a surface ligand density ranging from $11.7 \cdot 10^3$ to $102 \cdot 10^3$ VEGF/µm^2 (Table S1). To investigate how our system was able to accommodate complex samples, these experiments were performed with CM obtained from human trophoblastic primary cells in which the initial concentrations of sFlt-1_{total} and $PlGF_{free}$ were 0.27 pmol/mL (20868 pg/mL) and 0.015 pmol/mL (292 pg/mL), respectively. Two hundred microliters of this CM was incubated with the necessary amount of beads to ensure the required VEGF excess compared with initial sFlt-1 in the sample. The amount of sFlt-1 captured increased when the ligand surface density decreased, from 30% capture at $100 \cdot 10^3$ VEGF/µm^2 to 60% capture at $12 \cdot 10^3$ VEGF/µm^2 for the case of a 500 molar excess of VEGF (Figure 2A). This could be explained by a high steric hindrance at higher saturation rate limiting the capture.[12] Then, at constant surface ligand density, the effect of VEGF in excess compared with the initial concentration of sFlt-1 was evaluated. We increased the mass of beads to obtain a 10 to 500 molar excess of VEGF. As expected, the capture increased with the excess of VEGF. However, over 100 molar excess only a slight improvement of capture was observed. For PlGF release, the excess VEGF plays a more important role than for sFlt-1 because this molecule is initially complexed to sFlt-1 and has to be displaced. In addition, the levels of PlGF are considerably lower than those of sFlt-1 (sometimes ≥1 order of magnitude). For example, in the CM used for this study, the initial quantity of

free PlGF in solution was 3 fmol, whereas the total quantity of sFlt-1 was 54 fmol, corroborating the great difference in concentration between the 2 molecules and the fact that most of the PlGF will be complexed. Thus, we can observe in Figure 2B how a molar excess of at least 100 is required to have a significant release of PlGF.

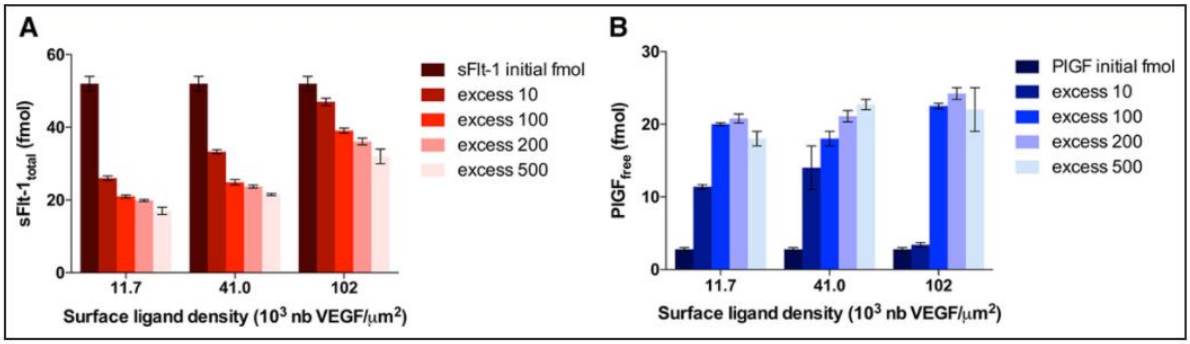


Figure 2. Impact of the grafting rates of VEGF (vascular endothelial growth factor)-coated beads (V-beads) on their capture/release performances in conditioned media (CM) of human trophoblastic cells. The amount of bt-VEGF (biotinylated VEGF) coated on streptavidin Dynabeads was evaluated from 30 to 259 pmol/mg of beads corresponding to a surface ligand density ranging from $11.7 \cdot 10^3$ to $102 \cdot 10^3$ VEGF/µm^2. Grafting of V-beads is done following the protocol in Bouzas-Ramos et al.[13] **A**, sFlt-1 capture and (**B**) PlGF (placental growth factor) release after 2.5-h incubation at 37°C with stirring. Note that the marked excess is the molar excess of VEGF compared with the initial concentration of sFlt-1.

Based on these series of experiments, the selected surface ligand density for further experiments was fixed at $41 \cdot 10^3$ VEGF/µm^2 (105 pmol VEGF/mg of beads; 35% saturation rate) as the better compromise in terms of beads and VEGF consumption and performance of capture/release. In patient samples, the quantities of these factors vary considerably and consequently the VEGF excess from beads may affect the efficiency of apheresis differently. Nevertheless, previous experiments show that this efficiency is not negatively affected if we ensure at least a 100 molar excess (VEGF/sFlt-1).

Valorization of the Competitive Strategy

To emphasize the features of this new specific and competitive strategy for restoring the angiogenic balance in preeclampsia, we compared the performances of the proposed approach with the specific strategy based on the use of antibodies for the capture of sFlt-1. Magnetic beads were functionalized either with VEGF or with anti–sFlt-1 antibody in a similar range of ligand surface density. Their performances in restoring the angiogenic balance in complex media (cell culture supernatants and mixed plasma of pregnant women) were compared using an equivalent amount of beads during the incubation. In Figure 3, we see that both systems capture sFlt-1 in the same range. However, the

competitive approach, by releasing PlGF, is more efficient for the final objective of restoring the angiogenic balance.

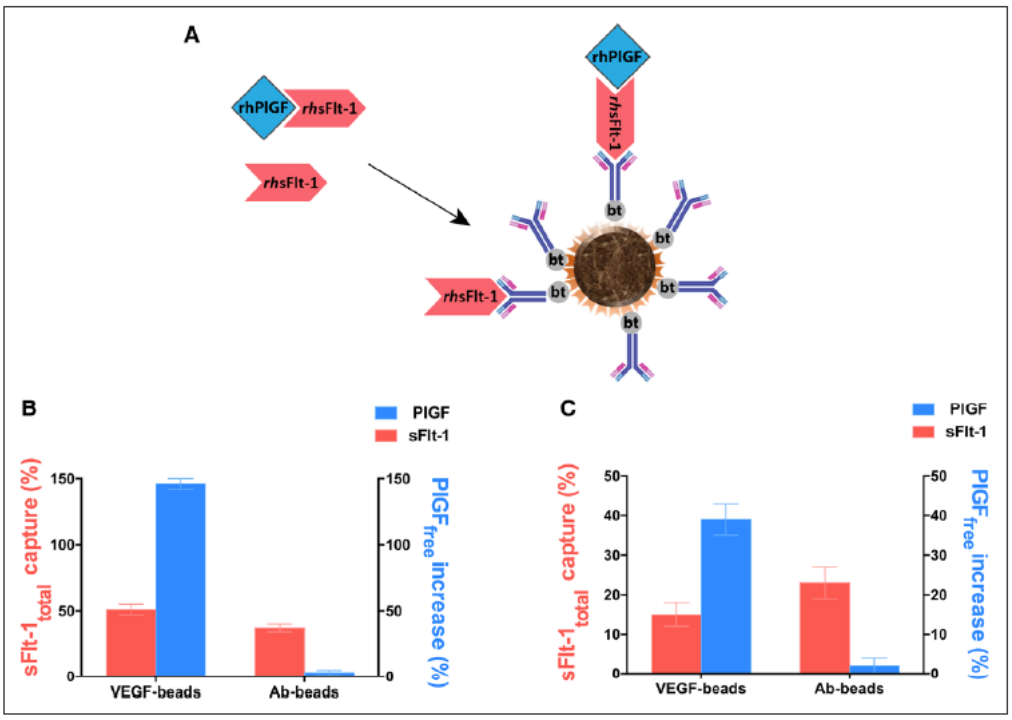


Figure 3. Comparison of specific systems to restore the angiogenic balance, one based on anti–sFlt-1 antibodies grafted beads (Ab-beads) and the other on competitive ligand (VEGF [vascular endothelial growth factor]) grafted beads (V-beads) in complex media. **A**, Schematic representation of the antibody-grafted beads during the capture of sFlt-1. **B**, Capture/release performances of both specific systems in conditioned media (CM); **C**, Capture/release performances of both specific systems in plasma. Note: The beads were grafted at 105 pmol VEGF and 25 pmol anti–sFlt-1 Ab per mg of beads ensuring an excess of biomolecule respect to the initial amount of sFlt-1 in the sample of 98× and 23×, respectively, in the case of CM; and 890- and 212-fold, respectively, in the case of the pooled plasma. (CM: 265 pg/mL PlGF (placental growth factor); 20 692 pg/mL sFlt-1. Pooled plasma: 502 pg/mL PlGF; 2250 pg/mL sFlt-1). bt indicates biotinylated; rhPlGF, recombinant human PlGF; and rhsFlt-1, recombinant human sFlt-1.

It should also be mentioned that both systems suffer a loss of efficiency in the capture of sFlt-1 when the sample matrix is more complex. Thus, antibody anti-sFlt-1 grafted beads capture 37% of sFlt-1 in CM and 23% in plasma, whereas V-beads capture 51% in CM and 15% in plasma capture. This fact could be explained by the complexification of the sample matrix.

iii) Optimization of the Microfluidic Conditions

To test this approach in a dynamic setting, a microfluidic polydimethylsiloxane chip of the magnetic fluidized bed previously described[10] was used to increase the surface-to-volume interactions during

the treatment of the CM and the plasma samples with the functionalized beads. Here, the solid phase of V-beads is continuously recirculated (fluidization) during the percolation of a liquid phase (the biological samples). In the following sections, we present the different steps of the optimization of the microfluidic device-based approach.

Time of Residence of the Sample Inside the Bed

We assessed the impact of the sample residence time inside the bed of magnetic beads. This residence time is directly correlated with the flow rate and the bed porosity. We used a CM of primary human trophoblastic cells where concentrations of sFlt-1 and PlGF were, respectively, 0.26 and 0.013 pmol/mL. Experiments with 150 µL of biological samples were performed at a flow rate ranging from 0.5 µL/min (residence time of 7.7 s) to 3 µL/min (residence time of 2.9 s). As shown in Figure 4A, increasing the residence time of each molecule inside the chip improved the capture of sFlt-1 and the release of PlGF in a nonlinear way because the optimum capture/release mechanism was reached at 6.5 s of residence time, representing a flow rate of 1 µL/min and a total experiment time of 2.5 hours. This residence time is in agreement with the results obtained in static conditions (Figure S4). As shown in Figure 4B, 6.5 s of residence time is enough to reach a final sFlt-1/PlGF ratio at a physiological level below 38 for a sample with an initial ratio around 80. Indeed, Zeisler et al[15] identified an sFlt-1/PlGF ratio cutoff of 38 as having important predictive value in clinical practice.

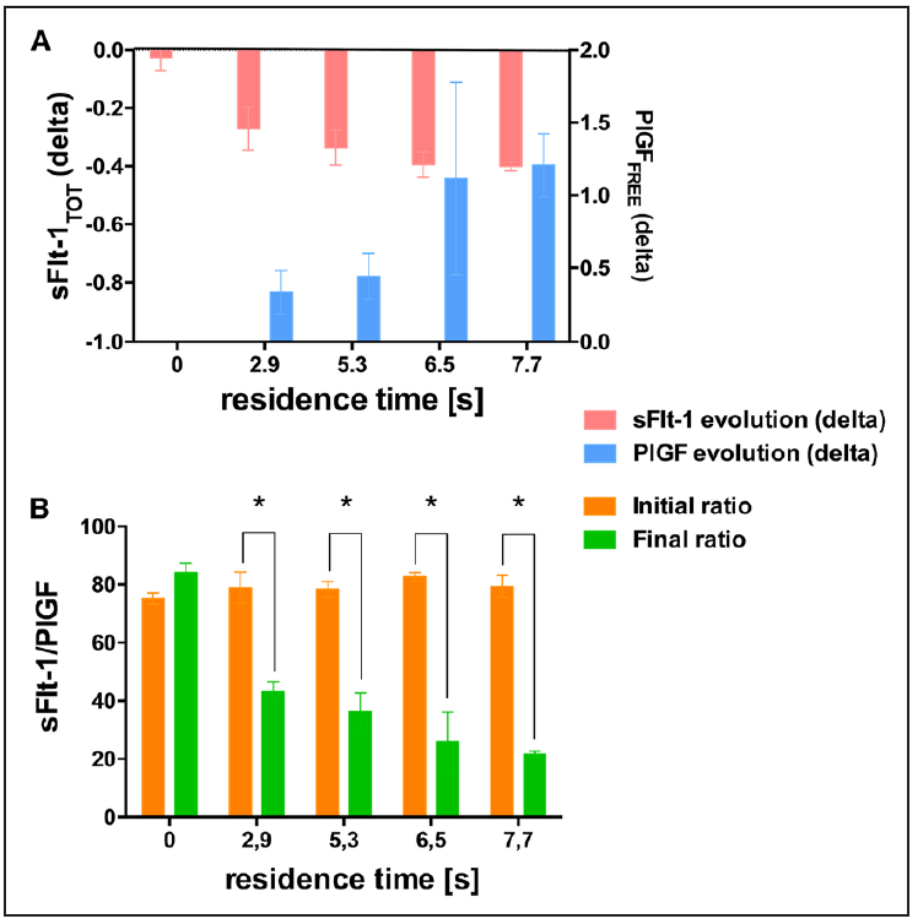


Figure 4. Evolution of concentrations of sFlt-1 and PlGF (placental growth factor) as a function of the residence time of each molecule inside the matrix (50 µg) of magnetic beads (beads ligand density: $41 \cdot 10^3$ VEGF (vascular endothelial growth factor)/µm^2; 105 pmol VEGF/mg beads) in the microfluidic device. **A**, the capture of sFlt-1 and the release of free PlGF and (**B**) the comparison between the initial and final sFlt-1/PlGF ratio. The abscissa 0 represents a control experiment done with Streptavidin Dynabeads M-280 without coating. Evolution of the concentration of molecules was evaluated as delta = ([C]fin – [C]init)/[C]init ; where concentrations are measured in pmol/mL. *P<0.001.

For the following experiments, a flow rate of 1 µL/min was chosen to percolate the sample through the bed, which means a residence time of 6.5 s of the biological sample inside the chip. When the experiment was performed with C-beads (the abscissa 0 in Figure 4), no capture and no release could be measured and the sFlt-1/PlGF ratio was not affected by the sample percolation through the bed of beads.

Surface Ligand Density of the Beads

The performance of capture/release of sFlt-1/PlGF in the microfluidic device was evaluated considering the surface ligand density of the magnetic beads. The amount of bt-VEGF coated on streptavidin Dynabeads was evaluated as $11.7 \cdot 10^3$ to $158 \cdot 10^3$ VEGF/μm^2. We showed that increasing the VEGF surface density on the beads from 11.7 to $41.0 \cdot 10^3$ VEGF/μm^2 beads increased the capture of sFlt-1. However, large ligand surface densities induced a decrease of capture of sFlt-1 (Figure S5). Thus, $41.0 \cdot 10^3$ VEGF/μm^2 was the final surface ligand density selected for the experiments. These findings are in agreement with the static experiments (Figure 2).

iv) Validation of the Approach in Complex Matrices: From Cell Culture to Human Plasma

To validate our system, we used 2 types of biological samples, CM of human trophoblastic cells (n=3) and plasma from pregnant women with preeclampsia (n=3). The details on these samples are summarized in Table S3.

First, we tested our device with CM from human primary trophoblastic cells. For each of the samples tested, we were able to capture sFlt-1, release PlGF and consequently decrease the sFlt-1/PlGF ratio. As shown in Figure 5A, we captured >70% of the sFlt-1 of the sample and released half to more than double the initial quantity of PlGF. The final sFlt-1/PlGF ratio in CM was significantly reduced and systematically below the physiological level of 38 (Figure 5C).

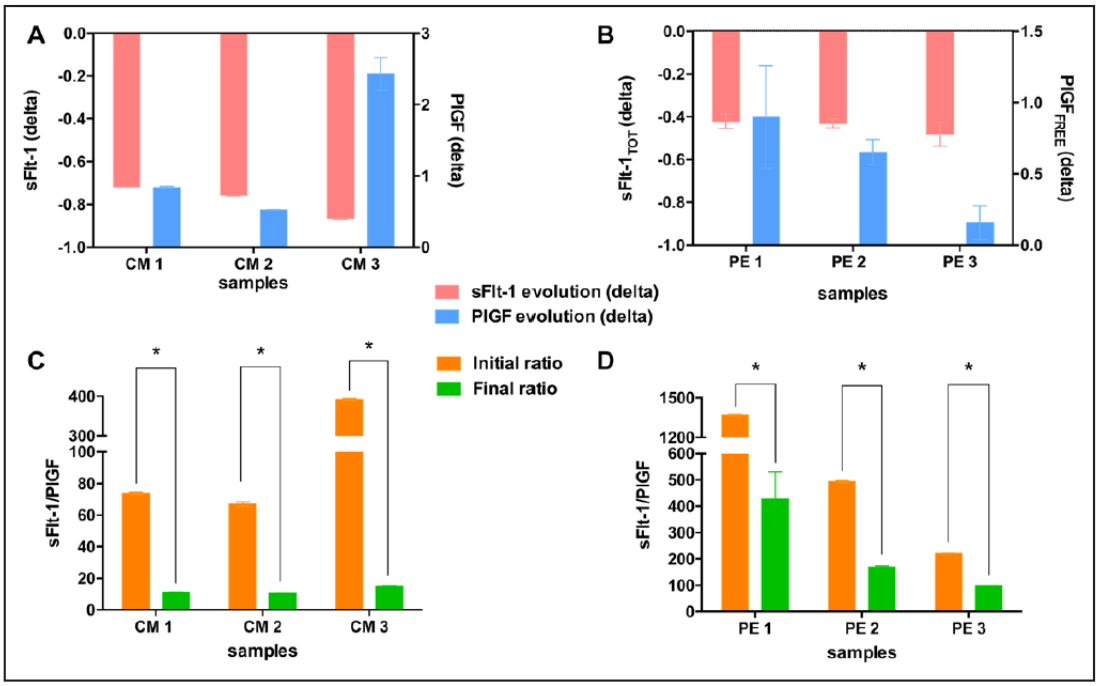


Figure 5. Performance of sFlt-1 capture and PlGF (placental growth factor) release in conditioned media (CM) from human trophoblastic primary cell culture (**A**) and human plasma from preeclamptic (PE) women (**B**) after passage through the microfluidic device at the optimized conditions (1 µL/min, 37°C). Evolution of the sFlt-1/PlGF ratio CM (**C**) and plasma samples (**D**) after passage through the microfluidic device at the same conditions. Beads ligand density: $41 \cdot 10^3$ VEGF (vascular endothelial growth factor)/um^2 (105 pmol VEGF/mg beads). Performances are evaluated as delta = ([C]fin – [C]init)/[C]init with concentrations measured in pmol/mL. **P*<0.001.

Finally, with plasma samples from pregnant women with preeclampsia (Figure 5B), we observed a ≈40% reduction of sFlt-1 and an increase in free PlGF concentration from one-sixth to more than double in all the tested samples. Thus, our microfluidic system with V-beads decreased the sFlt-1/PlGF ratio in plasma samples by 63% on average (Figure 5D).

We also assessed the potential release of VEGF after sFlt-1 apheresis. Free VEGF was almost undetectable in our samples (CM and maternal plasma) and systematically increased after incubation with V-beads (Figure S6). In addition, because sVEGFR-2 is detectable in plasma samples from pregnant women, but not in CM, we evaluated the ability of our V-beads to trap some sVEGFR-2. After incubation of plasma samples with V-beads, depletion in sFlt-1 and sVEGFR-2 was observed, showing that beads are also able to capture sVEGFR-2 significantly (Figure S7). Note that the initial concentrations of both receptors are in the same range. However, in all cases sFlt-1 were preferentially captured (23±5% for sFlt-1 versus 12±5% for sVEGFR-2, mean values).

DISCUSSION

Extracorporeal strategies to treat preeclampsia are evaluated for 3 main reasons:[1] the suspected primary role of circulating sFlt-1 in the pathogenesis of the disease,[2] the development of drugs that act specifically on the soluble form and not on the membrane form is particularly complex, and[3] apheresis methods avoid the adverse effects of molecules that cross the placenta. We decided to target sFlt-1 because of mounting evidence of its involvement in the pathogenesis of preeclampsia.[16–19] Soluble Flt-1 has been postulated to exert inhibitory effects on angiogenic signaling via 2 mechanisms: direct sequestration of angiogenic ligands, such as VEGF and PlGF and dominant-negative heterodimerization with surface VEGFRs.[20]

In vivo, the angiogenic effects are mainly related to the binding of VEGF to VEGFR-2. PlGF does not bind to VEGFR-2, but regulates VEGF bioavailability for VEGFR-2 by competing with VEGF-A in binding to VEGFR-1.[21] PlGF may also have direct angiogenic activity via intracellular signaling triggered by its binding to the VEGFR-1 membrane receptor.[22] During normal pregnancy, massive amounts of PlGF are produced by the placenta, reaching concentrations of free PlGF around 400 pg/mL, whereas during preeclampsia, free PlGF is extremely low due to the release of sFlt-1 into the maternal circulation.[23] Our sFlt-1 capture strategy consists of a specific and competitive approach between the VEGF coated on the beads and the PlGF bound to the sFlt-1. The decline in total sFlt-1 is, therefore, as important as the increase in free PlGF for our study end point, which is why we used the sFlt-1/PlGF ratio for the expression of our results. To capture sFlt-1 in vitro in static and dynamic conditions, we used streptavidin magnetic beads, which are easy to functionalize with specific ligands (eg, biotinylated VEGF, Figure S2). Before application, we performed several tests to evaluate surface ligand density (Table S1) and the ability to recognize sFlt-1 by the grafted ligand (Figure S2), as well as the storage stability of the V-beads (up to 2 weeks at 4°C, Figure S8). Then, the sFlt-1 capture combined with PlGF release was proven mainly by 2 series of experiments. First, with the rhVEGFR1/Fc/rhPlGF complexes in static conditions, we checked the total amount of PlGF used in the experiments, which is not possible with more complex media (CM, plasma) because human PlGF ELISA kits only measure free PlGF. These experiments demonstrated the ability of V-beads to capture rhVEGFR1/Fc and also to release rhPlGF significantly (20% of the initial complexed PlGF). Second, our approach was compared with another specific capture strategy based on beads coated with an sFlt-1 antibody. We demonstrated an equivalent capture rate of sFlt-1, but with the addition of increased free PlGF in solution, which proves the potential interest of our competitive approach. The increase in free PlGF in solution after incubation with the V-beads may be caused by the combination of 2 phenomena. The initially free sFlt-1 is trapped by the V-beads, resulting in a shift of the biochemical equilibrium towards free PlGF (see

equilibrium equation in Figure 1A). In addition, the V-beads compete with the PlGF bound to the sFlt-1, and due to the excess VEGF used for the incubation, we can displace the bound PlGF (Figure 2 and Figure S5). Finally, maybe because of this large excess of VEGF grafted on the beads, our approach is also able to displace the bound VEGF. This release of VEGF is sample-dependent (Figure S6), which shows the complexity of the VEGFs/VEGFRs system and the importance of the biochemical equilibria. During normal pregnancy, circulating free VEGF levels are very low, almost undetectable with noncompetitive ELISA. Whether these extremely low levels of VEGF have a physiological role during pregnancy is not known. Eremina et al[24] have shown that tight regulation of VEGF-A signaling is critical for establishment and maintenance of the glomerular filtration barrier. A slight elevation of circulating endogenous free VEGF could be beneficial, especially for the glomerular dysfunction characterized by proteinuria and endotheliosis, the renal lesion seen in preeclampsia.

The second part of our work was performed under dynamic conditions. To mimic the dynamic binding and release on the solid phase that take place in extracorporeal circulation and to evaluate the potential of our approach, we used the microfluidic fluidized bed model. The microfluidized bed allows the use of the same magnetic beads as for the static conditions while limiting the consumption of samples and reagents. Moreover, the magnetic fluidized bed has many advantages in applications involving fluid-solid exchanges, such as high surface-to-volume ratio, constant mixing, and low flow resistance.[10] Our results demonstrate the proof of concept of significant sFlt-1 capture combined with the release of PlGF in these dynamic conditions, with a 68% reduction of sFlt-1/PlGF ratio in plasma from preeclamptic women. The flow rates and the fluid volumes are low in such conditions and not compatible with application in pregnant women (50–60 mL/min),[6] but this dynamic microscale technique is of value in testing different molecules in the capture of sFlt-1 in preeclamptic plasma because of the limited amount of human material. This microfluidic device could also be of interest for a proof of concept of this approach in animal models.

Using VEGF as a competitive ligand for capture of sFlt-1 and release of PlGF, not only sFlt-1 is captured in the plasma of preeclamptic women but also sVEGFR-2 (Figure S7). The physiological impact of sVEGFR-2 in normal and pathological pregnancies is unclear. Mothers destined to develop preeclampsia have lower plasma sVEGFR-2 concentrations than those who have a normal pregnancy.[25] Work is currently underway to develop ligands with an affinity that is both greater than that of PlGF for sFlt-1 and significantly lower for sVEGFR-2 than for sFlt-1.

PERSPECTIVES

The nest steps of our strategy are: (1) to optimize the grafting with a VEGF-like molecular ligand, specific for sFlt-1, allowing no binding of sKDR; (2) to evaluate the biological effects of the release in the maternal circulation of the endogenous VEGF; and (3) to develop apheresis columns based on our ligand-based approach and usable in vivo with an animal model.

ARTICLE INFORMATION

Received 22 December 2018; revision received 17 January 2019; accepted 3 April 2019.

The online-only Data Supplement is available with this article at https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12380.

Correspondence

Correspondence to Vassilis Tsatsaris, AP-HP, Hôpital Cochin, Port-Royal Maternity, 123 Bd Port-Royal, Paris 75014, France. Email vassilis.tsatsaris@aphp.fr

Affiliations

From the UMR 8638 (L.T.-A., K.P., L.H., M.V., N.G.-E.), CNRS, Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

UMR 8038 (L.H., J.-F.G., I.B.), CNRS, Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

UMR 168 CNRS Institut Curie, PSL Research University, Institut Pierre Gilles de Gennes, Paris, France (L.A., S.Dumas, S. Descroix.)

Cochin Hospital, Assistance Publique-Hôpital de Paris, DHU Risques et grossesse, Paris Descartes University, INSERM UMR 1139, Fondation PremUp, Paris, France (C.F., M.H.-S., J.G., T.F., V.T.)

Cochin Hospital, UF d'Hormonologie, Service de Biologie Automatisée, Paris, France (M.H.-S., J.G.)

Université Paris Est Créteil, France (E.L.)

INSERM, U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, France (E.L.)

URC - CIC P1419, Cochin Hôtel-Dieu Hospital, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, France (L.L.-R.)

Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service de Gynécologie Obstétrique, France (K.P., E.L.)

LAAS-CNRS, Toulouse, France (L.M.).

Acknowledgments

We acknowledge the financial support provided by the Agence National de la Recherche (ANR-15-CE17-0005-01). Paris Descartes University, Institut National de la Santé et de la recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pierre Gilles de Gennes, Ecole Normale Supérieure (ENS Paris-Saclay) and PremUP Foundation are also acknowledged. We thank the UMR 8258-CNRS for sharing the TECAN SAFIRE and MULTISKAN EX plate-readers, and Danièle Evain-Brion and Patrick Tabling for the PremUP-IPGG collaboration.

Sources of Funding

The study was funded by the Agence Nationale pour la recherche (ANR-15-CE17-0005-01). Complementary funding was obtained from the Institut Pierre Gilles de Gennes (Equipement d'Excellence, Laboraotire d'excellence, "Investissement d'avenir", program ANR-10-EQPX-34) and the PremUP Foundation. L. Alexandre received a grant from the Ecole Normale Supérieure (ENS Paris-Saclay). K. Pons received a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM-DEA 40994).

Disclosure

None.

REFERENCES

1. Tranquilli, AL, Dekker, G, Magee, L, Roberts, J, Sibai, BM, Steyn, W. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens Int J Womens Cardiovasc Health*. 2014;4:97–104.

2. Maynard, S, Epstein, FH, Karumanchi, SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med*. 2008;59:61–78. doi: 10.1146/annurev.med.59.110106.214058 Crossref. PubMed.

3. Wu, FT, Stefanini, MO, Mac Gabhann, F, Kontos, CD, Annex, BH, Popel, AS. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *J Cell Mol Med*. 2010;14:528–552. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00941.x PubMed.

4. Maharaj, AS, Walshe, TE, Saint-Geniez, M, Venkatesha, S, Maldonado, AE, Himes, NC, Matharu, KS, Karumanchi, SA, D'Amore, PA. VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *J Exp Med*. 2008;205:491–501. doi: 10.1084/jem.20072041 Crossref. PubMed.

5. Thadhani, R, Kisner, T, Hagmann, H, et al. Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation*. 2011;124:940–950. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.034793 Crossref. PubMed.

6. Thadhani, R, Hagmann, H, Schaarschmidt, W, et al. Removal of soluble Fms-like tyrosine kinase-1 by dextran sulfate apheresis in preeclampsia. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:903–913. doi: 10.1681/ASN.2015020157 Crossref. PubMed.

7. U.S. National Library of Medicine. Proof-of-Concept Trial on Selective Removal of sFlt-1 in Pregnant Women With Preeclampsia Via Apheresis - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02923206. Accessed July 11, 2018.

8. Autiero, M, Luttun, A, Tjwa, M, Carmeliet, P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1356–1370. Crossref. PubMed.

9. Alsat, E, Haziza, J, Evain-Brion, D. Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human trophoblast cells in culture. *J Cell Physiol*. 1993;154:122–128. doi: 10.1002/jcp.1041540115 Crossref. PubMed.

10. Pereiro, I, Tabnaoui, S, Fermigier, M, du Roure, O, Descroix, S, Viovy, JL, Malaquin, L. Magnetic fluidized bed for solid phase extraction in microfluidic systems. *Lab Chip*. 2017;17:1603–1615. doi: 10.1039/c7lc00063d Crossref. PubMed.

11. Jennings, TL, Rahman, KS, Fournier-Bidoz, S, Chan, WC. Effects of microbead surface chemistry on DNA loading and hybridization efficiency. *Anal Chem*. 2008;80:2849–2856. doi: 10.1021/ac7026035 Crossref. PubMed.

12. Teste, B, Vial, J, Descroix, S, Georgelin, T, Siaugue, JM, Petr, J, Varenne, A, Hennion, MC. A chemometric approach for optimizing protein covalent immobilization on magnetic core-shell nanoparticles in view of an alternative immunoassay. *Talanta*. 2010;81:1703–1710. doi: 10.1016/j.talanta.2010.03.027 Crossref. PubMed.

13. Bouzas-Ramos, D, Trapiella-Alfonso, L, Pons, K, Encinar, JR, Costa-Fernández, JM, Tsatsaris, V, Gagey-Eilstein, N. Controlling ligand surface density on streptavidin-magnetic particles by a simple, rapid, and reliable chemiluminescent test. *Bioconjug Chem*. 2018;29:2646–2653. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00347 Crossref. PubMed.

14. Trapiella-Alfonso, L, Broussy, S, Liu, WQ, Vidal, M, Lecarpentier, E, Tsatsaris, V, Gagey-Eilstein, N. Colorimetric immunoassays for the screening and specificity evaluation of molecules disturbing VEGFs/VEGFRs interactions. *Anal Biochem*. 2018;544:114–120. doi: 10.1016/j.ab.2017.12.029 Crossref. PubMed.

15. Zeisler, H, Llurba, E, Chantraine, F, Vatish, M, Staff, AC, Sennström, M, Olovsson, M, Brennecke, SP, Stepan, H, Allegranza, D, Dilba, P, Schoedl, M, Hund, M, Verlohren, S. Predictive value of the sFlt-1:PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Engl J Med*. 2016;374:13–22. Crossref. PubMed.

16. Maynard, SE, Min, JY, Merchan, J, Lim, KH, Li, J, Mondal, S, Libermann, TA, Morgan, JP, Sellke, FW, Stillman, IE, Epstein, FH, Sukhatme, VP, Karumanchi, SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003;111:649–658. doi: 10.1172/JCI17189 Crossref. PubMed.

17. Rana, S, Powe, CE, Salahuddin, S, Verlohren, S, Perschel, FH, Levine, RJ, Lim, KH, Wenger, JB, Thadhani, R, Karumanchi, SA. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation*. 2012;125:911–919. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.054361 Crossref. PubMed.

18. Levine, RJ, Maynard, SE, Qian, C, Lim, KH, England, LJ, Yu, KF, Schisterman, EF, Thadhani, R, Sachs, BP, Epstein, FH, Sibai, BM, Sukhatme, VP, Karumanchi, SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350:672–683. doi: 10.1056/NEJMoa031884 Crossref. PubMed.

19. Kim, MY, Buyon, JP, Guerra, MM, et al. Angiogenic factor imbalance early in pregnancy predicts adverse outcomes in patients with lupus and antiphospholipid antibodies: results of the Promisse study. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;214:108.e1–108.e14. doi: 10.1016/j.ajog.2015.09.066 Crossref.

20. Wu, FT, Stefanini, MO, Mac Gabhann, F, Popel, AS. A compartment model of VEGF distribution in humans in the presence of soluble VEGF receptor-1 acting as a ligand trap. *PLoS One*. 2009;4:e5108. doi: 10.1371/journal.pone.0005108 Crossref. PubMed.

21. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25:581–611. doi: 10.1210/er.2003-0027 Crossref. PubMed.

22. Anisimov, A, Leppänen, VM, Tvorogov, D, Zarkada, G, Jeltsch, M, Holopainen, T, Kaijalainen, S, Alitalo, K. The basis for the distinct biological activities of vascular endothelial growth factor receptor-1 ligands. *Sci Signal*. 2013;6:ra52. doi: 10.1126/scisignal.2003905 Crossref. PubMed.

23. Verlohren, S, Herraiz, I, Lapaire, O, Schlembach, D, Zeisler, H, Calda, P, Sabria, J, Markfeld-Erol, F, Galindo, A, Schoofs, K, Denk, B, Stepan, H. New gestational phase-specific cutoff values for the use of

the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertens Dallas Tex*. 2014;63:346–52. Crossref. PubMed.

24. Eremina, V, Sood, M, Haigh, J, Nagy, A, Lajoie, G, Ferrara, N, Gerber, HP, Kikkawa, Y, Miner, JH, Quaggin, SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest*. 2003;111:707–716. doi: 10.1172/JCI17423 Crossref. PubMed.

25. Chaiworapongsa, T, Romero, R, Tarca, AL, Kusanovic, JP, Gotsch, F, Mittal, P, Kim, SK, Vaisbuch, E, Mazaki-Tovi, S, Erez, O, Dong, Z, Kim, CJ, Yeo, L, Hassan, SS. A decrease in maternal plasma concentrations of sVEGFR-2 precedes the clinical diagnosis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202:550.e1–550.e10. doi: 10.1016/j.ajog.2010.04.002 Crossref.

Discussion et conclusion

La première partie de ce travail de thèse a consisté à caractériser, *in vitro*, de façon exhaustive, les différentes étapes de la stéroïdogenèse placentaire dans le tissu trophoblastique normal, à l'aide de notre modèle dynamique de culture primaire de cytotrophoblastes villeux (CTV) humains normaux à terme.

Historiquement, le syncytiotrophoblaste (ST) a été considéré comme le seul tissu endocrine du placenta. En effet, c'est le tissu placentaire qui est en contact direct avec le sang maternel dans la chambre intervilleuse. Il sécrète donc à la fois des protéines hormonales comme l'hCG et des hormones stéroïdes comme la P4 et l'E2 dans la circulation maternelle (Miller 1998; Guibourdenche et al. 2009; Benirschke, Burton, et Baergen 2013; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018). Cependant, nous avons montré dans ce travail que la sécrétion de progestatifs débute plus précocement dès le stade CTV. Ces résultats consolident des résultats antérieurs du laboratoire qui avaient montré que le CTV était bien capable de secréter de l'hCG et de la pGH (Lacroix et al. 2002; Cocquebert et al. 2012). Cette capacité de sécrétion s'associe, comme pour les protéines hormonales, à une capacité de synthèse. Nous avons en effet montré que le CTV exprime en quantité significative, tant en terme de protéines que de transcrits, le transporteur mitochondrial du cholestérol MLN64 ainsi que les enzymes P450SCC et HSD3B1 impliquées dans la stéroïdogenèse. Pour être complet, il faudrait étudier les étapes plus précoces de la production des progestatifs en remontant jusqu'au substrat initial, le cholestérol, en évaluant notamment l'expression des récepteurs aux lipoprotéines dont la présence a été établie dans le ST (Alsat, Haziza, et Evain-Brion 1993). En effet, le placenta produit peu ou pas de cholestérol *de novo*. Il doit donc capter le cholestérol dans la circulation maternelle via le récepteur au LDL et le récepteur SR-B1 (Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018). Les CTV, issus à la fois de placentas du premier trimestre et à terme, sont capables d'internaliser des esters de cholestérol et expriment les récepteurs notamment SR-B1 (Wadsack et al. 2003).

De plus, si nous avons caractérisé la présence des principales enzymes de la stéroïdogenèse dans le CTV et approché leur fonctionnalité, via le profil des hormones stéroïdes sécrétées dans les surnageants de culture, nous n'avons pas mesuré directement l'activité de ces enzymes. Il serait donc informatif de mesurer ces activités, notamment celle des enzymes P450SCC et HSD3B1 afin de documenter le ratio P4/P5 observé dans nos surnageants et établir que la quasi-totalité de la P5 est bien convertie en P4. De plus, ces enzymes peuvent faire l'objet de régulations spécifiques de leur activité catalytique de façon autocrine et paracrine. En effet, la synthèse de P4 peut être régulée par

les oestrogènes au niveau de l'activité de la P450SCC (Babischkin et al. 1997). Ces enzymes peuvent aussi être des cibles spécifiques de perturbateurs endocriniens en inhibant à la fois l'expression et l'activité des enzymes des cellules trophoblastiques (Chu et al. 2018). Néanmoins, le développement des techniques de spectrométrie de masse adaptées aux surnageants de culture, nous a permis une approche indirecte satisfaisante pour étudier, en première intention, la stéroïdogenèse placentaire. Il faudrait toutefois compléter ce profil en incluant les catabolites potentiellement produits par le CTV. Cependant, à la différence des immuno-dosages, la spectrométrie de masse permet de caractériser spécifiquement et de quantifier sur un même échantillon de surnageant un grand nombre de progestatifs sécrétés (Hertig et al. 2010; Berkane et al. 2018). Ainsi, l'absence de 17-OH-progestérone en spectrométrie de masse dans nos milieux de culture confirme l'absence d'activité CYP17 dans le tissu trophoblastique, à la différence de l'ovaire. Il nous aurait été impossible de prouver la chose avec des immuno-dosages car la 17-OH-progestérone croise systématiquement avec les très grandes quantités de P4 sécrétées dans nos surnageants de culture. L'absence d'activité CYP17, au niveau placentaire, explique pourquoi, *in vivo,* dans le sang maternel, les taux circulants de P4 continuent d'augmenter alors que ceux de 17-OH-progestérone chutent lors du relais de la stéroïdogenèse ovarienne par le placenta. L'absence de ce complexe enzymatique explique également la nécessaire collaboration entre la mère, le fœtus et le placenta pour la synthèse des oestrogènes au cours de la grossesse. En effet, l'enzyme CYP17 permet la conversion des progestatifs en androgènes qui sont ensuite aromatisés en oestrogènes comme dans l'ovaire ou la surrénale (Jamnongjit et Hammes 2006; Turcu et Auchus 2015). Les oestrogènes placentaires sont donc synthétisés à partir du DHEA-S produit par les surrénales fœtales et maternelles (Pasqualini 2005; Reed et al. 2005). Nous avons montré dans ce travail que le CTV exprime, comme le ST, la Stéroïde Sulfatase (STS) qui permet d'utiliser le DHEA-S comme substrat. Il exprime également l'aromatase qui assure la conversion des androgènes en oestrogènes qui sont sécrétés dans nos surnageants de culture. C'est donc bien tout le tissu trophoblastique villeux et pas seulement le ST qui est doué d'une capacité stéroïdogène (Pasqualini 2005; Reed et al. 2005).

Nous avons travaillé par facilité de recrutement sur des placentas à terme. Cependant, il conviendrait de regarder si l'on retrouve des résultats similaires sur des placentas plus précoces, du premier et du second trimestre. En effet, des travaux antérieurs au sein du laboratoire ont montré que la production endocrine du trophoblaste villeux était particulièrement intense au premier trimestre et existait également dans le cytrophoblaste extra-villeux (CTEV) (Handschuh et al. 2007). Ces travaux ont ainsi montré que le CTEV exprimait les deux sous unités de l'hCG mais dans un ratio différent du CTV, et sécrétait des formes particulières d'hCG, notamment hyperglycosylées, dont l'activité biologique diffère de celle de l'hCG (Handschuh et al. 2007; Guibourdenche et al. 2010; Fournier, Guibourdenche,

et Evain-Brion 2015; Evans 2016). Cette stéroïdogenèse caractérisée dans le tissu trophoblastique villeux normal a également une forte probabilité d'être perturbée dans le trophoblaste pathologique comme en cas de trisomie 21 (T21) fœtale ou de pré-éclampsie (PE). Il a été établi de longue date que la présence d'un fœtus atteint de T21 était associée d'une part, à une diminution de la concentration sérique maternelle en oestriol et d'autre part, à une augmentation du risque de fausse couche dans la première moitié de la grossesse (Loncar, Barnabei, et Larsen 1995; Wald et al. 1997). La PE est, elle, associée à des anomalies de la voie des oestrogènes avec une diminution de l'expression de l'aromatase (Berkane et al. 2017; 2018). Les mécanismes sous-jacents sont encore discutés mais ils pourraient bien résulter d'une perturbation de la production et de l'action des stéroïdes placentaires qui reste à explorer.

Physiologiquement, le ST est en perpétuel renouvellement à la surface de la villosité choriale. Il se régénère au pôle basal, par agrégation puis fusion des CTV et au pôle apical, par apoptose libérant dans la circulation maternelle, des « knots » syncytiaux contenant l'ADN des noyaux en fin de vie. Au sein du laboratoire, nous avons su reproduire *in vitro* ce processus de différenciation du CTV qui est peu ou difficilement reproduit par les lignées de choriocarcinomes (Alsat, Haziza, et Evain-Brion 1993; Handschuh et al. 2007; Pidoux et al. 2007; Gerbaud et al. 2011). Les CTV mis en culture s'agrègent en 24h de culture puis fusionnent en différents syncytia dès 48h de culture. Nous avons confirmé que la différenciation morphologique du CTV s'accompagne d'une différenciation fonctionnelle marquée par une augmentation de la sécrétion d'hCG. Des travaux antérieurs de notre équipe ont montré que la fusion des membranes plasmiques des CTV, attestée par la disparition du marquage à la desmoplakine, est dépendante de la PKA et de la connexine-43 (Pidoux et al. 2014). Dans ce travail, nous avons, grâce à la microscopie électronique à transmission, poursuivi la caractérisation de cette différenciation des CTV en ST à l'échelon intracellulaire. Nous avons ainsi caractérisé une condensation plus importante de la chromatine dans les noyaux du ST que dans ceux des CTV, confirmant des études antérieures d'ultrastructure sur tissu (Benirschke, Burton, et Baergen 2013). La condensation de la chromatine est associée à une réduction globale de la transcription, ce qui n'est pas cohérent avec l'augmentation de la synthèse des hormones protéiques au niveau du ST. En revanche, la condensation de la chromatine est également observée lorsque que les noyaux entrent en phénomène d'apoptose, ce qui est en accord avec le renouvellement continu du ST. Nous avons observé que le réticulum endoplasmique (RE), organite cellulaire indispensable à la synthèse protéique, est plus fin et dense dans les CTV que dans le ST où il apparaît peu dense et très élargi. Ces modifications suggèrent une synthèse protéique intense dans le ST d'où la production plus importante d'hormones protéiques (hCG, pGH) (Guzel et al.

2017; Burton, Yung, et Murray 2017). Nos résultats attestent que la différenciation du CTV en ST s'accompagne aussi d'une différenciation au regard de la stéroïdogenèse.

Au cours de la différenciation des CTV en ST, nous avons montré que la sécrétion de P4 augmente avec la formation du ST. Cette augmentation de sécrétion de P4 est corrélée à celle d'hCG. Le ST est donc la source majeure de production de P4 comme attendu (Zosmer, Elder, et Sullivan 1997; Tuckey 2005). Grâce à la spectrométrie de masse, nous avons pu montrer que la sécrétion de P5 augmentait également lors de la différenciation trophoblastique mais dans une proportion nettement plus faible que l'augmentation de P4. Cela suggère que la P5 est majoritairement convertie en P4 lors de la formation du ST. Cette conversion se fait sous l'action de l'enzyme HSD3B1 dont l'expression augmente en terme de transcrits et de protéines, au cours de la différenciation des CTV en ST. En revanche, l'expression du transporteur mitochondrial MLN64 et de l'enzyme P450SCC ne varie pas au cours de la différenciation du CTV en ST. Ainsi, l'augmentation de la sécrétion de P4 résulte pour partie, de l'augmentation de l'expression de certaines enzymes et de la stimulation d'étapes spécifiques de la stéroïdogenèse. L'absence de variation de l'expression de MLN64 et de P450SCC suggère que ces 2 étapes ne sont pas ou peu limitantes à la synthèse de P4 comme cela a déjà été démontré dans l'ovaire (Charman et al. 2010). Nos expériences avec introduction, dans le milieu de culture, de cholestérol-sulfate utilisé comme substrat, montrent que l'ajout de ce dernier induit une augmentation de la sécrétion à la fois de P5 et de P4, sans influencer l'expression des partenaires de synthèse. Ces résultats confirment que le transporteur et les enzymes ne sont pas saturés dans notre modèle. En revanche, la sécrétion d'E2 diminue au cours de la différenciation trophoblastique, alors que l'expression protéique des enzymes impliquées (STS, HSD3B1 et aromatase) augmente. L'augmentation de l'expression de ces enzymes est en accord avec des études précédentes qui établissaient une augmentation de l'expression et de l'activité de l'aromatase au cours de la différenciation (Hudon Thibeault, Vaillancourt, et Sanderson 2018). Néanmoins, la diminution de sécrétion d'E2 alors que les enzymes sont fortement exprimées, pourrait résulter d'une carence en substrat DHEA-S. Pour pallier cette carence, certains auteurs ont développé des modèles de coculture de lignées trophoblastiques BeWo avec des cellules corticales des surrénales (Murthi et al. 2017; Yancu, Vaillancourt, et Sanderson 2019). L'augmentation de l'expression des enzymes STS, HSD3B1 et aromatase pourrait viser à compenser le défaut de synthèse d'E2 consécutif à la carence en substrat. Des processus de régulation paracrines et autocrines plus complexes pourraient également expliquer cette discordance car les oestrogènes sont impliqués dans la régulation de la sécrétion d'hCG et de P4 et réciproquement (Cronier et al. 1999; Malassiné et Cronier 2002; Gambino et al. 2012; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

Au niveau subcellulaire, la mitochondrie est un organite indispensable à la stéroïdogenèse puisqu'elle contient les 2 enzymes P450SCC et HSD3B1, ainsi qu'à la différenciation des CTV en ST (Wasilewski et al. 2012; Poidatz et al. 2015). Des études antérieures ont permis d'analyser la fonction mitochondriale et sa structure sur tissu total ou après fractionnement subcellulaire (Martinez, Kiriakidou, et Strauss 1997; De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014). En revanche, peu d'études ont été réalisées sur un modèle de culture primaire comme le nôtre. L'essentiel des études publiées ont été réalisés sur le modèle de choriocarcinome BeWo (Wasilewski et al. 2012; Shan et al. 2019). Dans notre modèle, nous avons utilisé une sonde mitochondriale fluorescente, le « mitotracker » CMX Ros qui s'intègre aux mitochondries avec un potentiel transmembranaire intact. Au cours de la différenciation trophoblastique, l'intensité de fluorescence de la sonde CMX Ros diminue. Les CTV possèdent donc un potentiel transmembranaire élevé et intact. Au contraire, le ST ne présente pas ou peu de fluorescence, reflétant un potentiel transmembranaire mitochondrial faible voire inexistant. La fonction mitochondriale, marquée par le potentiel de membrane, évolue donc au cours de la différenciation trophoblastique. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes démontrant, par cytométrie en flux, une diminution du potentiel de membrane dans les mitochondries isolées de ST (Martinez, Kiriakidou, et Strauss 1997; De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014; Martinez et al. 2015). Des études histologiques en microscopie électronique à transmission ont également montré des changements morphologiques des mitochondries (aspect des crêtes, densité de la matrice) entre les CTV et le ST (Martinez, Kiriakidou, et Strauss 1997; De Los Rios Castillo et al. 2011; Holland et al. 2017). Dans le ST, les mitochondries sont majoritairement plus petites avec des crêtes mitochondriales d'aspect atypique. Cette structure n'est pas retrouvée dans les mitochondries à potentiel de membrane intact comme dans le CTV (Martinez, Kiriakidou, et Strauss 1997; De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014; Martinez et al. 2015; Holland et al. 2017). En microscopie électronique, nous observons que les CTV présentent des mitochondries larges avec des crêtes clairement définies alors que le ST contient majoritairement, des mitochondries très petites et rondes avec des crêtes peu définies. Notre étude confirme les travaux histologiques antérieurs attestant une différence de morphologie de la mitochondrie entre les CTV et le ST (De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014; Martinez et al. 2015; Holland et al. 2017; Fisher et al. 2019). Ils attestent également que les mitochondries perdent leur phénotype métabolique actif pour un profil stéroïdogène lors de la différenciation du CTV en ST. Pour poursuivre l'étude de l'évolution des mitochondries, il serait nécessaire d'isoler les mitochondries des cellules cultivées à 24, 48 et 72h de culture. Nous pourrions ainsi étudier la structure de ces mitochondries isolées mais surtout leur fonctionnalité en mesurant par exemple la capacité de consommation d'O_2, la production d'ATP et celle de P4 (De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014).

Ces modifications morphologiques de la mitochondrie sont associées à une dynamique mitochondriale qui repose sur une alternance entre des processus de fusion et de fission. Ces processus impliquent différents facteurs pro-fusions (OPA1, Mfn1 et Mfn2) et pro-fissions (Drp1 et Fiss1). Dans notre modèle, nous montrons que l'expression des facteurs pro-fusions Mfn2 et OPA1 reste inchangée au cours de la différenciation trophoblastique. Ces résultats sont en désaccord avec ceux d'une étude précédente démontrant une diminution de la fusion mitochondriale avec la diminution de l'expression du facteur OPA1 au cours de la différenciation, mais sur un modèle de choriocarcinome (BeWo) et lors d'une différenciation pharmacologiquement induite par la forskoline (Wasilewski et al. 2012). L'expression constante des facteurs Mfn2 et OPA1 suggère que la fusion mitochondriale n'est pas ou peu impliquée dans la régulation de la synthèse de P4 dans notre modèle. Ils sont en accord avec des résultats obtenus à partir de la lignée cellulaire BeWo, montrant une augmentation de l'expression de l'enzyme P450SCC parallèlement à la diminution de la fusion mitochondriale et de l'expression du facteur OPA1 (Wasilewski et al. 2012). Sur un modèle de cellules de Leydig , il a été au contraire, montré que le facteur Mfn2 était indispensable à la synthèse des progestatifs et des androgènes (Duarte et al. 2012). Pour compléter notre travail, il serait nécessaire d'explorer de façon plus exhaustive la fission mitochondriale en étudiant l'expression des facteurs pro-fission (Drp1 et Fiss1), ce qui permettrait de préciser les places respectives de la fusion et la fission dans la régulation de la différenciation trophoblastique et de la stéroïdogenèse (De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014; Martinez et al. 2015; Holland et al. 2017; Fisher et al. 2019; Fraichard et al. 2020). Les mitochondries ne sont pas les seuls organites intracellulaires dont l'aspect voire la fonctionnalité changent avec la formation du ST. En effet, au cours de la différenciation des CTV en ST, nous avons observé une condensation de la chromatine au niveau du noyau ainsi qu'un élargissement du RE. Ces modifications concernent davantage l'évolution de la production des hormones protéiques placentaires comme l'hCG. L'étude de l'appareil de golgi serait aussi intéressante car il est le siège principal de la glycosylation, processus qui semble distinct entre CTEV et CTV au niveau de l'hCG (Handschuh et al. 2007; Guibourdenche et al. 2010).

La régulation de la différenciation du CTV en ST est un phénomène complexe dans lequel les hormones placentaires via leurs récepteurs, sont à la fois spectateurs et acteurs. En effet, le trophoblaste villeux exprime les récepteurs de l'hCG (Pidoux et al. 2007) ainsi que les différentes isoformes des récepteurs de la P4 (Wang et al. 1996; Taylor et al. 2009; Asavasupreechar et al. 2020) et des oestrogènes (Bukovsky, Cekanova, et al. 2003; Bukovsky, Caudle, et al. 2003). Cette différenciation est donc un processus dynamique autorégulé et intriqué impliquant les hormones qu'il

produit lors de cette différenciation. Nous n'avons pas réussi avec nos outils à caractériser les récepteurs de la P4. Néanmoins, l'étude de l'évolution de l'expression de ces récepteurs conjointement à ceux de l'hCG et de l'E2 serait nécessaire. En effet, des travaux antérieurs de notre équipe ont montré que l'expression des récepteurs de l'hCG variaient entre CTV et ST (Pidoux et al. 2007), il pourrait en être de même avec les récepteurs de la P4 et de l'E2.

La formation du ST implique différentes voies intracellulaires dont la voie AMPc/PKA (Rodway et al. 1988; Pidoux et al. 2014; Gerbaud, Taskén, et Pidoux 2015). Ainsi, les inducteurs pharmacologiques de cette voie, comme la FSK, induisent la fusion des CTV en ST et la production d'hCG (Wice et al. 1990; Azar et al. 2018). Cette voie est en partie ciblée par des hormones trophoblastiques comme l'hCG qui l'active en se liant à son récepteur LH/CG (Pidoux et al. 2007; Tsampalas et al. 2010). En incubant les CTV avec de la FSK, nous augmentons comme attendu, la sécrétion d'hCG mais aussi celle de P4 et de P5. Cette augmentation de sécrétion de progestatifs est associée à une augmentation de l'expression protéique du transporteur MLN64 et des enzymes P450SCC et HSD3B1. La production placentaire de P4 est donc régulée positivement par la voie de l'AMPc, confirmant des résultats antérieurs obtenus sur lignée de choriocarcinome (Maldonado-Mercado et al. 2008). L'activation de la voie AMPc/PKA aboutit à la phosphorylation activatrice du facteur de transcription « cAMP Response Element Protein » (CREB). Comme le promoteur des gènes codant pour les enzymes P450SCC et HSD3B1 contient des éléments de réponse au facteur CREB, la FSK pourrait induire directement leur l'expression via l'AMPc. Sous FSK, l'activation de l'adénylate cyclase aboutirait donc, dans un premier temps, à l'augmentation de l'expression des partenaires de synthèse de la P4 puis, dans un second temps, à l'augmentation de la synthèse de P5 et de P4. Comme la voie de l'AMPc régule de nombreux processus au niveau placentaire, l'effet activateur peut aussi être indirect. En effet, en régulant l'expression des syncytines et de la connexine-43, la voie AMPc/PKA induirait la fusion des CTV en ST et donc la production progestative associée. La voie AMPc induit aussi la sécrétion d'hormones, comme l'hCG et l'hPL, qui pourraient augmenter la production de P4 (Rodway et al. 1988; Wice et al. 1990; Orendi et al. 2010; Rothbauer et al. 2017; Azar et al. 2018). Dans notre étude, la corrélation positive entre l'hCG et la P4 suggère une inter-régulation entre ces hormones. Cette inter-régulation est ainsi retrouvée dans un modèle de choriocarcinome BeWo, où l'ajout d'hCG conduit à l'augmentation de la synthèse de P4 par activation de la voie AMPc/PKA (Manna et al. 2006). L'hCG est également impliquée dans le contrôle de l'expression du récepteur à la P4, régulant aussi l'action de la P4 (Tapia-Pizarro et al. 2017). En retour, la P4 module la sécrétion d'hCG. En effet, sur modèle ovarien, un antagoniste du récepteur à la P4 régule négativement l'expression du récepteur de l'hCG et inactive les voies de signalisation induites par ce récepteur (Yung et al. 2014). Dans notre modèle, il est possible que la P4 en se fixant son récepteur, active l'expression du récepteur de l'hCG

et favorise ainsi l'activation des voies de signalisation induites par l'hCG comme la voie AMPc. Cette induction de l'expression du récepteur à l'hCG pourrait varier entre CTV et ST car ce récepteur est plus exprimé dans le CTV (Pidoux et al. 2007). Ainsi, au niveau des CTV, le récepteur à l'hCG étant plus exprimé, l'hCG favoriserait la fusion des CTV en ST, ce qui provoquerait une sécrétion d'hCG et de P4 plus importante. Il en résulterait une boucle d'auto-activation à la fois de l'hCG et la P4 qui stimulerait la différenciation des CTV en ST (*Figure 54*).

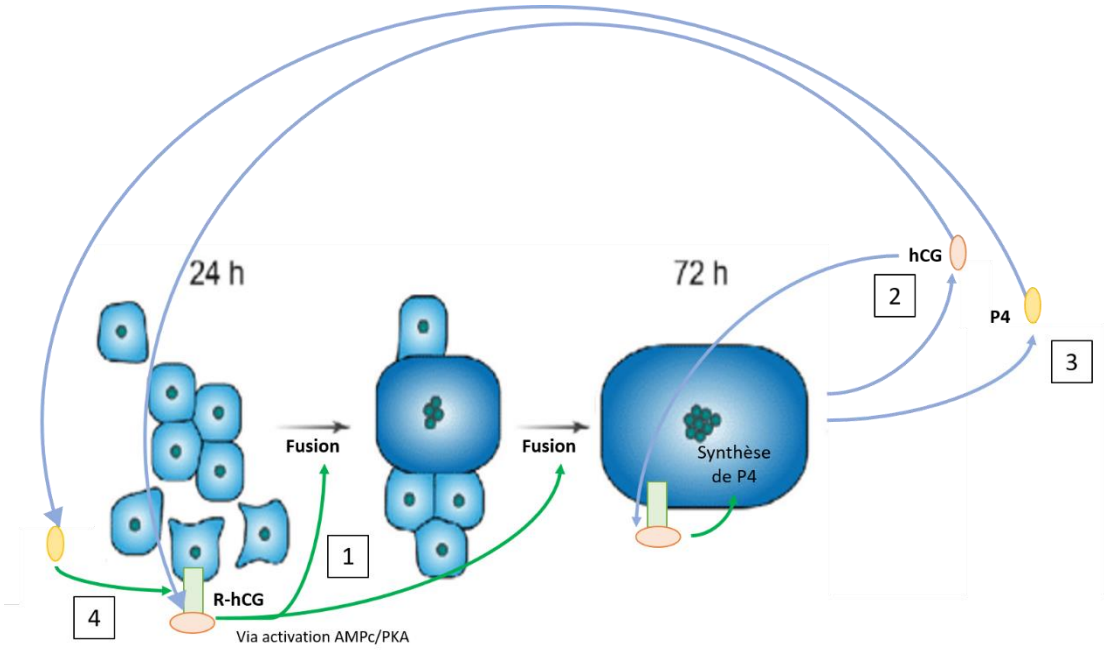


Figure 54 : Schéma d'hypothèse d'auto-activation de l'hCG et de la P4 au cours de la différenciation trophoblastique. La fusion des CTV en ST est un processus contrôlée par activation de la voie AMPc/PKA induite par l'hCG (1). La formation du ST aboutit à une sécrétion importante d'hCG (2) qui permet au niveau du ST de stimuler la synthèse de P4 (3), et au niveau des CTV de stimuler la fusion (1) ; créant ainsi une première boucle d'auto-activation permettant d'augmenter la sécrétion d'hCG et de P4. Cette dernière stimule l'expression des récepteur à l'hCG (R-hCG) au niveau des CTV (4), les rendant ainsi plus sensible à l'hCG. Il en résulte une augmentation de la fusion qui aboutit in fine à l'augmentation de la sécrétion d'hCG et de P4 ; créant ainsi une seconde boucle d'auto-activation.

Une première réponse sur l'inter-régulation entre la P4 et l'hCG pourrait venir des résultats obtenus à partir des expériences réalisées avec le cholestérol-sulfate qui mime l'ajout du substrat de la synthèse de P4. Comme l'ajout de cholestérol-sulfate n'induit pas d'augmentation de la sécrétion d'hCG, cela semble suggérer que la P4 sécrétée ne régule pas la sécrétion d'hCG. En revanche, comme démontré dans un modèle ovarien, elle pourrait intervenir dans la régulation de l'expression du récepteur à l'hCG, influençant ainsi l'activité de l'hCG (Yung et al. 2014). Ces résultats obtenus

confirment l'hypothèse de boucle d'auto-activation indirecte entre l'hCG et la P4. En effet, la P4 ne semble pas augmenter directement la synthèse d'hCG, mais elle pourrait augmenter l'expression du récepteur à l'hCG au niveau des CTV favorisant ainsi la différenciation trophoblastique et la sécrétion d'hCG associée. En retour, l'hCG en stimulant, au niveau du ST, la synthèse de P4 et en favorisant la fusion des CTV, maintiendrait l'activation de ces 2 boucles de régulation (*Figure 54*).

L'E2 en revanche, ne semble pas intervenir directement dans cette boucle d'activation au cours de la différenciation. En effet, la sécrétion d'E2 diminue au cours de la différenciation physiologique dans notre modèle. Néanmoins, au cours de la stimulation pharmacologique sous FSK, nous observons une augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'E2. La voie de l'AMPc n'agirait, à priori, pas en favorisant la différenciation trophoblastique mais plutôt directement par activation de l'expression et/ou de l'activité des enzymes. En effet, des études précédentes ont démontré d'une part, que le promoteur du gène codant la STS possède des éléments de réponse à CREB (Reed et al. 2005) et d'autre part, que l'activité et l'expression de l'aromatase sont augmentées par la FSK (Hudon Thibeault, Vaillancourt, et Sanderson 2018). L'activation de l'adénylate cyclase peut aboutir à l'activation de la PKA et de la protéine Epac. Il serait donc intéressant d'évaluer dans notre modèle, si ces protéines interviennent dans la régulation de la production de la P4 et de l'E2. La différence d'effet de la FSK sur la sécrétion de P4 versus sur celle d'E2 pourrait également être expliquée par une activation différentielle de ces 2 voies. En effet, l'effet stimulateur de la FSK sur la sécrétion d'E2 est plus précoce que celle de la sécrétion de P4. La voie AMPc/Epac régulant la sécrétion de P4 dans un modèle de choriocarcinome BeWo (Yoshie et al. 2010), il serait donc possible que la FSK active, prioritairement la voie AMPc/PKA aboutissant à l'augmentation de la production d'E2, puis secondairement, la voie AMPc/Epac entrainant l'augmentation de la production de P4 .

Le traitement des mères infectées par le VIH vise à obtenir une charge virale indétectable (< 50 copies) chez ces patientes. Les recommandations actuelles suggèrent d'utiliser une combinaison de 2 inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) (principalement l'Abacavir, le Ténofovir ou la Zidovudine) et 1 inhibiteur de protéase (IP) (principalement le Darunavir, le Lopinavir (LPV) ou l'Atazanavir) toujours « boosté » par le ritonavir (RTV). Les concentrations sériques maternelles maximales obtenues sont alors en moyenne de 12 µM pour le LPV et 5 µM pour le RTV utilisé comme « boosteur » (Morlat et al. 2018). Si le bénéfice de ces traitements est indéniable sur l'infection par le VIH, ils ne sont pas dénués d'effets secondaires. En effet, les INTI induisent une toxicité mitochondriale chez le nouveau-né (Leclercq, Roudiere, et Viard 2004). Les inhibiteurs de protéase (IP) quant à eux, sont décrits comme responsables de l'augmentation du risque de naissances prématurées (Powis et

al. 2011; Sibiude et al. 2012; Short et Taylor 2014) et perturberaient la stéroïdogenèse maternelle et fœtale. En effet, une diminution de 30% des taux sériques maternels de P4 et une augmentation de 25 % de ceux d'E2 sont observés à 28 semaines de grossesse, chez les patientes traitées avec la trithérapie (2 INTI et 1 IP) (Papp et al. 2015; McDonald et al. 2018). Côté fœtal, l'exposition *in utero* des nouveau-nés aux IP entraine un dérèglement de la stéroïdogenèse surrénalienne marquée par une augmentation des taux de 17-OH-progestérone et 17-OH-prégnénolone, ainsi qu'une augmentation des taux de certains androgènes (DHEA-S, DHEA et/ou androstènedione), tableau biologique évocateur d'un bloc en 21-hydroxylase (Kariyawasam et al. 2014). Si la surrénale a été bien étudiée, peu d'études ont porté sur les IP et la stéroïdogenèse placentaire. Nous avons émis l'hypothèse que les principaux IP prescrits, LPV et RTV, pourraient perturber le développement morphologique et fonctionnel du placenta endocrine, à savoir le trophoblaste villeux. En utilisant notre modèle de culture primaire de trophoblaste villeux humain, nous avons donc incubé les CTV avec du RTV de 5 à 20 µM ou du LPV à 10 µM pendant 6 à 48h afin d'explorer les possibles altérations des CTV, du ST, et de la différenciation morphologique et fonctionnelle des CTV en ST.

Nous avons commencé par étudier l'impact du ritonavir (RTV), connu pour être un puissant inhibiteur de l'enzyme CYP3A. Il est principalement utilisé comme « boosteur » des autres IP afin d'augmenter leur biodisponibilité et leur demi-vie. *In vivo*, le risque de naissances prématurées est plus important lorsque les IP sont « boostés » par le RTV (Sibiude et al. 2012). Sur notre modèle i*n vitro*, le RTV, quelques soient les concentrations utilisées ou temps d'incubation étudiés, n'altère pas la différenciation du CTV en ST. Il ne modifie ni les sécrétions hormonales (hCG, P4 et E2), ni l'expression des partenaires de synthèse des hormones stéroïdes (MLN64, P450SCC, HSD3B1, aromatase, stéroïde sulfatase). Le RTV n'a donc *in vitro* pas d'effets délétères sur le placenta endocrine. Il ne perturbe pas lui-même la stéroïdogenèse placentaire et ne semble donc pas être directement responsable des effets secondaires observés chez les mères traitées.

Nous nous sommes alors intéressés au lopinavir (LPV). Contrairement au RTV, le LPV *in vitro,* induit une diminution de la capacité des CTV à fusionner en ST. Il entraine également une diminution de la sécrétion d'hCG en accord avec la moindre formation de ST. Le LPV entraine une diminution précoce de la sécrétion de P4 par le CTV ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'E2. Nos datas *in vitro* corroborent donc pour partie, le profil hormonal observé *in vivo* chez des patientes traitées par IP (McDonald et al. 2018). Côté synthèse, l'expression des enzymes P450SCC et HSD3B1 n'est pas altérée précocement alors que celle des enzymes stéroïde sulfatase (STS) et aromatase est diminuée. Il y a donc a priori un découplage entre les effets du LPV, sur les sécrétions de P4 et d'E2 et ses effets sur l'expression des enzymes de la synthèse des hormones stéroïdes. La diminution d'expression des

enzymes pourrait résulter d'une diminution de leur synthèse sous LPV. En effet, il a été montré sur un modèle de myocytes que le LPV induisait une diminution globale de la synthèse protéique (Hong-Brown et al. 2008). De plus, les effets des IP ne sont pas uniformes. Les IP peuvent être soit des inhibiteurs enzymatiques comme pour l'enzyme hépatique CYP3A, soit des activateurs comme pour la CYP2C9, CYP2C19 ou CYP1A2 ou la 20-α-hydroxystéroïde déshydrogénase (Yeh et al. 2006; Papp et al. 2016). Il conviendrait donc de quantifier l'activité des enzymes de la stéroïdogenèse sous LPV.

Le LPV perturbe donc la fonction endocrine du CTV ainsi que sa capacité à fusionner en ST. Nous avons ensuite cherché à savoir quels organites cellulaires et quelles grandes voies de signalisation cellulaire étaient impactés par le LPV. Nous avons donc étudié dans le CTV (i) les mitochondries, (ii) le réticulum endoplasmique (RE) et sa voie UPR ainsi que (iii) la voie AMPc/PKA.

Nous nous sommes intéressés à l'impact du LPV sur la mitochondrie et plus particulièrement sur la dynamique mitochondriale. En effet, la mitochondrie, est essentielle à la fois à la stéroïdogenèse et à la différenciation trophoblastique (Evain-Brion et Malassiné 2010; Wasilewski et al. 2012; Poidatz et al. 2015; Shan et al. 2019). Nous avons d'une part, évalué la structure mitochondriale en microscopie électronique sous LPV et d'autre part, étudié la dynamique mitochondriale par western-blot, en ciblant les protéines Mfn2 et OPA1, impliquées dans la fusion des mitochondries. La structure des mitochondries est impactée par le LPV à la dose de 10 µM dans le ST. En absence de LPV, les mitochondries syncytiales présentent une structure atypique (petite taille et crête non clairement définie) décrite comme favorable à la stéroïdogenèse (Martinez, Kiriakidou, et Strauss 1997; De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014; Martinez et al. 2015; Holland et al. 2017; Fisher et al. 2019). En revanche, en présence de LPV, les mitochondries du ST ont une structure différente dite classique, avec une grande taille et des crêtes définies. Cette structure est décrite comme associée à une activité de régulation de l'énergie intracellulaire en défaveur d'une activité stéroïdogène. Ces modifications pourraient donc contribuer à la diminution de l'expression de certaines enzymes de la stéroïdogenèse que nous avons observée après 48h d'incubation.

Le réticulum endoplasmique (RE) est un autre organite cellulaire indispensable à la fonction endocrine car il intervient dans la synthèse des hormones protéiques mais aussi stéroïdes. En effet, les voies UPR sont impliquées dans la régulation de la stéroïdogenèse et la différenciation trophoblastique (Park et al. 2014; Takahashi et al. 2017; Yang et al. 2017; Bastida-Ruiz et al. 2019). Les voies UPR comprennent 3 branches : la voie PERK qui aboutit à l'activation du facteur de transcription ATF4, la voie ATF6 qui après activation induit le clivage activateur du facteur de transcription ATF6, et la voie IRE1α qui provoque l'épissage de l'ARNm du facteur XBP1 aboutissant à la formation du facteur « spliced XBP1 » (sXBP1). Il a été montré que l'inhibition des 3 branches des voies UPR par des siRNA,

aboutit à une réduction de la fusion des CTV en ST ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'hCG (Bastida-Ruiz et al. 2019). De plus, dans un modèle d'ovaire murin, l'induction d'un stress du RE par la tunicamycine qui provoque l'activation des voies UPR, aboutit à la diminution de la production de P4 ainsi qu'une diminution de l'expression des enzymes impliquées dans sa synthèse (Park et al. 2014). Dans ce travail, nous avons montré que le LPV à 10 µM provoque précocement un stress du RE au niveau du CTV qui aboutit à l'activation de la voie IRE1α marquée par une augmentation de l'expression de la protéine GRP78 et du facteur sXBP1. Nos résultats sont en accords avec ceux obtenus dans des modèles de macrophages et d'adipocytes, où le LPV à 15 µM pendant 24h induit un stress du RE (Chen et al. 2009; Zha et al. 2013). Ce stress du RE engendré par le LPV expliquerait la diminution de la fusion des CTV ainsi que la diminution des sécrétions d'hCG et de P4. Par ailleurs, concernant l'E2, il a été établi sur des cellules de granulosa ovarienne que l'induction d'un stress du RE aboutissait à une diminution de la sécrétion d'E2 (Lei et al. 2019). Nous observons, dans notre modèle, une augmentation de la sécrétion d'E2 qui ne semble pas impliquer l'induction d'un stress du RE par le LPV.

L'effet du LPV sur la voie AMPc/PKA a été étudié en évaluant par western-blot, l'état de phosphorylation des substrats de la PKA et en mesurant l'activité intrinsèque de la PKA grâce au kit « PepTag nonradioactive Protein Kinase Assay ». Les résultats ne mettent pas en évidence d'altération de la voie AMPc/PKA en cas d'incubation des cellules avec le LPV. Néanmoins, il serait intéressant d'évaluer la phosphorylation du facteur de transcription CREB, dernier élément de la voie, afin d'écarter totalement l'absence d'effet du LPV sur cette voie. En effet, les gènes codant l'hCG et les principales enzymes de la stéroïdogenèse (HSD3B1, P450SCC et STS) possèdent un élément de réponse au facteur CREB au sein de leur promoteur. Ce sont donc des gènes cibles de ce facteur et de cette voie de signalisation (Reed et al. 2005; Simard et al. 2005; Sher, Yivgi-Ohana, et Orly 2007; Henderson et al. 2008; Lavoie et King 2009; Delidaki et al. 2011; Shih et al. 2011; Chatuphonprasert, Jarukamjorn, et Ellinger 2018).

In vivo, le ST qui borde la villosité, est donc en contact direct avec le sang maternel et donc en contact direct avec les IP circulants, contrairement au CTV. Nous avons donc regardé les effets du LPV sur le ST déjà formé en l'incubant pendant 6h avec du LPV à 10 µM. Dans ces conditions, nous observons une diminution de la sécrétion d'hCG et de P4. La diminution de la sécrétion de P4 est associée à une diminution de sa synthèse puisque les expressions des enzymes HSD3B1 et P450SCC sont diminuées. Concernant la dynamique mitochondriale, le LPV augmente l'expression de Mfn2 dans le ST déjà formé. L'augmentation de Mfn2 sous LPV conduirait à l'augmentation de la fusion des mitochondries, ce qui pourrait expliquer la diminution de sécrétion de la P4. En effet, nous avons

précédemment démontré qu'une production importante de P4 est associée à un faible potentiel transmembranaire (Fraichard et al. 2020). Or la fusion mitochondriale provoque une augmentation de ce potentiel et donc une probable diminution de la production de P4 (Karavaeva et al. 2015). Au niveau du ST formé, le LPV induit l'augmentation de l'expression de GRP78 et du facteur sXBP1 démontrant l'induction d'un stress du RE via l'activation de la voie IRE1α. Nous avons donc pré-incubé le ST avec un inhibiteur de l'IRE1α. L'inhibition de cette voie ne bloque pas l'effet inhibiteur du LPV ni sur les sécrétions d'hCG et de P4, ni sur l'expression des enzymes P450SCC et HSD3B1. Dans le ST déjà formé, le LPV ne semble donc pas affecter uniquement la voie IRE1α. En effet, il pourrait activer l'une et/ou l'autre des 2 autres voies, à savoir la voie PERK et/ou la voie ATF6. Cet effet compensatoire d'une voie par une autre, lorsque l'une est bloquée, a déjà été démontré dans d'autres modèles comme des lignées cancéreuses d'ostéosarcome ou un modèle de ver C. Elegans (Lee et al. 2007; Gallagher et al. 2016). Il serait donc nécessaire d'utiliser des siRNA spécifiques de chacune de ces 3 voies UPR (PERK, ATF6 et IRE1α) pour préciser les cibles du LPV. Enfin, les mères VIH+ sont traitées, le plus souvent, avec un IP, notamment le LPV, « boosté » avec le ritonavir (RTV) (Sibiude et al. 2012). Par conséquent, nous avons commencé à regarder sur notre modèle de ST déjà formé, l'effet du LPV à 10 µM associé au RTV à 5 µM. *In vitro*, l'ajout du RTV au LPV tend à potentialiser l'effet inhibiteur du LPV à la fois sur la sécrétion d'hCG et de P4.

Notre étude a donc montré que le LPV, à la différence du RTV, affecte le tissu trophoblastique humain. Au niveau du CTV, il entraine une diminution des sécrétions d'hCG et de P4 ainsi qu'une augmentation de celle d'E2. Cet effet semble impliquer l'activation de la voie IRE1α. Il perturbe aussi la différenciation du CTV en ST ainsi que les modifications structurales des mitochondries, du noyau et du RE, associées à cette différenciation. Au niveau du ST, le LPV entraine une diminution des sécrétions d'hCG et de P4 associée à une diminution de l'expression des enzymes P450SCC et HSD3B1. Ces diminutions pourraient résulter d'une part, de l'activation des voies UPR, notamment la voie IRE1α, et d'autre part, de l'augmentation de la fusion mitochondriale. Ces observations *in vitro* confirment pour partie, les observations, *in vivo,* dans le sang maternel. Ces résultats pourraient ainsi expliquer les différentes complications obstétricales observées, chez les mères infectées et traitées par IP, qui résulteraient d'un dérèglement global de la fonction placentaire.

Perspectives

Notre travail ouvre différentes perspectives tant en physiologie qu'en pathologie.

Sur le plan physiologique, pour approfondir l'intrication des 3 voies hormonales à savoir l'hCG, la P4 et l'E2 dans la différenciation trophoblastique, il serait indispensable sur notre modèle, d'étudier l'expression des différentes isoformes des récepteurs à la P4 et des récepteurs à l'E2. Il faudrait également tester les effets d'un agoniste et d'un antagoniste de ces récepteurs sur la sécrétion d'hCG et sur l'expression du récepteur à l'hCG, et réciproquement entre ces 3 voies. Cela nous permettrait d'établir si l'inter-régulation porte sur les hormones elles-mêmes ou sur leurs récepteurs. Il parait également indispensable d'évaluer l'impact de ces agonistes et de ces antagonistes sur la différenciation des CTV en ST afin d'évaluer leur influence directe sur le tissu villeux.

Concernant les organites, les mitochondries occupent une place clé dans la différenciation du trophoblaste et la stéroïdogenèse. Elles ont été beaucoup étudiées sur tissu placentaire total ou après isolement et purification des mitochondries, donc de façon statique au regard de la différenciation du CTV (Martinez, Kiriakidou, et Strauss 1997; De Los Rios Castillo et al. 2011; Bustamante et al. 2014). Peu d'études ont étudié l'évolution de la structure mitochondriale au cours de la différenciation trophoblastique. L'approche dynamique de notre modèle de culture primaire combinée à une purification des mitochondries permettra d'analyser la structure des mitochondries, par microscopie électronique, à chaque étape de la différenciation des CTV (agrégation à 24-48h, fusion 48-72h, voire apoptose 96h) (Martinez, Kiriakidou, et Strauss 1997). Cette étude structurale pourrait être complétée par une étude fonctionnelle, en évaluant notamment, la capacité de ces mitochondries à produire de l'ATP, à consommer de l'O_2 et à produire des hormones stéroïdes. En ce qui concerne la dynamique mitochondriale, il conviendrait de poursuivre en élargissant l'analyse par mesure de l'expression d'autres facteurs régulant les processus de fission et fusion comme Fiss1, Drp1 et Mfn1. Il faudrait compléter cette analyse avec des expériences de siRNA contre les différents facteurs régulant la dynamique mitochondriale et observer alors l'impact sur la stéroïdogenèse au cours de la différenciation des CTV en ST.

Notre travail s'est principalement intéressé à la synthèse et à la sécrétion des hormones stéroïdes placentaires, principalement les progestatifs. Il faudrait compléter les travaux concernant la voie des oestrogènes, notamment à l'aide de la spectrométrie de masse, qui nous permettrait d'établir leur profil de sécrétion et de rechercher un possible catabolisme placentaire. En effet, il a été décrit que l'E2 pouvait être catabolisé en 2-méthoxyoestradiol au cours de la grossesse. Ce catabolisme serait dérégulé dans la pré-éclampsie (Hertig et al. 2010; Berkane et al. 2017; 2018). De plus, la carence en

DHEA-S dans nos milieux de culture nécessiterait d'appliquer le modèle de coculture entre les cellules trophoblastiques et les cellules surrénaliennes développé par Murthi et al (Murthi et al. 2017; Yancu, Vaillancourt, et Sanderson 2019) à notre modèle pour étudier la synthèse et la sécrétion des oestrogènes.

La force de notre modèle de culture est de pouvoir étudier la stéroïdogenèse dans un modèle dynamique de cellules normales purifiées spécifiques du placenta humain, les CTV. Ce modèle a néanmoins des limites comparé à l'*in vivo.* En effet, *in vivo*, les CTV sont en contact avec la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, laminine) et d'autres types cellulaires notamment des fibroblastes (Evain-Brion et Malassiné 2010; Benirschke, Burton, et Baergen 2013). Des travaux antérieurs de notre équipe ont établi l'existence d'une coopération entre les CTV et les fibroblastes. En effet, des surnageants de culture de fibroblastes (isolés de l'axe mésenchymateux villositaire) contiennent des cytokines et facteurs de croissance, notamment l'activine-A, qui favorisent la différenciation des CTV en ST (Gerbaud et al. 2011). Pour se rapprocher au mieux de la structure en trois dimensions de l'*in vivo*, il faudrait rétablir ce dialogue entre les trophoblastes villeux, la matrice extracellulaire et les fibroblastes, en travaillant sur modèle d'explants de villosités choriales placentaires mis en culture.

Sur le plan pathologique, nous avons démontré l'impact du LPV sur la fonction placentaire, impact qui semble être potentialisé par le RTV. Il faudrait donc poursuivre les études de cet effet potentialisateur du RTV sur toutes les fonctions placentaires puisque le RTV est utilisé comme « booster » des autres IP en clinique. L'étude de l'impact du LPV sur des cibles intracellulaires devra être élargie en incluant d'autres techniques et d'autres outils, notamment les siRNA, pour identifier les mécanismes intracellulaires impactés. De plus, la mitochondrie et le RE étant étroitement liés au niveau du fonctionnement intracellulaire (Burton, Yung, et Murray 2017), il faudrait chercher à mettre en évidence un lien entre l'induction d'un stress du RE, l'altération de la structure et des fonctions de la mitochondrie et les désordres endocriniens placentaires induits par les IP. En effet, dans des modèles de lignées cellulaires, l'induction d'un stress du RE par le RTV aboutit à un dérèglement mitochondrial (Ganta et Chaubey 2019). En utilisant des siRNA ciblant les 3 voies UPR (PERK, ATF6 et IRE1α), il faudrait étudier l'impact des IP sur la structure mitochondriale, ses fonctions (potentiel transmembranaire, production ATP, stéroïdogenèse…) et l'expression des facteurs régulant la dynamique mitochondriale. Il faudrait aussi regarder si les IP n'entrainent pas d'autres stress cellulaires comme le stress oxydatif. En effet, dans un modèle de cellules rénales, il a été démontré que le LPV est capable d'induire la production de « Reactive Oxygen Species » (ROS) qui entrainent l'activation de la voie JNK (Taura et al.

2013). Dans ce modèle, l'activation de la voie JNK conduit à l'activation de voies UPR. Il est donc possible d'envisager que, dans notre modèle, l'activation de la voie IRE1α par le LPV résulte d'une activation de la voie JNK induite par l'augmentation de ROS intracellulaire. La mesure de la production de ROS à l'aide de sonde fluorescente (H2DCFDA) ainsi que des western-blot ciblant la phosphorylation de JNK nous permettraient de répondre à cette hypothèse.

Notre étude met en évidence *in vitro,* l'induction d'un stress des cellules trophoblastiques par le LPV. Ce stress conduit à des dérégulations morphologiques et fonctionnelles du trophoblaste villeux (fusion des CTV en ST, altération des sécrétions hormonales). Au cours de la grossesse, le tissu trophoblastique qui est en perpétuelle différenciation, va devenir sénescent à l'approche du terme. Or des stress cellulaires induisent une sénescence pathologique du trophoblaste plus précoce (Burton, Yung, et Murray 2017). Il est donc possible de supposer que l'exposition continue du placenta aux IP peut provoquer une sénescence précoce du tissu trophoblastique. Cette sénescence pourrait expliquer, pour partie, les altérations placentaires observées *in vitro* mais aussi expliquer les multiples complications obstétricales observées *in vivo*. La sénescence du trophoblaste étant marquée par une libération d'ADN fœto-placentaire dans la circulation maternelle (Burton, Yung, et Murray 2017), il serait intéressant de mesurer les concentrations d'ADN fœtal libre circulant dans le sang maternel. Un taux plus important qu'en absence de traitement par IP, pourrait refléter une sénescence trop importante du placenta et donc son dysfonctionnement (Breveglieri et al. 2019).

Enfin , dans notre étude, nous nous sommes principalement intéressés aux hormones stéroïdes et à l'hCG. Nos travaux pourraient être élargis en dosant d'autres facteurs trophoblastiques, qui peuvent être des cibles potentielles des IP, comme par exemple, les facteurs angiogéniques PlGF et sFlt-1. En effet, une étude clinique a mis en évidence que les prématurités induites par les IP peuvent être consécutives à d'autres complications obstétricales, comme la pré-éclampsie ou le retard de croissance intra-utérin, dans lesquelles ces marqueurs sériques maternels sont connus pour être perturbés (Short et Taylor 2014).

Bibliographie

« 11_Pharmacologie_des_anti_retroviraux.pdf ». s. d. Consulté le 6 juin 2020. https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/11_Pharmacologie_des_anti_retroviraux.pdf.

« Abacavir ». 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548225/.

Aguiar, Renato S., et B. Matija Peterlin. 2008a. « APOBEC3 Proteins and Reverse Transcription ». *Virus Research* 134 (1-2): 74-85. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.12.022.

Ahmad, Nafees. 2000. « Molecular Mechanisms of Human Immunodeficiency Virus Type I Mother-Infant Transmission ». In *Advances in Pharmacology*, 49:387-416. Elsevier. https://doi.org/10.1016/S1054-3589(00)49032-0.

Alsat, E., J. Haziza, et D. Evain-Brion. 1993. « Increase in Epidermal Growth Factor Receptor and Its Messenger Ribonucleic Acid Levels with Differentiation of Human Trophoblast Cells in Culture ». *Journal of Cellular Physiology* 154 (1): 122-28. https://doi.org/10.1002/jcp.1041540115.

Alsat, E., J. Guibourdenche, D. Luton, F. Frankenne, et D. Evain-Brion. 1997. « Human Placental Growth Hormone ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 177 (6): 1526-34. https://doi.org/10.1016/s0002-9378(97)70103-0.

« *Antiviraux : Les points essentiels ». s. d. Consulté le 28 septembre 2020. https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antiviraux-les-points-essentiels.

Aoki, A., J. Metz, et W. G. Forssmann. 1978. « Studies on the Ultrastructure and Permeability of the Hemotrichorial Placenta. II. Fetal Capillaries and Tracer Administration into the Fetal Blood Circulation ». *Cell and Tissue Research* 192 (3): 409-22. https://doi.org/10.1007/BF00212322.

Arora, Nitin, Yoel Sadovsky, Terence S. Dermody, et Carolyn B. Coyne. 2017. « Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy ». *Cell Host & Microbe* 21 (5): 561-67. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007.

Asavasupreechar, Teeranut, Ryoko Saito, Yasuhiro Miki, Dean P. Edwards, Viroj Boonyaratanakornkit, et Hironobu Sasano. 2020. « Systemic Distribution of Progesterone Receptor Subtypes in Human Tissues ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 199 (mai): 105599. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105599.

« Atazanavir ». 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547918/.

« Autres antirétroviraux ». s. d. Consulté le 28 septembre 2020. https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/autres-antiretroviraux.

Azar, Christopher, Mark Valentine, Julie Trausch-Azar, Todd Druley, D. Michael Nelson, et Alan L. Schwartz. 2018. « RNA-Seq Identifies Genes Whose Proteins Are Transformative in the Differentiation of Cytotrophoblast to Syncytiotrophoblast, in Human Primary Villous and BeWo Trophoblasts ». *Scientific Reports* 8 (1): 5142. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23379-2.

Babischkin, J S, R W Grimes, G J Pepe, et E D Albrecht. 1997. « Estrogen stimulation of P450 cholesterol side-chain cleavage activity in cultures of human placental syncytiotrophoblasts ». *Biology of reproduction* 56 (1): 272-78.

Barnea, E. R., D. Feldman, et M. Kaplan. 1991. « The Effect of Progesterone upon First Trimester Trophoblastic Cell Differentiation and Human Chorionic Gonadotrophin Secretion ». *Human Reproduction* 6 (7): 905-9. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137456.

Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, et al. 1983. « Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) ». *Science (New York, N.Y.)* 220 (4599): 868-71. https://doi.org/10.1126/science.6189183.

Bastida-Ruiz, Daniel, Elizabeth Aguilar, Agnès Ditisheim, Lucile Yart, et Marie Cohen. 2017. « Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Placentation - A True Balancing Act ». *Placenta* 57 (septembre): 163-69. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.004.

Bastida-Ruiz, Daniel, Lucile Yart, Christine Wuillemin, Pascale Ribaux, Nolwenn Morris, Manuella Epiney, Begoña Martinez de Tejada, et Marie Cohen. 2019. « The Fine-Tuning of Endoplasmic Reticulum Stress Response and Autophagy Activation during Trophoblast Syncytialization ». *Cell Death & Disease* 10 (9): 651. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1905-6.

Benirschke, Kurt, Graham J. Burton, et Rebecca N Baergen. 2013. *Pathology of the Human Placenta 6th*. Springer. Berlin.

Berkane, Nadia, Philippe Liere, Guillaume Lefevre, Nadia Alfaidy, Roland Abi Nahed, Jessica Vincent, Jean-Paul Oudinet, et al. 2018. « Abnormal Steroidogenesis and Aromatase Activity in Preeclampsia ». *Placenta* 69 (septembre): 40-49. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.07.004.

Berkane, Nadia, Philippe Liere, Jean-Paul Oudinet, et Alexandre Hertig. 2017. « From Pregnancy to Preeclampsia: A Key Role for Estrogens ». *Endocrine Reviews*, 22.

Berndt, Sarah, Silvia Blacher, Carine Munaut, Julien Detilleux, Sophie Perrier d'Hauterive, Ilpo Huhtaniemi, Danièle Evain-Brion, Agnès Noël, Thierry Fournier, et Jean-Michel Foidart. 2013. « Hyperglycosylated Human Chorionic Gonadotropin Stimulates Angiogenesis through TGF-β Receptor Activation ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (4): 1309-21. https://doi.org/10.1096/fj.12-213686.

Berry, François, Pierre Khalfi, Florra Maillot, Paul Seigneres, Samy Sid Ahmed, et Francesca Di Nunzio. 2018. « Les facteurs du pore nucléaire : un collectif gagnant pour la translocation et l'intégration du VIH-1 ». *médecine/sciences* 34 (6-7): 512-15. https://doi.org/10.1051/medsci/20183406006.

Besse, A, S C Stolze, L Rasche, N Weinhold, G J Morgan, M Kraus, J Bader, H S Overkleeft, L Besse, et C Driessen. 2018. « Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma ». *Leukemia* 32 (2): 391-401. https://doi.org/10.1038/leu.2017.212.

Bielinska, Malgorzata, et Irving Boime. s. d. « The Glycoprotein Hormone Family: Structure and Function of the Carbohydrate Chains », 23.

Birken, S., E. G. Armstrong, M. A. Kolks, L. A. Cole, G. M. Agosto, A. Krichevsky, J. L. Vaitukaitis, et R. E. Canfield. 1988. « Structure of the Human Chorionic Gonadotropin Beta-Subunit Fragment from Pregnancy Urine ». *Endocrinology* 123 (1): 572-83. https://doi.org/10.1210/endo-123-1-572.

Breveglieri, Giulia, Elisabetta D'Aversa, Alessia Finotti, et Monica Borgatti. 2019. « Non-Invasive Prenatal Testing Using Fetal DNA ». *Molecular Diagnosis & Therapy* 23 (2): 291-99. https://doi.org/10.1007/s40291-019-00385-2.

Broder, S., et R. C. Gallo. 1984. « A Pathogenic Retrovirus (HTLV-III) Linked to AIDS ». *The New England Journal of Medicine* 311 (20): 1292-97. https://doi.org/10.1056/NEJM198411153112006.

Brüning, Ansgar, Tanja Kimmich, German J. Brem, Marie L. Buchholtz, Ioannis Mylonas, Bernd Kost, Katharina Weizsäcker, et Andrea Gingelmaier. 2014. « Analysis of Endoplasmic Reticulum Stress in Placentas of HIV-Infected Women Treated with Protease Inhibitors ». *Reproductive Toxicology* 50 (décembre): 122-28. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.10.012.

Buffone, Cindy, Alicia Martinez-Lopez, Thomas Fricke, Silvana Opp, Marco Severgnini, Ingrid Cifola, Luca Petiti, et al. 2018. « Nup153 Unlocks the Nuclear Pore Complex for HIV-1 Nuclear Translocation in Nondividing Cells ». *Journal of Virology* 92 (19). https://doi.org/10.1128/JVI.00648-18.

Bukovsky, Antonin, Michael R Caudle, Maria Cekanova, Romaine I Fernando, Jay Wimalasena, James S Foster, Donald C Henley, et Robert F Elder. 2003. « Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant – comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells ». *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 1 (avril): 36. https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-36.

Bukovsky, Antonin, Maria Cekanova, Michael R. Caudle, Jay Wimalasena, James S. Foster, Donald C. Henley, et Robert F. Elder. 2003. « Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol ». *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 1: 1-18.

Burdick, Ryan C., Krista A. Delviks-Frankenberry, Jianbo Chen, Sanath K. Janaka, Jaya Sastri, Wei-Shau Hu, et Vinay K. Pathak. 2017. « Dynamics and regulation of nuclear import and nuclear movements of HIV-1 complexes ». *PLoS Pathogens* 13 (8). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006570.

Bushman, Frederic, Mary Lewinski, Angela Ciuffi, Stephen Barr, Jeremy Leipzig, Sridhar Hannenhalli, et Christian Hoffmann. 2005. « Genome-Wide Analysis of Retroviral DNA Integration ». *Nature Reviews Microbiology* 3 (11): 848-58. https://doi.org/10.1038/nrmicro1263.

Burton, G. J., H. W. Yung, et A. J. Murray. 2017. « Mitochondrial – Endoplasmic Reticulum Interactions in the Trophoblast: Stress and Senescence ». *Placenta* 52 (avril): 146-55. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.04.001.

Burton, Graham J., Christopher W. Redman, James M. Roberts, et Ashley Moffett. 2019. « Pre-Eclampsia: Pathophysiology and Clinical Implications ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 366: l2381. https://doi.org/10.1136/bmj.l2381.

Bustamante, J., R. Ramírez-Vélez, A. Czerniczyniec, D. Cicerchia, A. C. Aguilar de Plata, et S. Lores-Arnaiz. 2014. « Oxygen Metabolism in Human Placenta Mitochondria ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 46 (6): 459-69. https://doi.org/10.1007/s10863-014-9572-x.

Cahoreau, Claire, Danièle Klett, et Yves Combarnous. 2015. « Structure-Function Relationships of Glycoprotein Hormones and Their Subunits' Ancestors ». *Frontiers in Endocrinology* 6 (février). https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00026.

Cai, Hongcai, Li Chen, Mengdi Zhang, Wenpei Xiang, et Ping Su. 2018. « Low Expression of MFN2 Is Associated with Early Unexplained Miscarriage by Regulating Autophagy of Trophoblast Cells ». *Placenta* 70 (octobre): 34-40. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.08.005.

Cai, Rong, Tingting Yu, Chao Huang, Xuefeng Xia, Xiaobing Liu, Jianmin Gu, Song Xue, Edward T.H. Yeh, et Jinke Cheng. 2012. « SUMO-Specific Protease 1 Regulates Mitochondrial Biogenesis through PGC-1α ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (53): 44464-70. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.422626.

Campbell, Edward M., et Thomas J. Hope. 2015. « HIV-1 Capsid: The Multifaceted Key Player in HIV-1 infection ». *Nature reviews. Microbiology* 13 (8): 471-83. https://doi.org/10.1038/nrmicro3503.

Ceccaldi, Pierre-Francois, Laurent Gavard, Laurent Mandelbrot, Elisabeth Rey, Robert Farinotti, Jean-Marc Treluyer, et Sophie Gil. 2009. « Functional Role of P-Glycoprotein and Binding Protein Effect on the Placental Transfer of Lopinavir/Ritonavir in the Ex Vivo Human Perfusion Model ». *Obstetrics and Gynecology International* 2009: 726593. https://doi.org/10.1155/2009/726593.

Cervellati, F., B. Pavan, L. Lunghi, E. Manni, E. Fabbri, C. Mascoli, C. Biondi, A. Patella, et F. Vesce. 2011. « Betamethasone, Progesterone and RU-486 (Mifepristone) Exert Similar Effects on Connexin Expression in Trophoblast-Derived HTR-8/SVneo Cells ». *Reproduction, Fertility and Development* 23 (2): 319-28. https://doi.org/10.1071/RD10077.

Chang, Ching-Wen, Anna K. Wakeland, et Mana M. Parast. 2018. « Trophoblast lineage specification, differentiation, and their regulation by oxygen tension ». *The Journal of endocrinology* 236 (1): R43-56. https://doi.org/10.1530/JOE-17-0402.

Chang, Hsun-Ming, Jung-Chien Cheng, He-Feng Huang, Feng-Tao Shi, et Peter C. K. Leung. 2015. « Activin A, B and AB Decrease Progesterone Production by down-Regulating StAR in Human Granulosa Cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 412 (septembre): 290-301. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.016.

Chaouat, Gérard, Marlène Moussa, Juan Maldonado, et Elisabeth Menu. 2003. « La barrière placentaire ». *Revue Française des Laboratoires* 2003 (353): 21-28. https://doi.org/10.1016/S0338-9898(03)90003-5.

Chappuy, Hélène, Jean-Marc Tréluyer, Vincent Jullien, Jérôme Dimet, Elisabeth Rey, Maria Fouché, Ghislaine Firtion, Gérard Pons, et Laurent Mandelbrot. 2004. « Maternal-Fetal Transfer and Amniotic Fluid Accumulation of Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors in Human Immunodeficiency Virus-Infected Pregnant Women ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (11): 4332-36. https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4332-4336.2004.

Charman, Mark, Barry E. Kennedy, Nolan Osborne, et Barbara Karten. 2010. « MLN64 Mediates Egress of Cholesterol from Endosomes to Mitochondria in the Absence of Functional Niemann-Pick Type C1 Protein ». *Journal of Lipid Research* 51 (5): 1023-34. https://doi.org/10.1194/jlr.M002345.

Chatuphonprasert, Waranya, Kanokwan Jarukamjorn, et Isabella Ellinger. 2018. « Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta ». *Frontiers in Pharmacology* 9. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01027.

Chau, K, A Hennessy, et A Makris. 2017. « Placental growth factor and pre-eclampsia ». *Journal of Human Hypertension* 31 (12): 782-86. https://doi.org/10.1038/jhh.2017.61.

Chen, Guanliang, Songbin Zhang, Yuanxiang Jin, Yan Wu, Ling Liu, Haifeng Qian, et Zhengwei Fu. 2015. « TPP and TCEP Induce Oxidative Stress and Alter Steroidogenesis in TM3 Leydig Cells ». *Reproductive Toxicology* 57 (novembre): 100-110. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.05.011.

Chen, Jessie Z.-J., May H. Wong, Shaun P. Brennecke, et Rosemary J. Keogh. 2011. « The Effects of Human Chorionic Gonadotrophin, Progesterone and Oestradiol on Trophoblast Function ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 342 (1-2): 73-80. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.034.

Chen, Hsiuchen, Scott A. Detmer, Andrew J. Ewald, Erik E. Griffin, Scott E. Fraser, et David C. Chan. 2003. « Mitofusins Mfn1 and Mfn2 Coordinately Regulate Mitochondrial Fusion and Are Essential for Embryonic Development ». *Journal of Cell Biology* 160 (2): 189-200. https://doi.org/10.1083/jcb.200211046.

Chen, Li, Sirikalaya Jarujaron, Xudong Wu, Lixin Sun, Weibin Zha, Guang Liang, Emily C. Gurley, et al. 2009. « HIV Protease Inhibitor Lopinavir-induced TNF-a and IL-6 Expression is Coupled to the Unfolded Protein Response and ERK Signaling Pathways in Macrophages ». *Biochemical pharmacology* 78 (1): 70-77. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.03.022.

Cheong, Mei-Leng, Liang-Jie Wang, Pei-Yun Chuang, Ching-Wen Chang, Yun-Shien Lee, Hsiao-Fan Lo, Ming-Song Tsai, et Hungwen Chen. 2015. « A Positive Feedback Loop between Glial Cells Missing 1 and Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Regulates Placental hCGβ Expression and Cell Differentiation ». *Molecular and Cellular Biology* 36 (1): 197-209. https://doi.org/10.1128/MCB.00655-15.

Choi, Yohan, Kalin Wilson, Patrick R. Hannon, Katherine L. Rosewell, Mats Brännström, James W. Akin, Thomas E. Curry, et Misung Jo. 2017. « Coordinated Regulation Among Progesterone, Prostaglandins, and EGF-Like Factors in Human Ovulatory Follicles ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 102 (6): 1971-82. https://doi.org/10.1210/jc.2016-3153.

Chu, Po-Wei, Zhi-Jie Yang, Hui-Hsin Huang, Ai-An Chang, Yu-Chen Cheng, Gwo-Jang Wu, et Hsin-Chieh Lan. 2018. « Low-dose bisphenol A activates the ERK signaling pathway and attenuates steroidogenic gene expression in human placental cells ». *Biol Reprod* 98 (2): 250-58. https://doi.org/10.1093/biolre/iox162.

Cocquebert, M., S. Berndt, N. Segond, J. Guibourdenche, P. Murthi, L. Aldaz-Carroll, D. Evain-Brion, et T. Fournier. 2012. « Comparative Expression of HCG β-Genes in Human Trophoblast from Early and Late First-Trimester Placentas ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 303 (8): E950-58. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00087.2012.

Cole, L. A., et S. Birken. 1988. « Origin and Occurrence of Human Chorionic Gonadotropin Beta-Subunit Core Fragment ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 2 (9): 825-30. https://doi.org/10.1210/mend-2-9-825.

Cole, Laurence A. 2009. « HCG and Hyperglycosylated HCG in the Establishment and Evolution of Hemochorial Placentation ». *Journal of Reproductive Immunology* 82 (2): 112-18. https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.04.007.

Communiqué - Salle de presse, INSERM. 2011. « Maladies hormonales : une enzyme majeure, la protéine kinase A en cause ». Salle de presse | Inserm. 9 juin 2011. https://presse.inserm.fr/maladies-hormonales-une-enzyme-majeure-la-proteine-kinase-a-en-cause/13854/.

Cronier, L., J. Guibourdenche, C. Niger, et A. MalassinÉ. 1999. « Oestradiol Stimulates Morphological and Functional Differentiation of Human Villous Cytotrophoblast ». *Placenta* 20 (8): 669-76. https://doi.org/10.1053/plac.1999.0423.

Cullen, Bryan R. 2003. « Nuclear MRNA Export: Insights from Virology ». *Trends in Biochemical Sciences* 28 (8): 419-24. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00142-7.

Cu-Uvin, Susan, Allison K. DeLong, Kartik K. Venkatesh, Joseph W. Hogan, Jessica Ingersoll, Jaclynn Kurpewski, Maria Pia De Pasquale, Richard D'Aquila, et Angela M. Caliendo. 2010. « Genital Tract HIV-1 RNA Shedding among Women with below Detectable Plasma Viral Load ». *AIDS* 24 (16): 2489–2497. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833e5043.

Dalle, Stéphane, Tanguy Martin-Denavit, et Luc Thomas. 2006. « Hypervariabilité génotypique des mélanomas : Un défi thérapeutique ». *médecine/sciences* 22 (2): 178-82. https://doi.org/10.1051/medsci/2006222178.

Dal Yontem, Fulya, Sun-Hee Kim, Zhen Ding, Elizabeth Grimm, Suhendan Ekmekcioglu, et Handan Akcakaya. 2019. « Mitochondrial Dynamic Alterations Regulate Melanoma Cell Progression ». *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (2): 2098-2108. https://doi.org/10.1002/jcb.27518.

Dang, Xuan, Qinling Zhu, Yaqiong He, Yuan Wang, Yao Lu, Xiaoxue Li, Jia Qi, Hasiximuke Wu, et Yun Sun. 2017. « IL-1β Upregulates StAR and Progesterone Production Through the ERK1/2- and P38-

Mediated CREB Signaling Pathways in Human Granulosa-Lutein Cells ». *Endocrinology* 158 (10): 3281-91. https://doi.org/10.1210/en.2017-00029.

Daoud, Georges, Marc Amyot, Éric Rassart, André Masse, Lucie Simoneau, et Julie Lafond. 2005. « ERK1/2 and P38 Regulate Trophoblasts Differentiation in Human Term Placenta ». *The Journal of Physiology* 566 (2): 409-23. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.089326.

« Darunavir ». 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547994/.

Deffieux, X, et J. -M Antoine. 2003. « Inhibines, activines et hormone anti-müllerienne : structure, signalisation, rôles et valeur prédictive en médecine de la reproduction ». *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 31 (11): 900-911. https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2003.08.012.

Delidaki, M., M. Gu, A. Hein, M. Vatish, et D.K. Grammatopoulos. 2011. « Interplay of CAMP and MAPK Pathways in HCG Secretion and Fusogenic Gene Expression in a Trophoblast Cell Line ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 332 (1-2): 213-20. https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.10.013.

De Los Rios Castillo, Daniela, Mariel Zarco-Zavala, Sofia Olvera-Sanchez, Juan Pablo Pardo, Oscar Juarez, Federico Martinez, Guillermo Mendoza-Hernandez, José J. García-Trejo, et Oscar Flores-Herrera. 2011. « Atypical Cristae Morphology of Human Syncytiotrophoblast Mitochondria ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (27): 23911-19. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252056.

Dewi, D. A., D. R. E. Abayasekara, et C. P. D. Wheeler-Jones. 2002. « Requirement for ERK1/2 Activation in the Regulation of Progesterone Production in Human Granulosa-Lutein Cells Is Stimulus Specific ». *Endocrinology* 143 (3): 877-88. https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8677.

Douglas, Gordon C., Fatemeh Fazely, et JinJie Hu. 1998. « Transmission of HIV to the Placenta, Fetus and Mother and Implications of Gametic Infection ». *Journal of Reproductive Immunology* 41 (1): 321-29. https://doi.org/10.1016/S0165-0378(98)00068-0.

Duarte, Alejandra, Cecilia Poderoso, Mariana Cooke, Gastón Soria, Fabiana Cornejo Maciel, Vanesa Gottifredi, et Ernesto J. Podestá. 2012a. « Mitochondrial Fusion Is Essential for Steroid Biosynthesis ». Édité par Jean-Marc Vanacker. *PLoS ONE* 7 (9): e45829. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045829.

Dulude, Dominic, et Léa Brakier-Gingras. 2006. « Quand une structure particulière de l'ARN du VIH-1 conduit à un décalage de phase : perspectives pour le traitement de l'infection par le VIH ». *médecine/sciences* 22 (11): 969-72. https://doi.org/10.1051/medsci/20062211969.

Dupressoir, Anne, Geoffroy Marceau, Cécile Vernochet, Laurence Bénit, Colette Kanellopoulos, Vincent Sapin, et Thierry Heidmann. 2005. « Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3): 725-30. https://doi.org/10.1073/pnas.0406509102.

Else, Laura J, Stephen Taylor, David J Back, et Saye H Khoo. 2011. « Pharmacokinetics of Antiretroviral Drugs in Anatomical Sanctuary Sites: The Fetal Compartment (Placenta and Amniotic Fluid) ». *Antiviral Therapy* 16 (8): 1139-47. https://doi.org/10.3851/IMP1918.

« Embryology ». s. d. http://www.embryology.ch/.

Emery, Andrew C., Maribeth V. Eiden, Tomris Mustafa, et Lee E. Eiden. 2013. « Rapgef2 Connects GPCR-Mediated cAMP Signals to ERK Activation in Neuronal and Endocrine Cells ». *Science signaling* 6 (281): ra51. https://doi.org/10.1126/scisignal.2003993.

Engelman, Alan, et Peter Cherepanov. 2012. « The Structural Biology of HIV-1: Mechanistic and Therapeutic Insights ». *Nature Reviews Microbiology* 10 (4): 279-90. https://doi.org/10.1038/nrmicro2747.

Esparza-Perusquía, Mercedes, Sofía Olvera-Sánchez, Oscar Flores-Herrera, Héctor Flores-Herrera, Alberto Guevara-Flores, Juan Pablo Pardo, María Teresa Espinosa-García, et Federico Martínez. 2015. « Mitochondrial Proteases Act on STARD3 to Activate Progesterone Synthesis in Human Syncytiotrophoblast ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850 (1): 107-17. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.009.

Esté, José A., et Amalio Telenti. 2007. « HIV Entry Inhibitors ». *Lancet (London, England)* 370 (9581): 81-88. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61052-6.

Evain-Brion, Danièle, et André Malassiné. 2010. *Le placenta humain*. Editions Médicales Internationales. Lavoisier.

Evans, Jemma. 2016. « Hyperglycosylated HCG: A Unique Human Implantation and Invasion Factor ». *American Journal of Reproductive Immunology* 75 (3): 333-40. https://doi.org/10.1111/aji.12459.

Fisher, Joshua J., Daniel R. McKeating, James S. Cuffe, Tina Bianco-Miotto, Olivia J. Holland, et Anthony V. Perkins. 2019. « Proteomic Analysis of Placental Mitochondria Following Trophoblast Differentiation ». *Frontiers in Physiology* 10 (décembre): 1536. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01536.

Finzi, Diana, Carl W. Dieffenbach, et Ravi Basavappa. 2007. « Defining and Solving the Essential Protein–Protein Interactions in HIV Infection ». *Journal of Structural Biology* 158 (2): 148-55. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.10.028.

Florio, P., S. Luisi, P. Ciarmela, F. M. Severi, C. Bocchi, et F. Petraglia. 2004. « Inhibins and Activins in Pregnancy ». *Molecular and Cellular Endocrinology*, Proceedings of the International Workshop on Inhibins, Activins and Follistatins, 225 (1): 93-100. https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.02.018.

Fournier, T., J. Guibourdenche, et D. Evain-Brion. 2015. « Review: HCGs: Different Sources of Production, Different Glycoforms and Functions ». *Placenta* 36 (avril): S60-65. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.02.002.

Fowler, Mary G., Min Qin, Susan A. Fiscus, Judith S. Currier, Patricia M. Flynn, Tsungai Chipato, James McIntyre, et al. 2016. « Benefits and Risks of Antiretroviral Therapy for Perinatal HIV Prevention ». *The New England Journal of Medicine* 375 (18): 1726-37. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1511691.

Fraichard, C., F. Bonnet, A. Garnier, M. Hébert-Schuster, A. Bouzerara, P. Gerbaud, I. Ferecatu, et al. 2020. « Placental Production of Progestins Is Fully Effective in Villous Cytotrophoblasts and Increases with the Syncytiotrophoblast Formation ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 499 (janvier): 110586. https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110586.

Frank, Stephan, Brigitte Gaume, Elke S. Bergmann-Leitner, Wolfgang W. Leitner, Everett G. Robert, Frédéric Catez, Carolyn L. Smith, et Richard J. Youle. 2001. « The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis ». *Developmental Cell* 1 (4): 515-25. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00055-7.

Freed, Eric O. 2001. « HIV-1 Replication ». *Somatic Cell and Molecular Genetics* 26 (1): 13-33. https://doi.org/10.1023/A:1021070512287.

Frendo, J.-L., J. Guibourdenche, G. Pidoux, M. Vidaud, D. Luton, Y. Giovangrandi, D. Porquet, F. Muller, et D. Evain-Brion. 2004a. « Trophoblast Production of a Weakly Bioactive Human Chorionic Gonadotropin in Trisomy 21-Affected Pregnancy ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89 (2): 727-32. https://doi.org/10.1210/jc.2003-030668.

Fujimoto, Jiro, Yumiko Nakagawa, Hiroshi Toyoki, Hideki Sakaguchi, Eriko Sato, et Teruhiko Tamaya. 2005. « Estrogen-related receptor expression in placenta throughout gestation ». *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 94: 67-69. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.030.

Gahir, Sarabjit, et Micheline Piquette-Miller. 2017. « The Role of PXR Genotype and Transporter Expression in the Placental Transport of Lopinavir in Mice ». *Pharmaceutics* 9 (4): 49. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040049.

Gallagher, Ciara M, Carolina Garri, Erica L Cain, Kenny Kean-Hooi Ang, Christopher G Wilson, Steven Chen, Brian R Hearn, et al. 2016. « Ceapins are a new class of unfolded protein response inhibitors, selectively targeting the ATF6α branch ». Édité par Davis Ng. *eLife* 5 (juillet): e11878. https://doi.org/10.7554/eLife.11878.

Gambino, Y. P., J. L. Maymó, A. Pérez Pérez, J. C. Calvo, V. Sánchez-Margalet, et C. L. Varone. 2012. « Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Molecular Mechanisms Underlying Estrogen Functions in Trophoblastic Cells − Focus on Leptin Expression ». *Placenta*, Placenta –Predicting Future Health, 33 (février): S63-70. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.12.001.

Ganser-Pornillos, Barbie K, Mark Yeager, et Wesley I Sundquist. 2008. « The Structural Biology of HIV Assembly ». *Current Opinion in Structural Biology* 18 (2): 203-17. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.02.001.

Ganta, Krishna Kumar, et Binay Chaubey. 2019. « Endoplasmic Reticulum Stress Leads to Mitochondria-Mediated Apoptosis in Cells Treated with Anti-HIV Protease Inhibitor Ritonavir ». *Cell Biology and Toxicology* 35 (3): 189-204. https://doi.org/10.1007/s10565-018-09451-7.

Gaspard, Ulysse J., Jean Hustin, Aimee M. Reuter, Rene Lambotte, et Paul Franchimont. 1980. « Immunofluorescent localization of placental lactogen, chorionic gonadotrophin and its alpha and beta subunits in organ cultures of human placenta ». *Placenta* 1 (2): 135-44. https://doi.org/10.1016/S0143-4004(80)80022-1.

Gavard, Laurent, Sophie Gil, Gilles Peytavin, Pierre-François Ceccaldi, Claudia Ferreira, Robert Farinotti, et Laurent Mandelbrot. 2006. « Placental Transfer of Lopinavir/Ritonavir in the Ex Vivo Human Cotyledon Perfusion Model ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 195 (1): 296-301. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.01.017.

Geijtenbeek, Teunis B.H, Douglas S Kwon, Ruurd Torensma, Sandra J van Vliet, Gerard C.F van Duijnhoven, Jeena Middel, Ine L.M.H.A Cornelissen, et al. 2000. « DC-SIGN, a Dendritic Cell–Specific HIV-1-Binding Protein That Enhances Trans-Infection of T Cells ». *Cell* 100 (5): 587-97. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80694-7.

Gemrot, Elodie, et Marie-Paule Lefranc. 2009. « IMGT Education ». 2009. http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/MHC/_FR/Presentation/MHC_VIH.html#11.

Gerbaud, Pascale, Guillaume Pidoux, Jean Guibourdenche, Niroshani Pathirage, Jean Marc Costa, Josette Badet, Jean-Louis Frendo, Padma Murthi, et Danièle Evain-Brion. 2011. « Mesenchymal Activin-A Overcomes Defective Human Trisomy 21 Trophoblast Fusion ». *Endocrinology* 152 (12): 5017-28. https://doi.org/10.1210/en.2011-1193.

Gerbaud, Pascale, Kjetil Taskén, et Guillaume Pidoux. 2015. « Spatiotemporal Regulation of CAMP Signaling Controls the Human Trophoblast Fusion ». *Frontiers in Pharmacology* 6. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00202.

Gerbouin, Olivier, et Jean Grellet. 2017. « Virus de l'immunodéficience humaine : cycle viral et épidémiologie ». *Actualités Pharmaceutiques* 56 (564): 1-2. https://doi.org/10.1016/j.actpha.2016.12.001.

Goetzl, Laura, David Krantz, Joe Leigh Simpson, Richard K. Silver, Julia M. Zachary, Eugene Pergament, Lawrence D. Platt, Maurice J. Mahoney, et Ronald J. Wapner. 2004. « Pregnancy-Associated Plasma Protein A, Free Beta-HCG, Nuchal Translucency, and Risk of Pregnancy Loss ». *Obstetrics and Gynecology* 104 (1): 30-36. https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000129969.78308.4f.

Goldman, Shlomit, et Eliezer Shalev. 2006. « Difference in Progesterone-Receptor Isoforms Ratio Between Early and Late First-Trimester Human Trophoblast Is Associated with Differential Cell Invasion and Matrix Metalloproteinase 2 Expression ». *Biology of Reproduction* 74: 13-22. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.044925.

Goldstein, Joseph L., et Michael S. Brown. 2009. « History of Discovery: The LDL Receptor ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29 (4): 431-38. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179564.

Gomez-Chang, E., M. T. Espinosa-Garcia, S. Olvera-Sanchez, O. Flores-Herrera, et F. Martinez. 2014. « PKA Tightly Bound to Human Placental Mitochondria Participates in Steroidogenesis and Is Not Modified by CAMP ». *Placenta* 35 (9): 748-62. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.06.005.

Gomez-Concha, Cuauhtemoc, Oscar Flores-Herrera, Sofia Olvera-Sanchez, Ma. Teresa Espinosa-Garcia, et Federico Martinez. 2011. « Progesterone synthesis by human placental mitochondria is sensitive to PKA inhibition by H89 ». *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 43 (9): 1402-11. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.06.005.

Gregor, Craig R., Eleonora Cerasoli, James Schouten, Jascindra Ravi, Jerry Slootstra, Adrian Horgan, Glenn J. Martyna, Maxim G. Ryadnov, Paul Davis, et Jason Crain. 2011. « Antibody Recognition of a Human Chorionic Gonadotropin Epitope (hCGβ66–80) Depends on Local Structure Retained in the Free

Peptide ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (28): 25016-26. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.246637.

Grunfeld, Carl, Joseph AC Delaney, Christine Wanke, Judith S. Currier, Rebecca Scherzer, Mary L. Biggs, Phyllis C. Tien, et al. 2009. « Preclinical Atherosclerosis Due to HIV Infection: Carotid Intima-Medial Thickness Measurements from the FRAM Study ». *AIDS* 23 (14): 1841–1849. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832d3b85.

Guiboudenche, Jean, Thierry Fournier, André Malassiné, et Danièle Evain-Brion. 2009. « Development and hormonal functions of the human placenta ». *Folia Histochem. Cytobiol.* 47: S35-40. https://doi.org/10.2478/v10042-009-0110-3.

Guibourdenche, J., A. Tarrade, I. Laurendeau, C. Rochette-Egly, P. Chambon, M. Vidaud, et D. Evain-Brion. 2000. « Retinoids Stimulate Leptin Synthesis and Secretion in Human Syncytiotrophoblast ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85 (7): 2550-55. https://doi.org/10.1210/jcem.85.7.6695.

Guibourdenche, Jean, Karen Handschuh, Vassilis Tsatsaris, Pascale Gerbaud, Marie-Clémence Leguy, F Muller, Danièle Evain-Brion, et Thierry Fournier. 2010. « Hyperglycosylated hCG is a marker of early human trophoblast invasion ». *J Clin Endocrinol Metab* 95 (10). https://doi.org/10.1210/jc.2010-0138.Epub 2010 Jul 21.

Guitart-Mampel, Mariona, A. Sandra Hernandez, Constanza Moren, Marc Catalan-Garcia, Ester Tobias, Ingrid Gonzalez-Casacuberta, Diana L. Juarez-Flores, et al. 2017. « Imbalance in Mitochondrial Dynamics and Apoptosis in Pregnancies among HIV-Infected Women on HAART with Obstetric Complications ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, juillet. https://doi.org/10.1093/jac/dkx187.

Gulati, Abhishek, F. Douglas Boudinot, et Phillip M. Gerk. 2009. « Binding of Lopinavir to Human α_1-Acid Glycoprotein and Serum Albumin ». *Drug Metabolism and Disposition* 37 (8): 1572-75. https://doi.org/10.1124/dmd.109.026708.

Guzel, Elif, Sefa Arlier, Ozlem Guzeloglu-Kayisli, Mehmet Selcuk Tabak, Tugba Ekiz, Nihan Semerci, Kellie Larsen, Frederick Schatz, Charles Joseph Lockwood, et Umit Ali Kayisli. 2017. « Endoplasmic Reticulum Stress and Homeostasis in Reproductive Physiology and Pathology ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (4). https://doi.org/10.3390/ijms18040792.

Halasz, Melinda, et Julia Szekeres-Bartho. 2013. « The Role of Progesterone in Implantation and Trophoblast Invasion ». *Journal of Reproductive Immunology*, Special issue covering highlights presented at the joint meeting of the European Society for Reproductive Immunology & the American

Society for Reproductive Immunology in Hamburg (Germany), May 31 - June 02, 2012, 97 (1): 43-50. https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.011.

Handschuh, Karen, Jean Guibourdenche, Vassilis Tsatsaris, Mickaël Guesnon, Ingrid Laurendeau, Danièle Evain-Brion, et Thierry Fournier. 2007. « Human Chorionic Gonadotropin Produced by the Invasive Trophoblast but Not the Villous Trophoblast Promotes Cell Invasion and Is Down-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma ». *Endocrinology* 148 (10): 5011-19. https://doi.org/10.1210/en.2007-0286.

Handschuh, K., J. Guibourdenche, M. Cocquebert, V. Tsatsaris, M. Vidaud, D. Evain-Brion, et T. Fournier. 2009. « Expression and Regulation by PPAR[gamma] of hCG [alpha]- and [beta]-subunits: Comparison between Villous and Invasive Extravillous Trophoblastic Cells ». *Placenta*, n° 12: 1016.

Harada, Nobuhiro, Noriko Yoshimura, et Shin-ichiro Honda. 2003. « Unique Regulation of Expression of Human Aromatase in the Placenta ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Proceedings of the VI International Aromatase Conference « AROMATASE 200 », 86 (3): 327-34. https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00375-3.

Haraguchi, Hirofumi, Tomoko Saito-Fujita, Yasushi Hirota, Mahiro Egashira, Leona Matsumoto, Mitsunori Matsuo, Takehiro Hiraoka, et al. 2014. « MicroRNA-200a Locally Attenuates Progesterone Signaling in the Cervix, Preventing Embryo Implantation ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 28 (7): 1108-17. https://doi.org/10.1210/me.2014-1097.

Hattori, Kenji, Nozomi Yamaguchi, Kazuo Umezawa, et Hiroomi Tamura. 2012. « Interferon Gamma Induces Steroid Sulfatase Expression in Human Keratinocytes ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 35 (9): 1588-93. https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00028.

Haute Autorité de Santé. 2016. « Suivi et orientation des femmes enceintes en fonction des situations à risque identifiées-Recommandations mise à jour Mai 2016 ».

Henderson, Ying C, Mitchell J Frederick, Mary T Wang, Lisa M Hollier, et Gary L Clayman. 2008. « LBP-1b, LBP-9, and LBP-32/MGR Detected in Syncytiotrophoblats from First-Trimester Human Placental Tissue and Their Transcriptional Regulation ». *DNA and Cell Biology* 27 (2): 71-79. https://doi.org/10.1089/dna.2007.0640.

Henríquez, Soledad, Paulina Kohen, Alex Muñoz, Ana Godoy, Felipe Orge, Jerome F. Strauss, et Luigi Devoto. 2017. « In-Vitro Study of Gonadotrophin Signaling Pathways in Human Granulosa Cells in Relation to Progesterone Receptor Expression ». *Reproductive Biomedicine Online* 35 (4): 363-71. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.06.011.

Hernandez, Sandra, Constanza Moren, Marc Catalán-García, Marta Lopez, Mariona Guitart-Mampel, Oriol Coll, Laura Garcia, et al. 2017. « Mitochondrial Toxicity and Caspase Activation in HIV Pregnant Women ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21 (1): 26-34. https://doi.org/10.1111/jcmm.12935.

Hernàndez, Sandra, Constanza Morén, Marta López, Oriol Coll, Francesc Cardellach, Eduard Gratacós, Oscar Miró, et Glòria Garrabou. 2012. « Perinatal Outcomes, Mitochondrial Toxicity and Apoptosis in HIV-Treated Pregnant Women and in-Utero-Exposed Newborn ». *AIDS (London, England)* 26 (4): 419-28. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32834f3232.

Hertig, Alexandre, Philippe Liere, Nathalie Chabbert-Buffet, Julie Fort, Antoine Pianos, Bernard Eychenne, Annie Cambourg, et al. 2010. « Steroid Profiling in Preeclamptic Women: Evidence for Aromatase Deficiency ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 203 (5): 477.e1-477.e9. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.06.011.

Hill, David J. 2018. « Placental Control of Metabolic Adaptations in the Mother for an Optimal Pregnancy Outcome. What Goes Wrong in Gestational Diabetes? » *Placenta* 69 (septembre): 162-68. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.01.002.

« HIV-1 Infection of Trophoblasts Is Independent of gp120/CD4 Interactions but Relies on Heparan Sulfate Proteoglycans | The Journal of Infectious Diseases | Oxford Academic ». s. d. Consulté le 28 septembre 2020. https://academic.oup.com/jid/article/195/10/1461/2191830.

Hoggard, Patrick G., et David J. Back. 2002. « Intracellular Pharmacology of Nucleoside Analogues and Protease Inhibitors: Role of Transporter Molecules »: *Current Opinion in Infectious Diseases* 15 (1): 3-8. https://doi.org/10.1097/00001432-200202000-00002.

Holland, Olivia, Marloes Dekker Nitert, Linda A. Gallo, Meliha Vejzovic, Joshua J. Fisher, et Anthony V. Perkins. 2017. « Review: Placental Mitochondrial Function and Structure in Gestational Disorders ». *Placenta*, Queensland Perinatal Consortium (QPACT) Supplement: Placental adaptations to the maternal environment, 54 (juin): 2-9. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.012.

Hong-Brown, Ly Q., C. Randell Brown, Danuta S. Huber, et Charles H. Lang. 2008. « Lopinavir Impairs Protein Synthesis and Induces EEF2 Phosphorylation via the Activation of AMP-Activated Protein Kinase ». *Journal of Cellular Biochemistry* 105 (3): 814-23. https://doi.org/10.1002/jcb.21882.

Hu, Jie, Zhonghua Zhang, Wen-Jun Shen, et Salman Azhar. 2010. « Cellular Cholesterol Delivery, Intracellular Processing and Utilization for Biosynthesis of Steroid Hormones », 25.

Huang, Ningwu, et Walter L Miller. 2000. « Cloning of Factors Related to HIV-inducible LBP Proteins That Regulate Steroidogenic Factor-1-independent Human Placental Transcription of the Cholesterol Side-Chain-Cleavage Enzyme, P450scc ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (4): 2852-58.

Huang, Ningwu, et Walter L Miller. 2005. « LBP Proteins Modulate SF1-Independent Expression of P450scc in Human Placental JEG-3 Cells ». *Molecular Endocrinology* 19 (2): 409-20. https://doi.org/10.1210/me.2004-0086.

Hudon Thibeault, Andrée-Anne, Cathy Vaillancourt, et J. Thomas Sanderson. 2018. « Profile of CYP19A1 mRNA expression and aromatase activity during syncytialization of primary human villous trophoblast cells at term ». *Biochimie* 148 (mai): 12-17. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.02.010.

Inagaki, Kenichi, Fumio Otsuka, Tomoko Miyoshi, Misuzu Yamashita, Mina Takahashi, Junko Goto, Jiro Suzuki, et Hirofumi Makino. 2009. « P38-Mitogen-Activated Protein Kinase Stimulated Steroidogenesis in Granulosa Cell-Oocyte Cocultures: Role of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 ». *Endocrinology* 150 (4): 1921-30. https://doi.org/10.1210/en.2008-0851.

« Inhibiteurs de la protéase du VIH ». s. d. Consulté le 5 juin 2020. https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/inhibiteurs-de-la-protease-du-vih.

« Inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH ». s. d. Consulté le 6 juin 2020. https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/inhibiteurs-de-la-transcriptase-inverse-du-vih.

INSERM. s. d. « Physiologie de la parturition ». http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/204/?sequence=14.

Institut, Pasteur. 2017. « La recherche sur le VIH/sida ». Institut Pasteur. 22 février 2017. https://www.pasteur.fr/fr/recherche-vihsida.

Islami, D., P. Bischof, et D. Chardonnens. 2003. « Modulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor by Leptin and HCG ». *Molecular Human Reproduction* 9 (7): 395-98. https://doi.org/10.1093/molehr/gag053.

Jamnongjit, Michelle, et Stephen R Hammes. 2006. « Ovarian Steroids: The Good, the Bad, and the Signals that Raise Them ». *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (11): 1178-83.

Janneh, Omar, Tariq Anwar, Christof Jungbauer, Stefan Kopp, Saye H Khoo, David J Back, et Peter Chiba. 2009. « P-Glycoprotein, Multidrug Resistance-Associated Proteins and Human Organic Anion

Transporting Polypeptide Influence the Intracellular Accumulation of Atazanavir ». *Antiviral Therapy* 14 (7): 965-74. https://doi.org/10.3851/IMP1399.

Jansson, T. 2001. « Amino Acid Transporters in the Human Placenta ». *Pediatric Research* 49 (2): 141-47. https://doi.org/10.1203/00006450-200102000-00003.

Jiang, Mengxi, Marcus Klein, Ulrich M. Zanger, Mohammad K. Mohammad, Matthew C. Cave, Nilesh W. Gaikwad, Natasha J. Dias, et al. 2016. « Inflammatory Regulation of Steroid Sulfatase: A Novel Mechanism to Control Estrogen Homeostasis and Inflammation in Chronic Liver Disease ». *Journal of Hepatology* 64 (1): 44-52. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.022.

Jones, Edith, Norma Gaytan, Iraselia Garcia, Alan Herrera, Manuel Ramos, Divya Agarwala, Maahrose Rana, Wendy Innis-Whitehouse, Erin Schuenzel, et Robert Gilkerson. 2017. « A threshold of transmembrane potential is required for mitochondrial dynamic balance mediated by DRP1 and OMA1 ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (7): 1347-63. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2421-9.

Jones, Simon P., Nadeem Qazi, John Morelese, Dirk Lebrecht, Jussi Sutinen, Hannele Yki-Järvinen, David J. Back, et al. 2005. « Assessment of Adipokine Expression and Mitochondrial Toxicity in HIV Patients with Lipoatrophy on Stavudine- and Zidovudine-Containing Regimens ». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 40 (5): 565-72. https://doi.org/10.1097/01.qai.0000187443.30838.3e.

Kamat, Amrita, Joseph L Alcorn, Cheryl Kunczt, et Carole R Mendelson. 1998. « Characterization of the Regulatory Regions of the Human Aromatase (P450arom) Gene Involved in Placenta-Specific Expression ». *Molecular Endocrinology* 12 (11): 1764-77.

Kang, S. K., C. J. Tai, K. W. Cheng, et P. C. Leung. 2000. « Gonadotropin-Releasing Hormone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Human Ovarian and Placental Cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 170 (1-2): 143-51. https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00320-8.

Karavaeva, I. E., K. V. Shekhireva, F. F. Severin, et D. A. Knorre. 2015. « Does Mitochondrial Fusion Require Transmembrane Potential? » *Biochemistry (Moscow)* 80 (5): 549-58. https://doi.org/10.1134/S0006297915050053.

Kariyawasam, D., A. Simon, K. Laborde, S. Parat, P.-F. Souchon, P. Frange, S. Blanche, et M. Polak. 2014. « Adrenal Enzyme Impairment in Neonates and Adolescents Treated with Ritonavir and Protease Inhibitors for HIV Exposure or Infection ». *Hormone Research in Paediatrics* 81 (4): 226-31. https://doi.org/10.1159/000356916.

Karumanchi, S. Ananth, et Joey P. Granger. 2016. « Preeclampsia and Pregnancy-Related Hypertensive Disorders ». *Hypertension* 67 (2): 238-42. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05024.

Kelly, Paul A, Anne Bachelot, Cécile Kedzia, Lothar Hennighausen, Christopher J Ormandy, John J Kopchick, et Nadine Binart. 2002. « The Role of Prolactin and Growth Hormone in Mammary Gland Development ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 197 (1): 127-31. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00286-1.

Keun Kang, Sung, Chen-Jei Tai, Kwai Wa Cheng, et Peter C. K Leung. 2000. « Gonadotropin-Releasing Hormone Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Human Ovarian and Placental Cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 170 (1): 143-51. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00320-8.

Kim, Mikyung, Zhisong Qiao, Jessica Yu, David Montefiori, et Ellis L. Reinherz. 2007. « Immunogenicity of Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1-like Particles Expressing Gp41 Derivatives in a Pre-Fusion State ». *Vaccine* 25 (27): 5102-14. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.071.

Knerr, Ina, Steffen W. Schubert, Christina Wich, Kerstin Amann, Thomas Aigner, Tina Vogler, Ronny Jung, Jörg Dötsch, Wolfgang Rascher, et Said Hashemolhosseini. 2005. « Stimulation of GCMa and Syncytin via CAMP Mediated PKA Signaling in Human Trophoblastic Cells under Normoxic and Hypoxic Conditions ». *FEBS Letters* 579 (18): 3991-98. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.06.029.

Kumar, Premlata, Yanmin Luo, Carmen Tudela, James M. Alexander, et Carole R. Mendelson. 2013. « The C-Myc-Regulated MicroRNA-17~92 (MiR-17~92) and MiR-106a~363 Clusters Target HCYP19A1 and HGCM1 to Inhibit Human Trophoblast Differentiation ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (9): 1782-96. https://doi.org/10.1128/MCB.01228-12.

Kumar, Premlata, et Carole R. Mendelson. 2011. « Estrogen-Related Receptor γ (ERRγ) Mediates Oxygen-Dependent Induction of Aromatase (CYP19) Gene Expression during Human Trophoblast Differentiation ». *Molecular Endocrinology* 25 (9): 1513-26. https://doi.org/10.1210/me.2011-1012.

Lacroix, M.C., J. Guibourdenche, J.L. Frendo, F. Muller, et D. Evain-Brion. 2002. « Human Placental Growth Hormone—A Review ». *Placenta* 23 (avril): S87-94. https://doi.org/10.1053/plac.2002.0811.

Lai, Weihong, Li Huang, Phong Ho, David Montefiori, et Chin-Ho Chen. 2011. « The Role of Dynamin in HIV Type 1 Env-Mediated Cell–Cell Fusion ». *AIDS Research and Human Retroviruses* 27 (9): 1013-17. https://doi.org/10.1089/aid.2010.0259.

Lairmore, M. D., P. S. Cuthbert, L. L. Utley, C. J. Morgan, C. S. Dezzutti, C. L. Anderson, et D. D. Sedmak. 1993. « Cellular Localization of CD4 in the Human Placenta. Implications for Maternal-to-Fetal Transmission of HIV. » *The Journal of Immunology* 151 (3): 1673-81.

Lavoie, Holly A, et Steven R King. 2009. « Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B ». *Experimental Biology and Medicine*, 880-907. https://doi.org/10.3181/0903-MR-97.

Lecarpentier, Édouard, Sarah Vieillefosse, Bassam Haddad, Thierry Fournier, Marie-Clémence Leguy, Jean Guibourdenche, et Vassilis Tsatsaris. 2016. « Le facteur de croissance placentaire (PlGF) et son récepteur soluble (sFlt-1) au cours de la grossesse : physiologie, dosage et intérêt dans la prééclampsie ». *Annales de Biologie Clinique* 74 (3): 259-67. https://doi.org/10.1684/abc.2016.1158.

Leclercq, P, L Roudiere, et J Viard. 2004. « Complications graves des traitements antirétroviraux ». *Réanimation* 13 (3): 238-48. https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2004.02.010.

Lee, Cheuk-Lun, Philip C.N. Chiu, Laura Hautala, Tuula Salo, William S.B. Yeung, Ulf-Håkan Stenman, et Hannu Koistinen. 2013. « Human Chorionic Gonadotropin and Its Free β-Subunit Stimulate Trophoblast Invasion Independent of LH/HCG Receptor ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 375 (1-2): 43-52. https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.009.

Lee, Dukgyu, Gunasekaran Singaravelu, Byung-Jae Park, et Joohong Ahnn. 2007a. « Differential Requirement of Unfolded Protein Response Pathway for Calreticulin Expression in Caenorhabditis elegans ». *Journal of Molecular Biology* 372 (2): 331-40. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.06.071.

Lei, Lanjie, Junbang Ge, Hui Zhao, Xiangguo Wang, et Lei Yang. 2019. « Role of endoplasmic reticulum stress in lipopolysaccharide-inhibited mouse granulosa cell estradiol production ». *The Journal of reproduction and development* 65 (5): 459-65. https://doi.org/10.1262/jrd.2019-052.

Levine, Richard J, Kee-Hak Lim, Enrique F Schisterman, Benjamin P Sachs, Baha M Sibai, et S Ananth Karumanchi. 2004. « Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia ». *The New England Journal of Medicine*, 12.

Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, et L. S. Oshiro. 1984. « Isolation of Lymphocytopathic Retroviruses from San Francisco Patients with AIDS ». *Science* 225 (4664): 840-42. https://doi.org/10.1126/science.6206563.

Lewis, S. H., H. E. Fox, S. H. Lewis, S. H. Lewis, C. Reynolds-Kohler, et J. A. Nelson. 1990. « HIV-1 in Trophoblastic and Villous Hofbauer Cells, and Haematological Precursors in Eight-Week Fetuses ». *The Lancet* 335 (8689): 565-68. https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)90349-A.

Lindquist, A., A. Poulton, J. Halliday, et L. Hui. 2018. « Prenatal Diagnostic Testing and Atypical Chromosome Abnormalities Following Combined First-Trimester Screening: Implications for Contingent Models of Non-Invasive Prenatal Testing ». *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 51 (4): 487-92. https://doi.org/10.1002/uog.18979.

Li, Jiaxin, Qian Zhou, Zhuang Ma, Meina Wang, Wen-Jun Shen, Salman Azhar, Zhigang Guo, et Zhigang Hu. 2017. « Feedback inhibition of CREB signaling by p38 MAPK contributes to the negative regulation of steroidogenesis ». *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 15 (mars). https://doi.org/10.1186/s12958-017-0239-4.

Li, Xiaoling, et William K Chan. 1999. « Transport, Metabolism and Elimination Mechanisms of Anti-HIV Agents ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Delivery of Anti-HIV Drugs, 39 (1): 81-103. https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00021-6.

Li, Y., V. Isomaa, A. Pulkka, R. Herva, H. Peltoketo, et P. Vihko. 2005. « Expression of 3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1, P450 Aromatase, and 17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase Types 1, 2, 5 and 7 MRNAs in Human Early and Mid-Gestation Placentas ». *Placenta* 26 (5): 387-92. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.07.008.

Lobo, Juliet O., et Francis L. Bellino. 1989. « Estrogen Synthetase (Aromatase) Activity in Primary Culture of Human Term Placental Cells: Effects of Cell Preparation, Growth Medium, and Serum on Adenosine 3',5'-Monophosphate Response ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 69 (4): 868-74. https://doi.org/10.1210/jcem-69-4-868.

Loncar, J., V. M. Barnabei, et J. W. Larsen. 1995. « Advent of Maternal Serum Markers for Down Syndrome Screening ». *Obstetrical & Gynecological Survey* 50 (4): 316-20. https://doi.org/10.1097/00006254-199504000-00027.

« Lopinavir ». 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547961/.

Luo, Shuang, Hui Yu, Dongning Wu, et Chun Peng. 2002. « Transforming Growth Factor-Beta1 Inhibits Steroidogenesis in Human Trophoblast Cells ». *Molecular Human Reproduction* 8 (4): 318-25. https://doi.org/10.1093/molehr/8.4.318.

Maazouzi, Hafid. 1993. « Hormone lactogène placentaire (hPL) - Fabrication d'anticorps anti-hPL et recherche des épitopes - L'hPL est-elle une kinase? », 233.

Mailler, Elodie, Serena Bernacchi, Roland Marquet, Jean-Christophe Paillart, Valérie Vivet-Boudou, et Redmond Smyth. 2016. « The Life-Cycle of the HIV-1 Gag–RNA Complex ». *Viruses* 8 (9): 248. https://doi.org/10.3390/v8090248.

Malassiné, André, et Laurent Cronier. 2002. « Hormones and Human Trophoblast Differentiation ». *Endocrine* 19 (1): 3-11. https://doi.org/10.1385/ENDO:19:1:3.

Malassiné, A., S. Blaise, K. Handschuh, H. Lalucque, A. Dupressoir, D. Evain-Brion, et T. Heidmann. 2007. « Expression of the Fusogenic HERV-FRD Env Glycoprotein (Syncytin 2) in Human Placenta Is Restricted to Villous Cytotrophoblastic Cells ». *Placenta* 28 (2-3): 185-91. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.03.001.

Maldonado-Mercado, Maria Guadalupe, Maria Teresa Espinosa-Garcia, Cuauhtemoc Gomez-Concha, Jessica Monreal-Flores, et Federico Martinez. 2008. « Steroidogenesis in BeWo cells: role of protein kinase A and benzodiazepines ». *Int J Biochem Cell Biol* 40 (5): 901-8. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.026.

Mandelbrot, Laurent, Dominique Duro, Emilie Belissa, et Gilles Peytavin. 2014. « Placental Transfer of Darunavir in an Ex Vivo Human Cotyledon Perfusion Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (9): 5617-20. https://doi.org/10.1128/AAC.03184-14.

Manna, Pulak R, Syam P Chandrala, Youngah Jo, et Douglas M Stocco. 2006. « cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation ». *Journal of Molecular Endocrinology* 37 (1): 81-95.

Mano, H, et J C Chermann. 1991. « Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary cultured placental cells ». *Research in virology* 142 (2-3): 95-104.

Martinez, Federico, Marianthi Kiriakidou, et Jerome F Strauss. 1997. « Structural and Functional Changes in Mitochondria Associated with Trophoblast Differentiation: Methods to Isolate Enriched Preparations of Syncytiotrophoblast Mitochondria » 138 (5): 12.

Martinez, Federico, Sofia Olvera-Sanchez, Mercedes Esparza-Perusquia, Erika Gomez-Chang, et Oscar Flores-Herrera. 2015. « Multiple Functions of Syncytiotrophoblast Mitochondria ». *Steroids*, Steroidogenesis: The Classics and Beyond, 103 (novembre): 11-22. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.09.006.

Mauvais-Jarvis, Franck. 2016. « Role of Sex Steroids in β Cell Function, Growth, and Survival ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27 (12): 844-55. https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.08.008.

Maymó, Julieta Lorena, Antonio Pérez Pérez, Bernardo Maskin, José Luis Dueñas, Juan Carlos Calvo, Víctor Sánchez Margalet, et Cecilia Laura Varone. 2012. « The Alternative Epac/CAMP Pathway and the MAPK Pathway Mediate HCG Induction of Leptin in Placental Cells ». *PLOS ONE* 7 (10): e46216. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046216.

Maynard, Sharon E., Jiang-Yong Min, Jaime Merchan, Kee-Hak Lim, Jianyi Li, Susanta Mondal, Towia A. Libermann, et al. 2003. « Excess Placental Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 (SFlt1) May Contribute to Endothelial Dysfunction, Hypertension, and Proteinuria in Preeclampsia ». *The Journal of Clinical Investigation* 111 (5): 649-58. https://doi.org/10.1172/JCI17189.

McDonald, Chloe R, Andrea L Conroy, Joel L Gamble, Eszter Papp, Michael Hawkes, Peter Olwoch, Paul Natureeba, Moses Kamya, Michael Silverman, et Deborah Cohan. 2018. « Estradiol Levels Are Altered in Human Immunodeficiency Virus-Infected Pregnant Women Randomized to Efavirenz-Versus Lopinavir/Ritonavir-Based Antiretroviral Therapy ». *Clinical Infectious Diseases* 66 (3): 428.

Méhats, Céline, Louis Marcellin, et Thomas Schmitz. 2018. « Une activation immunitaire à l'interface fœto-maternelle précède la parturition humaine ». *médecine/sciences* 34 (3): 208-10. https://doi.org/10.1051/medsci/20183403006.

Melendez, Quantil M., Sreevidhya T. Krishnaji, Catherine J. Wooten, et Dayami Lopez. 2017. « Hypercholesterolemia: The Role of PCSK9 ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 625-626 (juillet): 39-53. https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.06.001.

Mendelson, Carole R., Bing Jiang, John M. Shelton, James A. Richardson, et Margaret M. Hinshelwood. 2005. « Transcriptional Regulation of Aromatase in Placenta and Ovary ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 95 (1): 25-33. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.04.016.

Mendelson, Carole R., et Amrita Kamat. 2007. « Mechanisms in the Regulation of Aromatase in Developing Ovary and Placenta ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 106 (1-5): 62-70. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.05.001.

Mesfin, Yonatan Moges, Kelemu Tilahun Kibret, et Amsalu Taye. 2016. « Is Protease Inhibitors Based Antiretroviral Therapy during Pregnancy Associated with an Increased Risk of Preterm Birth? Systematic Review and a Meta-Analysis ». *Reproductive Health* 13 (avril): 30. https://doi.org/10.1186/s12978-016-0149-5.

Meyer, Joel N., Tess C. Leuthner, et Anthony L. Luz. 2017. « Mitochondrial Fusion, Fission, and Mitochondrial Toxicity ». *Toxicology*, Mitochondrial Toxicity, 391 (novembre): 42-53. https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.019.

Millar, Jane R., Zodumo Mvo, Nomonde Bengu, Rowena Fillis, Ken Sprenger, Philippa C. Matthews, Moherndran Archary, et al. 2019. « Increasing Diagnostic Uncertainties in Children With In Utero HIV Infection ». *The Pediatric Infectious Disease Journal* 38 (8): e166. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002315.

Miller, WL. 1998. « Steroid hormone biosynthesis and actions in the materno-placental unit ». *Clin. Perinatol* 25: 799-817.

Min, Sherene S., Amanda H. Corbett, Naser Rezk, Susan Cu-Uvin, Susan A. Fiscus, Leslie Petch, Myron S. Cohen, et Angela D. M. Kashuba. 2004. « Protease Inhibitor and Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Concentrations in the Genital Tract of HIV-1-Infected Women »: *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 37 (5): 1577-80. https://doi.org/10.1097/00126334-200412150-00008.

Mognetti, B., M. Moussa, J. Croitoru, E. Menu, D. Dormont, P. Roques, et G. Chaouat. 2000. « HIV-1 Co-Receptor Expression on Trophoblastic Cells from Early Placentas and Permissivity to Infection by Several HIV-1 Primary Isolates ». *Clinical & Experimental Immunology* 119 (3): 486-92. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01149.x.

Money, Deborah M., Emily C. Wagner, Evelyn J. Maan, Tessa Chaworth-Musters, Izabelle Gadawski, Julie E. van Schalkwyk, John C. Forbes, et al. 2015. « Evidence of Subclinical mtDNA Alterations in HIV-Infected Pregnant Women Receiving Combination Antiretroviral Therapy Compared to HIV-Negative Pregnant Women ». *PLoS ONE* 10 (8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135041.

Monks, Jenifer. 2007. « TGFβ as a Potential Mediator of Progesterone Action in the Mammary Gland of Pregnancy ». *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 12 (4): 249-57. https://doi.org/10.1007/s10911-007-9056-2.

Moravek, Molly B, Min Shang, Bindu Menon, et KMJ Menon. 2016. « HCG-Mediated Activation of mTORC1 Signaling Plays a Crucial Role in Steroidogenesis in Human Granulosa Lutein Cells ». *Endocrine* 54 (1): 217-24. https://doi.org/10.1007/s12020-016-1065-8.

Morlat, Philippe, Arnaud Blanc, Fabrice Bonnet, Françoise Brun-Vezinet, Dominique Costagliola, Françoise Dabis, Pierre Delobel, et al. 2018. « Groupe des experts « Prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH » », 57.

Muñoz, Laura Diaz, Maria Jesús Serramía, Manuel Fresno, et Maria Angeles Muñoz-Fernández. 2007. « Progesterone inhibits HIV-1 replication in human trophoblast cells through inhibition of autocrine tumor necrosis factor secretion ». *The Journal of infectious diseases* 195 (9): 1294-1302.

Murthi, Padma, Editor, Cathy Vaillancourt Editor, Andrée-Anne Hudon Thibeault, J. Thomas Sanderson, Cathy Vaillancourt, et John M. Walker Series editor. 2017. « Co-culture of H295R Adrenocortical Carcinoma and BeWo Choriocarcinoma Cells to Study Feto-placental Interactions: Focus on Estrogen Biosynthesis ». *Preeclampsia : Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, , 295. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6_23.

Nadal, Angel, Paloma Alonso-Magdalena, Sergi Soriano, Ana B. Ropero, et Ivan Quesada. 2009. « The Role of Oestrogens in the Adaptation of Islets to Insulin Resistance ». *The Journal of Physiology* 587 (21): 5031-37. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.177188.

Neumanova, Zuzana, Lukas Cerveny, Susan L. Greenwood, Martina Ceckova, et Frantisek Staud. 2015. « Effect of Drug Efflux Transporters on Placental Transport of Antiretroviral Agent Abacavir ». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 57 (novembre): 176-82. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.07.070.

« Nucleoside Analogues ». 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548938/.

Ogren, L, et F Talamantes. 1994. « The placenta as an endocrine organ: polypeptides ». *Physiology of reproduction*, 1994, In: Knobil E, Neill J editors édition.

Orendi, K, M Gauster, G Moser, H Meiri, et B Hupperts. 2010. « The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium specific proteins ». *Reproduction* 140: 759-66. https://doi.org/10.1530/REP-10-0221.

Papp, Eszter, Kayode Balogun, Nicole Banko, Hakimeh Mohammadi, Mona Loutfy, Mark H. Yudin, Rajiv Shah, et al. 2016. « Low Prolactin and High 20-α-Hydroxysteroid Dehydrogenase Levels Contribute to Lower Progesterone Levels in HIV-Infected Pregnant Women Exposed to Protease Inhibitor-Based Combination Antiretroviral Therapy ». *The Journal of Infectious Diseases* 213 (10): 1532-40. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw004.

Papp, Eszter, Hakimeh Mohammadi, Mona R. Loutfy, Mark H. Yudin, Kellie E. Murphy, Sharon L. Walmsley, Rajiv Shah, Jay MacGillivray, Michael Silverman, et Lena Serghides. 2015. « HIV Protease Inhibitor Use during Pregnancy Is Associated with Decreased Progesterone Levels, Suggesting a Potential Mechanism Contributing to Fetal Growth Restriction ». *The Journal of Infectious Diseases* 211 (1): 10-18. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu393.

Park, Hyo-Jin, Sun-Ji Park, Deog-Bon Koo, Sang-Rae Lee, Il-Keun Kong, Jae-Woong Ryoo, Young-Il Park, Kyu-Tae Chang, et Dong-Seok Lee. 2014. « Progesterone Production Is Affected by Unfolded Protein Response (UPR) Signaling during the Luteal Phase in Mice ». *Life Sciences* 113 (1-2): 60-67. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.033.

Pasqualini, J. R. 2005. « Enzymes Involved in the Formation and Transformation of Steroid Hormones in the Fetal and Placental Compartments ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, European Progestin Club Scientific Meeting: Progesterone and Progestins in Human Pregnancy and Breast Cancer, 97 (5): 401-15. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.08.004.

Paulesu, Luana, Ch V. Rao, Francesca Ietta, Adalgisa Pietropolli, et Carlo Ticconi. 2018. « HCG and Its Disruption by Environmental Contaminants during Human Pregnancy ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (3): 914. https://doi.org/10.3390/ijms19030914.

Petraglia, F. 1997. « Inhibin, Activin and Follistatin in the Human Placenta—a New Family of Regulatory Proteins ». *Placenta* 18 (1): 3-8. https://doi.org/10.1016/S0143-4004(97)90065-5.

Petraglia, F, J Vaughan, et W Vale. 1989. « Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (13): 5114-17.

Phipps, Elizabeth A., Ravi Thadhani, Thomas Benzing, et S. Ananth Karumanchi. 2019. « Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies ». *Nature reviews. Nephrology* 15 (5): 275-89. https://doi.org/10.1038/s41581-019-0119-6.

Pidoux, Guillaume, Pascale Gerbaud, Jim Dompierre, Birgitte Lygren, Therese Solstad, Danièle Evain-Brion, et Kjetil Taskén. 2014. « A PKA–Ezrin–Cx43 Signaling Complex Controls Gap Junction Communication and Thereby Trophoblast Cell Fusion ». *Journal of Cell Science* 127 (19): 4172-85. https://doi.org/10.1242/jcs.149609.

Pidoux, Guillaume, Pascale Gerbaud, Olivier Marpeau, Jean Guibourdenche, Fatima Ferreira, Josette Badet, Danièle Evain-Brion, et Jean-Louis Frendo. 2007. « Human Placental Development Is Impaired by Abnormal Human Chorionic Gonadotropin Signaling in Trisomy 21 Pregnancies ». *Endocrinology* 148 (11): 5403-13. https://doi.org/10.1210/en.2007-0589.

Pidoux, Guillaume, Pascale Gerbaud, Vassilis Tsatsaris, Olivier Marpeau, Fatima Ferreira, Geri Meduri, Jean Guibourdenche, Josette Badet, Danièle Evain-Brion, et Jean-Louis Frendo. 2007. « Biochemical

Characterization and Modulation of LH/CG-Receptor during Human Trophoblast Differentiation ». *Journal of Cellular Physiology* 212 (1): 26-35. https://doi.org/10.1002/jcp.20995.

Pilon, Antoine, Geneviève Martin, Stéphanie Bultel-Brienne, Didier Junquero, André Delhon, Jean-Charles Fruchart, Bart Staels, et Véronique Clavey. 2003. « Regulation of the Scavenger Receptor BI and the LDL Receptor by Activators of Aldosterone Production, Angiotensin II and PMA, in the Human NCI-H295R Adrenocortical Cell Line ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1631 (3): 218-28. https://doi.org/10.1016/S1388-1981(03)00020-9.

Poidatz, D., E. Dos Santos, A. Brulé, P. De Mazancourt, et M.N. Dieudonné. 2012. « Estrogen-Related Receptor Gamma Modulates Energy Metabolism Target Genes in Human Trophoblast ». *Placenta* 33 (9): 688-95. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.06.002.

Poidatz, Dorothée, Esther Dos Santos, Héloïse Gronier, François Vialard, Benoit Maury, Philippe De Mazancourt, et Marie-Noëlle Dieudonné. 2015. « Trophoblast Syncytialisation Necessitates Mitochondrial Function through Estrogen-Related Receptor-γ Activation ». *Molecular Human Reproduction* 21 (2): 206-16. https://doi.org/10.1093/molehr/gau102.

Powis, Kathleen M., Douglas Kitch, Anthony Ogwu, Michael D. Hughes, Shahin Lockman, Jean Leidner, Erik van Widenfelt, et al. 2011. « Increased Risk of Preterm Delivery Among HIV-Infected Women Randomized to Protease Versus Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor-Based HAART During Pregnancy ». *The Journal of Infectious Diseases* 204 (4): 506-14. https://doi.org/10.1093/infdis/jir307.

Prasad, Manoj, Kevin J. Pawlak, William E. Burak, Elizabeth E. Perry, Brendan Marshall, Randy M. Whittal, et Himangshu S. Bose. 2017. « Mitochondrial metabolic regulation by GRP78 ». *Science Advances* 3 (2). https://doi.org/10.1126/sciadv.1602038.

« Pré-éclampsie ». s. d. Inserm - La science pour la santé. Consulté le 25 août 2020. https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/pre-eclampsie.

« Protease Inhibitors (HIV) ». 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548893/.

Ravaud, Christophe, Martin Paré, Stéphane Azoulay, Christian Dani, et Annie Ladoux. 2017. « Impairment of the activin A autocrine loop by lopinavir reduces self-renewal of distinct human adipose progenitors ». *Scientific Reports* 7 (juin). https://doi.org/10.1038/s41598-017-02807-9.

Reed, M. J., A. Purohit, L. W. L. Woo, S. P. Newman, et B. V. L. Potter. 2005. « Steroid Sulfatase: Molecular Biology, Regulation, and Inhibition ». *Endocrine Reviews* 26 (2): 171-202. https://doi.org/10.1210/er.2004-0003.

« Ritonavir ». 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548301/.

Rodway, Marie, Fuzhen Zhou, Joanne Benoit, Basil Ho Yuen, et Peter C. K. Leung. 1988. « Differential Effects of 8-Bromo-Cyclic AMP on Human Chorionic Gonadotropin (HCG), Progesterone and Estrogen Production by Term Placental Cells ». *Life Sciences* 43 (18): 1451-58. https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90256-1.

Rojo, Manuel, Frédéric Legros, Danielle Chateau, et Anne Lombès. 2002. « Characterization of Mammalian Mitofusins ». *Journal of Cell Science* 115: 163-1674.

Ross, Anna Laura, Claude Cannou, Françoise Barré-Sinoussi, et Elisabeth Menu. 2009. « Proteasome-Independent Degradation of HIV-1 in Naturally Non-Permissive Human Placental Trophoblast Cells ». *Retrovirology* 6 (1): 46. https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-46.

Rothbauer, M, N Patel, H Gondola, M Siwetz, B Huppertz, et P Ertl. 2017. « A comparative study of five physiological key parameters between four different human trophoblast-derived cell lines ». *Scientific Reports* 7 (1): 5892. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06364-z.

Ruiz, Matthieu, Delphine Courilleau, Jean-Christophe Jullian, Dominique Fortin, Renée Ventura-Clapier, Jean-Paul Blondeau, et Anne Garnier. 2012. « A Cardiac-Specific Robotized Cellular Assay Identified Families of Human Ligands as Inducers of PGC-1α Expression and Mitochondrial Biogenesis ». *PLOS ONE* 7 (10): e46753. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046753.

Schwarz, Dianne S., et Michael D. Blower. 2016. « The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 79-94. https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6.

Scobie, Graeme A., Sheila Macpherson, Michael R. Millar, Nigel P. Groome, Panagiota G. Romana, et Philippa T. K. Saunders. 2002. « Human Oestrogen Receptors: Differential Expression of ER Alpha and Beta and the Identification of ER Beta Variants ». *Steroids* 67 (12): 985-92. https://doi.org/10.1016/s0039-128x(02)00047-8.

Shan, Anqi, Mengxue Li, Xuejun Li, Yaoyan Li, Mengfan Yan, Ping Xian, Ying Chang, Xi Chen, et Nai-jun Tang. 2019. « BDE-47 Decreases Progesterone Levels in BeWo Cells by Interfering with Mitochondrial

Functions and Genes Related to Cholesterol Transport ». *Chemical Research in Toxicology*, février. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00312.

Sher, Noa, Natalie Yivgi-Ohana, et Joseph Orly. 2007. « Transcriptional Regulation of the Cholesterol Side Chain Cleavage Cytochrome P450 Gene (CYP11A1) Revisited: Binding of GATA, Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Response Element-Binding Protein and Activating Protein (AP)-1 Proteins to a Distal Novel Cluster of cis-Regulatory Elements Potentiates AP-2 and Steroidogenic Factor-1-Dependent Gene Expression in the Rodent Placenta and Ovary ». *Molecular Endocrinology* 21 (4): 948-62.

Shih, Monica MC, Yi-Ning Chiu, Meng-Chun Hu, Ing-Chern Guo, et Bon-Chu Chung. 2011. « Regulation of steroid production: Analysis of Cyp11a1 promoter ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 336: 80-84.

Shoaito, Hussein, Julia Petit, Audrey Chissey, Nicolas Auzeil, Jean Guibourdenche, Sophie Gil, Olivier Laprévote, Thierry Fournier, et Séverine A. Degrelle. 2019. « The Role of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor Gamma (PPARγ) in Mono(2-Ethylhexyl) Phthalate (MEHP)-Mediated Cytotrophoblast Differentiation ». *Environmental Health Perspectives* 127 (2): 27003. https://doi.org/10.1289/EHP3730.

Short, Charlotte-Eve S., et Graham P. Taylor. 2014. « Antiretroviral therapy and preterm birth in HIV-infected women ». *Expert Review of Anti-infective Therapy* 12 (3): 293-306. https://doi.org/10.1586/14787210.2014.885837.

Shu, Qun, Wenjiao Li, Jianneng Li, Wangsheng Wang, Chao Liu, et Kang Sun. 2014. « Cross-Talk between CAMP and MAPK Pathways in HSD11B2 Induction by HCG in Placental Trophoblasts ». *PLOS ONE* 9 (9): e107938. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107938.

Sibiude, Jeanne, Josiane Warszawski, Roland Tubiana, Catherine Dollfus, Albert Faye, Christine Rouzioux, Jean-Paul Teglas, Dieudonné Ekoukou, Stéphane Blanche, et Laurent Mandelbrot. 2012. « Premature Delivery in HIV-Infected Women Starting Protease Inhibitor Therapy During Pregnancy: Role of the Ritonavir Boost? » *Clinical Infectious Diseases* 54 (9): 1348-60. https://doi.org/10.1093/cid/cis198.

Simard, Jacques, Marie-Louise Ricketts, Sébastien Gingras, Penny Soucy, F. Alex Feltus, et Michael H. Melner. 2005. « Molecular Biology of the 3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Δ5-Δ4 Isomerase Gene Family ». *Endocrine Reviews* 26 (4): 525-82. https://doi.org/10.1210/er.2002-0050.

Simon, Albane, Josiane Warszawski, Dulanjalee Kariyawasam, Jerome Le Chenadec, Valerie Benhammou, Paul Czernichow, Frantz Foissac, et al. 2011. « Association of Prenatal and Postnatal Exposure to Lopinavir-Ritonavir and Adrenal Dysfunction among Uninfected Infants of HIV-Infected Mothers ». *JAMA* 306 (1): 70-78. https://doi.org/10.1001/jama.2011.915.

Simpson, Sian, Lorna Smith, et James Bowe. 2018. « Placental Peptides Regulating Islet Adaptation to Pregnancy: Clinical Potential in Gestational Diabetes Mellitus ». *Current Opinion in Pharmacology*, • Endocrine & Metabolic Diseases • Gastrointestinal, 43 (décembre): 59-65. https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.004.

Sirianni, R., J. B. Seely, G. Attia, D. M. Stocco, B. R. Carr, V. Pezzi, et W. E. Rainey. 2002. « Liver Receptor Homologue-1 Is Expressed in Human Steroidogenic Tissues and Activates Transcription of Genes Encoding Steroidogenic Enzymes ». *Journal of Endocrinology* 174 (3): R13-17. https://doi.org/10.1677/joe.0.174r013.

Sleiman, Dona, Valérie Goldschmidt, Pierre Barraud, Roland Marquet, Jean-Christophe Paillart, et Carine Tisné. 2012. « Initiation of HIV-1 Reverse Transcription and Functional Role of Nucleocapsid-Mediated TRNA/Viral Genome Interactions ». *Virus Research* 169 (2): 324-39. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.006.

Soares, M J, et S R Glasser. 1987. « Placental lactogen production and functional differentiation of rat trophoblast cells in vitro ». *Journal of reproduction and fertility* 79 (2): 335-41.

Song, Y., J. Keelan, et J. T. France. 1996. « Activin-A Stimulates, While Transforming Growth Factor B1 Inhibits,Chorionic Gonadotrophin Production and Aromatase Activity in Cultured Human Placental Trophoblasts ». *Placenta* 17 (8): 603-10. https://doi.org/10.1016/S0143-4004(96)80078-6.

Srinivas, Ranga V., David Middlemas, Pat Flynn, et Arnold Fridland. 1998. « Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors Serve as Substrates for Multidrug Transporter Proteins MDR1 and MRP1 but Retain Antiviral Efficacy in Cell Lines Expressing These Transporters ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (12): 3157-62. https://doi.org/10.1128/AAC.42.12.3157.

Stringer, Elizabeth M., Michelle A. Kendall, Shahin Lockman, Thomas B. Campbell, Karin Nielsen-Saines, Fred Sawe, Susan Cu-uvin, Xingye Wu, et Judith S. Currier. 2018. « Pregnancy outcomes among HIV-infected women who conceived on antiretroviral therapy ». *PLoS ONE* 13 (7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199555.

Takahashi, Nozomi, Miyuki Harada, Yasushi Hirota, Lin Zhao, Jerilee M. K. Azhary, Osamu Yoshino, Gentaro Izumi, et al. 2017. « A Potential Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Progesterone Deficiency in Obese Women ». *Endocrinology* 158 (1): 84-97. https://doi.org/10.1210/en.2016-1511.

Tal, Reshef, Hugh S Taylor, Richard O Burney, Stephen B Mooney, et Linda C Giudice. 2015. « Endocrinology of Pregnancy ». Endotext. 2015. https://www.endotext.org/chapter/endocrinology-of-pregnancy-2/.

Tapia-Pizarro, Alejandro, Sebastián Archiles, Felipe Argandoña, Cecilia Valencia, Keyla Zavaleta, M. Cecilia Johnson, Reinaldo González-Ramos, et Luigi Devoto. 2017. « HCG Activates Epac-Erk1/2 Signaling Regulating Progesterone Receptor Expression and Function in Human Endometrial Stromal Cells ». *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 23 (6): 393-405. https://doi.org/10.1093/molehr/gax015.

Taura, Manabu, Ryusho Kariya, Eriko Kudo, Hiroki Goto, Takao Iwawaki, Masayuki Amano, Mary Ann Suico, Hirofumi Kai, Hiroaki Mitsuya, et Seiji Okada. 2013. « Comparative Analysis of ER Stress Response into HIV Protease Inhibitors: Lopinavir but Not Darunavir Induces Potent ER Stress Response via ROS/JNK Pathway ». *Free Radical Biology and Medicine* 65 (décembre): 778-88. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.161.

Taylor, Anthony H., Penny C. McParland, David J. Taylor, et Stephen C. Bell. 2009. « The cytoplasmic 60 kDa progesterone receptor isoform predominates in the human amniochorion and placenta at term ». *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 7 (22): 1-11.

« Tenofovir ». 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548917/.

Torres, G., V. García, E. Sánchez, A. Segarra, B.K. Patterson, et L.M. Meléndez-Guerrero. 2001. « Expression of the HIV-1 Co-Receptors CCR5 and CXCR4 on Placental Macrophages and the Effect of IL-10 on Their Expression ». *Placenta* 22 (avril): S29-33. https://doi.org/10.1053/plac.2001.0652.

Townsend, Claire L., Mario Cortina-Borja, Catherine S. Peckham, Annemiek de Ruiter, Hermione Lyall, et Pat A. Tookey. 2008. « Low Rates of Mother-to-Child Transmission of HIV Following Effective Pregnancy Interventions in the United Kingdom and Ireland, 2000–2006 ». *AIDS* 22 (8): 973–981. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282f9b67a.

Tsampalas, Marie, Virginie Gridelet, Sarah Berndt, Jean-Michel Foidart, Vincent Geenen, et Sophie Perrier d'Hauterive. 2010. « Human Chorionic Gonadotropin: A Hormone with Immunological and

Angiogenic Properties ». *Journal of Reproductive Immunology* 85 (1): 93-98. https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.11.008.

Tuckey, Robert C. 2005. « Progesterone Synthesis by the Human Placenta ». *Placenta* 26 (4): 273-81. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.06.012.

Turcu, Adina F., et Richard J. Auchus. 2015. « Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia ». *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 44 (2): 275-96. https://doi.org/10.1016/j.ecl.2015.02.002.

Vadlapatla, R K, A D Vadlapudi, D Pal, M Mukherji, et A K Mitra. 2014. « Ritonavir inhibits HIF-1α-mediated VEGF expression in retinal pigment epithelial cells in vitro ». *Eye* 28 (1): 93-101. https://doi.org/10.1038/eye.2013.240.

Vaillant, Sabine. s. d. « Le placenta : rôle, constitution et anomalies (placenta praevia) ». Futura. Consulté le 6 avril 2020. https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-tout-savoir-grossesse-1044/page/6/.

Vannuccini, Silvia, Caterina Bocchi, Filiberto M. Severi, John R. Challis, et Felice Petraglia. 2016. « Endocrinology of Human Parturition ». *Annales d'Endocrinologie*, 59e Journées Internationales d'Endocrinologie, Clinique Henri-Pierre Klotz (09/06-10/06/16, Paris) Hormones et grossesse / Hormones and Pregnancy, 77 (2): 105-13. https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.025.

Vause, Sarah, et Daljit K Saroya. 2005. « Functions of the Placenta », 4.

Vidricaire, Gaël, Sonia Gauthier, et Michel J. Tremblay. 2007. « HIV-1 Infection of Trophoblasts Is Independent of Gp120/CD4 Interactions but Relies on Heparan Sulfate Proteoglycans ». *The Journal of Infectious Diseases* 195 (10): 1461-71. https://doi.org/10.1086/515576.

Vidricaire, Gaël, et Michel G. Tremblay. 2004. « Vers une compréhension du mécanisme de transmission du VIH in utero ». *médecine/sciences* 20 (8-9): 784-87. https://doi.org/10.1051/medsci/2004208-9784.

Wadsack, C, A Hammer, S Levak-Frank, G Desoye, K. F Kozarsky, B Hirschmugl, W Sattler, et E Malle. 2003. « Selective Cholesteryl Ester Uptake from High Density Lipoprotein by Human First Trimester and Term Villous Trophoblast Cells ». *Placenta* 24 (2): 131-43. https://doi.org/10.1053/plac.2002.0912.

Wald, Nicholas J, Anne Kennard, Allan Hackshaw, et Ali McGuire. 1997. « Antenatal Screening for Down's Syndrome ». *Journal of Medical Screening* 4 (4): 181-246. https://doi.org/10.1177/096914139700400402.

Walker, O'Llenecia S., Rehginald Ragos, Michael K. Wong, Mohamed Adam, Anson Cheung, et Sandeep Raha. 2020. « Reactive Oxygen Species from Mitochondria Impacts Trophoblast Fusion and the Production of Endocrine Hormones by Syncytiotrophoblasts ». Édité par Kang Sun. *PLOS ONE* 15 (2): e0229332. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229332.

Wang, J.-d., Z. Jian-bao, Y. Fu, W.-l. Shi, G.-m. Qiao, Y.-q. Wang, J. Chen, et P.-d. Zhu. 1996. « Progesterone Receptor Immunoreactivity at the Maternofetal Interface of First Trimester Pregnancy: A Study of the Trophoblast Population ». *Human Reproduction* 11 (2): 413-19. https://doi.org/10.1093/HUMREP/11.2.413.

Wang, Ji-meng, Hong-xi Zhao, Li Wang, Zhi-ying Gao, et Yuan-qing Yao. 2013. « The Human Leukocyte Antigen G Promotes Trophoblast Fusion and β-HCG Production through the Erk1/2 Pathway in Human Choriocarcinoma Cell Lines ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434 (3): 460-65. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.004.

Wang, Weimin, Guiqin Bai, Yuting Zhang, Ting Zhang, Chen Li, Yongxing Yuan, Sixue Liu, et Caili Wang. 2018. « HBxAg suppresses cell apoptosis and promotes the secretion of placental hormones in human placental trophoblats via activation of the EGF/Akt pathway ». *Cell Biol Int* 42: 237-47. https://doi.org/10.1002/cbin.10891.

Wang, Weiping, Rong Wang, Qiao Zhang, Gil Mor, et Huidong Zhang. 2018. « 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 ». *Environmental Pollution* 233 (février): 820-32. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.022.

Wang, W. S., C. Liu, W. J. Li, P. Zhu, J. N. Li, et K. Sun. 2014. « Involvement of CRH and HCG in the Induction of Aromatase by Cortisol in Human Placental Syncytiotrophoblasts ». *Placenta* 35 (1): 30-36. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.10.018.

Wang, Xin, Tatsuhiko Furukawa, Takao Nitanda, Mika Okamoto, Yoshikazu Sugimoto, Shin-Ichi Akiyama, et Masanori Baba. 2003. « Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) Induces Cellular Resistance to HIV-1 Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors ». *Molecular Pharmacology* 63 (1): 65-72. https://doi.org/10.1124/mol.63.1.65.

Washington, C B, G E Duran, M C Man, B I Sikic, et T F Blaschke. 1998. « Interaction of anti-HIV protease inhibitors with the multidrug transporter P-glycoprotein (P-gp) in human cultured cells ». *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 19 (3): 203-9.

Wasilewski, Michał, Martina Semenzato, Susanne M. Rafelski, Jennifer Robbins, Anna I. Bakardjiev, et Luca Scorrano. 2012. « Optic Atrophy 1-Dependent Mitochondrial Remodeling Controls Steroidogenesis in Trophoblasts ». *Current Biology* 22 (13): 1228-34. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.054.

Weedon-Fekjær, M.S., et K. Taskén. 2012. « Review: Spatiotemporal Dynamics of HCG/CAMP Signaling and Regulation of Placental Function ». *Placenta* 33 (février): S87-91. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.003.

Weiss, Robin A. 2013. « Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection ». *BMC Biology* 11 (mai): 57. https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-57.

Wice, B, D Menton, H Geuze, et AL Schwartz. 1990. « Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro ». *Experimental Cell Research* 186 (2): 306-16.

Wide, M, H Persson, O Lundkvist, et L Wide. 1988. « Localization of mRNA for the beta-subunit of placental hCG by in situ hybridization ». *Acta endocrinologica* 119 (1): 69-74.

Wilson, Rachel A, et Sam A Mesiano. 2020. « Progesterone Signaling in Myometrial Cells: Role in Human Pregnancy and Parturition ». *Current Opinion in Physiology* 13 (février): 117-22. https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.09.007.

World Health Organization. 2016. *Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach.* http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208825/1/9789241549684_eng.pdf.

Xiang, Jin, Guihong Sun, Yongxin Mu, Hui Liu, Ying Liu, Fang Yang, Jian Xu, et Hong Ding. 2011. « Ritonavir Stimulates Foam Cell Formation by Activating PKC ». *Chemico-Biological Interactions* 194 (2-3): 127-33. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.09.005.

Xiang, Jin, Ying Wang, Ke Su, Min Liu, Peng-Chao Hu, Tian Ma, Jia-Xi Li, Lei Wei, Zhongliang Zheng, et Fang Yang. 2014. « Ritonavir Binds to and Downregulates Estrogen Receptors: Molecular Mechanism of Promoting Early Atherosclerosis ». *Experimental Cell Research* 327 (2): 318-30. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.002.

Xu, Shengyu, Katja Linher-Melville, Burton B. Yang, De Wu, et Julang Li. 2011. « Micro-RNA378 (MiR-378) Regulates Ovarian Estradiol Production by Targeting Aromatase ». *Endocrinology* 152 (10): 3941-51. https://doi.org/10.1210/en.2011-1147.

Yamamoto, T., K. Matsumoto, H. Kurachi, Y. Okamoto, Y. Nishio, M. Sakata, K. Tasaka, et Y. Murata. 2001. « Progesterone Inhibits Transcriptional Activation of Human Chorionic Gonadotropin-Alpha Gene through Protein Kinase A Pathway in Trophoblast Cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 182 (2): 215-24. https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00580-9.

Yancu, Debbie, Cathy Vaillancourt, et J. Thomas Sanderson. 2019. « Evaluating the Effects on Steroidogenesis of Estragole and Trans-Anethole in a Feto-Placental Co-Culture Model ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 498 (décembre): 110583. https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110583.

Yang, Diqi, Lei Wang, Pengfei Lin, Tingting Jiang, Nan Wang, Fan Zhao, Huatao Chen, et al. 2017. « An immortalized steroidogenic goat granulosa cell line as a model system to study the effect of the endoplasmic reticulum (ER)-stress response on steroidogenesis ». *J. Reprod. Dev* 63 (1): 27-36.

Yang, Ruifang, Xingji You, Xiaolu Tang, Lu Gao, et Xin Ni. 2006. « Corticotropin-Releasing Hormone Inhibits Progesterone Production in Cultured Human Placental Trophoblasts ». *Journal of Molecular Endocrinology* 37 (3): 533-40. https://doi.org/10.1677/jme.1.02119.

Yeh, Rosa F., Vincent E. Gaver, Kristine B. Patterson, Naser L. Rezk, Faustina Baxter-Meheux, Michael J. Blake, Joseph J. Jr Eron, Cheri E. Klein, John C. Rublein, et Angela D. M. Kashuba. 2006. « Lopinavir/Ritonavir Induces the Hepatic Activity of Cytochrome P450 Enzymes CYP2C9, CYP2C19, and CYP1A2 But Inhibits the Hepatic and Intestinal Activity of CYP3A as Measured by a Phenotyping Drug Cocktail in Healthy Volunteers ». *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 42 (1): 52–60. https://doi.org/10.1097/01.qai.0000219774.20174.64.

Yoshie, M., K. Kaneyama, K. Kusama, C. Higuma, H. Nishi, K. Isaka, et K. Tamura. 2010. « Possible Role of the Exchange Protein Directly Activated by Cyclic AMP (Epac) in the Cyclic AMP-Dependent Functional Differentiation and Syncytialization of Human Placental BeWo Cells ». *Human Reproduction* 25 (9): 2229-38. https://doi.org/10.1093/humrep/deq190.

Yung, Yuval, Ettie Maman, Libby Ophir, Nirit Rubinstein, Eran Barzilay, Gil M. Yerushalmi, et Ariel Hourvitz. 2014. « Progesterone antagonist, RU486, represses LHCGR expression and LH/hCG signaling in cultured luteinized human mural granulosa cells ». *Gynecological Endocrinology* 30 (1): 42-47. https://doi.org/10.3109/09513590.2013.848426.

Zachar, V, P Ebbesen, R A Thomas, V Zacharova, et A S Goustin. 1994. « Basal and Tat-transactivated expression from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in human placental trophoblast rules out promoter-enhancer activation as the partial block to viral replication ». *The Journal of general virology* 75 (Pt 6) (juin): 1461-68.

Zachar, Vladimir, Trine Fink, Uffe Koppelhus, et Peter Ebbesen. 2004. « Role of Placental Cytokines in Transcriptional Modulation of HIV Type 1 in the Isolated Villous Trophoblast ». Research-article. Https://Home-Liebertpub-Com.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/Aid. Mary Ann Liebert, Inc. World. 5 juillet 2004. https://doi.org/10.1089/08892220260190317.

Zachariades, E., D. Mparmpakas, Y. Pang, M. Rand-Weaver, P. Thomas, et E. Karteris. 2012. « Changes in Placental Progesterone Receptors in Term and Preterm Labour ». *Placenta* 33 (5): 367-72. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.002.

Zaidi, Syed Kashif, Wen-Jun Shen, Stefanie Bittner, Alex Bittner, Mark P. McLean, Jiahuai Han, Roger J. Davis, Fredric B. Kraemer, et Salman Azhar. 2014. « P38 MAPK Regulates Steroidogenesis through Transcriptional Repression of STAR Gene ». *Journal of Molecular Endocrinology* 53 (1): 1-16. https://doi.org/10.1530/JME-13-0287.

Zha, Beth S., Xiaoshan Wan, Xiaoxuan Zhang, Weibin Zha, Jun Zhou, Martin Wabitsch, Guangji Wang, Vijay Lyall, Phillip B. Hylemon, et Huiping Zhou. 2013. « HIV Protease Inhibitors Disrupt Lipid Metabolism by Activating Endoplasmic Reticulum Stress and Inhibiting Autophagy Activity in Adipocytes ». Édité par Hongyuan Yang. *PLoS ONE* 8 (3): e59514. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059514.

Zhang, Chen-ling, Hui Wang, Chang-you Yan, Xue-feng Gao, et Xiao-juan Ling. 2017. « Deregulation of RUNX2 by MiR-320a Deficiency Impairs Steroidogenesis in Cumulus Granulosa Cells from Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Patients ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482 (4): 1469-76. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.059.

Zhang, Yi, et Hong Xu. 2016. « Translational Regulation of Mitochondrial Biogenesis ». *Biochemical Society Transactions* 44 (6): 1717-24. https://doi.org/10.1042/BST20160071C.

Zhou, Hong, Guodong Fu, Hui Yu, et Chun Peng. 2009. « Transforming growth factor-beta inhibits aromatase gene transcription in human trophoblast cells via the Smad2 signaling pathway ». *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E* 7 (décembre): 146. https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-146.

Zhu, Xiao-Dong, Bartolome Bonet, et Robert H. Knopp. 1997. « 17β-Estradiol, Progesterone, and Testosterone Inversely Modulate Low-Density Lipoprotein Oxidation and Cytotoxicity in Cultured Placental Trophoblast and Macrophages ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 177 (1): 196-209. https://doi.org/10.1016/S0002-9378(97)70462-9.

« Zidovudine ». 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548210/.

Zosmer, A., M. G. Elder, et M. H. Sullivan. 1997. « Second Messengers and the Control of Progesterone Production from First Trimester Trophoblast ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 62 (2-3): 201-5. https://doi.org/10.1016/s0960-0760(97)00025-3.

Annexes

Instituts thématiques

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT
RECHERCHE NON INTERVENTIONNELLE

Développement et fonctions du placenta humain normal et pathologique (DevPlac)

VERSION N°2.0 du 31/08/2015

N° Gestionnaire	N°IDRCB	N° CPP	N° MESR	N° CNIL
C14-22	2014-A00719-38	2015-mai-13909	DC-2014-2247	1848687

Organisme responsable : Inserm ITMO Santé Publique Pôle Recherche Clinique (PRC) 8 rue de la Croix Jarry 75654 Paris Cedex 13	Responsable de la recherche : **Docteur, Thierry, Fournier** Fonction : Directeur de l'Unité Inserm U1139 Unité Inserm d'affiliation : U1139 Adresse : 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris Tel : 01 53 73 96 00 Fax : 01 44 07 39 92 Email : thierry.fournier@parisdescartes.fr

1. INFORMATION A L'ATTENTION DE LA PARTICIPANTE

Madame,

Nous vous proposons de participer à la recherche intitulée :

Développement et fonctions du placenta humain normal et pathologique (DevPlac)

L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) est responsable de cette recherche en tant que gestionnaire.

Le médecin ou la sage-femme _____ (Service _____ de l'Hôpital _____ - ☎ _____) est à votre disposition pour vous présenter la recherche et la façon dont vous pouvez y participer, pour répondre à toutes vos questions et pour vous expliquer ce que vous ne comprenez pas.

1. INFORMATION

Ce document a pour but de vous fournir les informations écrites nécessaires à votre décision. Nous vous remercions de le lire attentivement. N'hésitez pas à poser des questions au médecin ou à la sage-femme si vous voulez plus d'informations. En fin de document, si vous acceptez de participer à cette étude, le médecin ou la sage-femme vous demandera de compléter l'emplacement qui vous est réservé en y apposant votre signature et la date de votre consentement.

2. CONSENTEMENT

Votre participation est volontaire : vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à cette recherche médicale.

Si vous décidez de participer, sachez que vous pourrez retirer votre consentement à la recherche tant que le prélèvement de votre placenta et de vos urines n'aura pas été réalisé, et ce sans encourir aucune responsabilité ni aucun préjudice de ce fait. Cela ne changera en rien les rapports que vous avez avec votre médecin ou avec votre sage-femme. Nous vous demanderons simplement de les informer. Vous n'aurez pas à justifier votre décision.

Si vous ne souhaitez pas participer à la recherche, il suffit que vous l'indiquiez au médecin ou à la sage-femme. Vous n'aurez pas à vous justifier et la qualité des soins dont vous ou votre bébé devez bénéficier n'en sera pas modifiée.

3. CADRE GENERAL ET OBJECTIF DE LA RECHERCHE

Le placenta est un organe essentiel au bon déroulement de la grossesse. Il apporte au foetus l'oxygène et les nutriments vitaux nécessaires à sa croissance. Il sécrète par ailleurs de nombreuses hormones qui permettent à la mère de s'adapter à la grossesse. Lorsqu'il y a une anomalie ou un mauvais fonctionnement du placenta, le développement et la croissance du foetus s'en trouvent altérés.
Le but de cette recherche est de faire progresser les connaissances sur les fonctions du placenta au cours de la grossesse et notamment d'évaluer l'exposition du placenta à des polluants environnementaux. En effet, le placenta est un organe indispensable par ces fonctions de filtre, d'échange et hormonal, au bon déroulement de la grossesse et au développement et à la croissance du foetus. Nos recherches, au delà de l'apport de nouvelles connaissances, contribuent à améliorer le dépistage de certaines pathologies de la grossesse en développant de nouveaux biomarqueurs et d'adapter ainsi la prise en charge de la femme enceinte.

4. DEROULEMENT DE LA RECHERCHE

Actes prévus par la recherche : Recueil de votre placenta et de vos urines à l'issue de votre accouchement et de certaines données cliniques (terme de votre grossesse, poids et sexe du bébé…).
L'utilisation de votre placenta à des fins de recherche médicale ne présente pas de contre-indication, ne modifiera pas votre prise en charge médicale et n'entraînera aucune conséquence ni pour vous ni pour votre bébé.

5. DROIT D'ETRE INFORME DES RESULTATS GLOBAUX

Vous avez le droit d'être informée des résultats globaux de la recherche à l'issue de celle-ci, conformément au dernier alinéa de l'article L.1122-1 du Code de la Santé Publique, en adressant un courriel à Thierry Fournier (thierry.fournier@parisdescartes.fr).

Les résultats de cette recherche peuvent être présentés à des congrès ou dans des publications scientifiques. Cependant, vos données personnelles ne seront aucunement identifiables car elles auront été préalablement rendues complètement anonymes.

6. CONFIDENTIALITE ET TRAITEMENTS DES DONNEES INFORMATISEES

Dans le cadre de la recherche médicale à laquelle l'Inserm vous propose de participer, un traitement de vos données personnelles va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de cette dernière. Les données concernant votre grossesse resteront strictement anonymes.

7. INFORMATIONS SUR LE DEVENIR DE VOS PRELEVEMENTS EN COURS ET A L'ISSUE DE LA RECHERCHE

Au cours de la recherche
Vos prélèvements (tissus et cellules placentaires et urines) seront analysés afin de mieux comprendre le développement et les fonctions du placenta au cours de la grossesse. La recherche de polymorphisme génétique de certains gènes placentaires d'intérêt (analyse de votre ADN) pourra également être réalisée.

En fin de recherche
Si vos prélèvements ne sont pas utilisés en totalité à la fin de cette recherche, ceux-ci seront conservés 5 ans sous la responsabilité de Thierry Fournier (☎ 01 53 73 96 00) et pourront être utilisés ultérieurement pour d'autres recherches portant sur le développement et les fonctions du placenta humain, dans le respect de la confidentialité de votre identité.

8. CADRE LEGISLATIF DE LA RECHERCHE MEDICALE

Cette recherche est réalisée conformément aux dispositions légales en vigueur régissant les recherches médicales.

Ainsi cette recherche est réalisée conformément aux dispositions :

- De la loi relative à la bioéthique (loi du 7 juillet 2011 modifiée par la loi du 6 août 2013)
- De la loi relative l'Informatique, aux fichiers et aux libertés (loi du 6 janvier 1978 modifiée par la loi relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements de données à caractère personnel du 6 août 2004)
- Du Code de la Santé Publique

Elle a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes IDF I le 19/09/2015 et l'autorisation de la CNIL le 08/04/2015.

2. RECUEIL DU CONSENTEMENT DE LA PARTICIPANTE

Je soussignée _____ atteste avoir bien lu et pris connaissance des informations relatives à ma participation à la recherche intitulée « ***Développement et fonctions du placenta humain normal et pathologique (DevPlac)*** » exposées par écrit sur les pages précédentes (pages 1 à 3 : 1- Information de la participante,) et transmises oralement par le médecin ou la sage-femme _____, et avoir obtenu toutes les réponses aux questions que je lui ai posées.

- J'ai bien compris que ma participation à la recherche consiste à accepter que mon placenta et mes urines soient utilisés à des fins de recherche.
- J'ai été avisé(e) qu'aucune indemnisation n'est prévue pour cette recherche
- J'ai été informée que je peux retirer mon consentement de participation à cette recherche quelles que soient mes raisons et sans avoir à m'en justifier, sans supporter aucune responsabilité et sans encourir aucun préjudice. A cet égard, j'ai bien été informée que le retrait de mon consentement pourra s'effectuer à tout moment et à condition que le prélèvement de mon placenta et de mes urines ne soit pas encore intervenu. J'en informerai simplement le médecin ou la sage-femme.

CONSENTEMENT RELATIF AUX DONNEES PERSONNELLES

J'accepte que les données me concernant enregistrées à l'occasion de cette recherche puissent faire l'objet d'un traitement informatique par le gestionnaire ou pour son compte. Ces données concernent le terme de la grossesse, le poids et le sexe de mon bébé.

J'accepte également que l'ensemble de mon dossier médical puisse être consulté par les personnes habilitées dans le cadre de cette recherche, dans le respect de la confidentialité de mes données et de mon identité.

CONSENTEMENT RELATIF AU PRELEVEMENT DU PLACENTA (ET DE SES CELLULES) ET DES URINES

J'accepte le prélèvement, la conservation et l'utilisation de mon placenta (et de ses cellules) et de mes urines tels que prévus dans le cadre de ce protocole.

J'ai été informée que le protocole de la recherche prévoit de conserver les prélèvements biologiques après la fin de cette recherche, afin de pouvoir les réutiliser dans des recherches ultérieures :

J'autorise la conservation et l'utilisation de mes prélèvements biologiques pour des recherches ultérieures portant sur le développement et les fonctions du placenta humain. Ces recherches pourront être menées par d'autres équipes de recherche, privées ou publique, nationales ou internationales.

J'ai été informée que le protocole de la recherche prévoit de réaliser des analyses de mon ADN (examen de mes caractéristiques génétiques) :

J'accepte par ma signature que ces analyses génétiques soient réalisées sur mes prélèvements.

☐ Je m'oppose, en cochant la case ci-contre, à la réalisation de toute analyse génétique sur mes prélèvements.

Je certifie que je ne suis pas sous sauvegarde de la justice.

SIGNATURES

J'accepte librement et volontairement de participer à la recherche décrite ci-dessus. Mon consentement ne décharge en rien le médecin ou la sage-femme et le gestionnaire de l'ensemble de leurs responsabilités et je conserve tous mes droits garantis par la loi.

Personne donnant son consentement :	
NOM, Prénom :	Date : Signature :
Médecin ou Sage-femme ayant délivré l'information orale et ayant recueilli le consentement écrit :	
NOM, Prénom : ☎ :	Date : Signature :

La dernière page de ce document doit comporter les signatures du médecin ou de la sage-femme et de la personne sollicitée et doit être datée de la main de la personne qui a consenti dans l'emplacement prévu et qui lui est réservé. Le paraphe n'engage en rien la personne participante et son recueil ne peut lui être imposé.

Ce document d'information et de consentement est établi en deux exemplaires originaux : un exemplaire est remis à la personne, un exemplaire est conservé pendant la durée légale de conservation des documents de la recherche.

Pregnancy Hypertension 12 (2018) 82–83

Contents lists available at ScienceDirect

Pregnancy Hypertension

journal homepage: www.elsevier.com/locate/preghy

Urinary sFlt-1 and PlGF levels are strongly correlated to serum sFlt-1/PlGF ratio and serum PlGF in women with preeclampsia

Dear Editor, due to mortality rate of preeclampsia (PE), many recent researches aimed to validate a biological test able to predict PE risk. In the daily practice, a rapid test is still lacking to improve the daily monitoring of women with PE risk factors. In this preliminary study, we found that urinary angiogenic factors levels are strongly correlated to their serum levels in women suspected for preeclampsia. Many studies have assessed the predictive, diagnostic and prognostic value of serum angiogenic factors, mainly the soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) and the placental growth factor (PlGF). Some authors showed that low serum PlGF has high sensitivity and high negative predictive value for PE [1,2]. The excellent negative predictive value of a low serum ratio sFlt-1/PlGF has been recently demonstrated [3]. Interestingly some studies showed that severe PE is associated with increased excretion of sFlt-1 and a decreased excretion of PlGF in urines [4,5]. We aimed to evaluate if sFlt-1 and/or PlGF could be eligible for the design of a rapid urinary test of PE risk, and therefore we studied their concentrations in urines and the relation between serum and urinary levels.

We included twenty-five patients suspected for PE followed at the Port-Royal maternity (ANR APHERESE 2016-A00983-48) [mean maternal age ± SD 36.5 ± 4.6 years; term of pregnancy range 24–38 WG; all systolic blood pressures > 140 mmHg and/or diastolic blood pressures > 90 mmHg]. Urinary and serum samples were collected simultaneously (n = 35, stored as part of Perinat collection® ANR-10-EQPX-0010). We first checked the analytical performances of the measurement of sFlt-1 and PlGF in urines using the serum assay developed on the COBAS 8000 analyzer (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). Then we measured sFlt-1 and PlGF serum and urinary values, total proteinuria and creatininuria. Statistical analysis (Pearson test for correlation) was performed using the PASW statistics software (SPSS Inc., Chicago (IL), USA).

sFlt-1 and PlGF serum assays were suitable in urine. Intra-assay CVs were < 2.8% and < 2.5%, inter-assay CVs were < 3.9% and < 3.6% for concentrations ranging from 26.3 to 60.9 pg/ml for sFlt-1 and 24.4 to 236.6 pg/ml for PlGF. The accuracy evaluated by sequential dilutions and overload (range 21.5–312.7 pg/mL for sFlt-1 and 19.4–173.0 pg/mL for PlGF) was acceptable, fluctuating between 100.4% and 108.3% for sFlt-1 and 100.6% and 108.7% for PlGF. In urines samples from women suspected for PE, mean total proteinuria was 222 mg/24 h (range 23–1442 mg/24 h). Mean serum sFlt-1/PlGF ratio was 294.7 (range 0.3–1888). Mean urinary sFlt-1 and PlGF concentrations were respectively 64.4 and 102.4 pg/mL (range 28.14–228.7 and 4.59–1597 pg/ml). Urinary sFlt-1 levels were more strongly correlated with the serum sFlt-1/PlGF ratios (p-value = $1.23.10^{-11}$ ρ = 0.870) (Fig. 1) than urinary PlGF levels were (p-value = 0.072 ρ = −0.313). Urinary PlGF levels were strongly correlated with serum levels (Fig. 1, Table 1), at a less extend for sFlt1 (Table 1). The results were not influenced by adjustment using creatininuria or proteinuriua (Table 1). Only urinary sFlt1 level was correlated to proteinuria (p-value = <

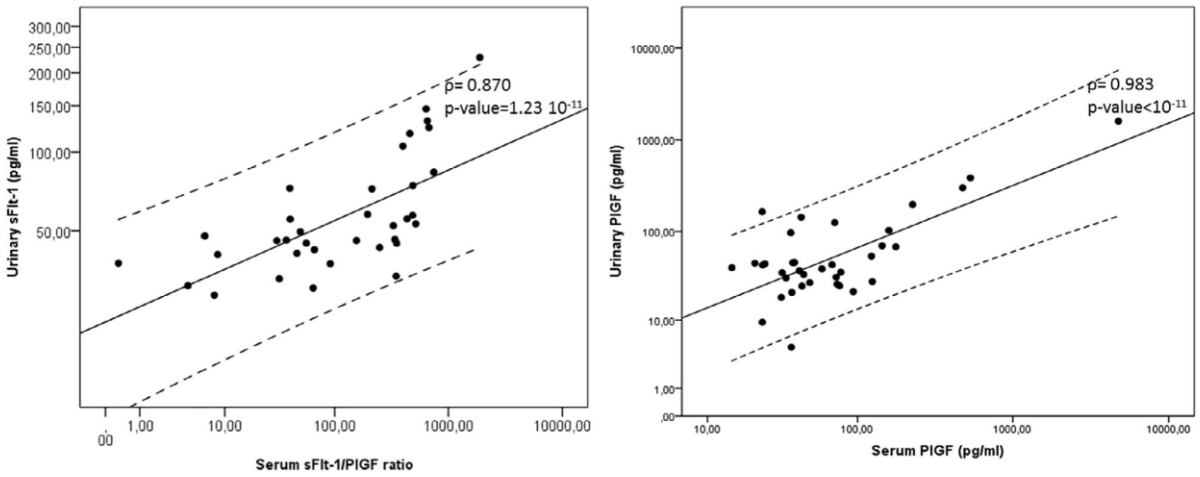


Fig. 1. Correlation of serum sFlt-1/PlGF ratio versus urinary sFlt-1 level (pg/ml) and urinary PLGF versus serum PlGF. Statistical analysis by Pearson test (dot plots limit 95% CI).

https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.03.011
Received 28 November 2017; Received in revised form 8 March 2018; Accepted 23 March 2018
Available online 26 March 2018
2210-7789/ © 2018 International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Pearson correlation tests for urinary VS serum parameters.

Correlation	ρ	p value
Urinary PlGF VS serum PlGF	0.983	$< 10^{-11}$
Urinary PlGF /creatininuria VS serum PlGF	0.808	$< 10^{-7}$
Urinary PlGF /proteinuria VS serum PlGF	0.810	$< 10^{-7}$
Urinary sflt1 VS serum sFlt1	0.679	$< 10^{-5}$
Urinary sflt1/creatininuria VS serum sFlt1	0.672	$< 10^{-4}$
Urinary sflt1/proteinuria VS serum sFlt1	−0.068	0.704

10^{-3} ρ = 0.495), not urinary PlGF. Notably, correlation of serum vs urinary PlGF for the population with PlGF serum levels < 100 pg/ml was not significant (n = 27 p-value = 0.874 ρ = 0.0325), but highly significant for the population with PlGF serum levels > 100 pg/ml (n = 8 p-value $< 10^{-5}$ ρ = 0.971). Dispersion rates were different for the two tests (Fig. 1), and serum sFlt-1/PlGF ratio explained only 75.6% of the variance of urinary sFlt1, whereas the variance of urinary PlGF was explained at 97.7% by serum PlGF.

We highlight a strong positive correlation between high urinary PlGF levels (above 100 pg/ml) and the serum PlGF level, with a tight dispersion compatible with clinical use. The differences between PlGF and sFlt1 dispersion rates could be explained by their differences in glomerular filtration properties linked to their respective sizes [5]. This pilot study lacks some power with only eight patients with serum PlGF levels above 100 pg/mL but these results encourage us to plan a prospective study with a larger number of patients. These works are stages in the development of a semi-quantitative urinary test that would allow to monitor every month the urinary PlGF during pregnancy.

Conflicts of interest

J. Guibourdenche and V. Tsatsaris are occasional consultants for Roche Diagnostics. The other authors report no conflicts.

Funding

This work was supported by the French National Research Agency (ANR) (grant : APHERESE 2016-A00983-48).

References

[1] J. Sibiude, J. Guibourdenche, M.D. Dionne, C. Le Ray, O. Anselem, R. Serreau, F. Goffinet, V. Tsatsaris, Placental growth factor for the prediction of adverse outcomes in patients with suspected preeclampsia or intrauterine growth restriction, PLoS One 7 (11) (2012) e50208.

[2] L.C. Chappell, S. Duckworth, P.T. Seed, M. Griffin, J. Myers, L. Mackillop, N. Simpson, J. Waugh, D. Anumba, L.C. Kenny, C.W. Redman, A.H. Shennan, Diagnostic accuracy of placental growth factor in women with suspected preeclampsia: a prospective multicenter study, Circulation 128 (19) (2013) 2121–2131.

[3] H. Zeisler, E. Llurba, F. Chantraine, M. Vatish, A.C. Staff, M. Sennstrom, M. Olovsson, S.P. Brennecke, H. Stepan, D. Allegranza, P. Dilba, M. Schoedl, M. Hund, S. Verlohren, Predictive value of the sFlt-1:PlGF ratio in women with suspected preeclampsia, N. Engl. J. Med. 374 (1) (2016) 13–22.

[4] R.J. Levine, R. Thadhani, C. Qian, C. Lam, K.H. Lim, K.F. Yu, A.L. Blink, B.P. Sachs, F.H. Epstein, B.M. Sibai, V.P. Sukhatme, S.A. Karumanchi, Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia, JAMA 293 (1) (2005) 77–85.

[5] C.S. Buhimschi, L. Magloire, E. Funai, E.R. Norwitz, E. Kuczynski, R. Martin, S. Richman, S. Guller, C.J. Lockwood, I.A. Buhimschi, Fractional excretion of angiogenic factors in women with severe preeclampsia, Obstet. Gynecol. 107 (5) (2006) 1103–1113.

Marylise Hebert-Schuster[a,b,*], Thimali Ranaweera[a], Camille Fraichard[b], Antoine Gaudet-Chardonnet[c], Vassilis Tsatsaris[b,c], Jean Guibourdenche[a,b], Edouard Lecarpentier[b,c]

[a] *Department of Automated Biology and Hormonology, Cochin Hospital, GH Hôpitaux Universitaires Paris Centre, AP-HP, Paris, France*

[b] *INSERM UMR-S 1139, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, Paris, France*

[c] *Department of Obstetrics and Gynecology, Port-Royal Maternity, GH Hôpitaux Universitaires Paris Centre, AP-HP, Paris, France*

E-mail address: marylise.hebert-schuster@parisdescartes.fr

* Corresponding author at: INSERM UMRSs 1139, Faculty of Pharmacy, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

Original Article

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Functionalized Magnetic Beads in a Microfluidic Device to Improve the Angiogenic Balance in Preeclampsia

Laura Trapiella-Alfonso,* Lucile Alexandre,* Camille Fraichard, Kelly Pons, Simon Dumas, Lucie Huart, Jean-François Gaucher, Marylise Hebert-Schuster, Jean Guibourdenche, Thierry Fournier, Michel Vidal, Isabelle Broutin, Laurence Lecomte-Raclet, Laurent Malaquin, Stéphanie Descroix, Vassilis Tsatsaris, Nathalie Gagey-Eilstein,† Edouard Lecarpentier†

Abstract—Preeclampsia is a hypertensive pregnancy disease associated with a massive increase in sFlt-1 (soluble form of the vascular endothelial growth factor 1) in the maternal circulation, responsible for angiogenic imbalance and endothelial dysfunction. Pilot studies suggest that extracorporeal apheresis may reduce circulating sFlt-1 and prolong pregnancy. Nonspecific apheresis systems have potential adverse effects because of the capture of many other molecules. Our concept is based on a specific and competitive apheresis approach using VEGF (vascular endothelial growth factor) functionalized magnetic beads to capture sFlt-1 while releasing endogenous PlGF (placental growth factor) to restore a physiological angiogenic balance. Magnetic beads were functionalized with VEGF to capture sFlt-1. Experiments were performed using PBS, conditioned media from human trophoblastic cells, and human plasma. The proof of concept was validated in dynamic conditions in a microfluidic device as an approach mimicking real apheresis. Magnetic beads were functionalized with VEGF and characterized to evaluate their surface ligand density and recognition capabilities. VEGF-coated magnetic beads proved to be an efficient support in capturing sFlt-1 and releasing PlGF. In static conditions, sFlt-1 concentration decreased by 33±13%, whereas PlGF concentration increased by 27±10%. In dynamic conditions, the performances were improved, with 40% reduction of sFlt-1 and up to 2-fold increase of free PlGF. The sFlt-1/PlGF ratio was reduced by 63% in the plasma of preeclamptic patients. Apheresis was also associated with VEGF release. A ligand-based approach using VEGF-coated beads is an effective approach to the capture of sFlt-1 and the release of endogenous PlGF. It offers new perspectives for the treatment of preeclampsia. (***Hypertension***. 2019;73:00-00. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12380.)** • Online Data Supplement

Key Words: endothelium ■ morbidity ■ preeclampsia ■ placenta ■ pregnancy

Hypertension

Downloaded from http://ahajournals.org by on June 12, 2019

Preeclampsia is a hypertensive disorder of pregnancy associated with substantive maternal and perinatal mortality and morbidity.[1] There is currently no curative treatment for preeclampsia, and only childbirth and delivery of the placenta alleviate maternal symptoms. The development of therapeutic strategies for preeclampsia is one of the highest priorities in perinatal medicine.

During preeclampsia, a massive amount of a sVEGFR1 (soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor 1), also named sFlt-1, is released by the placenta into the maternal circulation, resulting in inhibition of the proangiogenic effects of its ligands, VEGF (vascular endothelial growth factor)-A, and PlGF (placental growth factor) on the maternal endothelium.[2] These angiogenic factors are essential for the survival of endothelium, thus explaining the endothelial dysfunction during preeclampsia.[3,4]

On the basis of compelling evidence that circulating sFlt-1 is a critical and potentially rate-limiting step in the pathobiology of preeclampsia, it is supposed that by reducing its circulating concentrations with an extracorporeal device the disease

Received December 22, 2018; first decision January 17, 2019; revision accepted April 3, 2019.

From the UMR 8638 (L.T.-A., K.P., L.H., M.V., N.G.-E.) and UMR 8038 (L.H., J.-F.G., I.B.), CNRS, Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; UMR 168 CNRS Institut Curie, PSL Research University, Institut Pierre Gilles de Gennes, Paris, France (L.A., S.Dumas, S. Descroix.); Cochin Hospital, Assistance Publique-Hôpital de Paris, DHU Risques et grossesse, Paris Descartes University, INSERM UMR 1139, Fondation PremUp, Paris, France (C.F., M.H.-S., J.G., T.F., V.T.); Cochin Hospital, UF d'Hormonologie, Service de Biologie Automatisée, Paris, France (M.H.-S., J.G.); Université Paris Est Créteil, France (E.L.); INSERM, U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, France (E.L.); URC - CIC P1419, Cochin Hôtel-Dieu Hospital, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, France (L.L.-R.); Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, Service de Gynécologie Obstétrique, France (K.P., E.L.); and LAAS-CNRS, Toulouse, France (L.M.).

*L.T.-A and L.A. are joint first authors.

†N.G.-E. and E.L. are joint last authors.

The online-only Data Supplement is available with this article at https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12380.

Correspondence to Vassilis Tsatsaris, AP-HP, Hôpital Cochin, Port-Royal Maternity, 123 Bd Port-Royal, Paris 75014, France. Email vassilis.tsatsaris@aphp.fr

© 2019 American Heart Association, Inc.

progression could be limited. Based on the positive charge of sFlt-1, dextran sulfate columns have been used to remove excess circulating maternal sFlt-1 during preeclampsia.[5] Thadhani et al[6] have shown that this nonspecific method of apheresis for women with preterm preeclampsia can reduce sFlt-1 concentrations by 18%. A proof-of-concept trial on selective removal of sFlt-1 in healthy volunteers and preeclamptic women using an sFlt-1 antibody-specific adsorption column is ongoing to test the safety and efficacy of this procedure.[7]

The objective of this study was to develop and provide the proof of concept of a selective and competitive apheresis approach to reduce circulating sFlt-1 while increasing free PlGF to restore the physiological angiogenic balance in the maternal circulation. To shift the equilibrium of sFlt-1/PlGF binding, we grafted magnetic beads with ligands of sFlt-1 which competes with PlGF. To increase sFlt-1 capture and optimize equilibrium displacement, we chose to use VEGF as a competitive ligand, which has a >10× greater affinity for sFlt-1 than does PlGF.[8] This competitive biomimetic binding approach captures circulating sFlt-1 while releasing endogenous PlGF, thereby increasing the bioavailability of PlGF and potentiating its proangiogenic effects on maternal endothelial function. To go one step further in validating the potential of our approach, it was integrated in a microfluidic device mimicking a miniaturized extracorporeal circulation system (Figure S1 in the online-only Data Supplement).

Material and Methods

Data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request. Magnetic beads Dynabeads M-280 streptavidin, magnetic support Dynal Dynabeads MPC-DynaMag-96 Side Skirted Magnet, and DynaMag-5 Magnet were from Invitrogen. BSA fraction IV (BSA) and PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} were from Eurobio. Tween 20 was from Sigma-Aldrich. Human recombinant sFlt-1 with an antibody constant fraction (rhVEGFR1/Fc Chimera, Ser27-His687) and human recombinant PlGF (rh PlGF) were from R&D Systems. Kits from R&D systems (Quantikine) or from Roche Diagnostics (Elecsys) were used for the assay of free VEGF, free PlGF, sFlt-1, and sVEGFR-2 (soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor 2).

Bead Functionalization and Characterization

Dynabeads M-280 streptavidin were functionalized with homemade bt-VEGF (biotinylated VEGF, see online-only Data Supplement for $VEGF_{95}$-AVI-biotin expression and purification, AVI being a C-terminus tag sequence of 15 amino acids) or with human anti–Flt-1 biotinylated antibody (R&D Systems). The functionalization was performed following the supplier's information with slight modifications (see SI).

After bead functionalization, 2 tests were performed for their characterization: one to assess the ligand surface density and the other to ensure the ability of the grafted ligand to bind sFlt-1 (see SI).

Proof of Concept With Recombinant Protein

Formation and Assay of sFlt-1/PlGF Complexes

Increasing concentrations of rhVEGFR1/Fc (from 0 to 1000 ng/mL) in PBS/0.1% BSA were added to the same volume of a solution at 4 ng/mL of rhPlGF in PBS/0.1% BSA and the mixture was incubated for 1 hour at 37°C. Complex formation was quantified after assay of free rhPlGF with Quantikine kits. The maximum absorbance signal (S_{max}) was given by the solution of rhPlGF without rhVEGFR1/Fc. The amounts of free and complexed rhPlGF were obtained using equations 1 and 2:

$$\%rhPlGF_{free} = \frac{S}{S_{max}} \times 100 \quad (1)$$

$$\%rhPlGF_{complexed} = \frac{S_{max} - S}{S_{max}} \times 100 \quad (2)$$

Capture of rhVEGFR1/Fc and Release of rhPlGF With VEGF-Beads

Two hundred microliters of the solution of rhVEGFR1/Fc/rhPlGF complexes (see Formation and Assay of sFlt-1/PlGF Complexes) was incubated in a tube with 5 µL (50 µg) of VEGF-coated beads (V-beads) at 105 pmol of bt-VEGF/mg beads. For the negative control, nonfunctionalized beads (C-beads) were used. After 1-hour incubation at 37°C with stirring, the concentrations of free rhPlGF and rhVEGFR1/Fc were measured with Quantikine kits.

Ethical Statements and Biological Samples

The local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile de France 3) approved the studies of cultures of human primary cells from placenta tissue (Perinat Collection ANR-10-EQPX-0010) and the human plasma sample from the Angiogenic switch to Physiological state by Extracorporeal Removal of sFlt1 and release of free PlGF case/control prospective study (http://www.clinicaltrials.gov. Unique identifier: NCT03188900). All patients gave written consent for participation in these studies. For the primary cell culture, cytotrophoblasts were isolated as previously described, [9]and the conditioned media (CM) were collected after 72 hours of culture and then stored at −80°C.

Microfluidic Experiments

The characteristics and procedures for the chip fabrication and the microfluidic set-up were previously described and are summarized in the SI.[10] PBS containing 1% BSA (Sigma-Aldrich) was used for the conditioning of the chip.

Sample Treatment

The chip and tubing system was initially filled with washing buffer, and the temperature was adjusted to 37°C using an indium tin oxide glass slide with feedback regulation from a voltage controller (Eurotherm 3508) via a thermocouple gauge installed inside a slot in the polydimethylsiloxane chip. When using plasma samples, preliminary 3-minute spin centrifugation was used to remove any solid aggregates, and only supernatant was then collected.

The sample (150 µL) flow in the chip chamber was 1 µL/min. A Tygon tube (Saint Gobain AAD04103 Tygon Non-DEHP Medical Microbore Tubing, 0.020" ID, 0.060" OD) connected at the outlet was used to collect the emerging solution.

Results

Functionalization and Characterization of Streptavidin Magnetic Beads

Functionalization

To study the impact of VEGF density on the capacity of the beads to bind sFlt-1, it was necessary to estimate precisely the surface saturation of the magnetic beads because steric hindrance, repulsion, or interactions may play a role in protein recognition.[11,12] Based on previous work,[13] 4 different grafted V-beads with ligand densities between $11.7 \cdot 10^3$ and $158 \cdot 10^3$ VEGF/µm^2 were prepared by changing the initial quantity of VEGF, and then characterized (Table S1).

Binding of sFlt-1

To evaluate how the VEGF grafted on the beads was still able to recognize human recombinant sFlt-1 with good affinity, a binding assay was developed that yielded the dissociation constant of the immobilized VEGF/rhVEGFR1/Fc complex (Figure S2). The binding assay was performed with the 35% saturated beads (105 pmol VEGF/mg of beads) and revealed

Downloaded from http://ahajournals.org by on June 12, 2019

a K_d value of 1.0±0.4 nmol/L (n=5). This value is in good agreement with the value obtained when VEGF is coated in a plate for a classical ELISA test[14] and confirms the high ligand-receptor affinity.

Proof of Concept

Capture and Release of Recombinant Proteins

The ability of V-beads simultaneously to capture sFlt-1 and release PlGF was first demonstrated in static conditions with recombinant proteins.

Formation of rhVEGFR1/Fc /rhPlGF Complexes

The first step was to produce artificial samples of varying compositions of complexed and free proteins. To do so, it was necessary to control the formation of recombinant rhVEGFR1/Fc/rhPlGF complexes (Figure 1A). To estimate the initial amount of each protein required to form the complex, a theoretical study was performed (see SI). Taking into account these calculations, the initial concentration of *rh*PlGF was kept constant at 6.9 pmol/L, and the selected initial *rh*VEGFR1/Fc concentrations ranged from 0 to 500 pmol/L. The estimated K_d value for the *rh*PlGF/*rh*VEGFR1/Fc complex was 22±3 pmol/L (n=3; Figure S3).

sFlt-1 Capture and PlGF Release

The second step of the proof of concept was to evaluate the ability of V-beads to capture rhsFlt-1 and to disrupt the rhVEGFR1/Fc/*rh*PlGF complex (Figure 1A). Thus, 3 different complex solutions (C1, C2, and C3) obtained from 3 different initial concentrations of rhVEGFR1/Fc (ranging from 52.3 to 29.2 pmol/L), were incubated with C-beads as the negative control and V-beads. The final concentrations of rhVEGFR1/Fc and rhPlGF were thus determined in the supernatants. Figure 1B and 1C show the molar quantity of total rhVEGFR1/Fc and free rhPlGF in each solution before (sample bar) and after incubation (C- and V-beads bars). No significant effects were observed when C-beads were used, showing that the nonspecific interactions were minimized. In contrast, a significant decrease in rhVEGFR1/Fc concentration accompanied by an increase of PlGF concentration in the presence of V-beads was observed in all the samples tested. In addition, because the total amount of rhPlGF used to form the complexes is known (6.9 pmol/L), the % of PlGF initially and finally complexed could be calculated. Although around 90% of initial rhVEGFR1/Fc was captured, only 20% of initial rhPlGF complexed to rhVEGFR1/Fc was released. This could be explained by the great difference in the amounts of proteins used to form the complexes (Table S2). Note that, in this study, we chose conditions where almost all the rhPlGF was complexed (>90%) and rhVEGFR1/Fc was in high excess, which is the case during severe preeclampsia.

These results with recombinant proteins demonstrate our competitive approach for the capture of sFlt-1 and the release of PlGF and allow us to move on to more complex media to validate the strategy.

Impact of the Saturation Rate on the Capture of sFlt-1 and Release of PlGF

The efficiency of sFlt-1 capture and PlGF release was assessed according to the surface ligand density of the V-beads. The amount of bt-VEGF coated on streptavidin Dynabeads was evaluated from 30 to 259 pmol/mg of beads corresponding to a surface ligand density ranging from $11.7{\cdot}10^3$ to $102{\cdot}10^3$ VEGF/μm^2 (Table S1). To investigate how our system was able to accommodate complex samples, these experiments were performed with CM obtained from human trophoblastic primary cells in which the initial concentrations of $sFlt\text{-}1_{total}$ and $PlGF_{free}$ were 0.27 pmol/mL (20868 pg/mL) and 0.015 pmol/mL (292 pg/mL), respectively. Two hundred microliters of this CM was incubated with the necessary amount of beads to ensure the required VEGF excess compared with initial sFlt-1 in the sample. The amount of sFlt-1 captured increased when the ligand surface density decreased, from 30% capture at $100{\cdot}10^3$ VEGF/μm^2 to 60% capture at $12{\cdot}10^3$ VEGF/μm^2 for the case of a 500 molar excess of VEGF (Figure 2A). This could be explained by a high steric hindrance at higher saturation rate limiting the capture.[12] Then, at constant surface ligand density, the effect of VEGF in excess compared with the initial concentration of sFlt-1 was evaluated. We increased the mass of beads to obtain a 10 to 500 molar excess of VEGF. As expected, the capture increased with the excess of VEGF. However, over 100 molar excess only a slight improvement of capture was observed. For PlGF release, the excess VEGF plays a more important role than for sFlt-1 because this molecule is initially complexed to sFlt-1 and has to be displaced. In addition, the levels of PlGF are considerably lower than those of sFlt-1 (sometimes ≥1 order of magnitude). For example, in the CM used for this study, the initial quantity of free PlGF in solution was 3 fmol, whereas the total quantity of sFlt-1 was 54 fmol, corroborating the great difference in concentration between the 2 molecules and the fact that most of the PlGF will be complexed. Thus, we can observe in Figure 2B how a molar excess of at least 100 is required to have a significant release of PlGF.

Based on these series of experiments, the selected surface ligand density for further experiments was fixed at $41{\cdot}10^3$ VEGF/μm^2 (105 pmol VEGF/mg of beads; 35% saturation rate) as the better compromise in terms of beads and VEGF consumption and performance of capture/release. In patient samples, the quantities of these factors vary considerably and consequently the VEGF excess from beads may affect the efficiency of apheresis differently. Nevertheless, previous experiments show that this efficiency is not negatively affected if we ensure at least a 100 molar excess (VEGF/sFlt-1).

Valorization of the Competitive Strategy

To emphasize the features of this new specific and competitive strategy for restoring the angiogenic balance in preeclampsia, we compared the performances of the proposed approach with the specific strategy based on the use of antibodies for the capture of sFlt-1. Magnetic beads were functionalized either with VEGF or with anti–sFlt-1 antibody in a similar range of ligand surface density. Their performances in restoring the angiogenic balance in complex media (cell culture supernatants and mixed plasma of pregnant women) were compared using an equivalent amount of beads during the incubation. In Figure 3, we see that both systems capture sFlt-1 in the same range. However, the competitive approach, by releasing PlGF, is more efficient for the final objective of restoring the angiogenic balance.

It should also be mentioned that both systems suffer a loss of efficiency in the capture of sFlt-1 when the sample matrix

Downloaded from http://ahajournals.org by on June 12, 2019

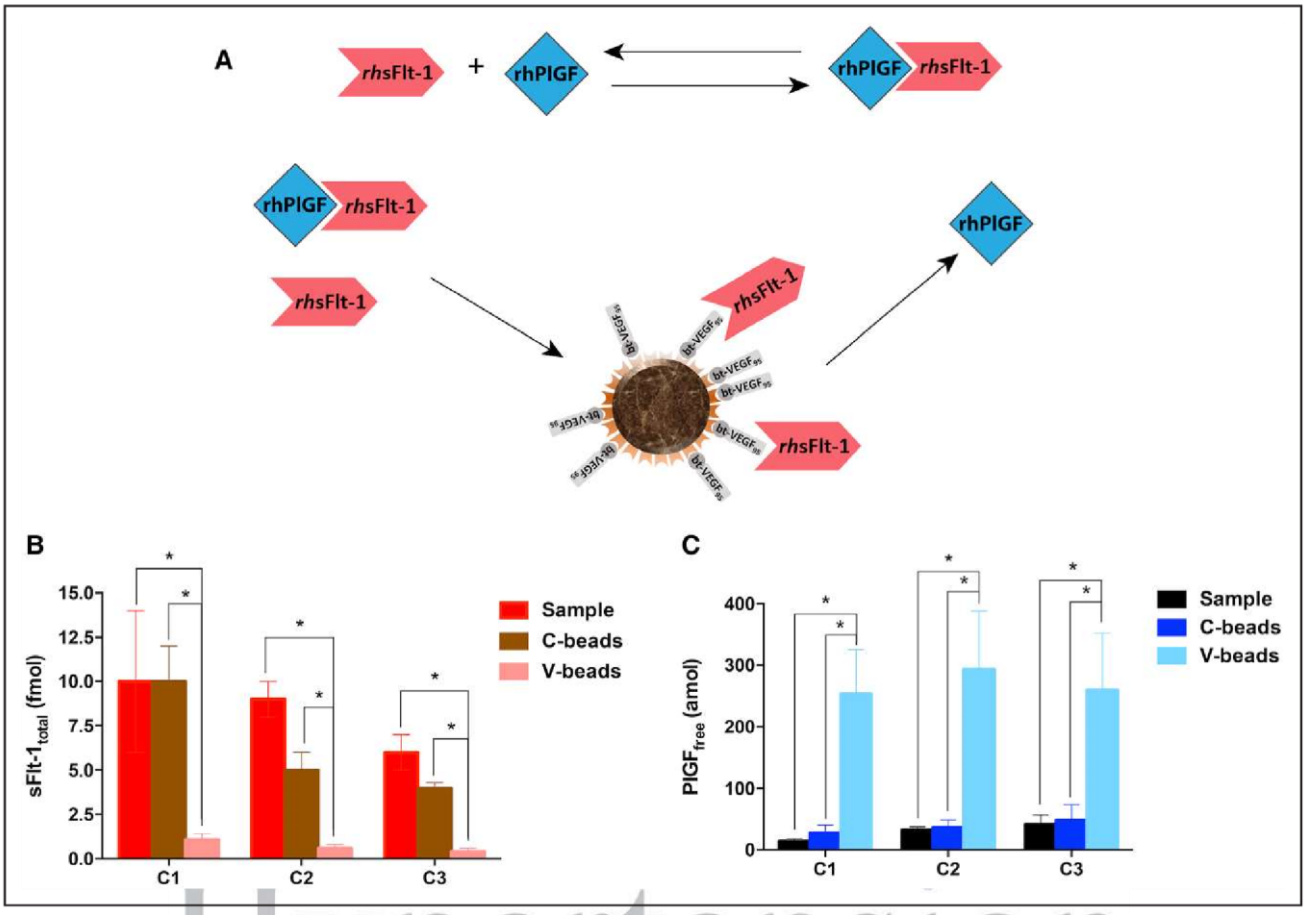


Figure 1. Proof of concept of the specific and competitive apheresis approach using recombinant proteins in physiological buffer medium (PBS at pH 7.4). **A**, Schematic representation of the rhVEGFR1/Fc/rhPlGF (recombinant human sFlt-1 with an antibody constant fraction) complex formation and its interaction with VEGF (vascular endothelial growth factor)-coated beads (V-beads), showing the hypothesis of our work (the ability to displace the PlGF complexed to sFlt-1); **B**, Evolution of the concentration of *rh*sFlt-1 after being incubated with V-beads; **C**, Evolution of the concentration of *rh*PlGF after incubation with V-beads. Please note that in **B** and **C**, i, C1, C2, and C3 are 3 solutions of complexes with different initial concentrations of *rh*VEGFR1/Fc (ie, 52.3; 43.7; and 29.2 pmol/L, respectively); obtained after 1 h incubation at 37°C of rhVEGFR1/Fc in PBS/0.1% BSA to the same volume of 4 ng/mL rhPlGF solution in PBS/0.1% BSA. Complex formation was quantified after assay of free rhPlGF with Quantikine kits. **B** and **C**, ii, Two hundred microliters of the solution of rhVEGFR1/Fc/rhPlGF complexes was incubated with 5 µL (50 µg) of V-beads at 105 pmol of bt-VEGF (biotinylated VEGF)/mg beads. Nonfunctionalized beads (C-beads) were used for negative control; concentrations of free rhPlGF and rhVEGFR1/Fc were measured with Quantikine kits. Sample denotes initial rhVEGFR1/Fc/rhPlGF formed complexes. rhsFlt-1 indicates recombinant human sFlt-1. *P<0.001.

is more complex. Thus, antibody anti-sFlt-1 grafted beads capture 37% of sFlt-1 in CM and 23% in plasma, whereas V-beads capture 51% in CM and 15% in plasma capture. This fact could be explained by the complexification of the sample matrix.

Optimization of the Microfluidic Conditions

To test this approach in a dynamic setting, a microfluidic polydimethylsiloxane chip of the magnetic fluidized bed previously described[10] was used to increase the surface-to-volume

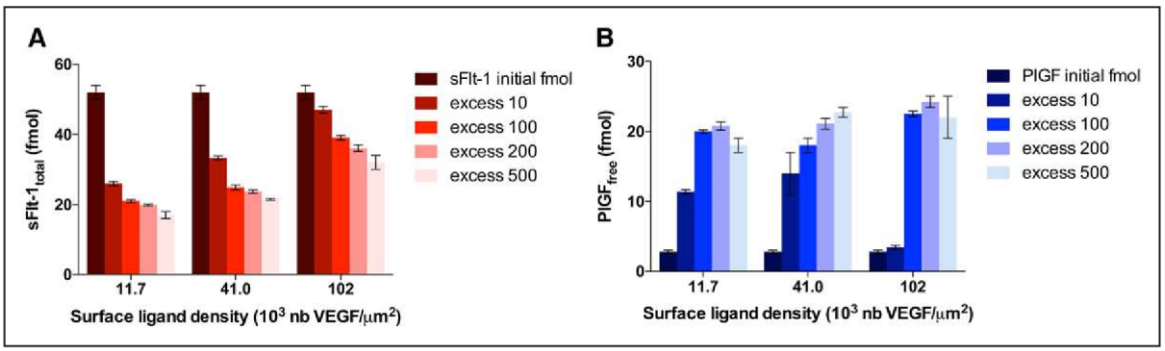


Figure 2. Impact of the grafting rates of VEGF (vascular endothelial growth factor)-coated beads (V-beads) on their capture/release performances in conditioned media (CM) of human trophoblastic cells. The amount of bt-VEGF (biotinylated VEGF) coated on streptavidin Dynabeads was evaluated from 30 to 259 pmol/mg of beads corresponding to a surface ligand density ranging from $11.7 \cdot 10^3$ to $102 \cdot 10^3$ VEGF/µm². Grafting of V-beads is done following the protocol in Bouzas-Ramos et al.[13] **A**, sFlt-1 capture and (**B**) PlGF (placental growth factor) release after 2.5-h incubation at 37°C with stirring. Note that the marked excess is the molar excess of VEGF compared with the initial concentration of sFlt-1.

Downloaded from http://ahajournals.org by on June 12, 2019

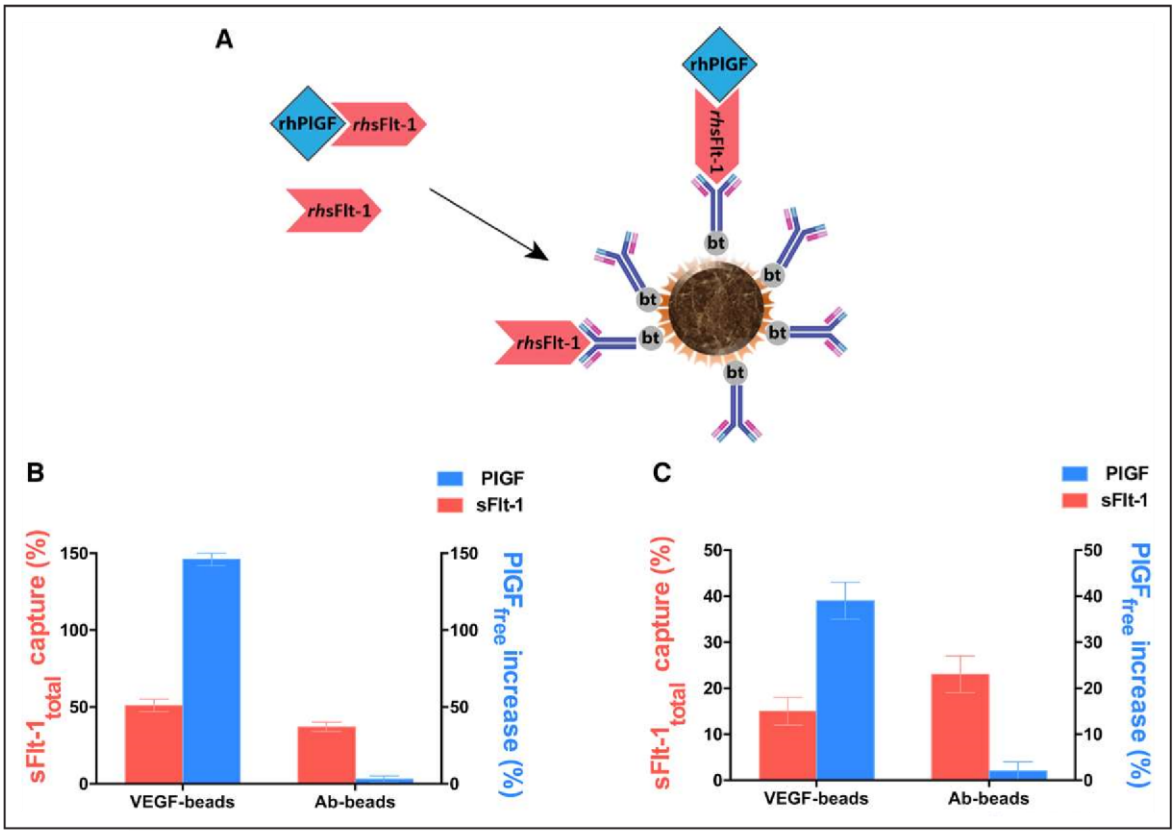


Figure 3. Comparison of specific systems to restore the angiogenic balance, one based on anti–sFlt-1 antibodies grafted beads (Ab-beads) and the other on competitive ligand (VEGF [vascular endothelial growth factor]) grafted beads (V-beads) in complex media. **A**, Schematic representation of the antibody-grafted beads during the capture of sFlt-1. **B**, Capture/release performances of both specific systems in conditioned media (CM); **C**, Capture/release performances of both specific systems in plasma. Note: The beads were grafted at 105 pmol VEGF and 25 pmol anti–sFlt-1 Ab per mg of beads ensuring an excess of biomolecule respect to the initial amount of sFlt-1 in the sample of 98× and 23×, respectively, in the case of CM; and 890- and 212-fold, respectively, in the case of the pooled plasma. (CM: 265 pg/mL PlGF (placental growth factor); 20 692 pg/mL sFlt-1. Pooled plasma: 502 pg/mL PlGF; 2250 pg/mL sFlt-1). bt indicates biotinylated; rhPlGF, recombinant human PlGF; and rhsFlt-1, recombinant human sFlt-1.

Hypertension

interactions during the treatment of the CM and the plasma samples with the functionalized beads. Here, the solid phase of V-beads is continuously recirculated (fluidization) during the percolation of a liquid phase (the biological samples). In the following sections, we present the different steps of the optimization of the microfluidic device-based approach.

Time of Residence of the Sample Inside the Bed

We assessed the impact of the sample residence time inside the bed of magnetic beads. This residence time is directly correlated with the flow rate and the bed porosity. We used a CM of primary human trophoblastic cells where concentrations of sFlt-1 and PlGF were, respectively, 0.26 and 0.013 pmol/mL. Experiments with 150 µL of biological samples were performed at a flow rate ranging from 0.5 µL/min (residence time of 7.7 s) to 3 µL/min (residence time of 2.9 s). As shown in Figure 4A, increasing the residence time of each molecule inside the chip improved the capture of sFlt-1 and the release of PlGF in a nonlinear way because the optimum capture/release mechanism was reached at 6.5 s of residence time, representing a flow rate of 1 µL/min and a total experiment time of 2.5 hours. This residence time is in agreement with the results obtained in static conditions (Figure S4). As shown in Figure 4B, 6.5 s of residence time is enough to reach a final sFlt-1/PlGF ratio at a physiological level below 38 for a sample with an initial ratio around 80. Indeed, Zeisler et al[15] identified an sFlt-1/PlGF ratio cutoff of 38 as having important predictive value in clinical practice.

For the following experiments, a flow rate of 1 µL/min was chosen to percolate the sample through the bed, which means a residence time of 6.5 s of the biological sample inside the chip. When the experiment was performed with C-beads (the abscissa 0 in Figure 4), no capture and no release could be measured and the sFlt-1/PlGF ratio was not affected by the sample percolation through the bed of beads.

Surface Ligand Density of the Beads

The performance of capture/release of sFlt-1/PlGF in the microfluidic device was evaluated considering the surface ligand density of the magnetic beads. The amount of bt-VEGF coated on streptavidin Dynabeads was evaluated as $11.7 \cdot 10^3$ to $158 \cdot 10^3$ VEGF/µm^2. We showed that increasing the VEGF surface density on the beads from 11.7 to $41.0 \cdot 10^3$ VEGF/µm^2 beads increased the capture of sFlt-1. However, large ligand surface densities induced a decrease of capture of sFlt-1 (Figure S5). Thus, $41.0 \cdot 10^3$ VEGF/µm^2 was the final surface ligand density selected for the experiments. These findings are in agreement with the static experiments (Figure 2).

Downloaded from http://ahajournals.org by on June 12, 2019

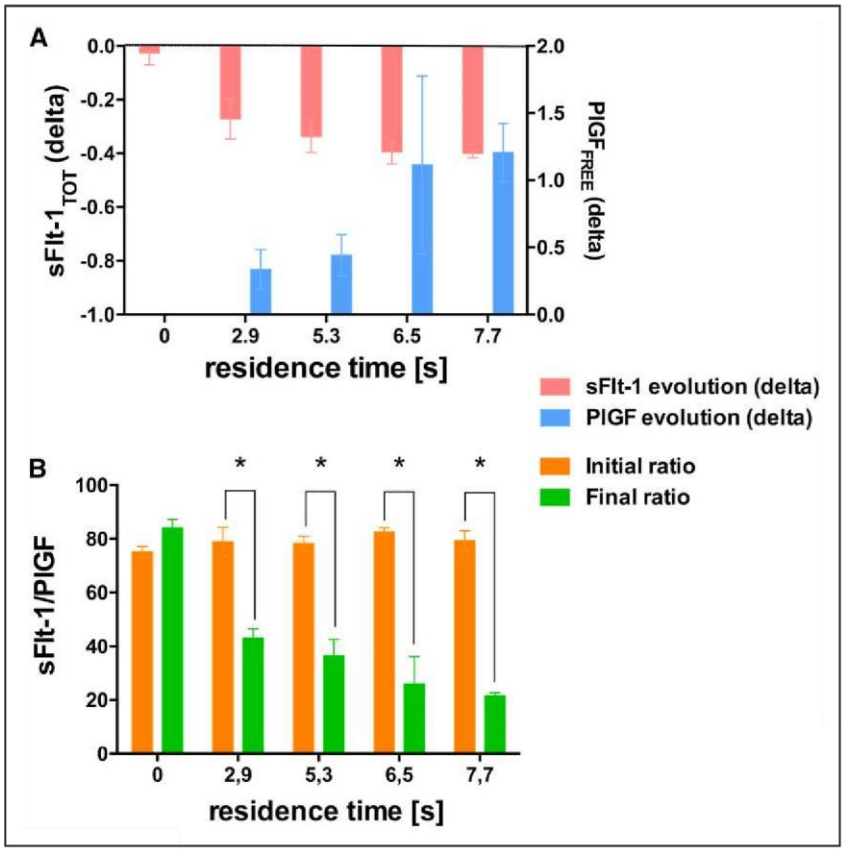


Figure 4. Evolution of concentrations of sFlt-1 and PlGF (placental growth factor) as a function of the residence time of each molecule inside the matrix (50 μg) of magnetic beads (beads ligand density: $41 \cdot 10^3$ VEGF (vascular endothelial growth factor)/μm^2; 105 pmol VEGF/mg beads) in the microfluidic device. **A**, the capture of sFlt-1 and the release of free PlGF and (**B**) the comparison between the initial and final sFlt-1/PlGF ratio. The abscissa 0 represents a control experiment done with Streptavidin Dynabeads M-280 without coating. Evolution of the concentration of molecules was evaluated as delta=$\frac{[C]_{fin}-[C]_{init}}{[C]_{init}}$ where concentrations are measured in pmol/mL. *P<0.001.

Hypertension

Validation of the Approach in Complex Matrices: From Cell Culture to Human Plasma

To validate our system, we used 2 types of biological samples, CM of human trophoblastic cells (n=3) and plasma from pregnant women with preeclampsia (n=3). The details on these samples are summarized in Table S3.

First, we tested our device with CM from human primary trophoblastic cells. For each of the samples tested, we were able to capture sFlt-1, release PlGF and consequently decrease the sFlt-1/PlGF ratio. As shown in Figure 5A, we captured >70% of the sFlt-1 of the sample and released half to more than double the initial quantity of PlGF. The final sFlt-1/PlGF ratio in CM was significantly reduced and systematically below the physiological level of 38 (Figure 5C).

Finally, with plasma samples from pregnant women with preeclampsia (Figure 5B), we observed a ≈40% reduction of sFlt-1 and an increase in free PlGF concentration from one-sixth to more than double in all the tested samples. Thus, our microfluidic system with V-beads decreased the sFlt-1/PlGF ratio in plasma samples by 63% on average (Figure 5D).

We also assessed the potential release of VEGF after sFlt-1 apheresis. Free VEGF was almost undetectable in our samples (CM and maternal plasma) and systematically increased after incubation with V-beads (Figure S6). In addition, because sVEGFR-2 is detectable in plasma samples from pregnant women, but not in CM, we evaluated the ability of our V-beads to trap some sVEGFR-2. After incubation of plasma samples with V-beads, depletion in sFlt-1 and sVEGFR-2 was observed, showing that beads are also able to capture sVEGFR-2 significantly (Figure S7). Note that the initial concentrations of both receptors are in the same range. However, in all cases sFlt-1 were preferentially captured (23±5% for sFlt-1 versus 12±5% for sVEGFR-2, mean values).

Discussion

Extracorporeal strategies to treat preeclampsia are evaluated for 3 main reasons:[1] the suspected primary role of circulating sFlt-1 in the pathogenesis of the disease,[2] the development of drugs that act specifically on the soluble form and not on the membrane form is particularly complex, and[3] apheresis methods avoid the adverse effects of molecules that cross the placenta. We decided to target sFlt-1 because of mounting evidence of its involvement in the pathogenesis of preeclampsia.[16–19] Soluble Flt-1 has been postulated to exert inhibitory effects on angiogenic signaling via 2 mechanisms: direct sequestration of angiogenic ligands, such as VEGF and PlGF and dominant-negative heterodimerization with surface VEGFRs.[20]

In vivo, the angiogenic effects are mainly related to the binding of VEGF to VEGFR-2. PlGF does not bind to VEGFR-2, but regulates VEGF bioavailability for VEGFR-2 by competing with VEGF-A in binding to VEGFR-1.[21] PlGF may also have direct angiogenic activity via intracellular signaling triggered by its binding to the VEGFR-1 membrane receptor.[22] During normal pregnancy, massive amounts of PlGF are produced by the placenta, reaching concentrations of free PlGF around 400 pg/mL, whereas during preeclampsia, free PlGF is extremely low due to the release of sFlt-1 into the maternal circulation.[23] Our sFlt-1 capture strategy consists of a specific and competitive approach

Downloaded from http://ahajournals.org by on June 12, 2019

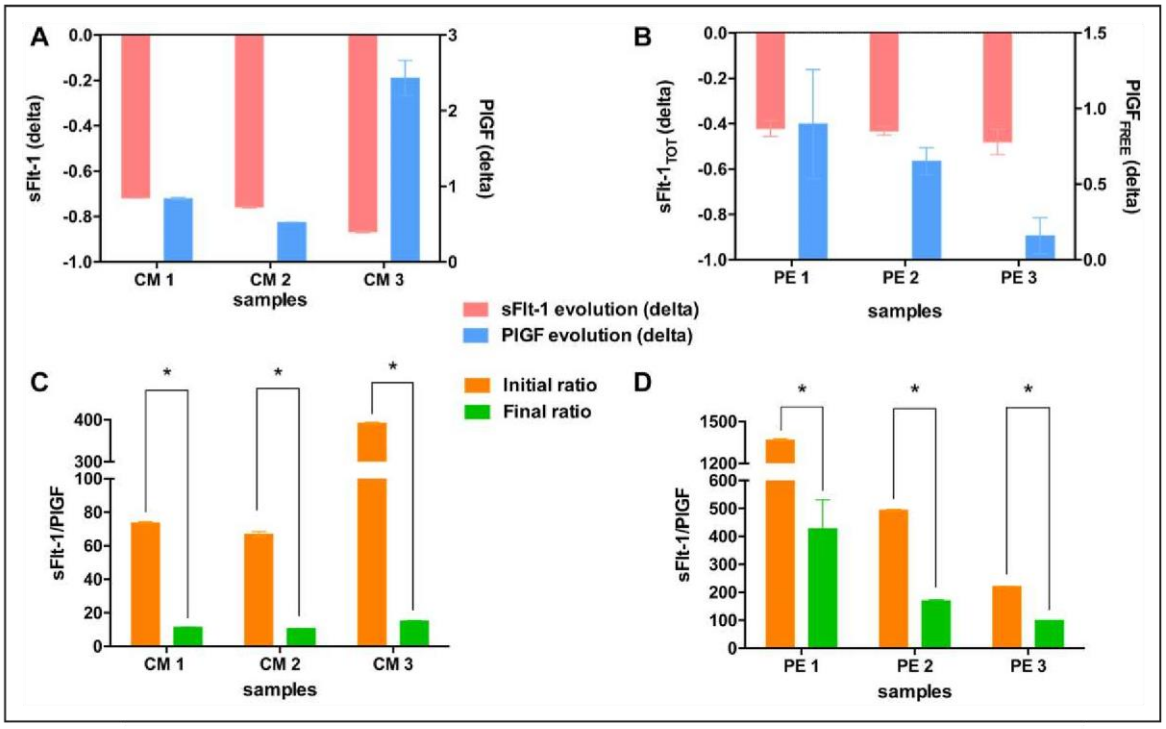


Figure 5 . Performance of sFlt-1 capture and PlGF (placental growth factor) release in conditioned media (CM) from human trophoblastic primary cell culture (**A**) and human plasma from preeclamptic (PE) women (**B**) after passage through the microfluidic device at the optimized conditions (1 μL/min, 37°C). Evolution of the sFlt-1/PlGF ratio CM (**C**) and plasma samples (**D**) after passage through the microfluidic device at the same conditions. Beads ligand density: $41{\cdot}10^3$ VEGF (vascular endothelial growth factor)/um^2 (105 pmol VEGF/mg beads). Performances are evaluated as delta=$\frac{[C]_{fin}-[C]_{init}}{[C]_{init}}$ with concentrations measured in pmol/mL. *P<0.001.

between the VEGF coated on the beads and the PlGF bound to the sFlt-1. The decline in total sFlt-1 is, therefore, as important as the increase in free PlGF for our study end point, which is why we used the sFlt-1/PlGF ratio for the expression of our results. To capture sFlt-1 in vitro in static and dynamic conditions, we used streptavidin magnetic beads, which are easy to functionalize with specific ligands (eg, biotinylated VEGF, Figure S2). Before application, we performed several tests to evaluate surface ligand density (Table S1) and the ability to recognize sFlt-1 by the grafted ligand (Figure S2), as well as the storage stability of the V-beads (up to 2 weeks at 4°C, Figure S8). Then, the sFlt-1 capture combined with PlGF release was proven mainly by 2 series of experiments. First, with the rhVEGFR1/Fc/rhPlGF complexes in static conditions, we checked the total amount of PlGF used in the experiments, which is not possible with more complex media (CM, plasma) because human PlGF ELISA kits only measure free PlGF. These experiments demonstrated the ability of V-beads to capture rhVEGFR1/Fc and also to release rhPlGF significantly (20% of the initial complexed PlGF). Second, our approach was compared with another specific capture strategy based on beads coated with an sFlt-1 antibody. We demonstrated an equivalent capture rate of sFlt-1, but with the addition of increased free PlGF in solution, which proves the potential interest of our competitive approach. The increase in free PlGF in solution after incubation with the V-beads may be caused by the combination of 2 phenomena. The initially free sFlt-1 is trapped by the V-beads, resulting in a shift of the biochemical equilibrium towards free PlGF (see equilibrium equation in Figure 1A). In addition, the V-beads compete with the PlGF bound to the sFlt-1, and due to the excess VEGF used for the incubation, we can displace the bound PlGF (Figure 2 and Figure S5). Finally, maybe because of this large excess of VEGF grafted on the beads, our approach is also able to displace the bound VEGF. This release of VEGF is sample-dependent (Figure S6), which shows the complexity of the VEGFs/VEGFRs system and the importance of the biochemical equilibria. During normal pregnancy, circulating free VEGF levels are very low, almost undetectable with noncompetitive ELISA. Whether these extremely low levels of VEGF have a physiological role during pregnancy is not known. Eremina et al[24] have shown that tight regulation of VEGF-A signaling is critical for establishment and maintenance of the glomerular filtration barrier. A slight elevation of circulating endogenous free VEGF could be beneficial, especially for the glomerular dysfunction characterized by proteinuria and endotheliosis, the renal lesion seen in preeclampsia.

The second part of our work was performed under dynamic conditions. To mimic the dynamic binding and release on the solid phase that take place in extracorporeal circulation and to evaluate the potential of our approach, we used the microfluidic fluidized bed model. The microfluidized bed allows the use of the same magnetic beads as for the static conditions while limiting the consumption of samples and reagents. Moreover, the magnetic fluidized bed has many advantages in applications involving fluid-solid exchanges, such as high surface-to-volume ratio, constant mixing, and low flow resistance.[10] Our results demonstrate the proof of concept of significant sFlt-1 capture combined with the release of PlGF in these

Downloaded from http://ahajournals.org by on June 12, 2019

dynamic conditions, with a 68% reduction of sFlt-1/PlGF ratio in plasma from preeclamptic women. The flow rates and the fluid volumes are low in such conditions and not compatible with application in pregnant women (50–60 mL/min),[6] but this dynamic microscale technique is of value in testing different molecules in the capture of sFlt-1 in preeclamptic plasma because of the limited amount of human material. This microfluidic device could also be of interest for a proof of concept of this approach in animal models.

Using VEGF as a competitive ligand for capture of sFlt-1 and release of PlGF, not only sFlt-1 is captured in the plasma of preeclamptic women but also sVEGFR-2 (Figure S7). The physiological impact of sVEGFR-2 in normal and pathological pregnancies is unclear. Mothers destined to develop preeclampsia have lower plasma sVEGFR-2 concentrations than those who have a normal pregnancy.[25] Work is currently underway to develop ligands with an affinity that is both greater than that of PlGF for sFlt-1 and significantly lower for sVEGFR-2 than for sFlt-1.

Perspectives

The nest steps of our strategy are: (1) to optimize the grafting with a VEGF-like molecular ligand, specific for sFlt-1, allowing no binding of sKDR; (2) to evaluate the biological effects of the release in the maternal circulation of the endogenous VEGF; and (3) to develop apheresis columns based on our ligand-based approach and usable in vivo with an animal model.

Acknowledgments

We acknowledge the financial support provided by the Agence National de la Recherche (ANR-15-CE17-0005-01). Paris Descartes University, Institut National de la Santé et de la recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pierre Gilles de Gennes, Ecole Normale Supérieure (ENS Paris-Saclay) and PremUP Foundation are also acknowledged. We thank the UMR 8258-CNRS for sharing the TECAN SAFIRE and MULTISKAN EX plate-readers, and Danièle Evain-Brion and Patrick Tabling for the PremUP-IPGG collaboration.

Sources of Funding

The study was funded by the Agence Nationale pour la recherche (ANR-15-CE17-0005-01). Complementary funding was obtained from the Institut Pierre Gilles de Gennes (Equipement d'Excellence, Laboraotire d'excellence, "Investissement d'avenir", program ANR-10-EQPX-34) and the PremUP Foundation. L. Alexandre received a grant from the Ecole Normale Supérieure (ENS Paris-Saclay). K. Pons received a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM-DEA 40994).

Disclosure

None.

References

1. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens Int J Womens Cardiovasc Health*. 2014;4:97–104.
2. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med.* 2008;59:61–78. doi: 10.1146/annurev.med.59.110106.214058
3. Wu FT, Stefanini MO, Mac Gabhann F, Kontos CD, Annex BH, Popel AS. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *J Cell Mol Med.* 2010;14:528–552. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00941.x
4. Maharaj AS, Walshe TE, Saint-Geniez M, Venkatesha S, Maldonado AE, Himes NC, Matharu KS, Karumanchi SA, D'Amore PA. VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *J Exp Med.* 2008;205:491–501. doi: 10.1084/jem.20072041
5. Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, et al. Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation.* 2011;124:940–950. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.034793
6. Thadhani R, Hagmann H, Schaarschmidt W, et al. Removal of soluble Fms-like tyrosine kinase-1 by dextran sulfate apheresis in preeclampsia. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:903–913. doi: 10.1681/ASN.2015020157
7. U.S. National Library of Medicine. Proof-of-Concept Trial on Selective Removal of sFlt-1 in Pregnant Women With Preeclampsia Via Apheresis - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02923206. Accessed July 11, 2018.
8. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1356–1370.
9. Alsat E, Haziza J, Evain-Brion D. Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human trophoblast cells in culture. *J Cell Physiol.* 1993;154:122–128. doi: 10.1002/jcp.1041540115
10. Pereiro I, Tabnaoui S, Fermigier M, du Roure O, Descroix S, Viovy JL, Malaquin L. Magnetic fluidized bed for solid phase extraction in microfluidic systems. *Lab Chip.* 2017;17:1603–1615. doi: 10.1039/c7lc00063d
11. Jennings TL, Rahman KS, Fournier-Bidoz S, Chan WC. Effects of microbead surface chemistry on DNA loading and hybridization efficiency. *Anal Chem.* 2008;80:2849–2856. doi: 10.1021/ac7026035
12. Teste B, Vial J, Descroix S, Georgelin T, Siaugue JM, Petr J, Varenne A, Hennion MC. A chemometric approach for optimizing protein covalent immobilization on magnetic core-shell nanoparticles in view of an alternative immunoassay. *Talanta.* 2010;81:1703–1710. doi: 10.1016/j.talanta.2010.03.027
13. Bouzas-Ramos D, Trapiella-Alfonso L, Pons K, Encinar JR, Costa-Fernández JM, Tsatsaris V, Gagey-Eilstein N. Controlling ligand surface density on streptavidin-magnetic particles by a simple, rapid, and reliable chemiluminescent test. *Bioconjug Chem.* 2018;29:2646–2653. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00347
14. Trapiella-Alfonso L, Broussy S, Liu WQ, Vidal M, Lecarpentier E, Tsatsaris V, Gagey-Eilstein N. Colorimetric immunoassays for the screening and specificity evaluation of molecules disturbing VEGFs/VEGFRs interactions. *Anal Biochem.* 2018;544:114–120. doi: 10.1016/j.ab.2017.12.029
15. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, Olovsson M, Brennecke SP, Stepan H, Allegranza D, Dilba P, Schoedl M, Hund M, Verlohren S. Predictive value of the sFlt-1:PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Engl J Med.* 2016;374:13–22.
16. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111:649–658. doi: 10.1172/JCI17189
17. Rana S, Powe CE, Salahuddin S, Verlohren S, Perschel FH, Levine RJ, Lim KH, Wenger JB, Thadhani R, Karumanchi SA. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation.* 2012;125:911–919. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.054361
18. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004;350:672–683. doi: 10.1056/NEJMoa031884
19. Kim MY, Buyon JP, Guerra MM, et al. Angiogenic factor imbalance early in pregnancy predicts adverse outcomes in patients with lupus and antiphospholipid antibodies: results of the Promisse study. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214:108.e1–108.e14. doi: 10.1016/j.ajog.2015.09.066
20. Wu FT, Stefanini MO, Mac Gabhann F, Popel AS. A compartment model of VEGF distribution in humans in the presence of soluble VEGF receptor-1 acting as a ligand trap. *PLoS One.* 2009;4:e5108. doi: 10.1371/journal.pone.0005108
21. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25:581–611. doi: 10.1210/er.2003-0027
22. Anisimov A, Leppänen VM, Tvorogov D, Zarkada G, Jeltsch M, Holopainen T, Kaijalainen S, Alitalo K. The basis for the distinct biological activities of vascular endothelial growth factor receptor-1 ligands. *Sci Signal.* 2013;6:ra52. doi: 10.1126/scisignal.2003905

Downloaded from http://ahajournals.org by on June 12, 2019

23. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Zeisler H, Calda P, Sabria J, Markfeld-Erol F, Galindo A, Schoofs K, Denk B, Stepan H. New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertens Dallas Tex.* 2014;63:346–52.
24. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest.* 2003;111:707–716. doi: 10.1172/JCI17423
25. Chaiworapongsa T, Romero R, Tarca AL, Kusanovic JP, Gotsch F, Mittal P, Kim SK, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Erez O, Dong Z, Kim CJ, Yeo L, Hassan SS. A decrease in maternal plasma concentrations of sVEGFR-2 precedes the clinical diagnosis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202:550.e1–550.e10. doi: 10.1016/j.ajog.2010.04.002

Novelty and Significance

What Is New

- Our work provides proof of concept of a new strategy to capture circulating sFlt-1 and release endogenous PlGF (placental growth factor). This approach is based on a competitive and biomimetic strategy to bind sFlt-1 with its natural ligand (VEGF [vascular endothelial growth factor]) and release part of the PlGF trapped by sFlt-1.

What Is Relevant?

- This technique rebalances the sFlt-1/PlGF ratio in the maternal plasma, offering new perspectives for the treatment of preeclampsia.

Downloadedfromhttp://ahajournals.orgbyonJune12,2019

American Heart Association.
Hypertension

Molecular and Cellular Endocrinology 499 (2020) 110586

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Placental production of progestins is fully effective in villous cytotrophoblasts and increases with the syncytiotrophoblast formation

C. Fraichard[a], F. Bonnet[b], A. Garnier[c,d,1], M. Hébert-Schuster[a,b,1], A. Bouzerara[a,b], P. Gerbaud[e], I. Ferecatu[a], T. Fournier[a], I. Hernandez[a], S. Trabado[c,d], J. Guibourdenche[a,b,*]

[a] UMR-S 1139, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, Paris, France
[b] Service d' Hormonologie, CHU Cochin, HUPC, AP-HP, Paris, France
[c] Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, CHU de Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin Bicêtre, France
[d] UMR-S U1185, Faculté de Médecine Paris-Sud, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, France
[e] UMR-S 1180, Faculté de Pharmacie, 5 Rue JB Clément, 92296, Châtenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Human placenta
Villous trophoblast
Mitochondria
Steroidogenic enzymes
Mass spectrometry
Progesterone

ABSTRACT

Placental syncytiotrophoblast (ST) is considered as the main placental endocrine tissue secreting progesterone, a steroid essential for maintenance of pregnancy. However, each step of progestins production has been poorly investigated in villous cytotrophoblast (VCT) regarding ST formation. We aimed to characterize progestins production during human differentiation of VCT into ST. VCTs were isolated from term placenta and cultivated, with or without forskolin (FSK), to stimulate trophoblast differentiation. Secreted progestins concentrations were determined by immuno-assay and Gas Chromatography-tandem mass spectrometry. Intracellular expression of cholesterol transporter and enzymes involved in steroidogenesis were studied by immunofluorescence, western-blot, and RT-qPCR. Progesterone and pregnenolone are produced by VCT and their secretion increases with VCT differentiation while 17-hydroxyprogesterone concentration remains undetectable. HSD3B1 enzyme expression increases whereas MLN64, the cholesterol placental mitochondrial transporter and P450SCC expressions do not. FSK induces progestins production. Progestins placental synthesis is effective since VCT and increases with ST formation thanks to mitochondria.

1. Introduction

Human placenta is an endocrine organ that produces both protein hormones such as human chorionic gonadotropin (hCG) or placental growth hormone, and steroid hormones such as progesterone (P4) and estrogens, including estradiol (E2) and estriol (E3) (Miller, 1998; Guibourdenche et al., 2009; Chatuphonprasert et al., 2018). Its structural and functional unit is the chorionic villus and its specific tissue is the trophoblast. The syncytiotrophoblast (ST) arises from the aggregation and fusion of villous cytotrophoblasts (VCT) and is considered as the main endocrine placental tissue (Benirschke et al., 2012). It covers the entire surface of the villi bathing into maternal blood where it secretes most of the produced hormones. Placental hormones are required for maintenance of pregnancy, adaptation of maternal organism to pregnancy, and for fetal growth. P4 is indeed mandatory for pregnancy continuation as it modulates maternal immuno-tolerance and maintains myometrium quiescence. Its production starts in the mitochondria. Indeed, after entering the mitochondria via the MLN64 transporter, cytoplasmic cholesterol is transformed by P450SCC enzyme in pregnenolone (P5), that is further converted in P4 via HSD3B1 enzyme (Pasqualini, 2005). There is now growing evidence that maternal treatments as well as maternal environment can alter placental endocrine functions, thus being able to affect fetal development and pregnancy outcome. Fungicides such as tributylin decrease P4 and E2 production in JEG-3 choriocarcinoma cell lines *in vitro* (Cao et al., 2017) and in pregnant rats *in vivo* (Feng et al., 2016). Triclosan, an antimicrobial agent, and bisphenol A, a well known endocrine disruptor, alter the endocrine pathway of P4 and the decidualization of endometrial stroma cells (Forte et al., 2016). More precisely, triclosan induces spontaneous abortion in mice and decreases estrogen sulfotransferase in both mice and humans (Wang et al., 2015). However, most of these studies on placental steroidogenesis have been performed either on cell lines models *in vitro* or on mice and rats *in vivo*, but scarcely on human primary trophoblast cells. This is particularly

* Corresponding author. Hormonologie, Bâtiment J. Dausset, 2ème étage, CHU Cochin, 27 rue du Fg St Jacques, 75014, Paris, France.
E-mail address: jean.guibourdenche@aphp.fr (J. Guibourdenche).
[1] equal contribution.

https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110586
Received 13 May 2019; Received in revised form 6 September 2019; Accepted 16 September 2019
Available online 17 September 2019
0303-7207/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

important in the context of steroidogenesis study as cell enzymatic equipment may vary between species (e.g. rodent, equine, human), endocrine tissues (e.g. adrenal, ovary, placenta) and trophoblast derived cell lines (Rothbauer et al., 2017; Legacki et al., 2017), thus limiting conclusions generalization. In human, P4 production has been mainly described *in vivo* in maternal blood and *in vitro* in ST fragments but only few studies focused on trophoblast differentiation (Tuckey, 2005; Morel et al., 2016). We aimed, in this study, to fully characterize the synthesis and secretion of progestins during the differentiation of VCT into ST and their regulation in human normal trophoblast.

2. Materials and methods

2.1. Placental tissue collection and isolation of villous cytotrophoblasts

Placental tissues from patients delivering by cesarean section at full term were obtained from Beaujon Hospital (Clichy, France), Antony Hospital (Antony, France), Port-Royal Maternity (Paris, France) and Montsouris Mutual Institute (Paris, France). These biological samples were collected following informed patient written consent and approval from our local ethics committee (CPP 2015-mai-13909).

Placentas included came from monofetal non-complicated pregnancies thus considered as normal. Indeed, no fetal and no placental abnormalities had been detected on ultrasound during pregnancy follow-up. The mother also had no associated pathology or specific treatment (i.e; diabetes, thyroid disorder, hypertension, preeclampsia). Maternal biological investigations were normal with serum markers of Trisomy 21 placing the patient in a non-risk group and serological assessments excluding any major infection during pregnancy. The probability of chorioamnionitis was excluded on both clinical examination (absence of maternal fever) and biological investigations (no increase either in white blood cells count or in CRP when measured). Cesarean sections were performed at a mean gestational age of 39 + 1 WG. Indications for cesarean sections were: maternal uterus abnormalities (uterus scar, myomectomy), maternal wish, breech presentation, narrow maternal pelvis. Placentas included were all weighed and macroscopically examined. They all had normal weight and appearance i.e. a basal plate and chorion without particularities (no calcifications, no hematomas, no thrombosis detectable), a parenchyma with normal appearance (no congestion, no calcification, no edema, no detectable infarction). Membranes and cord also had no particularities.

Chorionic villi were obtained by manual dissection of placental tissues from term placentas as previously described about 1 h after delivery (Kliman et al., 1986; Alsat et al., 1993). Villous tissue was dissected free of membranes, rinsed and minced in HBSS 1X (Gibco™, Fisher Scientific, France). The villous sample was then subjected to sequential enzymatic digestion in HBSS 1X containing 0,2% trypsin (w/v), 25 IU/mL DNAse I, 0,1 mM $MgSO_4$, 0,1 mM $CaCl_2$ and 7% milk (v/v). Cell dissociation was monitored by light microscopy. The first three digests were discarded to eliminate residual ST fragments. The cell suspensions resulting from the following four or five sequential digestions were pooled. The cells were then purified on a discontinuous Percoll gradient (5%–70% in 14 steps). Cells viability was determined in v/v solution with trypan blue. The isolated cells were plated in DMEM containing 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% L-Glutamin and were incubated at 37 °C with 5% CO_2. Purified VCTs aggregate and fuse to form ST at 72 h of culture (Leguy et al., 2014). Cells were incubated or not with FSK (10 μM) for 6 h/24 h of culture or for 48 h/72 h of culture to stimulate cytotrophoblasts fusion. Cell culture media were collected every 24 h, centrifuged at 1000×*g* for 20 min at 4 °C; supernatants were kept frozen at −80 °C as part of the Equipex 10-PhC/SC-11/243 project "Perinatcollection" until used. Cells were either fixed in methanol for immunofluorescence or snap-frozen for RNA/Protein extraction and stored at −80 °C until use.

2.2. Immunofluorescence microscopy

Immunocytofluorescence staining was performed at 24 and 72 h of culture. Cells were washed in PBS 1X, then fixed and permeabilized in methanol for 8 min at −20 °C and blocked in PBS 1X-1% BSA-Tween 0,1% for 1 h at room temperature. Cells were first incubated overnight at 4 °C with primary polyclonal rabbit antibodies to P450SCC (1 μg/mL, ab75497 abcam®) and to MLN64 (5 μg/mL, ab3478 abcam®) or primary monoclonal rabbit antibody to HSD3B1 (3 μg/mL, ab167417 abcam®) and primary monoclonal mouse antibody to desmoplakin (5 μg/mL, ab16434 abcam®), prepared in PBS 1X with BSA 1%-Tween 0,1%. They were then incubated for 1 h at room temperature and protected from light, with secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (1/500, A-11008 LifeTechnologies) and secondary goat anti-mouse antibody conjugated with Alexa Fluor 546 (1/500, A-11003 LifeTechnologies) diluted in PBS 1X with BSA 1%-Tween 0,1%. Nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted in PBS 1X for 10 min at room temperature and protected from light. Samples were conserved in mounted-medium and pictures were taken using a BX60 epifluorescence microscope (Olympus) equipped with a 40× oil objective (Olympus 1.00), an ultrahigh-vacuum mercury lamp and a Hamamatsu camera (C4742-95). Pictures were analyzed with VisionStage Orca® software (v 1.6), associated with Hamamatsu camera. The "control immunoglobulin without antigen" conditions were used to select parameters "time of integration of trame" for each antibody concentration. The signal value retained has been selected when no staining is observed. Then, these parameters were conserved to take pictures in the presence of each antibody at 24 h and 72 h of culture. For nuclei staining, fluorescence intensity was selected with "Shutter Electric" and further conserved for all culture conditions. ImageJ® software was used to colorize and merge grey scale pictures. Three different channels: green, red and blue were associated to the grey scale pictures obtained respectively with Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 546 conjugated antibodies and with DAPI. Adjusting the "color balance" allowed us to optimize the signal-to-background ratio of the different fluorochromes. The value of "color balance" for each channel was conserved for pictures taken at both 24 h and 72 h of culture.

2.3. Mitochondria analysis

Mitochondria were observed at 24 and 72 h of culture with a MitoTracker Red CMXRos (M7512, Invitrogen™), a dye staining active mitochondria in living cells (Ferecatu et al., 2018). Trophoblastic cells were incubated at 24 and 72 h with MitoTracker Red CMXRos (50 nM, diluted in DMEM containing 1% Penicillin-Streptomycin and 1% L-Glutamin) for 45 min at 37 °C. Then, cells were fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% for 20 min at room temperature, protected from light. PFA were neutralized with NH_4Cl (50 mM) for 10 min at room temperature, protected from light. Cells were blocked for 1 h in PBS 1X-1% BSA-Tween 0,1%, protected from light. Cells were first incubated overnight at 4 °C, protected from light with primary polyclonal rabbit antibody to desmoplakin (2 μg/mL, ab71690 abcam®) prepared in PBS 1X with BSA 1%-Tween 0,1%. Then incubated for 1 h at room temperature protected from light with secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor® 488 (1/500, A-11008 LifeTechnologies) diluted in PBS 1X with BSA 1%-Tween 0,1%. Nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) diluted in PBS 1X for 10 min at room temperature and protected from light. Samples were conserved in mounted-medium and pictures were taken with Leica® SP2 confocal microscope. Pictures were analyzed with Fiji® software. The Fiji® software is used to colorize and merge grey scale pictures obtained from Leica® SP2 confocal microscope. Three different channels: green, red and blue were associated to grey scale pictures obtained respectively with Alexa Fluor 488 conjugated antibody, with MitoTracker Red CMXRos and with DAPI. The pictures of "conditions without

Table 1
Primers data used for RT-qPCR analysis.

Target mRNA	Gene name		Sequence
MLN64	*STARD3*	Forward	GAGCGATGGTATCTTGCCGC
		Reverse	CTGCAAAGGATTCTGGGGGT
P450SCC	*CYP11A1*	Forward	TTTTTGCCCCTGTTGGATGCA
		Reverse	CCCTGGCGCTCCCCAAAAAT
HSD3B1	*HSD3B1*	Forward	AGTACGTCCACTCTTCTGTCCA
		Reverse	TTCTCCTTCACCAAGAGGCG

MitoTracker Red CMXRos" were used to adjust "color balance" in order to obtain no red signal. These "color balance" value was conserved to adjust "color balance" of pictures of "conditions with MitoTracker Red CMX Ros". Adjusting "color balance" of other channels allowed us to optimize the signal-to-background ratio. These values of "color balance" for each channel were conserved for picture of each condition.

2.4. Real-time PCR

Total RNA was purified from cultured VCT and ST on RNeasy Mini Kit columns (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription (500 ng total RNA) was performed using Superscript III (200 U) (Invitrogen) with random primer (3 µg), dNTP (0,5 mM of each dNTP), RNase Out (40 U) and DTT (0,5 mM in final). Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was carried out on a StepOne instrument (Applied Biosystems) thanks to qPCR MasterMix Plus for SYBR® Green I w/fluorescein kit (Eurogentec) with cDNA diluted 1/5 in RNase-DNase free H_2O, forward and reverse primers (100 nM) and MasterMix 2X buffer. Normalization of the results was based on the use of 18S, RPL0, SDHA and HPRT as endogenous controls. Used primers are described in Table 1.

2.5. Hormones immuno assays

Total hCG and P4 concentrations were determined in supernatants after 24 and 72 h of culture using ECLIA immuno-assay (Liaison®, DiaSorin). Measuring ranges of both assays were respectively of 1.5–10 000 UI/L and of 0.7–190 nmol/L. Between assay precision illustrated by the coefficient of variation (CV %) were respectively < 5% and < 11%. Detection limits were respectively of 0.3 UI/L and 0.4 nmol/L.

2.6. Progestins profile of secretion determination by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) (Giton et al., 2015)

-Reagents: Progesterone (P4), 17-hydroxyprogesterone (17OHP4) and pregnenolone (P5) were assayed simultaneously after extraction and derivatization as previously described (Giton et al., 2015). One ng of deuterated internal standard of Δ4-androstenedione-d7 and progesterone-d9 were added to each supernatant samples (CDN Isotopes, Inc., Point-Claire, Quebec, Canada) before extraction.

-Plasma sample extraction and purification: Briefly, each sample (1 mL of culture medium sample, calibration standards and quality controls) was collected in borosilicate tube (Kimble, DURAN Group, USA). A volume of 50 µL of a solution of deuterated internal standard steroids and of 3 mL of 1-Chlorobutane were added. After mixing, samples were centrifugated at 3000 g for 10 min at 20 °C. Organic phase was deposited on silica columns (c18, SPE 500 mg/3 mL, Fischer Scientific, USA), previously activated and conditioned successively with 2.5 mL of ethyl acetate, 2.5 mL of hexane and 2.5 mL of 1-Chlorobutane. After sample deposition, columns were washed with (3 × 2 mL) of ethyl acetate/hexane solution (ratio 1:9). Steroids fraction was then eluted with (2 × 2 mL) of ethyl acetate/hexane solution (ratio 1:1). Solvents were further evaporated to dryness at 60 °C and the dry residue was then dissolved again in 200 µL of ethyl acetate before derivatization reaction.

-Derivatization reaction: After azote evaporation, steroids fraction was derivatized with 50 µL of heptafluorobutyric anhydrous (HFBA, Regis Technologies, USA)/acetone anhydrous solution (ratio 1:1) for 1 h at room temperature.

-GC-MS/MS analysis: The resulting derivatized extracts were reconstituted in hexane, and then transferred into conical vials for injection into the GC system (Waters, Milford, Mass., USA). Steroids were analyzed by a GCMS/MS TQ8040 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Japan), equipped with an electron impact source (EI), using a 5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane ZB-5MSi (30 m × 0.25 mm, internal diameter, 0.25 µm film thickness, Phenomenex, Torrance, California, USA) chromatography column with helium vector gaz (MESSER, Germany). Two transitions (m/z values) were determined by steroid molecule, the most intense fragment ion being used for quantification and the second one being used as confirming ion. Thus, transitions 465.20 > 109.10/465.20, 510.25 > 510.25/147.20 and 298.30 > 213.30/145.10 were respectively monitored for analysis of the 3 steroid molecules 17-OHP4, P4 and P5 (molecular ion > quantifying ion/confirming ion). Data were processed using GC-MS/MS browser software (V 4.2). Linearity of each steroid measurement method was confirmed by plotting the response ratio (peak area) of the steroid molecule/internal standard (IS) to the known concentration of steroid for each calibration standard.

2.7. Western blots

Total proteins were isolated from VCT and ST using commercial reagents (Lysis Buffer, Invitrogen™; Carlsbad, California, USA). Proteins (20 µg) were loaded on 4–15% gradient gel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, BIORAD®; Hercules, California, USA) and the resulting proteins blots were probed with polyclonal rabbit anti-MLN64 (1 µg/mL, ab3478 abcam®), polyclonal rabbit anti-P450SCC (1 µg/mL, ab75497 abcam®), monoclonal rabbit anti-HSD3B1 (0,18 µg/mL, ab167417 abcam®) or monoclonal mouse anti-actin (0,2 µg/mL, A5441 sigma) antibodies. Actin was used as loading control. Addition of secondary goat anti-mouse antibody conjugated with DyLight 680 (1/15 000, #35518 Thermo Fisher Scientific) or secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with DyLight800 4X PEG (1/15 000, SA5-35571 Thermo Fischer Scientific) allowed blots revelation using Odyssey infrared fluorescent system (LI-COR, France).

2.8. Data analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software package ® (California, USA). Results are expressed as crude values or mean ± SD. Significant differences ($p < 0,05$) were identified using non parametric student *t*-test (n = 5 ou 6).

3. Results

3.1. In vitro differentiation of the placental villous trophoblast

Isolated VCT spontaneously aggregated after 24 h–48 h of culture and then fused to form a ST after 72 h of culture as assessed by the decrease of desmoplakin involved in intercellular junctions between different nuclei (Fig. 1). In freshly isolated VCT, most of the mitochondria were intact, being stained by the CMX Ros probe and organized in a tubular network (Fig. 2). In contrast, in ST, less mitochondria were stained by the CMX Ros probe and their network seemed more fragmented with a punctiform aspect.

3.2. Secretion of P4 and hCG during the VCT differentiation

Morphological differentiation of VCT into ST was associated with a functional trophoblastic differentiation. Indeed, isolated VCTs carried on an endocrine activity secreting not only hCG but also P4 at low

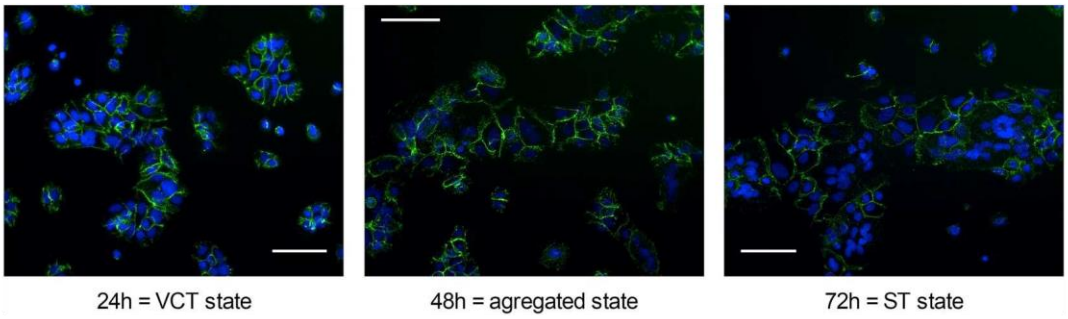


Fig. 1. Differentiation of VCTs into ST. Immunofluorescent pictures of trophoblastic cells after 24 h, 48 h and 72 h of primary VCT cells culture from human term placenta. Plasma membranes were immunostained with anti-desmoplakin (green). Nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). 400× magnification. Scale bar = 50 µm.

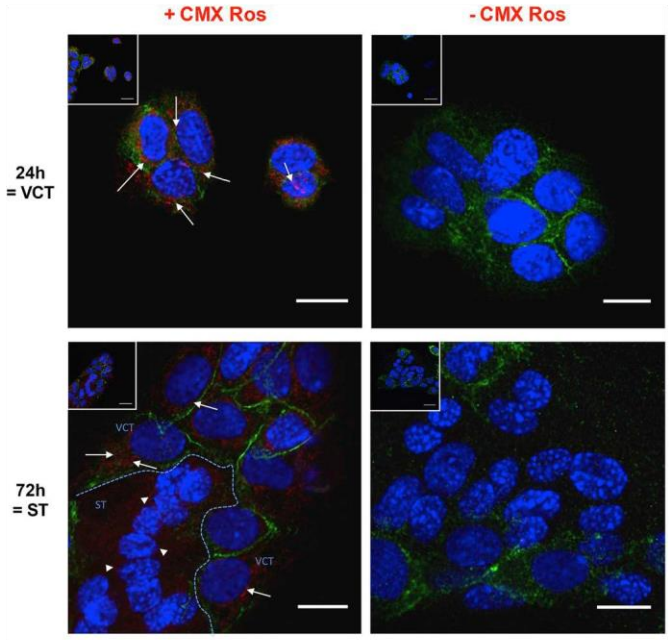


Fig. 2. Mitochondria and Trophoblastic Differentiation. Immunofluorescent pictures of trophoblastic cells after 24 h and 72 h of primary VCT cells culture from human term placenta. Cells were incubated with or without CMX Ros (50 nM) for 45 min at 37 °C protected from light. Mitochondria with intact transmembrane potential were stained in red and indicated with white arrow. Plasma membranes were immunostained with anti-desmoplakin antibody (green) after cell fixation with paraformaldehyde (PFA). Nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (blue). 800× magnification for picture at upper left (scale bar = 20 µm). Zoom in ×2 for principal picture (scale bar = 10 µm).

levels, respectively 7,7 ± 1,6 UI/L and 26,9 ± 17,1 nmol/L (Fig. 3A and 3B). ST formation was associated with a significant increase in both P4 and hCG secretion by respectively 8,5 folds and 25 folds. There was a positive correlation between P4 and hCG secretion (log P4 = 0,6361 log hCG + 0,9413; R^2 = 0,7; Pearson coefficient = 0,82; p = 5.10^{-14}) (Fig. 3C).

3.3. Progestins profile of secretion

GC-MS/MS analysis confirmed our findings on P4. Indeed, GC-MS/MS allowed us to fully characterize progestins trophoblastic secretion profile (Fig. 4A). P4 was the main progestin secreted in both VCT and ST. Among steroidogenic precursors and metabolites, we observed a significant increase in P5 secretion by 5,7 folds (p < 0,05) during the formation of ST whereas 17-OHP4 remained undetectable in both VCT and ST (Fig. 4B). These findings pointed out a global increase in the trophoblastic progestins pathway accompanying ST formation. P5 levels were not correlated neither with P4 nor with hCG levels (data not shown).

3.4. Expression of transporters and enzymes involved in P4 production

We investigated each step of progestins secretion, i.e expression of the cholesterol mitochondrial transporter (MLN64) and of steroidogenic enzymes (P450SCC and HSD3B1). Immunocytofluorescence showed that MLN64, P450SCC and HSD3B1 were expressed in the cytoplasm of both VCT and ST (Fig. 5). As expected, no staining was observed in the nuclei but a weak staining was observed in the perinuclear region. Western blot analysis showed that MLN64, P450SCC and HSD3B1 were expressed at the protein level in both VCT and ST (Fig. 6). During ST formation, expression of HSD3B1 significantly increased by 4,1 ± 1,9 folds while MLN64 and P450SCC protein expression did not change. RT-qPCR experiments demonstrated that MLN64, P450SCC and

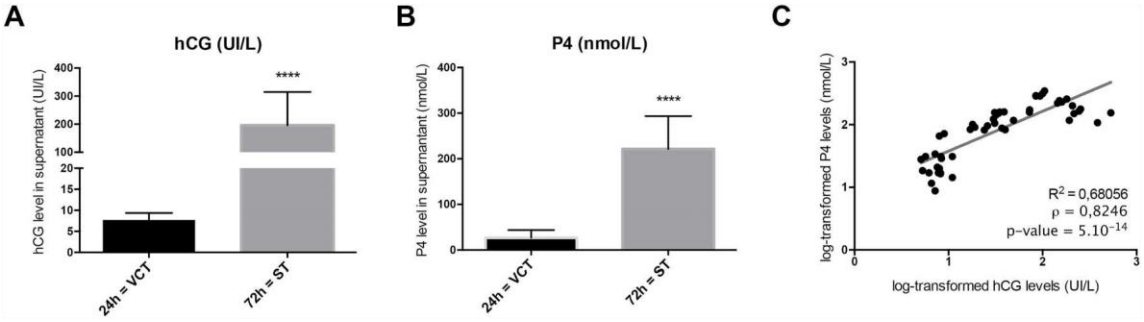


Fig. 3. Secretions of hCG and P4 during VCT differentiation into ST. hCG (UI/L) **(A)** and progesterone (P4) (nmol/L) **(B)** levels in culture supernatants from primary VCT cells culture from human term placenta after 24 h or 72 h of culture. Concentrations were determined by immuno-assays (Liaison®, DiaSorin). Data are presented as mean ± SD from eleven independent experiments. ****: p < 0,0001 VS 24 h. Fig. 3C represents the correlation between Progesterone (P4) and hCG levels. Correlation was assessed by Pearson correlation test (ρ).

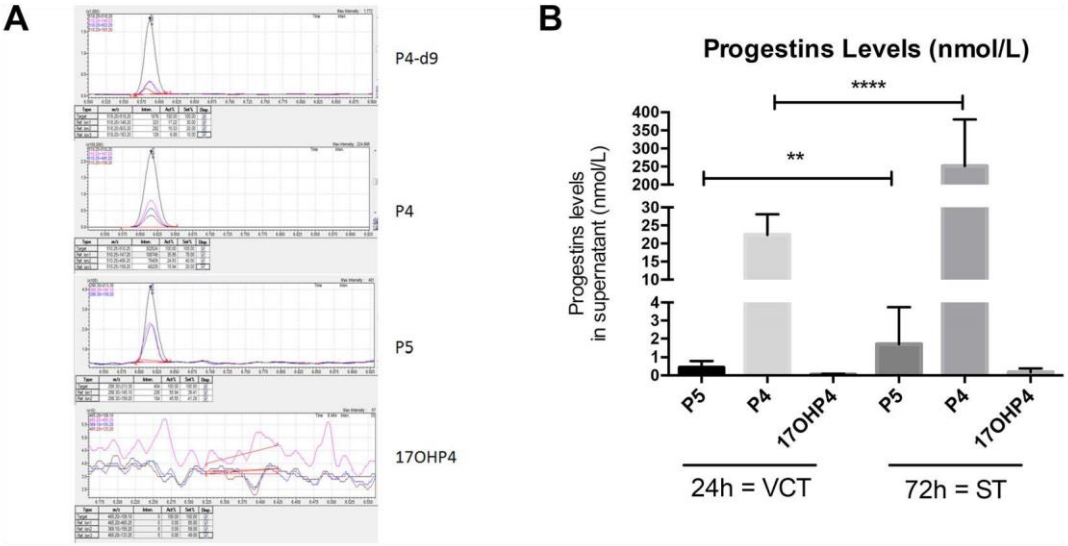


Fig. 4. Progestins trophoblastic secretion profile during VCT differentiation into ST. A) Steroid profile of deuterated Progesterone (P4-d9), Progesterone (P4), Pregnenolone (P5) and 17-hydroxyprogesterone (17OHP4). **B)** Pregnenolone (P5), Progesterone (P4) and 17-hydroxyprogesterone (17OHP4) levels (nmol/L) in culture supernatant from primary cell culture of VCT (24 h) and during ST differentiation (72 h). P5, P4 and 17OHP4 levels were measured using gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Data are presented as mean ± SD from eleven independent experiments. *: $p < 0,05$, ****: $p < 0,001$ VS 24 h.

HSD3B1 were expressed at mRNA level in both VCT and ST (Fig. 7). Confirming the results obtained at the protein level, HSD3B1 mRNA increased significantly by 2, 5 ± 0, 8 folds during ST formation while MLN64 and P450SCC mRNA levels did not change during VCT differentiation.

3.5. Modulation of VCT differentiation and progestins pathway under FSK

Forskolin (FSK), an adenylate cyclase activator was used to stimulate VCT differentiation. As expected, FSK drastically stimulated hCG secretion by 3,5 folds after 6 h of incubation and by 5,1 folds after 48 h of stimulation (Fig. 8A). Furthermore, FSK induced an increase in P4 secretion but to a smaller extend (1,5 folds, $p < 0,05$) and also in P5 secretion by 1,5 folds- P4 and P5 concentrations being assessed by GC-MS/MS. The increase in P4 secretion became significant after 72 h of culture and 48 h of incubation with FSK (Fig. 8B and C). Under FSK stimulation, P4 increase was positively correlated with hCG increase as demonstrated by Pearson correlation test (Log P4 = 0,3665 × Log hCG + 1,2837; $R^2 = 0,78$; Pearson Coefficient = 0,86; $p = 1,96.10^{-7}$) (Fig. 8D). FSK stimulated the expression of all the partners but only at the proteic level (Fig. 9). After 72 h of culture and 48 h of incubation with FSK, protein levels of MLN64, P450SCC and HSD3B1 were respectively increased by 2,1 folds, 1,8 folds and 1,2 folds in comparison to 48 h incubation with DMSO.

4. Discussion

For many years, ST has been considered as the only endocrine tissue of the human placenta secreting both protein hormones such as hCG, and steroidogenic hormones such as P4 in maternal circulation (Miller, 1998; Guibourdenche et al., 2009; Bernischke et al., 2012; Chatuphonprasert et al., 2018). However, we had previously shown that this endocrine production is not restricted to ST as hCG is also produced by VCT and even by the extravillous cytotrophoblast (EVCT) (Handschuh et al., 2007). In this work, we aimed to investigate progestins production by the VCT *in vitro,* using new tools such as mass spectrometry.

In our *in vitro* culture model, VCTs isolated from human placenta aggregate and fuse to form ST within 72 h of culture mimicking their *in vivo* physiological differentiation (Kliman et al., 1986; Alsat et al., 1993). This morphological differentiation is associated with a functional differentiation as stated by the significant increase in hCG secretion (Kudo et al., 2003; Leguy et al., 2014). In this work, we showed that VCT secretes significant amounts of P4 increasing as it turns into ST. We confirmed that ST is a major source of P4 *in vitro* (Zosmer et al., 1997; Tuckey, 2005). Interestingly, we showed that this increase in steroidogenesis is not restricted to P4, as P5 is also secreted.

Like in ovaries and adrenals, progestins production requires cholesterol as initial substrate (Winkel et al., 1981; Miller and Auchus, 2011). As human placenta does not synthetize cholesterol, ST catches maternal cholesterol carried by LDL and HDL in maternal circulation (Winkel et al., 1980; Palinski, 2009; Chatuphonprasert et al., 2018). Thus, cholesterol availability can be a limiting factor of steroidogenesis. The stability of cholesterol levels in our culture medium all along culture duration (data not shown) ruled out this possibility. This observation is in line with previous studies showing that placental mitochondria are able to synthesize P4 without addition of exogenous cholesterol in culture medium (Martinez et al., 1997, 2015). Cholesterol has then to enter the mitochondria to undergo the first step of the cascade of reactions leading to progestins production (Miller and Auchus, 2011; Miller, 2013). We showed that *in vitro*, mitochondria functionality and organization changes with ST formation using CMX Ros staining. Indeed, in VCT, most of the mitochondria have an intact transmembrane potential and are organized in tubular network. In contrast, in ST, few mitochondria are stained by CMX Ros and mitochondrial network seems to be fragmented. Our results are in favor of an alteration of mitochondrial membrane potential during VCT differentiation in agreement with previous studies (De Los Rios Castillo et al., 2011; Bustamante et al., 2014). Thus, we showed that mitochondrial network morphology, harboring either typical lamellar or tubular or vesicular aspect, is coupled with endocrine activity VCT differentiation.

In contrast with other endocrine steroidogenic tissues, human placental mitochondria do not express StAR, the common transporter of cholesterol (Tuckey, 2005), this function being ensured by MLN64 (Bose et al., 2000; Olvera-Sanchez et al., 2011). Our study shows that MLN64 is not only expressed in ST but also in VCT and at the same level. The increase in P4 secretion observed during ST formation is not associated with an increase in MLN64, suggesting that cholesterol entry in the mitochondria is not a limiting step of P4 synthesis. Indeed, it has been shown *in vitro* that a decrease in MLN64 expression by 90% is responsible for a decrease in P4 synthesis of only 30% (Charman et al., 2010). Then, we focused on two major enzymes known to be expressed

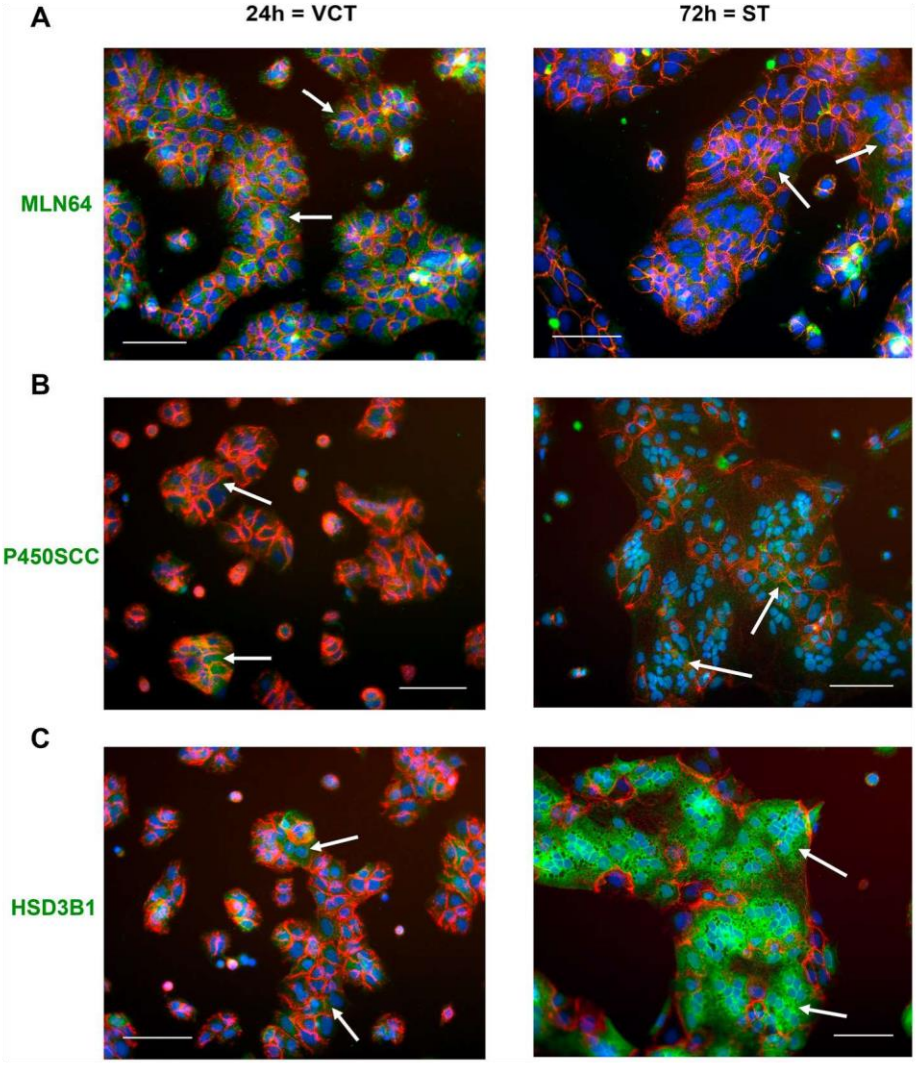


Fig. 5. Localization of MLN64 transporter and P450SCC and HSD3B1 enzymes in VCT and ST. Immunocytofluorescent pictures of trophoblastic cells after 24 h and 72 h of primary VCT cells culture from human term placenta. Cells were immunostained with anti-MLN64 (A, green), anti-P450SCC (B, green) and anti-HSD3B1 (C, green). Plasma membranes were immunostained with anti-desmoplakine antibody (A, B and C, red). Nuclei were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, A, B and C, blue). 400× magnification. Scale bar = 50 µm.

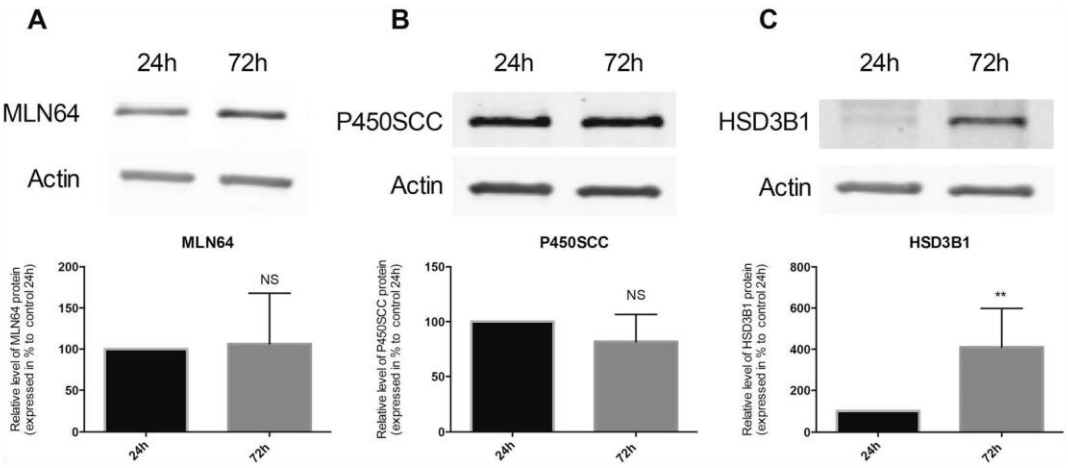


Fig. 6. Protein expression of MLN64 transporter and P450SCC and HSD3B1 enzymes involved in progesterone synthesis in VCT and ST. Human VCTs were isolated from term placenta and then kept in culture for 24 or 72 h. MLN64 (A), P450SCC (B) and HSD3B1 (C) protein expressions were determined using immunoblotting with anti-MLN64, anti-P450SCC and anti-HSD3B1 antibodies. Actin protein expression was determined with anti-actin antibody, used as loading control. Lanes intensity was measured with ImageJ program. Data are presented as percentage of the 24 h control and are expressed as mean +/− SD from five independent experiments. NS: not significant; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ VS 24 h two-tailed paired *t*-test.

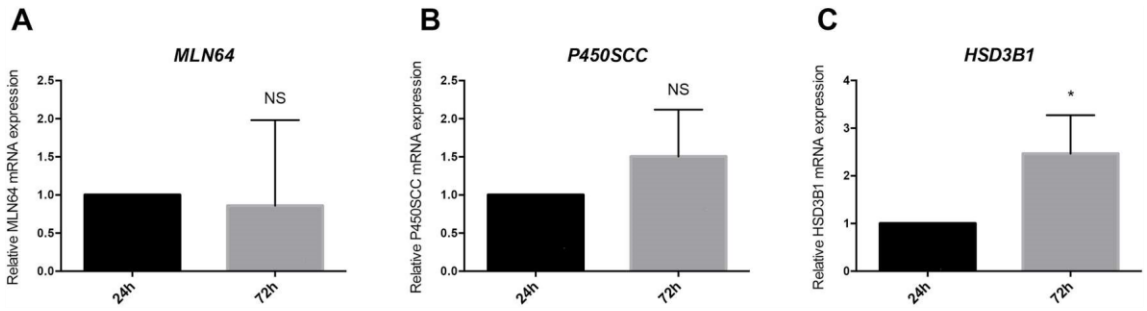


Fig. 7. mRNA expression of MLN64 transporter and P450SCC and HSD3B1 enzymes in VCT and ST. Human VCTs were isolated from term placenta and kept in culture for 24 or 72 h. MLN64 (A), P450SCC (B) and HSD3B1 (C) mRNA expressions were determined using real-time quantitative PCR method and were normalized using 18S, RPLO, HPRT and SDHA mRNA expressions. Data are presented as mRNA expression ratio to the 24 h control and are expressed as mean −/+ SD from four independent experiments. NS: not significant; *: $p < 0,05$ VS 24 h, two-tailed paired *t*-test.

in placenta and involved in cholesterol transformation into P4 (Tuckey et al., 1994; Pasqualini, 2005; Chatuphonprasert et al., 2018). Cholesterol is converted into P5 by P450SCC type 1 (CYP11A1) and P5 is then converted in P4 by HSD3B type 1. We showed at both mRNA and protein levels that those two enzymes are not only expressed in ST but also in VCT. HSD3B1 expression significantly increases during VCT differentiation into ST while P450SCC expression remains stable. This is in contradiction with a previous study that described an increase in P450SCC concentration in human placenta during gestation (Simpson and Miller, 1978). However, this increase probably only reflected the growth of placental mass as P450SCC concentration in trophoblast only represented 20% of the concentration measured in placental homogenate (Tuckey et al., 1994). The increase in P4 production concomitant with the stability of MLN64 and P450SCC expressions, suggests a lack of saturation of both MLN64 transporter and steroidogenic enzymes. This is important since the degree of P450SCC saturation with cholesterol may limit P4 synthesis as observed in choriocarcinoma cell lines (Martinez et al., 1997). The increase in HSD3B1 expression could explain the discrepancy between the drastic increase in P4 and the small increase in P5 on our MS profile, P5 being quickly converted in P4. Indeed, it has previously been shown that HSD3B1 activity is higher than P450SCC activity, thus not representing a rate-limiting step in P4 synthesis (Tuckey, 2005). The absence of any detectable 17OHP4 on this steroids profile also confirms the lack of CYP17A1 expression in the

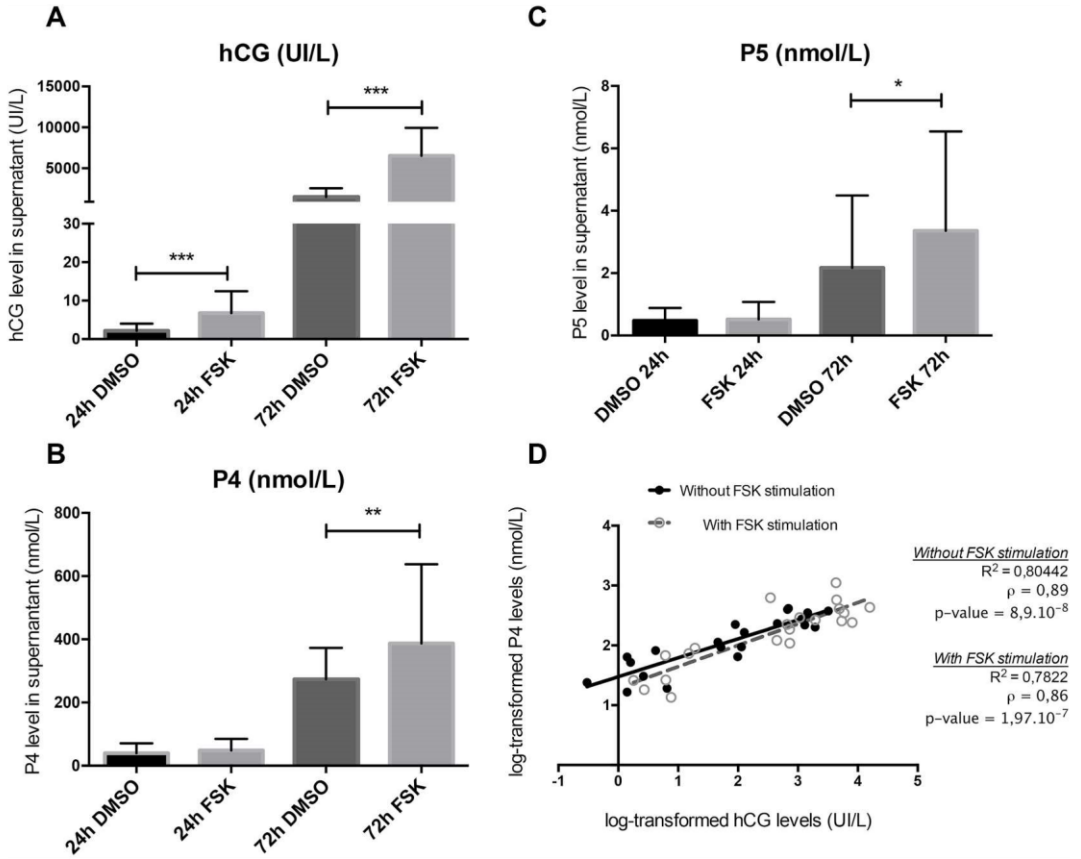


Fig. 8. Secretions of hCG, P4 and Pregnenolone under FSK stimulation. hCG (UI/L) **(A),** Progesterone (P4) (nmol/L) **(B)** and Pregnenolone (P5) (nmol/L) **(C)** levels in culture supernatants from primary cell culture of VCT incubated with or without FSK (10 μM) after 24 h or 72 h of culture. DMSO is used as vehicle control of FSK. hCG concentrations were measured using immuno-assay (Liaison®, DiaSorin). P4 and P5 levels were determined using mass spectrometry (GC-MS/MS). Data are presented as mean ± SD from seven independent experiments. *: $p < 0,05$ in comparison to DMSO control at the same culture time. Fig. 8. **D** represents the correlation between Progesterone (P4) and hCG levels with or without FSK stimulation. Correlation was assessed by Pearson correlation test (ρ).

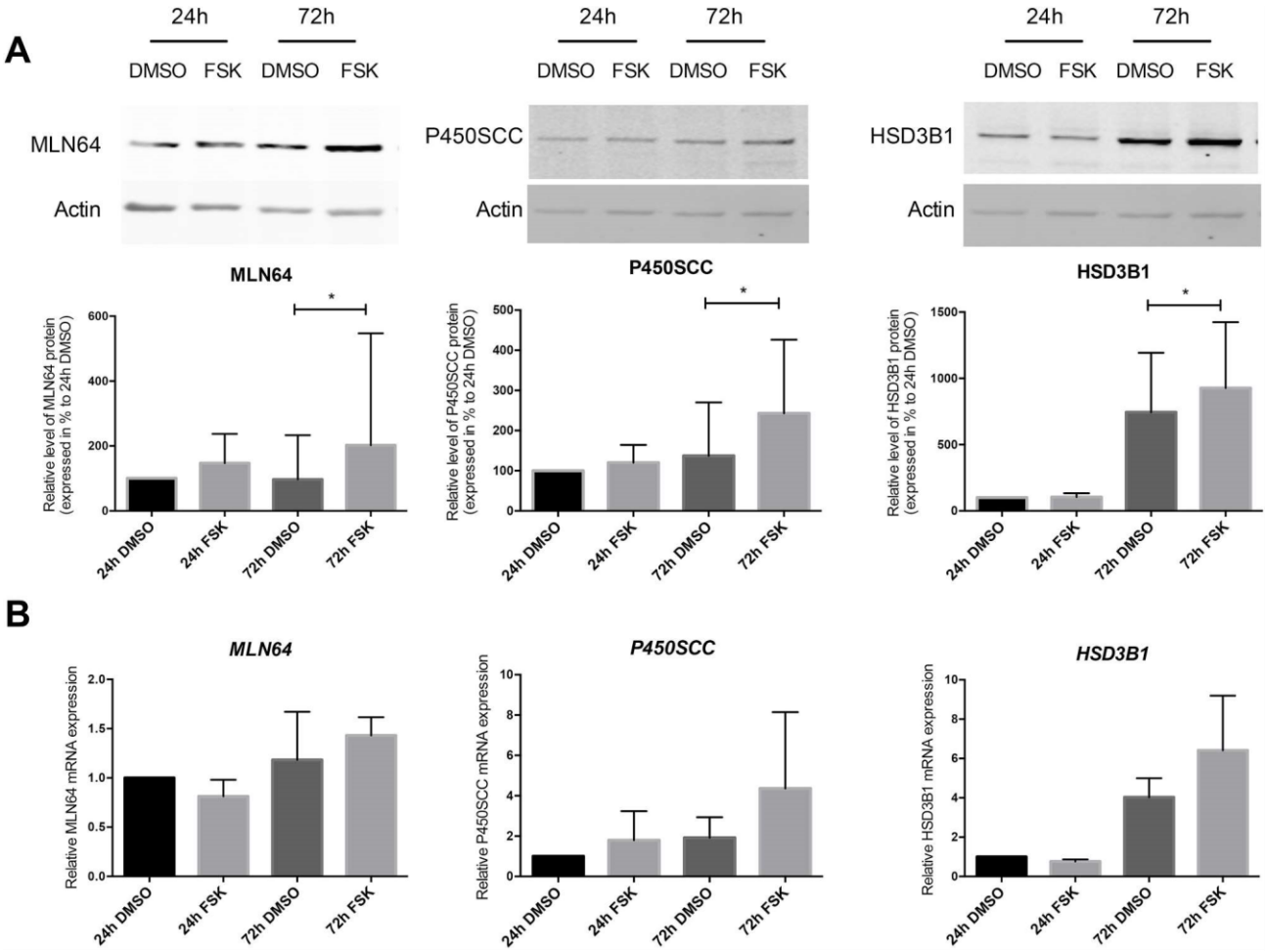


Fig. 9. Expression of MLN64transporter and P450SCC and HSD3B1 enzymes under FSK stimulation. Human VCTs were isolated from term placenta and then cultivated for 24 or 72 h with or without FSK (10 μM). (A) MLN64, P450SC and HSD3B1 protein expressions of were determined using immunoblotting with anti-MLN64, anti-P450SCC and anti-HSD3B1 antibodies. Actin protein expression was determined with anti-actin antibody, used as loading control. Lanes intensity was measured with ImageJ program. Data are presented as percentage of the 24 h control DMSO and are expressed as mean −/+ SD from six independent experiments. NS: not significant; *: $p < 0,05$ in comparison to DMSO at the same time of culture, two-tailed paired *t*-test. (B) MLN64, P450SCC and HSD3B1 mRNA expressions were determined using real-time quantitative PCR method and were normalized using 18S, RPLO, HPRT and SDHA mRNA expressions. Data are presented as mRNA expression ratio to the 24 h control DMSO and are expressed as mean −/+ SD from four independent experiments. NS: not significant 05 in comparison to DMSO at the same culture time, two-tailed paired *t*-test.

trophoblast (Voutilainen and Miller, 1986).

As the differentiation of VCT into ST is associated with an increased secretion of P4, we investigated the link between this morphological differentiation and steroidogenesis. Regulation of this fusion process and of steroidogenesis is complex involving both hormones and their second messengers (Stocco et al., 2005; Gauster and Huppertz, 2008; Gauster et al., 2009). Among them, cAMP produced by adenylate cyclase (AC) is known to induce VCT fusion, and also to regulate steroidogenic tissues activity (Azar et al., 2018). cAMP has pleiotropic effects such as PKA activation, leading to the phosphorylation of proteins such as SF-1 and CREB. We used forskolin (FSK), an AC/PKA pathway activator stimulating VCT differentiation and fusion (Wice et al., 1990). FSK stimulation induced an increase in the secretion of all hormones (i.e. hCG, P5, P4) and in the expression of MLN64, HSD3B1, P450SCC, suggesting a relationship between fusion and steroidogenesis. Indeed, in choriocarcinoma cell lines, cAMP analogs increase P4 synthesis while PKA inhibitors decrease P4 synthesis and increase mitochondrial proteins phosphorylation (Maldonado-Mercado et al., 2008). However, cAMP modifies neither P4 synthesis nor protein phosphorylation in normal placental mitochondria (Gomez-Chang et al., 2014). In fact, several isoforms of AC can be expressed and differentially regulated in choriocarcinoma cells and normal placenta (Bernatchez et al., 2003). Several proteins being critical for this fusion process, such as syncytins, can be modulated by cAMP/PKA pathway (Gerbaud and Pidoux, 2015) and P450SCC and HSD3B1 promoters harbor binding sites for CRE (Simard et al., 2005; Shih et al., 2011).

The positive correlation between hCG and P4 increase suggests a potential implication of hCG which plays a key role in trophoblast fusion and functions (Saleh et al., 2007; Guibourdenche et al., 2009). BeWo cells are responsive to signals inducing cell fusion and FSK or 8-br-cAMP are known to enhance ST formation and hormonal differentiation (Wice et al., 1990; Orendi et al., 2010; Rothbauer et al., 2017; Azar et al., 2018). hCG addition in BeWo cells culture medium increased P4 synthesis through PKA pathway (Manna et al., 2006). This suggests that placental steroidogenesis could be regulated by hCG and its receptors, whose expression changes between VCT and ST states (Weedon-Fekjaer and Tasken, 2012). P4 and its receptors could also be involved in the same way. In Bewo cells, syncytialisation is associated with changes in P4 receptors expression which is globally decreased by FSK (Zachariades et al., 2012). Other hormones could be implied and a paracrine regulation is also possible via Aldo Keto Reductase (AKR) (Pepe and Albrecht, 1999; Byrns, 2012). P4 production by human placenta occurs in the villous tissue since VCT stage. VCT functions and differentiation are complex involving both hCG and cAMP. Further

a a

investigations would be required as these pathways can be altered in pathological pregnancies or by endocrine disruptors (Byrns, 2014; Berkane et al., 2018; Shan et al., 2019).

Acknowledgments

This work was supported by PRINCEPS and ANRS (PhD Grant n°17198) (Paris, France). The authors thank Dr Jeanne Sibiude, the consenting patients and the clinical staff midwives of Cochin Port-Royal, Antony, Beaujon and Montsouris hospitals for providing placental tissues, and Cellular and Molecular Imaging facility, (INSERM UMS 025 – CNRS UMS 3612, Faculty of Pharmacy of Paris, Paris Descartes University, France).

References

Alsat, E., Haziza, J., Evain-Brion, D., 1993. Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human trophoblast cells in culture. J. Cell. Physiol. 154, 122–128.

Azar, C., Valentine, M., Trausch-Azar, J., Druley, T., Michael Nelson, D., Schwartz, A.L., 2018. RNA-Seq identifies genes whose proteins are transformative in the differentiation of cytotrophoblast to syncytiotrophoblast, in human primary villous and BeWo trophoblasts. Sci. Rep. 8, 5142. https://doi.org/10.1038/s41598-018-23379-2.

Benirschke, K., Burton, G., Baergen, R., 2012. In: heidelberg, Bernischke K. (Ed.), Pathology of the Human Placenta. Springer doi10.1007.

Berkane, N., Liere, P., Lefevre, G., Alfaidy, N., Nahed, R.A., Vincent, J., Oudinet, J.P., Pianos, A., Cambourg, A., Rozenberg, P., Galichon, P., Rousseau, A., Simon, T., Schumacher, M., Chabbert-Buffet, N., Hertig, A., 2018. Abnormal steroidogenesis and aromatase activity in preeclampsia. Placenta 69, 40–49. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.07.004.

Bernatchez, R., Belkacemi, L., Rassart, E., Daoud, G., Simoneau, L., Lafond, J., 2003. Differential expression of membrane and soluble adenylyl cyclase isoforms in cytotrophoblast cells and syncytiotrophoblasts of human placenta. Placenta 24, 648–657.

Bose, H.S., Whittal, R.M., Huang, M.C., Baldwin, M.A., Miller, W.L., 2000. N-218MLN64, a protein with StAR-like steroidogenic activity is folded and cleaved similarly to StAR. Biochemistry 39, 11722–11731.

Bustamante, J., Ramirez-Vélez, R., Czerniczyniec, A., Cicerchia, D., Aguilar de Plata, A.C., Lores-Arnaiz, S., 2014. Oxygen metabolism in human placenta mitochondria. J. Bioenerg. Biomembr. 46, 459–469. https://doi.org/10.1007/s10863-014-9572-x.

Byrns, M.C., 2012. Role of aldo-keto reductase enzymes in mediating the timing of parturition. Front. Pharmacol. 2. https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00092.

Byrns, M.C., 2014. Regulation of progesterone signaling during pregnancy: implications for the use of progestins for the prevention of preterm birth. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 139, 173–181. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.01.015.

Cao, S., Ye, L., Wu, Y., Mao, B., Chen, L., Wang, X., Huang, P., Su, Y., Ge, R.S., 2017. The effects of fungicides on human 3b-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and aromatase in human placental cell line JEG-3. Pharmacology 100, 139–147. https://doi.org/10.1159/000475531.

Charman, M., Kennedy, B.E., Osborne, N., Karten, B., 2010. MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick type C1 protein. JLR (J. Lipid Res.) 51, 1023–1034. https://doi.org/10.1194/jlr.M002345.

Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K., Ellinger, I., 2018. Physiology and pathophysiology of steroid biosynthesis, transport and metabolism in the human placenta. Front. Pharmacol. 9, 1027. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01027.

De Los Rios Castillo, D., Zarco-Zavala, M., Olvera-Sanchez, S., Pardo, J.P., Juarez, O., Martinez, F., Mendoza-Hernandez, G., Garcia-Trejo, J.J., Flores-Herrera, O., 2011. Atypical cristae morphology of human syncytiotrophoblast mitochondria: role for complex V. J. Biol. Chem. 286, 23911–23919. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252056.

Feng, Y., Zhang, P., Zhang, Z., Shi, J., Jiao, Z., Shao, B., 2016. Endocrine Disrupting Effects of Triclosan on the Placenta in Pregnant Rats. Plos One 11, e0154758. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154758.

Ferecatu, I., Canal, F., Fabbri, L., Mazure, N.M., Bouton, C., Golinelli-Cohen, M.P., 2018. Dysfunction in the mitochondrial Fe-S assembly machinery leads to formation of the chemoresistant truncated VDAC1 isoform without HIF-1α activation. PLoS One 13, e0194782. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194782.

Forte, M., Mita, L., Cobellis, L., Merafina, V., Specchio, R., Rossi, S., Mita, D.G., Mosca, L., Castaldi, M.A., De Falco, M., Laforgia, V., Crispi, S., 2016. Triclosan and bisphenol a affect decidualization of human endometrial stromal cells. Mol. Cell. Endocrinol. 422, 74–83. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.11.017.

Gauster, M., Huppertz, B., 2008. Fusion of cytotrophoblast with syncytiotrophoblast in the human placenta : factors involved in syncytialization. J. Reprod. Med. Endocrinol. 5, 76–82.

Gauster, M., Moser, G., Orendi, K., Huppertz, B., 2009. Factors involved in regulating trophoblast fusion : potential role in the development of preeclampsia. Placenta 30, S49–S54. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.10.011.

Gerbaud, P., Pidoux, G., 2015. An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. Placenta 29, S35–S42. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.12.015.

Giton, F., Trabado, S., Maione, L., Sarfati, J., Le Bouc, Y., Brailly-Tabard, S., Fiet, J., Young, J., 2015. Sex steroids, precursors, and metabolite deficiencies in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism and panhypopituitarism: a GCMS-based comparative study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 100, E292–E296. https://doi.org/10.1210/jc.2014-2658.

Gomez-Chang, E., Espinosa-Garcia, M.T., Olvera-Sanchez, S., Flores-Herrera, O., Martinez, F., 2014. PKA tightly bound to human placental mitochondria participates in steroidogenesis is not modified by cAMP. Placenta 35, 748–762. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.06.005.

Guibourdenche, J., Fournier, T., Malassine, A., Evain-Brion, D., 2009. Development and hormonal functions of the human placenta. Folia Histochem. Cytobiol. 47, S35–S40. https://doi.org/10.2478/v10042-009-0110-3.

Handschuh, K., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., Fournier, T., 2007. Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. Placenta 28, 175–184.

Kliman, H.J., Nestler, J.E., Sermasi, E., Sanger, J.M., Strauss, J.F., 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. Endocrinology 118, 1567–1582.

Kudo, Y., Boyd, C.A., Kimura, H., Cook, P.R., Redman, C.W., Sargent, I.L., 2003. Quantifying the syncytialisation of human placental trophoblast BeWo cells grown in vitro. Biochim. Biophys. Acta 1640, 25–31.

Legacki, E., Ball, A., Corbin, C., Loux, S., Scoggin, K., Stanley, S., Conley, A., 2017. Equine fetal adrenal, gonadal and placental steroidogenesis. Reproduction 154, 445–454. https://doi.org/10.1530/REP-17-0239.

Leguy, M.C., Brun, S., Pidoux, G., Salhi, H., Choiset, A., Menet, M.C., Gil, S., Tsatsaris, V., Guibourdenche, J., 2014. Pattern of secretion of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) during pregnancies complicated by fetal aneuploidy, in vivo and in vitro. Reprod. Biol. Endocrinol. 12, 129. https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-129.

Maldonado-Mercado, M.G., Espinosa-Garcia, M.T., Gomez-Concha, C., Monreal-Flores, J., Martinez, F., 2008. Steroidogenesis in Bewo cells: role of protein kinase A and benzodiazepines. Int. J. Biochem. Cell Biol. 40, 901–908.

Manna, P.R., Chandrala, S.P., Jo, Y., Stocco, D.M., 2006. cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. J. Mol. Endocrinol. 37, 81–95.

Martinez, F., Kiriakidou, M., Strauss, J.F., 1997. Structural and functional changes in mitochondria associated with trophoblast differentiation: methods to isolate enriched preparations of syncytiotrophoblast mitochondria. Endocrinology 138, 2172–2183.

Martinez, F., Olvera-Sanchez, S., Esparza-Perusquia, M., Gomez-Chang, E., Flores-Herrera, O., 2015. Multiple functions of syncytiotrophoblast mitochondria. Steroids 103, 11–22. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.09.006.

Miller, W.L., 1998. Steroid hormone biosynthesis and actions in the materno-feto-placental unit. Clin. Perinatol. 25, 799–817.

Miller, W.L., 2013. Steroid hormone synthesis in mitochondria. Mol. Cell. Endocrinol. 379, 62–73. https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.014.

Miller, W.L., Auchus, R.J., 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endocr. Rev. 32, 81–151. https://doi.org/10.1210/er.2010-0013.

Morel, Y., Roucher, F., Plotton, I., Goursaud, C., Tardy, V., Mallet, D., 2016. Evolution of steroids during pregnancy: maternal, placental and fetal synthesis. Ann. Endocrinol. 77, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.023.

Olvera-Sanchez, S., Espinosa-Garcia, M.T., Monreal, J., Flores-Herrera, G., Martinez, F., 2011. Mitochondrial heat shock protein participates in placental steroidogenesis. Placenta 32, 222–229. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.12.018.

Orendi, K., Gauster, M., Moser, G., Meiri, H., Hupperts, B., 2010. The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium specific proteins. Reproduction 140, 759–766. https://doi.org/10.1530/REP-10-0221.

Palinski, W., 2009. Maternal-fetal cholesterol transport in the placenta: good, bad and target for modulation. Circ. Res. 104, 569–571. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.

Pasqualini, J.R., 2005. Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 97, 401–415.

Pepe, G.J., Albrecht, E.D., 1999. Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy. Steroids 64, 624–627.

Rothbauer, M., Patel, N., Gondola, H., Siwetz, M., Huppertz, B., Ertl, P., 2017. A comparative study of five physiological key parameters between four different human trophosblast-derived cell lines. Sci. Rep. 7, 5892. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06364-z.

Saleh, L., Prast, J., Haslinger, P., Husslein, P., Helmer, H., Knöfler, M., 2007. Effects of different human chorionic gonadotrophin preparations on trophoblast differentiation. Placenta 28, 199–203.

Shan, A., Li, M., Li, X., Yan, M., Chang, Y., Chen, X., Tang, N.J., 2019. BDE-47 decreases progesterone levels in BeWo cells by interfering with mitochondrial functions and genes related to cholesterol transport. Chem. Res. Toxicol. 32, 621–628. https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00312.

Shih, M.C., Chiu, Y.N., Hu, M.C., Guo, I.C., Chung, B.C., 2011. Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. Mol. Cell. Endocrinol. 336, 80–84. https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.12.017.

Simard, J., Ricketts, M.L., Gingras, S., Soucy, P., Feltus, A., Melner, M.H., 2005. Molecular biology of the 3-b-hydroxysteroid dehydrogenase/Δ5-Δ4 isomerase gene family. Endocr. Rev. 26, 525–582.

Simpson, E.R., Miller, D.A., 1978. Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450, and iron-sulfur protein in human placental mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 190, 800–808.

Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y., Manna, P.R., 2005. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. Mol. Endocrinol. 19, 2647–2659.
Tuckey, R.C., 2005. Progesterone synthesis by the human placenta. Placenta 26, 273–281.
Tuckey, R.C., Kostadinovic, Z., Cameron, K.J., 1994. Cytochrome P450scc activity and substrate supply in human placental trophoblasts. Mol. Cell. Endocrinol. 105, 103–109.
Voutilainen, R., Miller, W.L., 1986. Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450scc (20,22-Desmolase), P450cl7 (17a-Hydroxylase/17,20-Lyase), and P450c21 (21-Hydroxylase) in the human fetus. J. Clin. Endocrinol. Metab. 63, 1145–1150.
Wang, X., Chen, X., Feng, X., Chang, F., Chen, M., Xia, Y., Chen, L., 2015. Triclosan causes spontaneous abortion accompanied by decline of estrogen sulfotranferase activity in humans and mice. Sci. Rep. 5, 18252. https://doi.org/10.1038/srep18252.
Weedon-Fekjaer, M.S., Tasken, K., 2012. Spatiotemporal dynamics of hCG/cAMP signaling and regulation of placental function. Placenta 33, S87–S91. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.003.
Wice, B., Menton, D., Geuze, H., Schwartz, A.L., 1990. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. Exp. Cell Res. 186, 306–316.
Winkel, C.A., Snyder, J.M., MacDonald, P.C., Simpson, E.R., 1980. Regulation of cholesterol and progesterone synthesis in human placental cells in culture by serum lipoproteins. Endocrinology 106, 1054–1060.
Winkel, C.A., MacDonald, P.C., Hemsell, P.G., Simpson, E.R., 1981. Regulation of cholesterol metabolism by human trophoblastic cells in primary culture. Endocrinology 109, 1084–1090.
Zachariades, E., Mparmpakas, D., Pang, Y., Rand-Weaver, M., Thomas, P., Karteris, E., 2012. Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour. Placenta 33, 367–372. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.002.
Zosmer, A., Elder, M.G., Sullivan, M.H.F., 1997. Second messengers and the control of progesterone production from first trimester trophoblast. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 62, 201–205.

c c l s

Résumé

Le nombre de grossesse se déroulant dans un contexte de traitement maternel au long cours, notamment pour les antirétroviraux (ARV) contre l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), augmente constamment. Des études ont montré que ces traitements entrainaient des complications obstétricales, des fausses couches et des naissances prématurées. D'autres ont établi que les traitements anti-VIH, notamment les inhibiteurs de protéases (IP), altéraient la production d'hormones stéroïdes à la fois chez la mère et le fœtus. Les mécanismes intracellulaires responsables de ces altérations restent mal connus et peu de choses a été décrit au niveau du placenta humain, alors que la fonction endocrine placentaire est indispensable au bon déroulement de la grossesse. La production des hormones placentaires comme l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) et la progestérone (P4) est assurée par le tissu trophoblastique villeux au sein de la villosité choriale, principalement le syncytiotrophoblaste (ST). Le ST qui est en contact direct avec le sang maternel, résulte de la différenciation des cytotrophoblastes villeux (CTV), processus que nous savons reproduire *in vitro* au laboratoire. Nous postulons que les complications des grossesses sous ARV impliquent pour partie, une altération de la différenciation morphologique et fonctionnelle du trophoblaste villeux.

Notre premier objectif a été de caractériser la stéroïdogenèse placentaire sur culture primaire de trophoblastes villeux humain normaux à terme, et ce dès le stade CTV. Nous avons développé les outils pour évaluer au cours de la différenciation trophoblastique, la sécrétion des principales hormones placentaire (hCG, P4 et oestradiol [E2]) dans les surnageants de culture par immunodosages et spectrométrie de masse, et leur synthèse (analyse des partenaires cellulaires impliqués en terme de transcrits et de protéines, organites cellulaires concernés). Le second objectif a été d'étudier in vitro, l'impact des IP prescrits (ritonavir et lopinavir) sur cette différenciation, les mécanismes et organites intracellulaires affectés. Nous nous sommes focalisés sur la progestérone, la mitochondrie et sur deux voies de signalisation, la voie « Unfolded Protein Response » et la voie AMPc/PKA.

Nous avons montré que la stéroïdogenèse placentaire n'était pas l'apanage du seul ST mais débutait dès le stade CTV. Le CTV exprime les partenaires clés de la synthèse de P4 à savoir, le transporteur du cholestérol (MLN64) et les enzymes (P450SCC et HSD3B1). Leur expression augmente avec la différenciation morphologique des CTV en ST et s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de P4. Cette augmentation est corrélée à celle de la sécrétion d'hCG, suggérant une inter-régulation entre l'hCG et la P4 dans ce processus de différenciation.

Nous avons ensuite montré que parmi les 2 principaux IP étudiés, seul le lopinavir altérait la différenciation dès la dose de 10 µM. On observe en effet, sur le plan morphologique une diminution de la fusion des CTV pour former du ST, qui s'accompagne d'une diminution de la sécrétion d'hCG. La production de P4 est aussi diminuée tant en terme de sécrétion que de synthèse (diminution de l'expression de P450SCC et HSD3B1). Le lopinavir altère la structure la dynamique de fusion/fission des mitochondries avec une diminution de l'expression de la protéine Mfn2. Le lopinavir induit un stress du réticulum endoplasmique avec activation de la voie UPR IRE1α.

Ainsi, nous avons établi que le trophoblaste villeux humain normal à terme était capable dès le stade CTV, in vitro, de produire de l'hCG mais aussi de la P4, et que cette production augmentait avec sa différenciation en ST. Le lopinavir altère cette différenciation et impacte la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. Il en résulte une diminution de la production de P4 et d'hCG, hormones indispensables à la grossesse, qui pourrait expliquer les complications obstétricales des patientes VIH+ traitées, comme la prématurité et les fausses couches.

Mots clés : placenta humain, hCG, stéroïdogenèse, progestérone, mitochondrie, inhibiteur de protéase, lopinavir, stress du réticulum endoplasmique, VIH, grossesse