

AIX MARSEILLE UNIVERSITE
Ecole Universitaire de Maïeutique Marseille Méditerranée

IMPACT DES MICROPARTICULES ISSUES DU MICROENVIRONNEMENT PLACENTAIRE SUR LES MONOCYTES

Présenté et publiquement soutenu devant
l'Ecole Universitaire de Maïeutique Marseille Méditerranée

Le 27 Avril 2016

Par

Margot TESSONNIER
Née le 11 Janvier 1992
à Marseille

Pour obtenir le Diplôme d'Etat de Sage-Femme

Directeur de Mémoire : Pr Jean-Louis Mège
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Jean-Louis MEGE, directeur du laboratoire de m'avoir permis de réaliser ce mémoire au sein de l'unité, de la patiente dont il a fait preuve avec moi, ainsi que pour son aide.

Je tiens à remercier également le Docteur Amira BEN AMARA pour son soutien, son implication tout au long de ma présence au sein du laboratoire, sa gentillesse et sa patience. Merci également pour les conseils et l'apprentissage aussi bien technique, scientifique et humain qu'elle a pu m'apporter.

Merci également à toute l'équipe pour leur aide, le Docteur Soraya MEZOUAR et le Docteur Yassina BECHAH, Céline, Rym, Eya, et tous les autres.

Et enfin, je tiens à remercier mes proches pour leur aide tout au long de la rédaction et la réalisation de ce mémoire.

**IMPACT DES MICROPARTICULES
ISSUES DU MICROENVIRONNEMENT
PLACENTAIRE SUR LES MONOCYTES**

Table des matières

I. Introduction	2
A. Données générales sur le placenta	2
B. Les différentes fonctions du placenta	3
C. Placenta et microparticules	7
II. Matériels et Méthodes.....	9
A. Schéma d'étude.....	9
B. Critères d'inclusion	9
C. Critères de non inclusion	9
D. Protocoles.....	10
III. Résultats.....	14
A. Isolement et culture des trophoblastes.....	14
B. Effet des microparticules sur les monocytes	15
IV. Discussion et Conclusion.....	16
A. Limites et Biais.....	16
B. Discussion	16
Références	19
Annexes.....	21

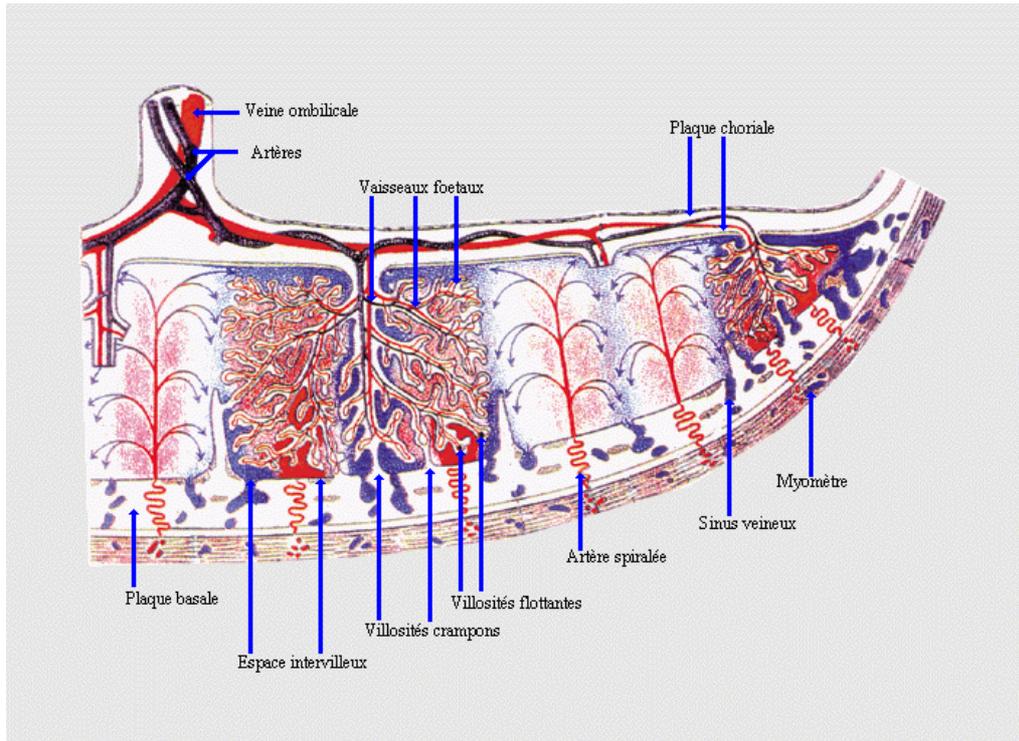
I. Introduction

A. Données générales sur le placenta

Au cours de la grossesse, les échanges entre la mère et le fœtus se font à travers le placenta, un organe clé et transitoire. Cet organe est d'origine fœtale et constitue une semi-allogreffe. A terme, il représente environ 1/6 du poids fœtal, soit environ 500 grammes, pour 20 cm de diamètre et 3 cm d'épaisseur. Après avoir atteint le stade de blastocyste, l'œuf fécondé s'attache à l'endomètre maternel qui se différencie alors en decidua ou caduque. Le trophoblaste, qui délimite le blastocyste, se différencie et s'épaissit en cytotrophoblastes et syncytiotrophoblastes (1).

Les syncytiotrophoblastes participent à l'érosion de l'épithélium de l'endomètre et à la formation de la barrière hémato-placentaire. Cette barrière permet les échanges materno-fœtaux sans que le sang maternel et le sang fœtal n'entrent en contact. Cela est possible grâce à l'unité structurale et fonctionnelle du placenta : la villosité chorale. Celle-ci est composée d'un axe mésenchymateux parcouru par les vaisseaux fœtaux et contenant les cellules de Hofbauer, une sous population de macrophages tissulaires (2). Cet axe est délimité par les cytotrophoblastes sur sa face interne, et les syncytiotrophoblastes sur sa face externe. Ces derniers sont en contact avec le sang maternel dans la chambre intervillieuse et le siège des échanges materno-fœtaux.

La circulation placentaire regroupe la circulation maternelle, la chambre intervillieuse et la circulation fœtale. Leur intégrité est la clé du bon déroulement des échanges.



Structure du placenta humain. Alsat E, Evain-Brion B. Le placenta humain : neuf mois d'une intense activité encore méconnue. Médecine thérapeutique / Pédiatrie. 1999

B. Les différentes fonctions du placenta

Le placenta est un organe à part entière assurant plusieurs fonctions indispensables au maintien de la grossesse.

1. Echanges et protection

La fonction respiratoire

Le placenta assure le rôle de « poumon fœtal » tout au long de la grossesse. Il apporte de l'oxygène dans la circulation fœtale et assure l'évacuation du dioxyde de carbone. Les échanges se font par diffusion ou transfert passif et sont facilités par les différences de pressions et de concentrations entre la circulation fœtale et la circulation maternelle, mais également par l'affinité importante de l'hémoglobine fœtale pour l'oxygène maternel.

La fonction excrétrice et nutritive

Le placenta assure les apports en nutriments et l'excrétion des déchets (3). Les échanges d'eau et d'urée se font par diffusion simple. Le transfert du glucose, principale source d'énergie du fœtus, nécessite une molécule porteuse (4). Les protéines et les lipides ne passent pas la barrière placentaire en raison de leur grosse taille. Le placenta assure leur dégradation en peptides et en acides aminés. Leur transport se fait par transport actif grâce à l'adénosine triphosphate (ATP). Il existe également une autre voie de transfert actif, grâce à l'endocytose via des récepteurs qui est utilisée par le fer ou le cholestérol (5). Les vitamines liposolubles traversent facilement le placenta.

Ainsi, on peut dire que les molécules de faible poids moléculaire (inférieure à 600 daltons), peu ionisées, ou liposolubles passent facilement la barrière placentaire et de façon spontanée. Leur transfert ne dépend ainsi que des débits des circulations maternelle et fœtale. Certains agents pathogènes et toxiques passent également la barrière placentaire. (Tableau 1).

Produits toxiques	Alcool
	Plomb, phosphore, mercure, iode
Médicaments	Analgésiques (morphine, paracétamol) Anesthésiques (thiopental, pilocaine) Tranquillisants et hypnotiques Diurétiques Antibiotiques liposolubles (ampiciline, méthicilline)
Drogues	Opiacés, LSD
Agents Pathogènes	Virus, Parasites (toxoplasmose, paludisme), Bactéries (syphilis)
Substances Organiques	Poids moléculaire < 600 Daltons

Tableau 1 : Alsat E, Evain-Brion D. Le placenta humain : neuf mois d'une intense activité encore méconnue. Médecine thérapeutique / Pédiatrie. 1999

2. Fonction endocrine

Le placenta a une grande fonction endocrine aussi bien pour le fœtus que pour la mère. Cet organe joue un rôle important dans la synthèse d'hormones, indispensables au maintien de la grossesse, et au développement fœtal. On constate également la synthèse des protéines y compris des neuropeptides, analogues des produits synthétisés par l'axe hypothalamo-hypophysaire, des cytokines et des facteurs de croissance. La production hormonale du placenta évolue au cours de la grossesse.

La première hormone synthétisée par l'embryon est un polypeptide: l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) (6), composée de deux sous-unité, α et β , cette dernière étant spécifique à cette hormone. In vitro, elle favorise la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes. C'est également un facteur angiogénique impliqué dans l'implantation et le développement du placenta (7).

L'hormone peptidique la plus sécrétée par le placenta est l'hormone lactogène placentaire. Elle aide au développement du fœtus.

Les principales hormones stéroïdiennes produites par le placenta sont les oestrogènes et la progestérone (8), la production de cette dernière est régulée par l'hCG. Sa synthèse et celle de la prégnénolone se fait à partir du cholestérol contenu dans les low density lipoproteins (LDL) d'origine maternelle. La progestérone a un effet myorelaxant sur l'utérus, ce qui prévient les contractions utérines (3). Le taux d'oestrogène et de progestérone augmente progressivement au court de la grossesse (9). Juste avant l'accouchement, le taux de progestérone chute.

3. Fonction immunologique

La barrière placentaire est aussi une barrière immunologique. En effet, la mère doit tolérer le fœtus, qui constitue une semi-allogreffe, pour le maintien de la grossesse. Cette tolérance repose entre autre sur l'antigénicité (capacité de l'antigène à être reconnu par le système immunitaire) spécifique du placenta et la modulation du système immunitaire maternel (3). Cela abouti une tolérance immunologique. Le placenta contient différentes populations de cellules immunitaires. On note en particulier la présence de cellules dendritiques, de cellules Natural Killer (NK), fortement représentées au début de la grossesse et disparaissant à terme, et de macrophages. Les lymphocytes T jouent un rôle dans la tolérance fœtale, en particulier grâce à l'expansion des cellules T régulatrices. D'ailleurs, certaines hormones, dont la progestérone ont une action immunosuppressive pendant la grossesse, en agissant de façon spécifique sur les lymphocytes (10).

L'embryon possède à la fois le patrimoine génétique de son père et de sa mère. Ainsi, à la surface de ses cellules sont exprimées des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Humain Leucocyte Antigen (HLA)) différentes de celles des cellules maternelles. Pour éviter la réaction immunitaire maternelle, les cytotrophoblastes expriment des molécules HLA non classiques et peu polymorphes comme les molécules HLA-G. Celles-ci inhibent l'action cytolytique des cellules NK et permettent donc de préserver le placenta et l'embryon, quel que soit le groupe HLA paternel. Les cellules trophoblastiques quant à elles, échappent à l'activité immunologique maternelle en n'exprimant pas de molécules HLA classiques (11)(12).

Les macrophages placentaires représentent 20% des cellules immunes du placenta et varient peu tout au long de la grossesse. Ils ont certaines particularités par rapport aux macrophages d'autre origine. Les macrophages placentaires expriment la molécule CD14, un marqueur considéré comme spécifique des monocytes circulants. Ils se différencient spontanément en cellules géantes multinucléées (Multinuclear giant cells

(MGC)) alors qu'une telle différenciation n'est observée, ni chez les monocytes circulants ni chez les macrophages différenciés à partir de monocytes, à moins qu'ils ne soient traités par des cytokines comme l'interféron ou l'interleukine 4. Ces cellules gardent leurs propriétés phagocytaires mais sont moins inflammatoires. La différenciation en cellules géantes multinucléées semble induite par le microenvironnement placentaire, et pourrait dépendre de médiateurs solubles produits par les trophoblastes. L'ajout de surnageant de trophoblastes à des monocytes circulant de femmes enceintes induit leur différenciation en cellules géantes multinucléées (13).

Ce processus de différenciation en cellules géantes est-il retrouvé dans des situations pathologiques comme la chorioamniotite ?

La chorioamniotite est une infection de l'amnios et du chorion qui peut entraîner avortements ou fausses couches tardives. Différents agents pathogènes tels que *Escherichia coli*, Streptocoque du groupe B sont impliqués dans cette pathologie. Au niveau cellulaire, cette infection affecte les macrophages placentaires. Non seulement leurs propriétés sont altérées, mais il apparaît un défaut de fusion et donc de formation de cellules géantes multinucléées (14). L'inflammation entraînée par la pathologie semble rompre la tolérance maternelle pour le fœtus.

C. Placenta et microparticules

Le microenvironnement placentaire contient des microparticules à côté des nombreux médiateurs solubles produits par les trophoblastes. Les microparticules sont issues du bourgeonnement de la membrane cellulaire, et sont des vésicules de petite taille. Elles sont porteuses des caractéristiques des cellules dont elles découlent. Les microparticules ont déjà été isolées à partir d'explant de placenta (15), cependant, les médiateurs solubles produits par les trophoblastes comme les microparticules sont difficiles à étudier en raison de la présence de sérum de veau fœtal (SVF), classiquement utilisé pour la culture cellulaire. Des milieux synthétiques (Opti-MEM) permettent de résoudre ce problème.

Nous nous sommes alors demandé si les microparticules avaient un effet sur la fusion des monocytes.

L'objectif de mon travail a été d'étudier l'impact du microenvironnement placentaire sur les monocytes et plus particulièrement le rôle des microparticules. J'ai utilisé des surnageants de trophoblastes et mesuré leur capacité à induire la formation de cellules géantes à partir des monocytes circulants.

II. Matériels et Méthodes

A. Schéma d'étude

L'étude est une recherche qualitative basée sur une analyse expérimentale, par le biais d'une démarche prospective et descriptive, portant sur les placentas de patientes ayant accouchées à l'Hôpital de la Conception. Cette étude s'inscrit dans la suite de travaux réalisés au sein de l'UMR CNRS 7278 (URMITE) et ayant reçu un avis favorable de la part du Comité d'Ethique de l'Université d'Aix-Marseille (n°08-012). Les placentas ont été récupérés de Janvier 2015 à janvier 2016.

B. Critères d'inclusion

Les placentas ayant été récoltés pour l'étude devaient répondre à plusieurs critères : les patientes dont ils étaient issus devait avoir signé un consentement, après accouchement par voie basse et à terme en dehors de tout contexte infectieux, avec une grossesse d'évolution normale.

C. Critères de non inclusion

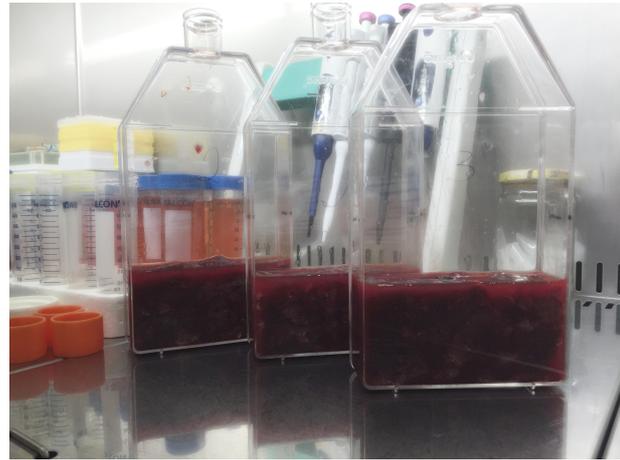
Les placentas n'ayant pas été retenus sont ceux issus d'accouchements prématurés, ou dans un contexte infectieux, issus de césarienne ou en l'absence de signature du consentement.

D. Protocoles

1. Préparation des trophoblastes

Le protocole d'extraction des cellules placentaires a été le suivant (8)

Le placenta est récupéré dans une solution de NaCl, découpé du côté maternel, le long des villosités en morceaux et les membranes ont été enlevées. Les morceaux sont ensuite placés dans des boîtes de pétri contenant du Phosphate Buffered Salin (PBS) afin d'éliminer le maximum de sang possible. La solution de digestion est composée de 300 ml d'Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 1X, tamponnée avec 7,5 ml d'HEPES 1/40^{ème}, 0,3 mg de MgSO₄, 30 ml de Trypsine/EDTA à 2,5% (Invitrogen), 60 mg de DNase I (Sigma) et 3ml de PBS 1%.



Morceaux de placenta dans la solution de digestion

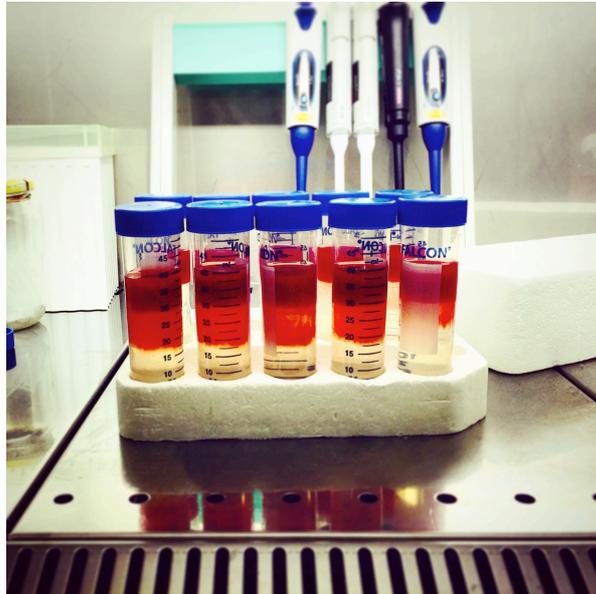
Une première digestion est effectuée à 37°C pendant 45 min, sous une faible agitation. Les produits de digestion sont récupérés, filtrés sur des tamis cellulaires de 100 µm, placés sur des tubes de 50 ml contenant 2 ml de SVF puis centrifugés à 1 000 x g pendant 15 min. La seconde digestion est réalisée pendant 30 min dans les mêmes conditions que la première. Les culots cellulaires sont récupérés dans du milieu cellulaire supplémenté avec 10% de SVF et 1% d'antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine).

La solution contenant les cellules est ensuite déposée sur des gradients de Percoll dans des tubes de 50 ml.

Préparation des gradients de Percoll

Pour préparer les gradients de Percoll, du D-Glucose est mélangé à du PBS 10X (1g/L), et parallèlement, du PBS 1X est préparé. Un gradient de Percoll à 90% est réalisé à partir de la solution de Percoll et du PBS 10X. Puis, les solutions de gradient de Percoll à 25 et 60% sont faites.

Deux phases sont déposées, à raison de 15 ml par phase, en commençant par la plus concentrée (60%) et centrifugées 20 min à 1 200 x g. A l'interface des 2 phases de gradient de Percoll de 25 et 60%, un anneau blanc est obtenu, correspondant aux cellules trophoblastiques.

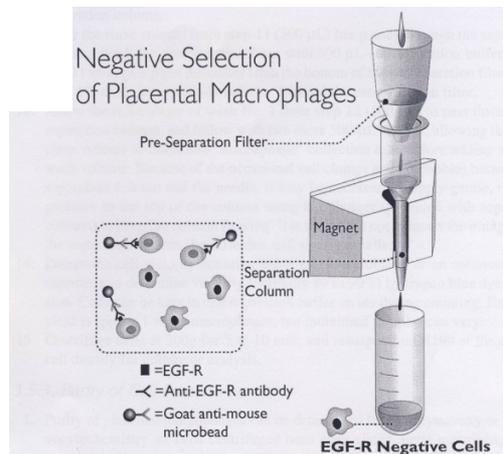


Gradient de Percoll avec les différentes phases

Après récupération de l'anneau cellulaire, les trophoblastes sont isolés par sélection positive en utilisant des billes magnétiques couplées avec des anticorps (Ac) anti-EGFR (EGFR pour *Epidermal Growth Factor Receptors*) et un automate (AUTOMAX, Miltenyi Biotec) qui permet de séparer les cellules EGFR⁺ et EGFR⁻. La pureté des préparations est déterminée par cytométrie en flux en utilisant des Ac anti-EGFR. Seules les préparations contenant plus de 95% de trophoblastes (cellules EGFR⁺) sont conservées et analysées. Les trophoblastes sont ensuite comptés et mis en culture dans du DMEM-F12 contenant 10% de SVF, 100 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine à 37°C. Le surnageant de trophoblastes est récupéré dès que les cellules atteignent la confluence et centrifugé à 1000 x g pendant 10 min afin d'éliminer les débris cellulaires.



AUTOMAX, Milteny Biotec



Methods in Molecular Medicine, McIntire et al, 2006 vol 122

2. Mise en culture des cellules et production des microparticules (MP)

Les trophoblastes sont cultivés dans du milieu complet (contenant du SVF, et des antibiotiques), leur nombre doublant toutes les 48 heures. Lorsqu'ils sont arrivés à 80% de confluence, à l'aide de la trypsine, ils sont décollés pour être à nouveau déposés dans une flasque plus grande. Cela a permis la multiplication de cellules, jusqu'à obtenir assez de cellules pour couvrir des flasques T175. Lorsque les cellules sont arrivées à 80% de confluence, elles sont lavées deux fois avec du PBS et de l'Opti-MEM (milieu de culture synthétique) est ajouté. Les cellules sont incubées pendant une nuit à 37°C en présence de 5% de

CO₂. Le lendemain, le surnageant est récupéré et centrifugé 20 min à 1500 x g pour enlever les débris.

Le surnageant est ultracentrifugé deux fois pendant 30 min à 20 000 x g à 4°C. Le culot est récupéré dans du PBS et congelé à -80°C.

3. Préparation des monocytes et mise en culture

Les cellules mononucléées du sang périphérique (peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)) provenant de l'Établissement Français du Sang (Marseille) sont isolées à partir de couches leucoplaquettaires par centrifugation à 700 x g sur coussin de Ficoll pendant 20 min. Les monocytes sont isolés à partir des PBMCs par sélection positive en utilisant des billes magnétiques couplées à des Ac anti-CD14 (Miltenyi Biotec Biotec). Les monocytes sont incubés dans du Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 contenant 10% de SVF, 100 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine (Invitrogen).



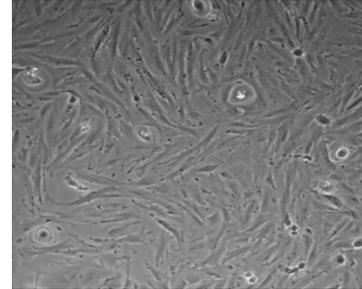
Gradient de Ficoll

Les microparticules sont ajoutées à 3 concentrations différentes : pure, diluée au demi et au dixième. Les cellules sont incubées avec les microparticules et sont conduites en culture pendant 3, 6 et 9 jours. A chaque temps, des colorations May-Grünwald Giemsa (MGG) ont été effectuées et le nombre de cellules géantes multinucléées a été quantifié.

III. Résultats

A. Isolement et culture des trophoblastes

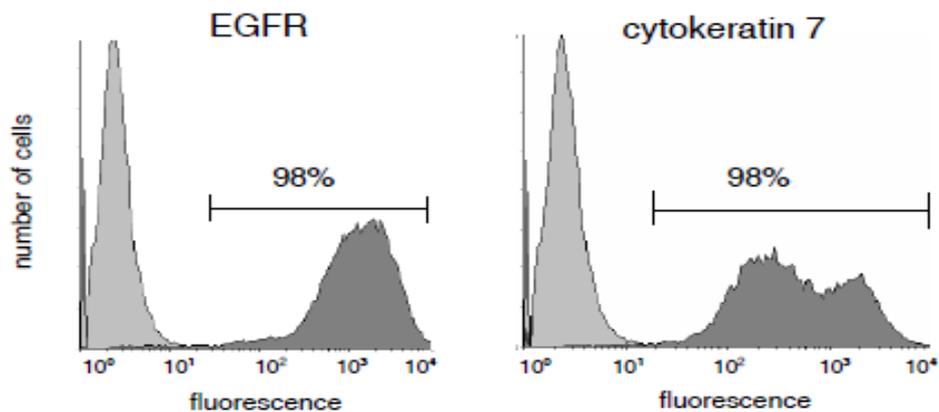
Dix placentas ont été récupérés de grossesses normales à terme. Les trophoblastes ont été isolés par gradient de Percoll, à l'interface de 2 phases, l'anneau cellulaire a été récupéré. On obtient un rendement de 2×10^7 cellules EGF-R⁺/g de tissus.



Trophoblastes

La pureté des trophoblastes a été estimée par cytométrie en flux en utilisant deux anticorps, anti EGFR et anti cytokératine 7. Les cellules obtenues expriment à la fois l'EGFR et la cytokératine 7 à raison de 98%. En se basant sur l'expression de la cytokératine 7 on remarque la présence de deux sous population des cellules qui l'expriment fortement et d'autres qui l'expriment à moindre niveau.

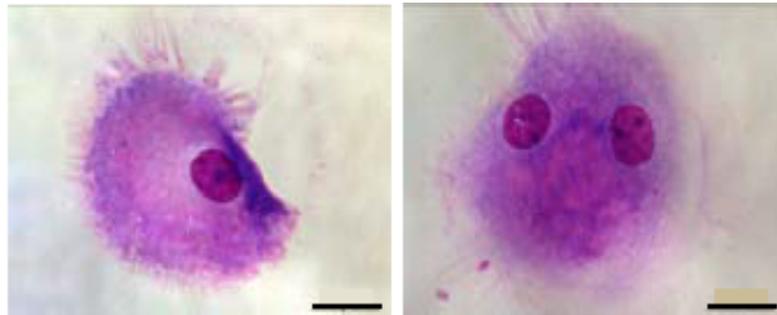
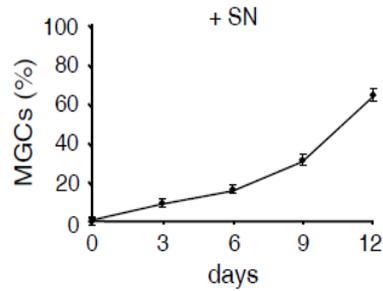
Nous avons isolé et caractérisé phénotypiquement les trophoblastes à partir de dix placentas.



Estimation de la pureté des trophoblastes par cytométrie en flux

B. Effet des microparticules sur les monocytes

La pureté des monocytes CD14⁺ est vérifiée par cytométrie en flux et est supérieure à 98%. Les cellules (2×10^5) ont été mises en culture pendant 9 jours en présence de différentes concentrations de microparticules. Tous les 3 jours le nombre de cellules géantes multinucléées a été compté. En présence d'une solution non diluée de microparticules, nous avons observé que 15% de cellules ont fusionné à partir du 3^{ème} jour de culture. Ce nombre de MGCs continue de croître pour atteindre environ 80% au bout du 9^{ème} jour. En présence de solutions diluées (1/2 ou 1/10) nous n'avons pas observé de formation de cellules géantes multinucléées.



- MP

+ MP

IV. Discussion et Conclusion

A. Limites et Biais

Plusieurs limites peuvent être évoquées pour cette étude. Tout d'abord, le temps de manipulation très long pour extraire les cellules du placenta. Le recueil des placentas sur le site n'est pas toujours facile, et restreint aussi le nombre de sujet inclus. Le temps d'apprentissage des manipulations et des connaissances requises pour réaliser ce travail a également constitué une limite lors de cette étude.

Le principal biais de cette étude est le nombre de sujet inclus. En effet, il faudra refaire les manipulations afin de pouvoir obtenir des résultats plus significatifs. De plus, l'absence de quantification des microparticules est également un manque pour déterminer avec certitude l'effet induit par celles-ci.

B. Discussion

Le maintien de la grossesse nécessite la tolérance du fœtus par la mère. Cette tolérance est rompue par l'inflammation retrouvée dans certaines pathologies comme la chorioamniotite. Les macrophages placentaires sont altérés dans cette pathologie et en particulier perdent la capacité à fusionner in vitro en MGC. Si le microenvironnement placentaire semble nécessaire à cette réponse, les mécanismes de fusion restent mal compris. Nous nous sommes demandés si les surnageants de trophoblastes avaient un impact sur la fusion de ces cellules. Comme les surnageants de trophoblastes correspondent à un ensemble de molécules très important, nous avons fait le choix d'aborder l'impact du microenvironnement placentaire sur les macrophages placentaires par l'étude des microparticules. Nous avons constaté la formation de cellules géantes multinucléées qui semblent être induites par le contact des monocytes avec les microparticules.

Parmi les perspectives de ce travail, la quantification précise des microparticules et leur composition seront importants pour connaître les

effecteurs placentaires de la fusion des macrophages. L'abondance de matériel sera indispensable si on veut réaliser une étude qualitative des microparticules. Il sera intéressant de concentrer du surnageant de trophoblastes issus d'un même placenta. La comparaison entre les microparticules issus du surnageant de trophoblastes provenant de différents placentas pourrait aussi être une ouverture et une aide à l'identification des composés des microparticules et à la compréhension de leurs effets.

Enfin, le défaut de fusion constaté dans certaines pathologies semble être un facteur immunologique important, débouchant sur des accouchements prématurés ou des fausses couches tardives. Il serait intéressant de savoir si les microparticules, et donc le microenvironnement placentaire est capable de rétablir cette capacité des cellules à fusionner, pour cela, il faudrait, in vitro, développer un modèle pour investiguer le mécanisme de fusion comme l'étude des métallo-protéases membranaires (MMP) qui sont connues comme étant impliquées dans le processus de formation des cellules géantes multinucléées. Des travaux au sein du laboratoire ont été conduites afin d'identifier le rôle potentiel des MMPs dans la fusion cellulaire. Il serait intéressant également de tester en qRT-PCR ou en cytométrie en flux les molécules d'adhésion telle que ICAM et les intégrines qui seraient des protagonistes potentiels du processus de fusion. De plus, en identifiant la composition des microparticules, il serait intéressant de savoir quelles sont les molécules impliquées et responsables de cette fusion.

La comparaison entre la composition du microenvironnement issu d'un placenta sain et d'un placenta infecté pourrait être enrichissante et pourrait peut-être révéler des différences induites par la pathologie.

En plus d'être impliquées dans les pathologies infectieuses, l'activité immunitaire des cellules placentaires est altérée dans beaucoup d'autres phénomènes comme la pré-éclampsie (16), ou par des facteurs environnementaux. La compréhension et l'identification des molécules contenues dans le surnageant permettrait peut-être d'explorer à terme un aspect thérapeutique qui pourrait être utilisé en obstétrique et pour le traitement de plusieurs pathologies graves de la grossesse.

Références

1. Alsat E, Evain-Brion D. Le placenta humain : neuf mois d'une intense activité encore méconnue. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 1999;1(6):509-16.
2. Wood, Gary W. Mononuclear phagocytes in the human placenta. *Placenta*, Volume 1, Issue 2, 113-123.
3. Évain-Prion D, Malassiné A. : Le placenta humain. Paris : Lavoisier ; 2010. p.195.
4. Baumann M, Deborde S, Nicholas P. Illsley. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine*, October 2002, Volume 19, Issue 1, pp13-22.
5. Orsini JC, Pellet J. Introduction biologique à la psychologie, Collection Grand amphi, Bréal, p185
6. Ogren, L. 1994. The placental as an endocrine organ: polypeptides. In *The physiology of reproduction*. E. Knobil, and J.D. Neil, editors. New York: Raven press. 875-945.
7. Tsampalas, M., Gridelet V, Berndt S, Foidart JM, Gennen V, Perrier d'Hauterive S. Human chorionic gonadotropin: A hormone with immunological and angiogenic properties. *J. Reprod. Immunol.* (2010), doi:10.1016/j.jri.2009.11.008
8. Albrecht, E.D., and Pepe, G.J. 1990. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev* 11:124-150.
9. Heffner, Linda J. (2001), *Human Reproduction*, Blackwell Science Ltd : Oxford, Collection : At a Glance. p17

10. Ehring G. R, Kerschbaum H. H, Eder C, et al. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K⁺ channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998;188(9):1593–1602. doi: 10.1084/jem.188.9.1593
11. Le Bouteiller P, Tabiasco J. Immunologie de la grossesse : faits nouveaux. *M/S : médecine sciences*, Volume 22, numéro 8-9, août-septembre 2006, p. 745-750
12. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. mai 2005;19(7):681–693
13. Ben Amara A, Gorvel L, Verollet C, Mehraj V, Barry A, El-Filali A, et al. Placenta environment induces the differentiation of macrophages into multinucleated giant cells. *J Immunol* 25 Oct 2013, 191: 000–000.
14. Ben Amara A, Gorvel L, Baulan K, Derain-Court J, Buffat C, Vérollet C, et al. Placental macrophages are impaired in chorioamnionitis, an infectious pathology of the placenta. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 déc 2013;191(11):5501–5514.
15. Joerger-Messerli MS, Hoesli IM, Rusterholz C, Lapaire O. Stimulation of monocytes by placental microparticles involves toll-like receptors and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells. *Front Immunol*. 2014 ;5 :173
16. Bachy V. « Mécanismes de tolérance immunitaire du fœtus » *Encyclop. Med. Chir*, 2007, (5-006-C-50) :1-13

Glossaire

Ac : anticorps

ATP : adénosine triphosphate

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptors*

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HCG : hormone gonadotrophine chorionique

HLA : Humain Leucocyte Antigen

LDL : low density lipoproteins

MGC : Multinuclear giant cells

MGG : May-Grünwald Giemsa

MP : microparticules

NK : Natural Killer

PBMCs : peripheral blood mononuclear cells

PBS : Phosphate Buffered Salin

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

SVF : sérum de veau foetal

Annexes



Assistance Publique
Hôpitaux de Marseille

**HOPITAL LA CONCEPTION
PAVILLON MERE ENFANT
SERVICE DE GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE**

Le service de Gynécologie-Obstétrique du Pr Gamerre et Boubli sont des services de pointe impliqués dans la recherche médicale.

Les examens que nous faisons sont destinés à optimiser votre prise en charge.

Après avoir réalisé les analyses éventuelles nécessaires à votre prise en charge, il est possible que nous exploitions, de façon anonyme :

- Le produit de l'aspiration
- Le placenta
- Le reste des prélèvements sanguins ou vaginaux

Ces éléments nous permettront de mieux comprendre certaines maladies, de mettre au point de nouveaux tests diagnostiques.

Aucun prélèvement supplémentaire ne vous sera fait dans le but de cette recherche.

Nous vous demandons l'autorisation d'utiliser ces prélèvements à des fins scientifiques plutôt que de les détruire. Après utilisation, ces produits, en particulier le placenta, seront incinérés.

Ce type de recherche a été validé par le comité d'éthique de l'université d'Aix Marseille et une autorisation a été délivrée le 19/09/2008.

Je soussignée Madame
déclare

- avoir reçu une information appropriée sur la possibilité d'utilisation des prélèvements réalisés lors de ma prise en charge ainsi que sur leur finalité.
- autoriser l'utilisation des prélèvements réalisés lors de ma prise en charge
- autoriser la publication anonyme des conclusions médicales et scientifiques découlant de ces analyses.

Fait à Marseille, le

Résumé

La tolérance foëto-maternelle est indispensable au maintien de la grossesse et implique l'intervention de cellules immunitaires telles que les macrophages placentaires. Ces cellules se différencient spontanément en cellules géantes multinucléées et ont la particularité d'exprimer la molécule CD14, marqueur des monocytes circulants. Au cours de certaines pathologies, la formation de ces cellules géantes est altérée.

Il a été constaté que le microenvironnement placentaire, et plus particulièrement le surnageant de trophoblaste, induisait cette fusion chez les monocytes circulants de femmes enceintes.

Le but de cette étude a été de déterminer l'impact du microenvironnement placentaire et plus précisément des microparticules sur la fusion des monocytes. Pour cela, des microparticules ont été mises en contact avec des monocytes circulants, après extraction à partir du surnageant de trophoblaste et le taux de cellules géantes a été quantifié. Après 9 jours de culture, 80% des monocytes avaient formé des cellules géantes multinucléées.

Mots-clés : microparticules, macrophages placentaires, microenvironnement placentaire, placenta, monocytes, trophoblaste

Summary

The immune cells, located in placenta, are thought to play several important roles in pregnancy. For example, placental macrophages spontaneously differentiate in multinucleated giant cells and express the CD14 molecule, a marker of circulating monocytes. In some pathologies, the formation of those multinucleated giant cells is impaired.

It was found that placental microenvironment, specifically the supernatant of trophoblasts, induces fusion in circulating monocytes of pregnant women.

The aim of this study was to investigate the impact of placental microenvironment and more specifically microparticles on the fusion of monocytes. To this end, the microparticles were brought into contact with circulating monocytes, after extraction from the trophoblast supernatant and the rate of giant cells was quantified. After 9 days in culture, 80% of the monocytes had formed multinucleated giant cells.

Key words : microparticles, placental macrophages, placental microenvironment, placenta, monocytes, trophoblast