

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'INFLAMMATION PAR
LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR ET UN DÉRIVÉ DE
L'ACIDE AMINOBENZOÏQUE

THÈSE PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
JOVANE HAMELIN MORRISSETTE

JUIN 2020

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (PH. D.)

Direction de recherche :

Carlos Reyes-Moreno, Ph. D. Université du Québec à Trois-Rivières
Directeur de recherche

Céline Van Themsche Université du Québec à Trois-Rivières
Codirectrice de recherche

Jury d'évaluation de la thèse :

Carlos Reyes-Moreno, Ph. D. Université du Québec à Trois-Rivières
Directeur de recherche

Céline Van Themsche Université du Québec à Trois-Rivières
Codirectrice de recherche

Geneviève Pépin, Ph. D. Université du Québec à Trois-Rivières
Présidente de jury

Julie Lafond, Ph. D. Université du Québec à Montréal
Évaluatrice externe

Yves St-Pierre, Ph. D. INRS – Institut Armand-Frappier
Évaluateur externe

Thèse soutenue le 20 mai 2020.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier sincèrement mon directeur de recherche, Carlos Reyes-Moreno. Carlos m'a pris sous son aile pour mon stage de fin de baccalauréat, et a continué de me soutenir pendant des temps parfois difficiles tout au long de ma maîtrise et de mon doctorat. Merci de m'avoir fourni d'innombrables conseils et encouragements. L'ambiance décontractée que ta présence imposait a favorisé, je crois, un environnement de travail agréable et productif, aimé des étudiants qui t'ont côtoyé.

Je tiens aussi à remercier ma co-directrice, Céline Van Themsche, pour son écoute et ses conseils précieux, autant académiques que personnels. Bien que nos collaborations ne se soient faites que plus tardivement dans mon parcours, j'ai adoré travailler avec toi dans les laboratoires d'enseignement et grandement apprécié ton aide dans la rédaction de ma thèse.

L'équipe du laboratoire Reyes-Moreno a aussi été une famille que je quitte avec un peu de tristesse. Julie Girouard, pilier central du laboratoire de recherche, avec sa grande rigueur et sa patience légendaire, m'a laissé lui poser un millier (surement plus) de questions. Je lui dois beaucoup du savoir technique acquis pendant mes années en sa compagnie. Merci, Julie, pour les nombreux bons moments partagés; je me souviendrai toute ma vie de ce fameux congrès à Porto Rico en tête à tête avec toi. Les membres de la famille élargie du laboratoire, incluant les étudiants de Céline, ont souvent contribué, par leurs conseils, mais surtout par leur écoute et présence bienveillante, à me garder sur le chemin de la réussite; je remercie tout particulièrement Valérie Boulanger, Laurie Fortin, Yassine Oufqir, Valérie Leblanc, Carol-Ann Joly et Jessica Dion.

Un remerciement spécial au professeur Gervais Bérubé, avec qui nous avons collaboré dès les premiers mois de ma présence dans le laboratoire de Carlos. Ces échanges m'ont permis de suivre les premières étapes de la recherche précliniques sur

un nouveau médicament potentiel et de faire des études plus appliquées, quand mon projet avait, à l'origine, surtout des objectifs en recherche fondamentale.

Je tiens à remercier ma mère, Andrée Hamelin et mon père, Daniel Morrissette pour leur soutien et leurs encouragements. Je remercie aussi ma petite sœur, Anne Hamelin Morrissette, d'avoir partagé avec moi les joies et les stress des études supérieures. On y est arrivée toutes les deux!

Évidemment, la contribution de plusieurs organismes subventionnaires doit être soulignée. Le financement par le conseil de recherche en sciences naturelles et génie du Canada (CRSNG), les instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), la société de recherche sur le cancer (SRC), les Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) et du réseau québécois en reproduction (RQR) ont permis de réaliser les expériences présentées dans cette thèse. J'ai également reçu des bourses du RQR, CRSNG, du département de biologie médicale et de la fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières durant mon parcours doctoral.

RÉSUMÉ

Les macrophages (Mφs) utérins sont exceptionnels dans leur capacité à protéger le placenta contre des agents pathogènes infectieux tout en supportant le développement d'un autre corps à moitié étranger, le fœtus. Par contre, une activation non contrôlée de voies inflammatoires dans ces cellules immunes peut affecter la survie et la fonction du trophoblaste à l'origine du placenta, entraînant des complications gestationnelles comme la perte embryonnaire précoce, la prééclampsie ou le retard de croissance intra-utérin. Cette étude visait à caractériser des molécules anti-inflammatoires naturelles (*leukemia inhibitory factor*; LIF) et synthétiques (dérivés de l'acide aminobenzoïque; DABs), qui pourraient réduire l'inflammation médiée par les Mφs.

Des travaux antérieurs ont montré que LIF pouvait induire la production par les trophoblastes d'une cytokine ayant un effet anti-inflammatoire sur les Mφs, c'est-à-dire IL-10. Ces études ont établi que l'IL-10 produit par le trophoblaste en réponse à LIF modifiait le phénotype pro-inflammatoire du Mφ activé par l'IFNγ. Le mécanisme de désactivation impliquait alors une inhibition de Stat1, une activation de Stat3 et un profil d'expression plus important en IL-10 et moins élevé en TNFα.

Des travaux plus récents (acceptés pour publication en janvier 2020) ont mis en évidence la capacité de LIF à réduire l'activité pro-inflammatoire des Mφs humains, leur permettant ainsi d'adopter un phénotype supportant l'invasion et la fonction trophoblastique. De façon similaire à IL-10, le mécanisme d'action de LIF sur les Mφs humains implique une régulation négative sur l'activation des voies IFNγ/Stat1 et GM-CSF/Stat5. Ce mécanisme immunorégulateur de LIF est également opérationnel sur les trophoblastes humains soumis à un stress inflammatoire.

Des molécules synthétiques, les DABs, ont également un effet anti-inflammatoire sur les Mφs et pourraient être utilisées dans le traitement de pathologies causées ou exacerbées par une activation aberrante des Mφs. Des études menées par notre laboratoire ont montré l'activité anti-inflammatoire de DAB-1, un DAB de première génération, par leur capacité à inhiber l'expression du CMH-II et CD40, deux marqueurs de surface associés à un profil pro-inflammatoire chez les Mφs humains. Cette molécule diminue également la production d'oxyde nitrique induite par l'IFNγ et le TNFα dans les Mφs murins et les cellules épithéliales de cancer de la vessie. Nos résultats actuels indiquent que le mécanisme d'action anti-inflammatoire des DABs implique, tout comme le LIF et l'IL-10, une régulation négative sur l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires, notamment les voies IFNγ/Stat1, TNFα/NFκB et IL-6/Stat3.

Des études complémentaires réalisées avec DAB-1 dans un modèle *in vivo* ont permis d'éclaircir son mécanisme d'action sur les Mφs murins. Après une injection de DAB-1 dans la cavité péritonéale, les Mφs isolés produisaient moins de NO que ceux des souris non traitées. Des tests avec une lignée cellulaire ont montré que la présence protéique de l'*inducible nitric oxide synthase* (iNOS) était diminuée, mais pas celle de la

cyclo-oxygénase-2 (COX-2). Ces résultats ont été confirmés avec un modèle murin d'inflammation de la patte induite par la carraghénane dans lequel l'enflure est due, dans la première phase, à l'expression d'iNOS et dans la seconde, à l'expression de COX-2. DAB-1 a pu réduire significativement l'œdème pendant les premières 24 h, mais aucune différence n'est observée dans les 48 h suivants, confirmants les résultats obtenus avec la lignée cellulaire.

Ces résultats indiquent que LIF et les DABs réduisent efficacement l'activation de voies inflammatoires et qu'ils pourraient avoir un effet bénéfique dans le traitement de pathologies gestationnelles à composante inflammatoire.

Mots-clés : Inflammation, macrophages, *leukemia inhibitory factor*, gestation, trophoblaste, anti-inflammatoire.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	v
LISTE DES FIGURES ET TABLEAU.....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xiv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 Système immunitaire humain	1
1.2.1 Généralités	1
1.2.2 Immunité innée	2
1.2.3 Le macrophage sous la loupe.....	6
1.2.4 La réponse inflammatoire	8
1.2.5 Les cytokines	12
1.3 La gestation normale chez l'humain.....	18
1.3.1 Généralités	18
1.3.2 Cycle menstruel	18
1.3.3 Phase lutéale : décidualisation	19
1.3.4 Placentation.....	20
1.4 Gestation et inflammation chez l'humain.....	23
1.4.1 Inflammation gestationnelle physiologique.....	23
1.4.2 Inflammation et pathologies gestationnelles.....	25
1.4.3 Les macrophages de l'interface fœto-maternelle.....	26
1.4.4 Les cytokines de l'interface fœto-maternelle.....	27
1.5 Traitement des pathologies associées à l'inflammation intra-utérine.....	33
1.5.1 Généralités	33
1.5.2 Thérapies disponibles	34
1.6 Hypothèse	38
1.7 Objectifs et méthodologie.....	39

1.7.1	Étude de l'activité anti-inflammatoire de LIF dans des macrophages et cellules trophoblastiques <i>in vitro</i>	39
1.7.2	Description de l'activité anti-inflammatoire d'un nouveau composé chimique avec potentiel anticancer	39
1.7.3	Étude sur l'activité anti-inflammatoire DAB-1 <i>in vivo</i>	40

CHAPITRE II

LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR REGULATES THE ACTIVATION OF INFLAMMATORY SIGNALS IN MACROPHAGES AND TROPHOBLAST CELLS.....

2.1	Contribution des auteurs	42
2.2	Résumé de l'article	42
2.3	Article complet (anglais) : <i>Leukemia inhibitory factor regulates the activation of inflammatory signals in macrophages and trophoblasts cells</i>	44
	Abstract.....	44
	Introduction.....	45
	Materials and Methods	48
	Reagents, chemicals and antibodies	48
	Preparation of monocyte-derived macrophages	48
	Trophoblast cell culture.....	49
	Cell signaling studies	50
	Motility assay	50
	RNA isolation and mRNA quantitation	51
	Transwell micro-invasion assays	51
	Quantification of secreted β -human chorionic gonadotrophin (β -hCG)...	52
	Statistical analyses.....	53
	Results	53
	Inhibitory impact of LIF on IFN γ /Stat1 and GM-CSF/Stat5 signaling pathways in human macrophages.....	53
	Involvement of LIF in the regulation of cell motility and MMP-9 mRNA expression in resting and IFN γ -activated macrophages.....	54
	Regulatory effect of LIF in IFN γ /Stat1 and GM-CSF/Stat5 signaling pathways in BeWo trophoblast cells	55
	Influence of LIF on the invasiveness of IFN γ -stimulated trophoblast cells.....	55

Influence of LIF on cell invasiveness of trophoblast cells by soluble factors from GM-CSF-differentiated Mφs	56
Implication of LIF in the regulation of β-hCG production in resting and GM-CSF-activated trophoblast BeWo cells.....	56
Discussion.....	57
Conclusion.....	62
Conflicts of Interest	62
Acknowledgments	62
References.....	64
Figure Legends	69
Graphical abstract.....	78

CHAPITRE III

IDENTIFICATION OF AN ANTI-INFLAMMATORY DERIVATIVE WITH ANTI-CANCER POTENTIAL: THE IMPACT OF EACH OF ITS STRUCTURAL COMPONENTS ON INFLAMMATORY RESPONSES IN MACROPHAGES AND BLADDER CANCER CELLS

80

3.1 Contribution des auteurs.....	80
3.2 Résumé de l'article	81
3.3 Article complet (anglais) : Identification of an anti-inflammatory derivative with anti-cancer potential: The impact of each of its structural components on inflammatory responses in macrophages and bladder cancer cells	82
Abstract.....	82
Introduction.....	83
Results and discussion.....	85
Chemistry	85
Evaluation of anti-inflammatory properties in activated macrophages	86
Evaluation of anti-proliferative activities in tumor cells.....	88
Evaluation of anti-inflammatory properties of the structural components of compound 1.....	89
Conclusion	90
Experimental protocols	91
Biological evaluation.....	91
Chemistry	94
Statistical analyses.....	99

Acknowledgments	99
References.....	100
Legend of Figures and scheme	105
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	115
4.1 Thérapies actuellement à l'étude	115
4.1.1 Progestérone.....	117
4.1.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens	117
4.1.3 Prostaglandines anti-inflammatoires.....	118
4.2 Le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules anti-inflammatoires	119
4.2.1 Nouvelles cibles moléculaires pour le traitement des complications gestationnelles à composante inflammatoire	119
4.2.2 Le potentiel de DAB-1 pour traiter l'inflammation.....	120
4.2.3 DAB-1 dans le traitement d'autres pathologies	122
4.2.4 Pistes sur les mécanismes d'actions de DAB-1	123
4.3 LIF comme traitement anti-inflammatoire naturel	124
4.3.1 Implantation et inflammation.....	124
4.3.2 LIF comme traitement pour augmenter le succès de l'implantation	125
4.3.3 LIF comme traitement potentiel pour les complications gestationnelles autre que l'échec d'implantation.....	125
4.3.4 Pistes sur les mécanismes d'action multiples et contexte-dépendants de LIF.....	128
4.4 Limitations et perspectives	131
4.4.1 Limitations au sujet des études sur le LIF	131
4.4.2 Projets futurs utilisant LIF	132
4.4.3 Limitations au sujet des études sur DAB-1	133
4.4.4 Projets futurs utilisant DAB-1	133
4.5 Conclusion générale.....	134
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	136
ANNEXE A	
ÉTUDE DE L'EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DE DAB-1 <i>IN VIVO</i>.....	168
A.1 Implication de iNOS/NO et COX-2 dans les modèles murins de pathologies gestationnelles.....	168

A.1.1	Perte embryonnaire précoce.....	168
A.1.2	Naissance prématurée	169
A.2	Inflammation de la patte chez la souris	169
A.3	Objectifs.....	170
A.4	Matériel et méthode	171
A.4.1	Réactifs, milieux de culture et anticorps.....	171
A.4.2	Dosage de l'oxyde nitrique produit par des macrophages péritonéaux murins traités <i>in vivo</i> avec DAB-1	171
A.4.3	Enflure de la patte induite par la carraghénane dans un modèle murin ..	172
A.4.4	Analyse par Western blot de la présence protéique d'iNOS et COX-2..	173
A.4.5	Marquage de iNOS et COX-2 dans les macrophages péritonéaux murins traités avec DAB-1 <i>in vivo</i>	173
A.4.6	Analyses statistiques	173
A.5	Résultats.....	174
A.5.1	L'injection intrapéritonéale de DAB-1 réduit significativement l'oxyde nitrique produit par les macrophages péritonéaux.....	174
A.5.2	Le traitement avec DAB-1 diminue l'œdème de la patte induit par le carraghénane pendant la première phase de l'inflammation, mais pas dans la deuxième.....	175
A.5.3	DAB-1 diminue l'expression d'iNOS induite par l'IFN γ et le LPS, mais pas celle de COX-2	175
A.5.4	L'injection de DAB-1 réduit le marquage d'iNOS dans les macrophages péritonéaux activés avec LPS, mais pas celui de COX-2.	178
A.6	Conclusion	178

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU

Figure		Page
1.1	Rôle du système immunitaire inné dans la défense contre les pathogènes et l'homéostasie tissulaire	3
1.2	Rôle de l'immunité innée dans l'activation de la réponse adaptative.	5
1.3	Polarisation du macrophage M1/M2	7
1.4	Signaux impliqués dans la différenciation des différents sous-types de macrophages.....	8
1.5	Inflammation résolue et inflammation chronique	10
1.6	Résolution de l'inflammation.....	11
1.7	Cycle menstruel.....	19
1.8	Les trophoblastes dans le placenta	21
1.9	Inflammation normale dans le placenta en cours de gestation.....	25
1.10	Représentation schématique de la distribution de macrophages M1 et M2 à proximité des artères spiralées dans la grossesse normale et prééclampsique	27
1.11	Résumé des rôles connus de LIF dans l'implantation embryonnaire.....	31
1.12	Structure de DAB-1	39
4.1	Recherche sur la composante inflammatoire de la naissance prématurée entre 1986 et 2010 et statistiques sur la naissance prématurée	116
4.2	Rôle du trophoblaste dans le recrutement et l'éducation des Mφs utérins.....	127
A.1	Modèle murin d'inflammation de la patte.....	170
A.2	Mesure de l'enflure de la patte	172
A.3	Régulation de la production d'oxyde nitrique par DAB-1	174
A.4	Effet de DAB-1 dans un modèle d'inflammation de la patte	175

A.5	DAB-1 dans la modulation de la présence protéique de iNOS et COX-2	177
A.6	Immunofluorescence de iNOS et COX-2 dans Mφs péritonéaux de souris traitées avec DAB-1	178

Tableau**Page**

1.1	Résumé des stratégies thérapeutiques utilisées en recherche préclinique et clinique sur la prééclampsie (PE) et le retard de croissance intra-utérin (FGR) (2015).....	35
-----	--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Akt	Protéine kinase B
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein 1
ARG-1	Arginase-1
BATF2	Basic leucine zipper transcription factor 2
CCL	CC chemokine ligands
CD40	Cluster of differentiation 40
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclooxygénase
CTB	Cytotrophoblast
DAB	Dérivé de l'acide aminobenzoïque
DAMPs	Danger-associated molecular patterns
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DUSP4	Dual-specificity phosphatase 4
eCTB	Endothelial cytotrophoblast
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FSH	Follicle-stimulating hormone
G-CSF	Granulocyte colony-simulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-simulating factor
GMR	Granulocyte-macrophage colony-simulating factor receptor
gp130	Glycoprotéine 130
hCG	Human chorionic gonadotropin

HLA-G	Histocompatibility antigen, class I, G
iCTB	Invasive cytotrophoblast
IFN	Interféron
IFNGR	Gamma-interferon receptor
IL	Interleukine
IL10R	Récepteur de l'interleukine 10
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IP	Intrapéritonéal
JAK	Janus kinase
KO	Knockout
LH	luteinizing hormone
LIF	Leukemia inhibitory factor
LIFR β	Récepteur de LIF-bêta
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Macrophage colony-simulating factor
MMP9	Matrix metallopeptidase 9
M ϕ	Macrophage
NF κ B	Nuclear factor kappa-B
NK	Natural killer
NO	Oxyde nitrique
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
OSM	Oncostatine-M
P ₄	Progesterone
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns

PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1
PE	Prééclampsie
PG	Prostaglandine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
PKA	Proteine kinase A
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PS	Syncytium primitif
PTP	Protein tyrosine phosphatase
SH2	Src homology 2
SHP	Protein Src homology 2-containing phosphatase
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
Stat	Signal transducer and activator of transcription
TGF β	Tumor growth factor beta
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor necrosis factor-alpha
TSH	Thyroid-stimulating hormone
TYK2	Non-receptor tyrosine-protein kinase-2
uNK	Uterine natural killer cells

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Problématique

La gestation est un processus par lequel un embryon, qui constitue une greffe semi-allogénique, arrive à s'implanter dans l'utérus de la mère, où il peut se développer sans être rejeté. Il existe de nombreux mécanismes qui permettent la tolérance du fœtus par le système immunitaire maternel, et lorsque l'un de ceux-ci fait défaut, cela entraîne souvent des complications gestationnelles. Par exemple, en cas d'infection utérine par un agent pathogène (bactérien ou viral), une activation non contrôlée de voies inflammatoires dans les cellules de l'immunité innée, notamment les macrophages (Mφs), peut se produire et affecter la survie, la différenciation et la fonction du trophoblaste, entraînant des complications comme la perte embryonnaire précoce, la prééclampsie (PE) ou le retard de croissance intra-utérin. La compréhension des mécanismes de régulation de l'inflammation intra-utérine, ainsi que la recherche de nouvelles molécules permettant de tempérer celle-ci sont d'une importance cruciale afin de diminuer le stress placentaire et fœtal et d'éviter des conséquences graves à court et à long terme sur la santé des nouveau-nés issus de ces grossesses compliquées.

1.2 Système immunitaire humain

1.2.1 Généralités

L'immunité, au sens large, réfère à un ensemble de processus qui permettent au corps de se défendre contre des substances étrangères, des microorganismes pathogènes ou des toxines. Cette immunité peut être médiée par des cellules du système immunitaire ou d'autres mécanismes généraux de défenses de l'hôte.

Le système immunitaire se divise en deux grandes lignes de défense : l'immunité innée et adaptative [1]. L'immunité innée réfère à l'ensemble des mécanismes qui permet de combattre une grande variété de menaces non spécifiques et comprend des mécanismes passifs et actifs. Les défenses passives comprennent les barrières physiques, comme la peau, des molécules en circulation comme les protéines du complément et des protéines sécrétées (mucines, HCl gastrique, lysozyme, opsonines, etc.). Les défenses actives sont composées principalement des granulocytes (macrophages/cellules dendritiques, cellules Natural Killer, basophiles, éosinophiles et neutrophiles). Le système immunitaire adaptatif, quant à lui, est plus récent d'un point de vue évolutif et est plus sophistiqué [1]. Il permet, en opposition au système immunitaire inné, de différencier les pathogènes et de monter une réponse spécifique à chacun. Les lymphocytes B ont à leur surface des anticorps et les lymphocytes T ont leur récepteur de cellule T, capable de reconnaître avec une précision impressionnante les antigènes des pathogènes ou des cellules du soi infectées par ceux-ci [1]. Si le système immunitaire inné arrive rapidement à répondre à une infection, c'est le système immunitaire adaptatif qui permet la mémoire immune et donc, offre protection contre une infection déjà combattue. Les études réalisées dans le cadre de cette thèse portent sur l'inflammation normale et pathologique médiée par les Mφs, le système immunitaire adaptatif ne sera donc pas couvert en détail.

1.2.2 Immunité innée

L'immunité innée est le système de défense qui est fonctionnel dès la naissance. Grâce aux avancées actuelles en génétique, il est établi maintenant que les mécanismes de défense du système immunitaire inné sont anciens et extrêmement bien conservés parmi les animaux [2]. Le système immunitaire inné assure la première ligne de défense contre le non-soi ou pour préserver l'homéostasie cellulaire lors des dommages tissulaires. Étant donné la rapidité de croissance des bactéries et virus, l'élaboration d'une réponse spécifique à chaque pathogène n'est pas assez rapide pour garantir à l'hôte les meilleures chances de survie. D'ailleurs, même si les chercheurs ont longtemps pensé que cette portion de la réponse immunitaire ne servait qu'à gagner du temps pour la préparation de la réponse adaptative, on a aujourd'hui une meilleure appréciation du rôle de ces cellules dans l'homéostasie tissulaire (Figure 1.1) [3]. Notre organisme entier tire donc profit de

différentes composantes du système immunitaire inné afin d'orchestrer la réponse innée locale et d'assurer, entre autres, la phagocytose des cellules apoptotiques des tissus ou organes lésés [3].

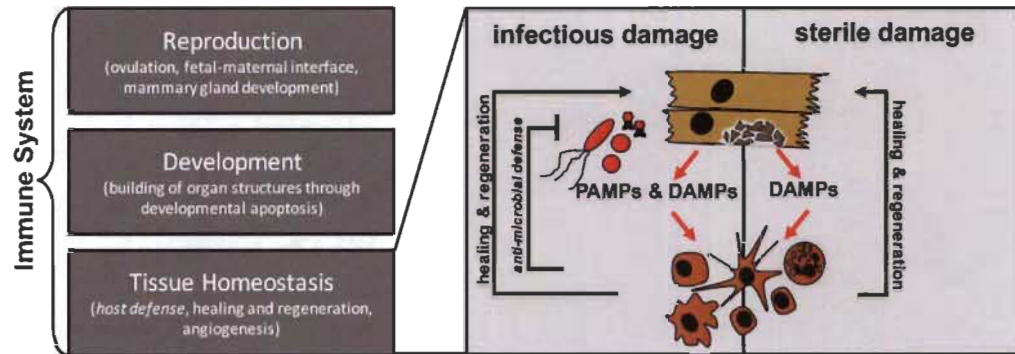


Figure 1.1 Rôle du système immunitaire inné dans la défense contre les pathogènes et l'homéostasie tissulaire.

Le système immunitaire est essentiel pour la reproduction, le développement et l'homéostasie tissulaire. Il peut être activé non seulement par des *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) dans l'inflammation dérivée d'une infection, mais aussi par des *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) dans l'inflammation stérile. Tirée de Sattler [4].

1.2.2.1 Barrières physiques

Avant même d'entrer en contact avec les cellules immunitaires de l'hôte, les pathogènes doivent se buter à une panoplie de mesures mises en place afin d'éviter l'entrée de ceux-ci dans les tissus ou la circulation sanguine [5]. Seulement un très petit nombre d'organismes ont la capacité de pénétrer une peau intacte et la majorité le fait à travers une blessure ou par injection, comme lors d'une piqûre de moustique. De plus, la surface de la peau est colonisée par des bactéries probiotiques et est irriguée de sueur contenant des molécules antimicrobiennes, ce qui contribue à empêcher la croissance des pathogènes potentiellement nocifs [5]. La structure arborescente des bronches et bronchioles, ainsi que leur couverture muqueuse, sont également des barrières physiques qui rendent la tâche difficile aux microbes qui oseraient s'y aventurer. Le mucus, comme la sueur, contient des molécules antimicrobiennes telles que des défensines, lysozymes et surfactants [6].

1.2.2.2 Défenses actives

Le système immunitaire des mammifères est composé d'une grande variété de cellules dont la collaboration permet l'établissement d'une réponse pertinente pour les différentes menaces possibles. Pour surveiller l'organisme en entier, elles circulent dans le sang et la lymphe et certaines deviennent résidentes de tissus. La découverte d'un récepteur aux endotoxines par l'équipe de Bruce Beutler a été une petite révolution dans notre compréhension de l'immunité innée [7]. Ces récepteurs permettent la détection de différentes classes de pathogènes grâce à une reconnaissance d'éléments structurels (*pattern recognition*). Les récepteurs de type Toll (*toll-like receptors*; TLRs) détectent, par exemple, le lipopolysaccharide (LPS), une molécule présente sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ce mécanisme de reconnaissance diffère toutefois de celui de l'immunité adaptative. La reconnaissance d'éléments structurels par un seul récepteur permet en effet d'identifier comme pathogènes plusieurs microbes différents tandis que l'immunité adaptative reconnaît les particularités de chacun (antigènes) [3].

S'il reconnaît des motifs similaires sur une grande variété de bactéries, comment le système immunitaire inné fait-il pour différencier le bon du mauvais? Rappelons qu'il y a plus de cellules bactériennes dans un humain que de cellules humaines, et ces bactéries ne sont pas toutes néfastes. Par exemple, le LPS à la surface des bactéries, reconnu par le TLR4, entraîne heureusement une réponse différente selon le contexte du tissu; cela empêche, par exemple, que nos bactéries intestinales commensales ne soient systématiquement éliminées. L'auteur de *Microbial « social networks »* [8] offre une analogie intéressante pour décrire l'importance de la régulation du système immunitaire inné : le fait de détecter quelqu'un dans un bâtiment ne signifie pas que celui-ci est un intrus, parce que toutes les personnes ne sont pas des intrus. Toutefois, si cette personne entre par une fenêtre au milieu de la nuit, cela indique peut-être qu'il s'agit d'un voleur. Plus communément appelés globules blancs, les leucocytes participent aussi à la réponse inflammatoire innée. Ces cellules ont pour rôle d'identifier et d'éliminer le pathogène, soit par phagocytose pour les plus petits, ou par contact pour les plus grands.

1.2.2.3 Phagocytes

Le mot phagocyte vient du grec *phago* « manger », et « -cyte », utilisé couramment en biologie pour dénoter une cellule. Les principaux phagocytes sont les neutrophiles et les macrophages. Les neutrophiles, habituellement les premières cellules à répondre à une blessure ou une infection, ont une longévité très courte en circulation, mais sont renouvelés fréquemment dans la moelle osseuse [9]. Tout comme les Mφs, ils peuvent éliminer les pathogènes phagocytés [9]. Contrairement aux neutrophiles, les Mφs arrivent plus lentement au site lésé, mais ont un certain potentiel de prolifération dans les tissus [10] et produisent beaucoup plus de cytokines [11]. De plus, ils expriment plus fortement les TLRs que les neutrophiles [12] et peuvent participer, comme les cellules dendritiques et les lymphocytes B, à la présentation des antigènes des pathogènes phagocytés aux cellules du système immunitaire adaptatif (Figure 1.2) [13].

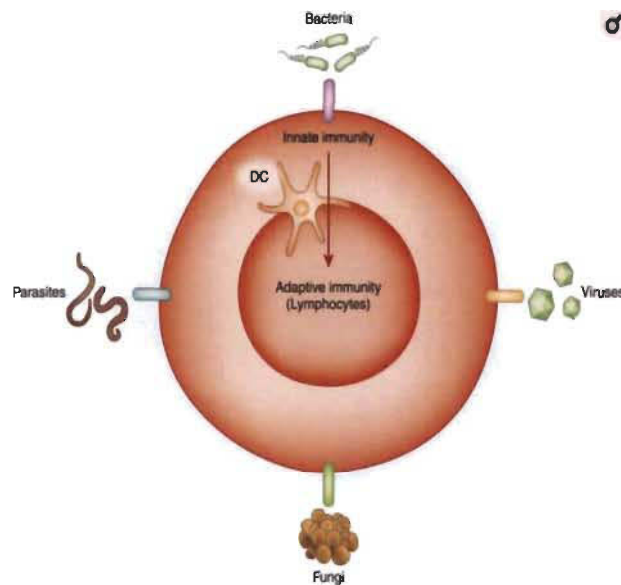


Figure 1.2 Rôle de l'immunité innée dans l'activation de la réponse adaptative. Un des rôles importants de l'immunité innée est la détection des pathogènes par reconnaissance de molécules comme des PAMPs, ou par l'internalisation et dégradation d'un pathogène et présentation par le CMH d'une molécule étrangère au soi par un phagocyte. Tirée de Yatim et al. [1].

1.2.3 Le macrophage sous la loupe

En général, le M ϕ tissulaire est un phagocyte mature qui est différencié à partir du monocyte circulant dans le sang, un processus longtemps considéré comme le principal moyen de générer des M ϕ s tissulaires [14]. Selon ce concept, après quelques heures dans la circulation sanguine, ce dernier passe dans les tissus par extravasation, pour y devenir un M ϕ dérivé des monocytes. On sait maintenant que le M ϕ peut aussi avoir une origine embryonnaire et une capacité de division à même les tissus; on appelle ces cellules M ϕ s résidents [15]. Ceux-ci ont un rôle à jouer dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, mais ce sont majoritairement les M ϕ s dérivés des monocytes qui sont impliqués dans la réponse inflammatoire [16]. Pour cette raison, toute mention subséquente au M ϕ s dans le texte réfèrera aux M ϕ s dérivés de monocytes. La polarisation des macrophages fait référence au processus de différenciation vers l'une des extrémités d'un spectre cellulaire ayant des fonctions opposées, mais complémentaires au cours d'une réponse inflammatoire, soit un phénotype pro-inflammatoire M1, ou anti-inflammatoire M2 (Figure 1.3). Le macrophage peut se polariser en fonction de son environnement; l'adoption de son phénotype est réversible et la population de M ϕ s dans un tissu est en général hétérogène [17]. Le M ϕ M1 est impliqué dans l'initiation de la réponse inflammatoire, entre autres par la production de cytokines, mais aussi à la défense contre les pathogènes, car sa capacité phagocytaire est accrue. Le M ϕ M2, quant à lui, est plutôt responsable de la résolution de la réponse inflammatoire et de la réparation tissulaire. Le phénotype M1 est induit par différents facteurs, seuls ou en combinaison, notamment le LPS, l'interféron gamma (IFN γ), et le *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), tandis que le phénotype M2 est induit en réponse à l'IL4 et l'IL13 [18, 19].

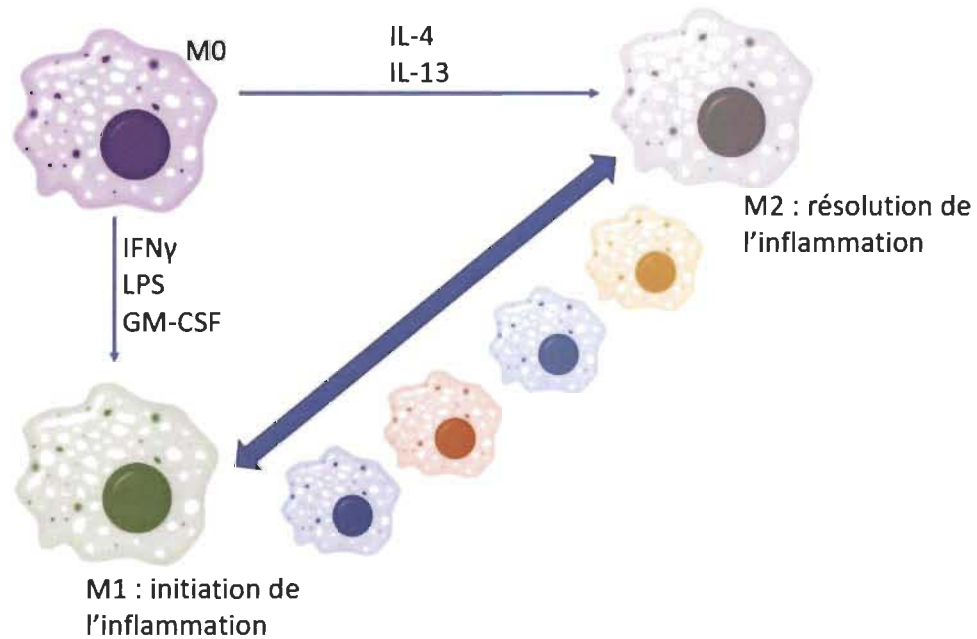


Figure 1.3 Polarisation du macrophage M1/M2.

Le macrophage a la capacité de modifier drastiquement sa polarisation en fonction des signaux qu'il reçoit. Adaptée de Murray [17].

Si on parle habituellement de la dualité M1-M2 pour les M ϕ s, la description de leur phénotype s'est grandement complexifiée avec les années. On reconnaît maintenant au moins trois sous-types de M ϕ s M2 (Figure 1.4). Les M ϕ s M2 traditionnellement décrits sont maintenant appelés M2a et impliqués dans la réponse contre les parasites et les allergies. Les M2b sont induits en réponse aux complexes immuns en combinaison avec des ligands de TLRs et les M2c par IL10, participant à l'homéostasie et au remodelage tissulaire [20].

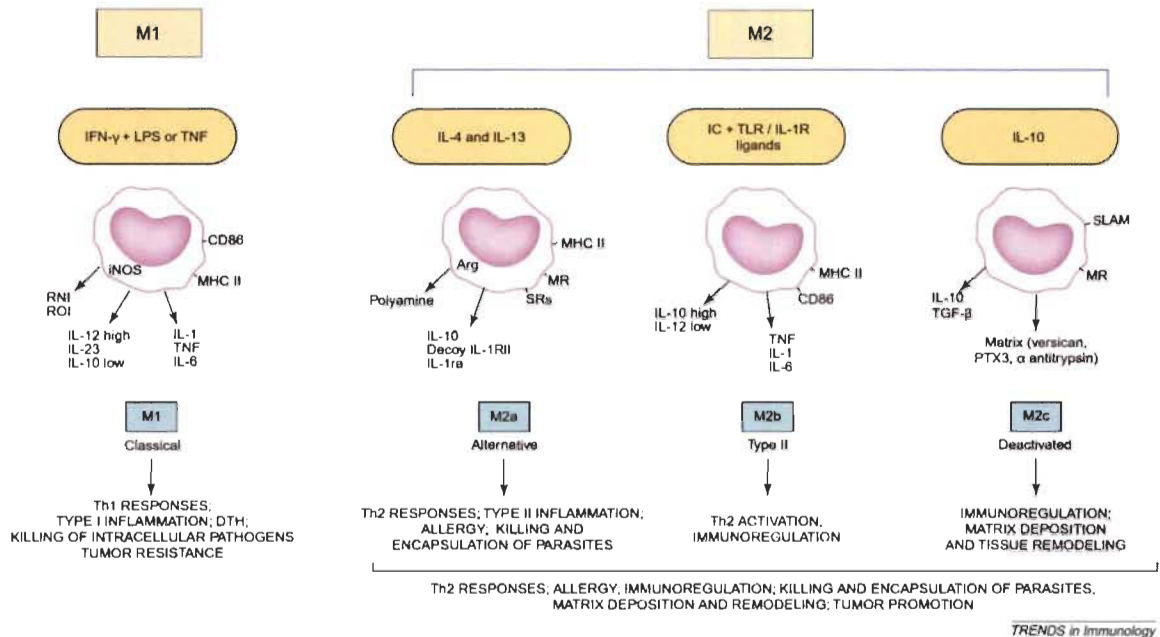


Figure 1.4 Signaux impliqués dans la différenciation des différents sous-types de macrophages.

Les macrophages acquièrent différents sous-types en fonction des signaux de l'environnement. La description de leurs phénotypes s'est complexifiée, et on reconnaît plusieurs sous-types de macrophages anti-inflammatoires aux fonctions biologiques diverses. Tirée de Mantovani et al. [20].

Un marqueur intéressant pour l'étude de la polarisation M1-M2 du Mφ, surtout chez la souris, est l'expression des enzymes du métabolisme de l'arginine. Le Mφ M1 exprime l'enzyme *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) pour convertir l'arginine en oxyde nitrique (NO), tandis que le Mφ M2 métabolise l'arginine disponible en exprimant l'enzyme Arginase-1 (ARG-1), qui convertit l'arginine en urée et en ornithine [21].

1.2.4 La réponse inflammatoire

1.2.4.1 Établissement de la réponse inflammatoire

L'inflammation est caractérisée par une augmentation locale du flux sanguin, une dilatation des capillaires, l'infiltration des leucocytes et la production de médiateurs chimiques. Elle est essentielle pour le retour à l'homéostasie tissulaire lors d'une blessure ou d'une infection, même si cela entraîne une baisse de fonction temporaire du tissu

inflammé [22]. La réponse inflammatoire aigüe est principalement médiée par les M ϕ s et les neutrophiles. Elle comporte une cascade successive de processus pro-inflammatoires et anti-inflammatoires et peut être déclenchée par une grande variété de stimuli comme une blessure, une brûlure ou la présence d'un agent pathogène. Habituellement, le stimulus active les cellules immunitaires résidentes, dont les M ϕ s, et induit par ceux-ci la production de molécules pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL1 β . Leur activation et le relargage de molécules inflammatoires entraînent une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins au site de l'inflammation, ce qui permet par la suite le recrutement des monocytes sanguins et des neutrophiles. Une fois activés, les M ϕ s et les neutrophiles participent alors activement à la phagocytose des cellules mortes ou infectées, causant également de dommages tissulaires qui doivent être réparés au cours de la phase de résolution. En effet, en présence des cytokines pro-inflammatoires et des pathogènes, les M ϕ s et les neutrophiles enclenchent une poussée oxydative et de production d'enzymes protéolytiques qui dégrade la matrice extracellulaire, affectant ainsi l'homéostasie tissulaire.

1.2.4.2 Résolution de l'inflammation

Sans régulation, l'inflammation aigüe laisse place à l'inflammation chronique et semble caractéristique de nombreuses maladies humaines, incluant l'Alzheimer, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires et le cancer. En fait, l'inflammation chronique entraîne des dommages tissulaires et un dérèglement du processus de guérison (Figure 1.5).

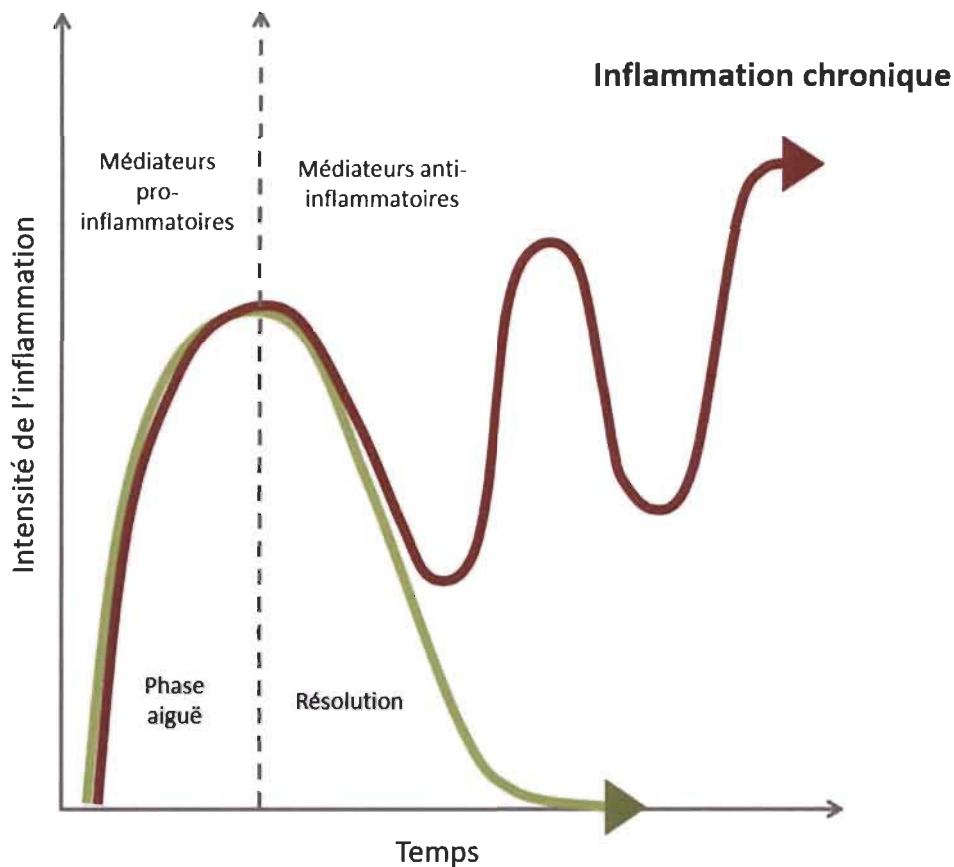


Figure 1.5 Inflammation résolue et inflammation chronique.

La résolution de l'inflammation est primordiale afin d'éviter l'installation d'une inflammation chronique menant à diverses pathologies, comme le cancer. Adaptée de Barnig et al. [23].

Nous avons longtemps cru que l'inflammation disparaissait passivement, résultant de la dilution des cytokines et chimiokines avec le temps, mais le laboratoire du professeur Serhan à Harvard a été l'un des premiers à montrer que la résolution de l'inflammation était un processus actif, impliquant la production de médiateurs anti-inflammatoires (Figure 1.6). Les M ϕ s ont un rôle important à jouer dans la résolution de la réponse inflammatoire, entre autres par la phagocytose des neutrophiles et M ϕ s pro-inflammatoires apoptotiques, ce qui entraîne une modification de leur phénotype vers un sous-type M2 et une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires, ce qui promeut le retour à l'homéostasie tissulaire [23, 24]. Le recrutement des monocytes et leur différenciation en M ϕ s au site de l'inflammation sont des événements déterminants dans le succès de la résolution de l'inflammation [25]. Par exemple, les M ϕ s sécrètent des protéases qui clivent les chimiokines afin d'empêcher le recrutement de nouveaux

neutrophiles [26]. Les médiateurs de la réponse anti-inflammatoire sont nombreux et biochimiquement divers. Certains lipides (lipoxines, résolvines, protectines et maresines), protéines (annexine A1), peptides et gaz ont des rôles à jouer dans la résolution de l'inflammation [26]. Ces molécules sont produites majoritairement par les monocytes/M ϕ s et les neutrophiles, mais peuvent aussi être synthétisées dans les cellules endothéliales vasculaires [27-30]. Plusieurs cytokines ayant un effet anti-inflammatoire sont également sécrétées, comme décrit dans la section suivante consacrée aux cytokines. De plus, la production de cytokines associées à l'inflammation aiguë, comme TNF α , GM-CSF et IL8, est diminuée [26].

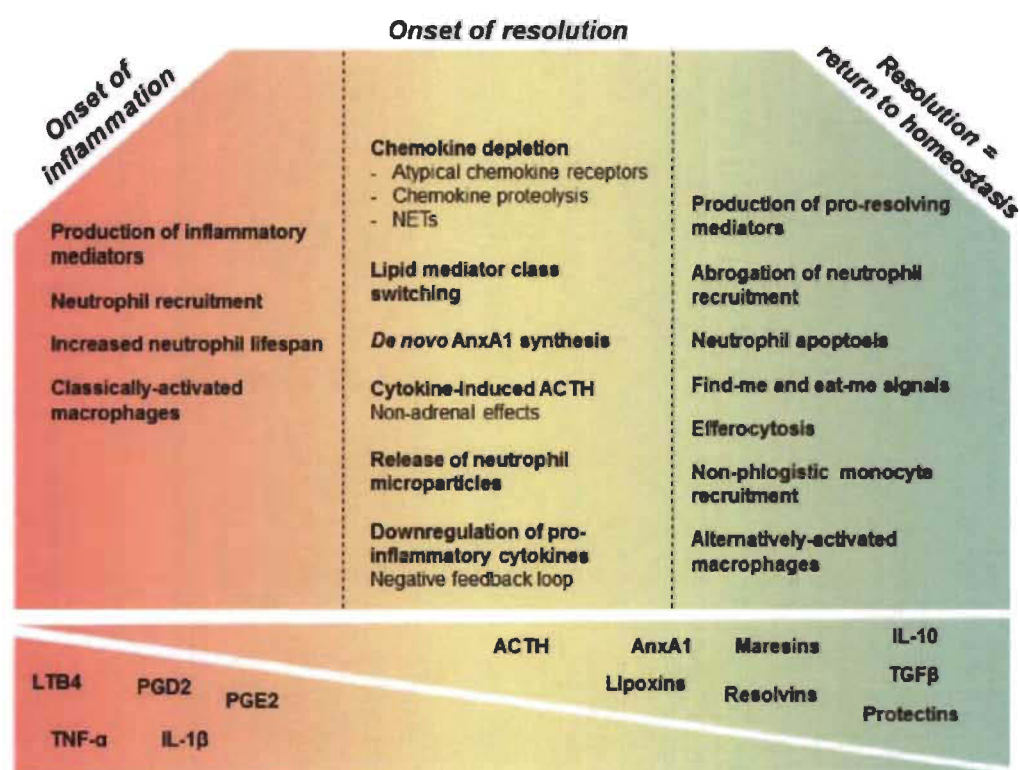


Figure 1.6 Résolution de l'inflammation.

Durant la première phase de l'inflammation, la production de médiateurs pro-inflammatoires promeut l'accumulation de leucocytes au site inflammé. Des mécanismes de régulation, comme une rétroaction négative induite par des cytokines pro-inflammatoires et la déplétion de chimiokines sont des mécanismes qui permettent, en situation physiologique, d'initier la phase de résolution de l'inflammation. Adaptée de Sugimoto et al. [31].

1.2.5 Les cytokines

1.2.5.1 Généralités

Les cytokines sont une famille d'une centaine de petites molécules peptidiques ou glycoprotéiques sécrétées par des cellules ayant des fonctions diverses allant de la croissance et la différenciation à la modulation immunitaire [32, 33]. Leurs appellations sont variées selon leur origine ou leur fonction : lymphokines (cytokines produites par les lymphocytes), monokines (produites par les monocytes), interleukines (produites par les lymphocytes et agissant sur des lymphocytes) et les chimiokines (molécules chimioattractantes). Ces molécules de signalisation peuvent avoir un effet sur les cellules qui les sécrètent (autocrine), sur des cellules adjacentes (paracrine) ou, dans certains cas, des cellules éloignées (endocrine). Il est d'ailleurs commun qu'une même cytokine soit produite par différents types cellulaires ou encore qu'une même cytokine puisse avoir un effet différent selon le type et l'état de différenciation des cellules ciblées (pléiotropie). Même si les cytokines sont produites par de nombreuses cellules, les principales sont produites par les lymphocytes T *helper* et les Mφs.

1.2.5.2 Macrophages, cytokines et inflammation

Durant la réponse inflammatoire, il y a non seulement une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi une diminution de cytokines anti-inflammatoires. Les principales cellules responsables de la production de cytokines pro-inflammatoires sont les macrophages activés [34]. Bien que les cytokines agissant sur les leucocytes soient très nombreuses, la section suivante traitera des celles agissant particulièrement sur les monocytes/macrophages et ayant un rôle physiologique ou pathologique dans la gestation humaine.

L'interféron gamma

L'IFN γ est l'une des premières cytokines à avoir été identifiée [35]. On classe parmi les IFN les molécules solubles sécrétées lors d'infections virales et ayant la capacité de

les protéger contre les virus [36]. On divise les IFN en deux grands groupes : type I et type II. Les IFN de type I sont habituellement produits en réponse à une infection virale et sont subdivisés en plusieurs sous-types, dont IFN α et IFN β , selon les cellules d'origine, et un type identifié plus récemment, IFN ϵ . Les IFN α sont une famille de 17 protéines encodées par des gènes distincts et sont synthétisés principalement par les lymphocytes. L'IFN β est une protéine produite majoritairement par des fibroblastes. Contrairement à IFN α et IFN β , IFN ϵ est exprimé constitutivement dans plusieurs organes, dont les poumons, le cerveau et les tissus reproducteurs [37]. Bien qu'ils soient utiles pour protéger la mère d'infections virales ou bactériennes, les IFNs de type I ne semblent pas être impliqués dans les complications gestationnelles liées à l'inflammation, contrairement à IFN γ [38, 39]. L'IFN de type II ou IFN γ est produit en réponse à des stimuli immuns inflammatoires, et ce, presque exclusivement par les lymphocytes T et les cellules NK [36, 40]. Les IFNs, en plus de leur activité antivirale, peuvent inhiber la prolifération et exercer d'autres fonctions pro-inflammatoires comme polariser des M ϕ s en un sous-type pro-inflammatoire (M1), sensibiliser ceux-ci à des signaux comme le LPS et induire la production d'oxyde nitrique (NO) et d'espèces réactives de l'oxygène [40, 41].

IFN γ est une petite protéine de 34 kDa qui entraîne des modifications dans l'expression génique par l'activation de son récepteur, composé de deux sous-unités : IFN γ Receptor-1 et -2 (IFNGR1 et IFNGR2). Le changement de conformation du récepteur en présence du ligand permet la phosphorylation des protéines *janus kinases* (JAKs) attachées constitutivement à la portion intracellulaire des deux sous-unités du récepteur, plus précisément JAK1 et JAK2 [42, 43]. L'activation de ces protéines à activité kinasique induit la phosphorylation du domaine intracellulaire de IFNGR. Ce site de phosphorylation permet l'ancrage du facteur de transcription Stat1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-1*) [43, 44]. Une fois phosphorylés au niveau de la tyrosine 701, les Stat1 s'associent pour former des homodimères qui sont transloqués au noyau où ils peuvent induire l'expression de gènes cibles [43, 45].

La voie JAK/Stat est régulée négativement par plusieurs mécanismes, les plus étudiés impliquant les protéines connues sous les acronymes PTP (*protein tyrosine*

phosphatase), SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) et PIAS (*protein inhibitor of activated Stat*). D'autres mécanismes inhibiteurs de Stat1 peuvent également co-exister, à savoir l'internalisation du récepteur IFNGR [46] ainsi que la sumoylation et la dégradation par le protéasome de Stat1 [47]. Pour réguler la voie JAK/Stat1, la PTP *protein Src homology 2-containing phosphatase* (SHP-2) déphosphoryle les JAKs et l'IFNGR1 afin d'entraver la signalisation de l'IFN γ . SHP-2 est activé (phosphorylé) au niveau de ses tyrosines 542 et 580 en réponse à des facteurs de croissance comme l'*Epidermal growth factor* (EGF), et facilite la signalisation des *Mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) en activant les *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs) [48]. Il semble d'ailleurs qu'une réponse diminuée à l'IFN γ serait accompagnée de l'activation de SHP-2 [49]. SOCS1 exerce un contrôle sur la signalisation de l'IFN γ en liant son domaine SH2 (*Src homology 2*) à des tyrosines phosphorylées de JAK1 (Tyr1034-1035) [50], JAK2 (Tyr1007) [51] et de *non-receptor tyrosine-protein kinase-2* (TYK2) (Tyr1054-1055) [52], inhibant ainsi leur activité [50]. Il a été découvert récemment que SOCS1 peut se lier à JAK non phosphorylé, suggérant un scénario où SOCS1 peut empêcher l'autophosphorylation des JAKs avant même que le récepteur soit activé par le ligand [50]. L'interleukine-10 (IL-10), une cytokine anti-inflammatoire, peut induire l'expression de SOCS1 et, donc, diminuer l'action de IFN γ [53]. PIAS1 arrive à réduire l'expression de gènes cibles de l'IFN γ non pas en inhibant l'activation de Stat1, mais plutôt en empêchant son action. Il peut se lier au domaine de transactivation de Stat1, augmenter sa SUMOylation ou se lier directement au promoteur des gènes cibles de IFN γ (*interferon-stimulated genes*; ISGs) pour empêcher le recrutement de Stat1 [54-56].

Le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

Le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF; CSF-2) fait partie de la famille des facteurs de croissance hématopoïétiques, avec le *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF; CSF-1) et *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF; CSF-3). Il a été initialement reconnu capable de stimuler la prolifération de granulocytes et macrophages, d'où son nom [57]. Il contribue également au maintien de l'homéostasie immunitaire en promouvant la survie, la prolifération et l'activation de cellules myéloïdes matures [58]. Le récepteur pour GM-CSF est composé de deux

sous-unités, la chaîne α pour la reconnaissance du ligand et la chaîne β pour la transduction du signal [59]. Cette dernière est aussi partagée par les récepteurs pour les interleukines (IL) -3 et -5 et nécessite l'association de JAKs pour l'activation de voies de signalisation intracellulaire comme JAK2/Stat5, les kinases de la famille de *Src*, *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) et MAPK [60]. La voie JAK2/Stat5 est principalement responsable de la différenciation immune et l'activation pro-inflammatoire [61], tandis que PI3K stimule la survie et la prolifération des cellules myéloïdes [62]. En situation physiologique, GM-CSF est virtuellement absent de la circulation sanguine [63]; il est produit en réponse à des cytokines ou des PAMPs par les cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastiques, stromales et hématopoïétiques [64-70]. Son action est plutôt juxtacrine ou paracrine, qu'endocrine, alors le site de sa production est indicatif de sa fonction [71]. Même si GM-CSF est décrit comme un facteur de croissance hématopoïétique, les seules conséquences de son absence, du moins chez la souris vierge, sont une diminution du nombre de macrophages alvéolaires et d'un sous-type de cellules dendritiques dans des tissus non lymphoïdes [59, 68, 72].

La régulation de Stat5 implique des mécanismes similaires à ceux de Stat1, c'est-à-dire la production de SOCS, dont SOCS7 [73], et la déphosphorylation des Stat5 par des PTPs, dont SHP-1 et SHP-2 [74, 75]. Même si la régulation de Stat5 est à la base semblable à celle de Stat1 ou de Stat3, de nombreux mécanismes différents modifiant son activité transcriptionnelle ou son activation ont été identifiés [76]. Par exemple, la capacité de Stat5A à se lier au promoteur de certains gènes peut être augmentée par une phosphorylation de la sérine 780 par ERK1/2 [77]. L'interaction avec la phosphatase *dual-specificity phosphatase 4* (DUSP4) avec Stat5B diminuerait aussi la phosphorylation de Stat5 et, par la même occasion, son activité transcriptionnelle [78]. De plus, le *transforming growth factor beta* (TGF β) peut interagir directement avec le domaine N-terminal de Stat5A et Stat5B dans le cytosol et inhiber leur phosphorylation [79].

1.2.5.3 Cytokines anti-inflammatoires ayant un effet sur les macrophages

Leukemia inhibitory factor (LIF)

La cytokine LIF est une petite molécule peptidique de 22 acides aminés (20kDa) faisant partie de la famille de l'interleukine-6 (IL6) [80]. Étant donné son caractère pléiotropique, son récepteur est exprimé dans de nombreux tissus, incluant la décidue et le placenta chez l'humain et la souris [81-83]. Il est également exprimé à la surface des Mφs [84]. Son récepteur hétérodimérique est composé de la même sous-unité que les autres membres de la famille de l'IL6, la glycoprotéine 130 (gp130), et d'une sous-unité spécifique à LIF et à Oncostatine-M (OSM), le récepteur de LIF-bêta (LIFRβ). Les sous-unités gp130 et LIFRβ comportent chacune deux protéines JAKs associées (JAK1 et JAK2) à la portion intracellulaire du récepteur [85]; rappelons qu'un changement conformationnel de celui-ci en présence du ligand induit l'autophosphorylation des JAKs, les activant. Le complexe activé du récepteur de LIF a la capacité d'activer directement les facteurs de transcription Stat3 et, dans une moindre mesure Stat1, mais aussi les voies de signalisation des MAPK et de PI3K/Protéine kinase B (Akt) [45]. Dans les Mφs, l'activation de la voie Stat3 a un effet anti-inflammatoire [86]. La voie MAPK/ERK joue un rôle dans la production de protéines inflammatoires comme TNFα et la cyclooxygénase 2 (COX-2), mais aussi dans l'induction de l'expression d'ARG-1 [87], un marqueur anti-inflammatoire, selon le contexte et la cinétique d'activation [88]. De plus la voie MAPK/ERK peut induire la prolifération de ces cellules [89]. La voie de PI3K/Akt régule la survie, la migration et la prolifération des Mφs, en plus d'orchestrer la réponse à différents signaux métaboliques et inflammatoires [90].

Dans différents tissus, la transcription de LIF peut être régulée par plusieurs facteurs, dont le stress inflammatoire [91], l'hypoxie [92], les cytokines IL-1α, IL-1β, TGF-β et TNFα [93-96], l'œstrogène [97] et le facteur de transcription p53 [98]. De plus, une analyse du promoteur de LIF a révélé que le facteur de transcription Stat5 pouvait induire la transcription de son ARNm dans les cellules de la lignée myéloïde [99]. La transcription de LIF peut être diminuée par la vitamine D₃, la dexaméthasone [100] et l'excès de progestérone [101].

L'ARNm de LIF est plutôt instable, probablement en raison de la présence d'une séquence riche en AU dans la région 3' non traduite de l'ARNm. Sa demi-vie est d'environ 30 minutes, et l'induction de sa production se fait rapidement (45 minutes) en réponse à des stimuli comme TNF α et IL-1b [102]. Un mécanisme récemment identifié et pouvant augmenter l'expression de LIF sans affecter sa transcription est la stabilisation de son ARNm par la nucléoline et la *Poly(rC)-binding protein 1* (PCBP1). Ces deux protéines stabilisatrices ont été détectées en interaction avec la séquence riche en AU de l'ARNm de LIF dans les cellules de lymphome histiocytaire U937 différenciées avec du *phobol-12-myristate-13-acetate* (PMA) [103].

L'interleukine IL-10

IL-10 est le principal membre de la superfamille des IL-10s, comprenant IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 et IL-26, en plus de la sous-famille de l'IFN- λ comprenant IL-28A, IL28B et IL-29 [104, 105]. Cette cytokine est sécrétée par de nombreux types cellulaires, incluant les M ϕ s et le syncytiotrophoblaste [106, 107]. Son récepteur est composé de deux sous-unités, IL10R1 et IL10R2 [107-109]. La transduction du signal implique l'activation des kinases JAK1 et TYK2, associées au récepteur, et l'activation de Stat3. Cependant, Stat1 et Stat5 peuvent aussi être activés dans certains cas [110]. Bien que le récepteur d'IL-10 (IL10R) ne possède pas de site pour l'ancrage de Stat1, le ratio Stat1/Stat3 activé par IL-10 est augmenté en présence d'IFN γ [111]. Dans cette étude, les auteurs proposent qu'une association entre IFNGR et IL10R puisse expliquer cette activation de Stat1 et le caractère pléiotropique de la cytokine. Une autre explication possible est l'inhibition par IL-10 de la régulation négative de Stat1 dans les cellules stimulées par IFN γ .

IL-10 joue un rôle essentiel dans la régulation de l'inflammation [112]. Un des rôles importants d'IL-10 médié par Stat3 sur les M ϕ s est la répression de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), dont les gènes sont constitutivement exprimés ou induit par IFN γ [113]. De plus, IL-10 inhibe fortement la

sécrétion de cytokines dans les M ϕ s activés au LPS en induisant l'expression de SOCS3 [114]. IL-10 inhibe aussi la production de NO dans ces mêmes cellules [115].

Les interleukines IL-4 et IL-13

IL-4 et IL-13 sont des cytokines anti-inflammatoires classiques ayant des rôles se chevauchant, mais distinct et jouant un rôle dans la défense contre les parasites en induisant la production d'immunoglobulines IgE [116]. De plus, en tant que cytokines de type-2, elles induisent une polarisation de type M2 dans les M ϕ s et de type Th2 dans les lymphocytes T [116].

1.3 La gestation normale chez l'humain

1.3.1 Généralités

La gestation humaine a une longueur de 40 semaines, en moyenne, suivant la date des dernières menstruations. Seulement 4 % des femmes accouchent à la date prévue, estimée à l'échographie, mais 70 % d'entre elles le font dans un délai de 10 jours avant ou après cette date [117]. Il semble que la cinétique de l'ovulation et de l'implantation, en plus de l'âge de la mère, sont des facteurs qui peuvent influencer la durée de la grossesse [118].

1.3.2 Cycle menstruel

Chez l'humain, l'utérus se prépare à chaque mois (ou cycle menstruel) à la potentielle implantation d'un embryon. Le cycle menstruel décrit la période entre la première journée de menstruations et la première du cycle suivant; sa durée médiane est de 28 jours avec la majorité entre 25 et 30 jours (Figure 1.7) [119, 120]. Il peut être divisé en deux phases : la phase folliculaire ou proliférative, qui commence dès le début des menstruations et mène à l'ovulation et la phase lutéale ou sécrétoire, qui suit l'ovulation jusqu'au retour des menstruations. C'est durant la phase folliculaire, d'où son nom, que se développent les follicules ovariens. Le follicule presque mature induit une augmentation drastique des niveaux d'œstradiol, ce qui déclenche une rapide

augmentation de la LH et entraîne l'ovulation. La *luteinizing hormone* (LH) agit sur les cellules de la granulosa et stimule la production de progestérone par le corps jaune. En absence des signaux de survie induits par l'hormone *human chorionic gonadotropin* (hCG) sécrétée par le blastocyste, il se résorbe, entraînant une chute des niveaux de progestérone. Cette baisse est le principal signal du déclenchement des menstruations (Figure 1.7) [120].

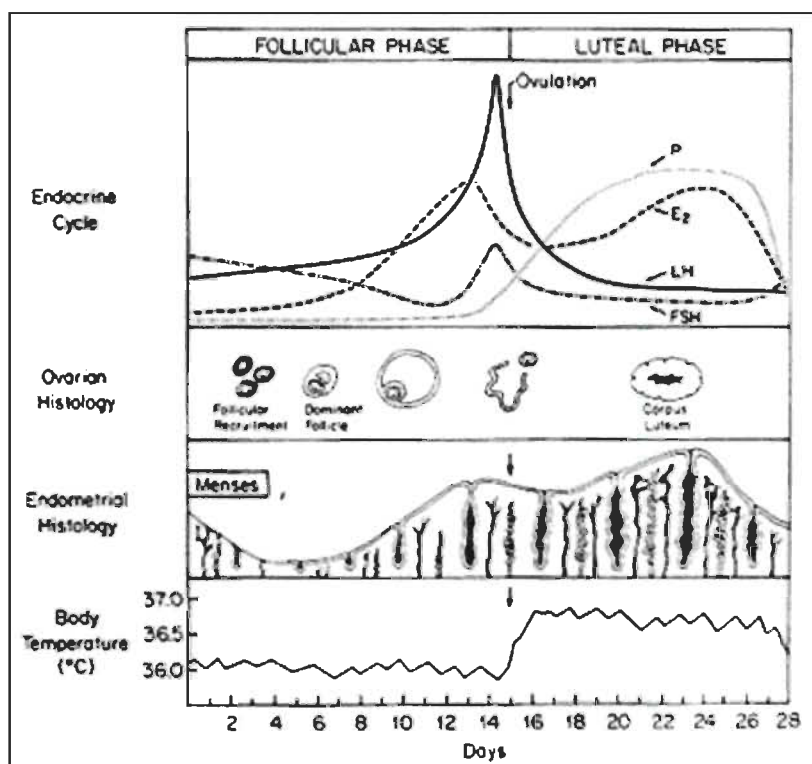


Figure 1.7 Cycle menstruel.

Le cycle menstruel se divise en deux phases, folliculaire et lutéale. Ces phases sont initiées en réponse à des signaux hormonaux, à savoir la hausse le pic de LH, qui déclenche l'ovulation et la phase lutéale, et la chute de progestérone et œstradiol, qui déclenche les menstruations et le début de la phase folliculaire. Tirée de *Harrison's Principles of Internal Medicine*, chapter 385: *Disorder of the ovary and female reproductive tract*, 1987.

1.3.3 Phase lutéale : décidualisation

La phase lutéale sert essentiellement à préparer l'utérus à un éventuel blastocyste prêt à s'implanter. D'abord, les cellules qui entouraient l'ovule, les cellules de la granulosa

et de la thèque, se transforment sous l'influence de la LH pour former un organe endocrine éphémère : le corps jaune ou *corpus luteus*. Celui-ci sécrète la progestérone qui constitue le deuxième signal que l'endomètre attendait, après l'œstradiol, pour enclencher la décidualisation. Donc, au niveau de l'utérus, ces changements hormonaux entraînent une panoplie de changements morphologiques et fonctionnels en passant du remodelage de la vasculature à la différenciation des cellules endométriales stromales en cellules déciduales spécialisées. Il est à noter que la décidualisation n'a lieu qu'après la fécondation chez la majorité des mammifères; seulement ceux dont la décidualisation est déclenchée par l'ovulation ont des menstruations [120-124].

Les cellules déciduales stromales ont un rôle majeur à jouer dans le bon succès de l'implantation embryonnaire, mais aussi dans la modulation de l'immunité maternelle [125]. En plus de contribuer au microenvironnement qui promeut le remodelage des artères et la formation du placenta par la production de cytokines comme IL-11 [126], LIF [127], ou d'hormones comme la prolactine [128], elles influencent le recrutement, la distribution et la fonction des cellules immunitaires de la décidue par la sécrétion de chimiokines et cytokines dont la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), IL-6, IL-8 et IL-15 [129, 130].

Il y a un dialogue étroit entre les cellules déciduales et les leucocytes maternels. Durant la phase lutéale, une grande portion de ces leucocytes est constituée de cellules tueuses naturelles utérines (*uterine natural killer cells*; uNK), qui ne semblent pas avoir de fonctions cytotoxiques, comme les NK circulants. Dans le contexte gestationnel, les cellules uNK semblent plutôt impliquées dans le remodelage des artères spiralées et, si la fécondation est réussie, à l'invasion du trophoblaste [126, 131-133].

1.3.4 Placentation

1.3.4.1 Le placenta humain

La portion fœtale du placenta est formée de trois couches de tissus. Celle en contact avec le sang maternel s'appelle le trophoblaste. Le trophoblaste est dérivé de la couche

externe du blastocyste et compose une grande partie de la masse du placenta. Il se divise en deux types cellulaires différenciés, issus des cytotrophoblastes non différenciés : le syncytiotrophoblaste et le trophoblaste extravilloux. L'origine et l'organisation structurelle des trophoblastes en relation avec la décidue maternelle sont présentées dans la figure 1.8.

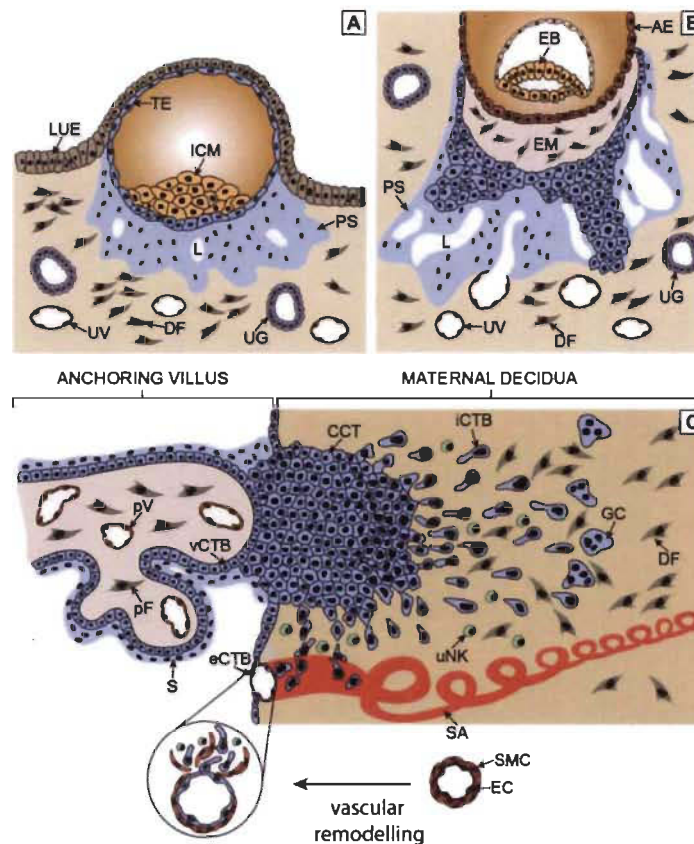


Figure 1.8 Les trophoblastes dans le placenta.

En a), les cellules du trophoblaste donnent naissance à un syncytium primitif (PS) par fusion cellulaire. En b), des cellules du trophoblaste se différencient en cytotrophoblaste (CTBs) et traversent le syncytium. En c), les CTBs envahissent la décidue maternelle (*invasive* CTBs, iCTBs) et recouvrent la paroi interne des artères maternelles (*endothelial* CTBs; eCTBs). Adaptée de Knofler et al. [134].

Le syncytiotrophoblaste est une couche de cellules épithéliales syncytiales, c'est-à-dire fusionnées et multinucléées, et cette structure est responsable de véhiculer les échanges de nutriments entre le sang de la mère et la circulation fœtale [135]. La couche syncytiale du trophoblaste est non seulement une barrière physique entre la circulation maternelle et fœtale, elle a aussi des fonctions endocrines et immunomodulatrices.

Elle produit de nombreux facteurs de croissance et d'hormones qui régulent le développement du placenta et de l'embryon [135]. La hCG est produite presque exclusivement par ces cellules; c'est l'hormone qui est détectée lors des tests de grossesse. Elle est produite maximale à 10 semaines post-fécondation et décline par la suite [136]. L'une de ses fonctions importantes est d'induire le maintien de la production de progestérone par le corps jaune jusqu'à ce que le placenta puisse prendre la relève, vers la 8^e semaine de grossesse [137]. Le syncytiotrophoblaste produit également de la progestérone et des œstrogènes, mais seulement la production de progestérone est essentielle au maintien de la grossesse. Le placenta en produit d'ailleurs assez, dès la fin du premier trimestre, pour qu'une ovariectomie n'affecte pas la survie du fœtus [136]. On attribue aussi au syncytiotrophoblaste des fonctions immunomodulatrices, soit par la production de facteurs anti-inflammatoires, comme IL-10, ou la production de vésicules extracellulaires circulant dans le sang maternel [138, 139]. Ces fonctions seront décrites plus en détail plus bas (sous-section 1.2.5).

L'autre population cellulaire du trophoblaste est composée de cytotrophoblastes extravilloux, des cellules non fusionnées, également issues des cytotrophoblastes non différenciés, et participe au remodelage des artères spiralées. Cette étape importante de la placentation sera explorée plus en détail dans la section suivante. Les cytotrophoblastes extravilloux sont invasifs et sont responsables d'ancrer le placenta dans la décidue maternelle et ses vaisseaux [140]. Leur différenciation entraîne la production de plusieurs marqueurs spécifiques, comme la *vascular endothelial cadherin*, et la *matrix metalloproteinase 9* (MMP9), le premier impliqué dans la fonction vasculaire, le second dans l'invasion des tissus [141, 142]. Pour favoriser la tolérance immunitaire maternelle, ces cellules expriment aussi une forme alternative du CMH-I appelée HLA-G [143].

1.3.4.2 Décidualisation et remodelage des artères

La couche endométriale de l'utérus subit des changements majeurs en préparation à l'implantation du blastocyste et à l'invasion du trophoblaste. Après la prolifération et la différenciation des cellules endométriales stromales, les artères irriguant le placenta sont

remodelées par le trophoblaste extravilleux et deviennent insensibles aux signaux vasoconstricteurs afin d'assurer un apport sanguin adéquat au fœtus (Figure 1.8) [144].

1.3.4.3 β -hCG

L'hormone hCG est composée de deux sous-unités, l'alpha, qui est commune à toutes les hormones glycoprotéiques (FSH, LH et TSH), et la bêta, spécifique à hCG; elles ne sont pas liées de façon covalente [145]. La sous-unité bêta tient son origine dans la duplication du gène de la LH, mais des changements au niveau de son promoteur lui permettent une régulation transcriptionnelle indépendante [136]. La hCG est produite par le syncytiotrophoblaste et la quasi-totalité (99 %) est sécrétée dans le sang maternel [145]. En plus de son rôle dans la production de progestérone par le corps jaune, hCG agit de façon autocrine et paracrine pour réguler la différenciation des trophoblastes [146, 147]. La liaison de hCG avec son récepteur active l'adénylyl cyclase associée, ce qui augmente les niveaux intracellulaires d'AMP cyclique (AMPC) [148]. La hausse des concentrations d'AMPC intracellulaire active la *protéine kinase A* (PKA) qui augmente ultimement la fusion des cytotrophoblastes, *in vitro*, en plus d'induire l'expression de syncytin-1, une protéine membrane impliquée également dans la fusion des cytotrophoblastes [148, 149]. hCG promeut aussi l'angiogenèse dans l'endomètre et contribuerait à induire la quiescence du myomètre et la tolérance immunitaire [150-152]. Ses niveaux de production sont finement contrôlés, et une sur- ou sous-production est associée à des pathologies gestationnelles [153]. En effet, la fusion anormale des cytotrophoblastes est observée dans la PE et le retard de croissance intra-utérin.

1.4 Gestation et inflammation chez l'humain

1.4.1 Inflammation gestationnelle physiologique

Dans le tractus génital féminin, plusieurs processus complexes comme les menstruations, l'ovulation, l'accouchement et l'implantation présentent tous des signes distinctifs de l'inflammation [32]. Le déclencheur initial des nombreux changements immunologiques se déroulant durant la grossesse suit de près le dépôt de la semence, composée principalement de spermatozoïdes et de plasma séminal. À ce moment,

le tractus génital femelle subit une réponse inflammatoire caractérisée par une infiltration leucocytaire et la production de cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance. Il a été mis en évidence que le plasma séminal accroît la production par les cellules épithéliales et stromales de plusieurs protéines, notamment des chimiokines, et que cela participerait au recrutement des leucocytes [154]. Cette réponse est par ailleurs très bien conservée parmi les mammifères [155]. L'efflux de leucocytes, principalement des neutrophiles, a été observé chez l'humain aussi tôt que 20 minutes après un traitement d'insémination artificielle [156, 157]. Ces événements ont été proposés comme contribuant au processus de fertilisation [158]. L'implantation embryonnaire est aussi reconnue comme un événement inflammatoire, probablement pour favoriser le remodelage tissulaire nécessaire à la placentation [159]. Cette réponse inflammatoire semble être essentielle à l'implantation chez l'humain; la consommation d'anti-inflammatoires pendant la fenêtre péri-implantatoire serait associée à un risque augmenté de fausse couche [160]. Il est suggéré que cette réponse inflammatoire est ancienne, d'un point de vue évolutif, et est le résultat d'une réponse de l'endomètre à l'apposition d'un corps étranger, le blastocyste [161]. En effet, les marqueurs de l'implantation sont produits dans l'endomètre rapidement après le contact du trophoblaste avec l'épithélium utérin [161]. Durant le second et le troisième trimestre, l'inflammation est régulée (Figure 1.9), ce qui est nécessaire à la tolérance des antigènes paternels du fœtus [161]. La progestérone (P_4), en activant son récepteur nucléaire, exerce un rôle anti-inflammatoire et empêche la contraction myométriale [162]. Elle limite aussi l'activation des facteurs de transcription *nuclear factor kappa B* (NF κ B) et l'*activator protein 1* (AP-1) [163, 164]. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans l'initiation de la contraction myométriale par l'induction de gènes comme ceux de COX-2 et du récepteur F₂A des prostaglandines [165, 166]. L'accouchement est accompagné par le retour de la réponse inflammatoire. On voit dans figure 1.9 un schéma de l'état inflammatoire du placenta durant la grossesse. On détecte une hausse de la quantité de cytokines pro-inflammatoires dans le liquide amniotique, dans le myomètre et le cervix [167-169]. De plus, les membranes fœtales sont infiltrées par des leucocytes qui sécrètent des cytokines et chimiokines promouvant des cascades de signalisation menant à l'activation, entre autres, de NF κ B et AP-1 dans ces mêmes tissus [170].

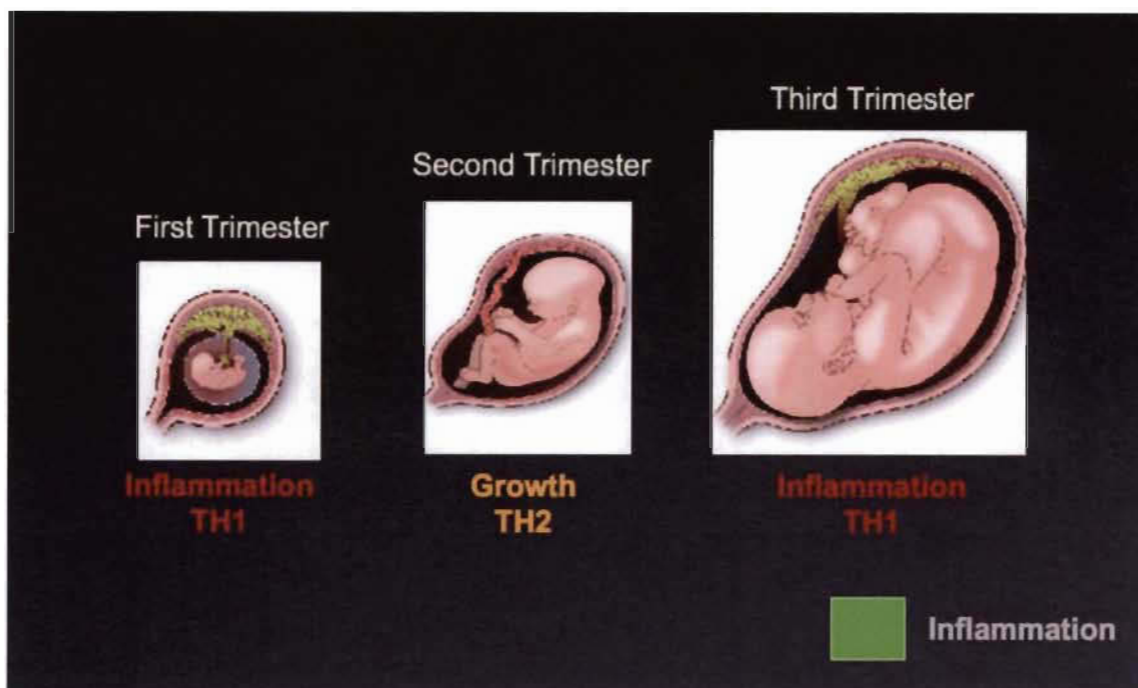


Figure 1.9 Inflammation normale dans le placenta en cours de gestation. Les différentes phases de la grossesse sont caractérisées par un état inflammatoire différent au niveau du placenta. Le premier trimestre requiert une réponse inflammatoire, le second nécessite une régulation de cette inflammation, et la fin du troisième trimestre voit le retour d'une inflammation qui est impliquée dans l'accouchement. Adaptée de Mor et al. [171].

1.4.2 Inflammation et pathologies gestationnelles

L'inflammation intra-utérine non régulée, par l'absence de signaux anti-inflammatoires, ou exacerbée, par excès de signaux pro-inflammatoires, constitue un élément causal de plusieurs pathologies du tractus génital féminin comme des troubles menstruels [172], l'infertilité associée à l'endométriose [173], l'avortement spontané récurrent [174, 175], le retard de croissance intra-utérin [176], la naissance prématurée [177, 178] et la PE [159, 179, 180]. Bien que l'implantation embryonnaire requière une réponse inflammatoire, il est connu que plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme $IFN\gamma$ et $d'IL-1\beta$ diminuent la motilité et l'invasion du trophoblaste, pouvant entraver la placentation si produites en trop grandes quantités, ou trop longtemps [181, 182]. Une invasion insuffisante du trophoblaste dans la décidue maternelle semble être à l'origine de la PE et le retard de croissance intra-utérin [183, 184]. Une invasion trop

profonde du placenta n'est pas souhaitable non plus, menant à un *placenta accreta* [185]. Une balance délicate entre les facteurs pro-invasifs, comme IL-6, LIF et EGF avec les facteurs limitant l'invasion, comme l'IFN γ et le TGF β semble alors essentielle pour une placentation efficace [181, 182, 186-189].

1.4.3 Les macrophages de l'interface fœto-maternelle

Durant la grossesse, la polarisation des M ϕ s semble être critique. Pendant la période péri-implantatoire, on observe surtout des M ϕ s de type M1 dans la décidue, mais dès que le trophoblaste s'attache à l'endomètre, la transition de M1 vers M2 s'amorce [190]. Ce changement permettra un remodelage efficace des artères spiralées déciduales et, donc, un apport sanguin suffisant au fœtus. La population reste mixte jusqu'à la fin du remodelage des artères en début de second trimestre, moment auquel les M ϕ s seront polarisés majoritairement selon le phénotype M2 [191]. La figure 1.10 montre la distribution normale et pathologique des M ϕ s M1 et M2 dans l'interface fœto-maternelle. Les M ϕ s utérins sont soupçonnés être les principaux producteurs d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire permettant la régulation des fonctions pro-inflammatoires et cytotoxiques de cellules NK et des lymphocytes T [192, 193]. Cette régulation permettrait de maintenir la tolérance maternelle envers le fœtus [194]. De plus, les M ϕ s utérins semblent interagir directement avec les cellules trophoblastiques extravilleuses et avoir un rôle à jouer dans le contrôle de leur invasion [195].

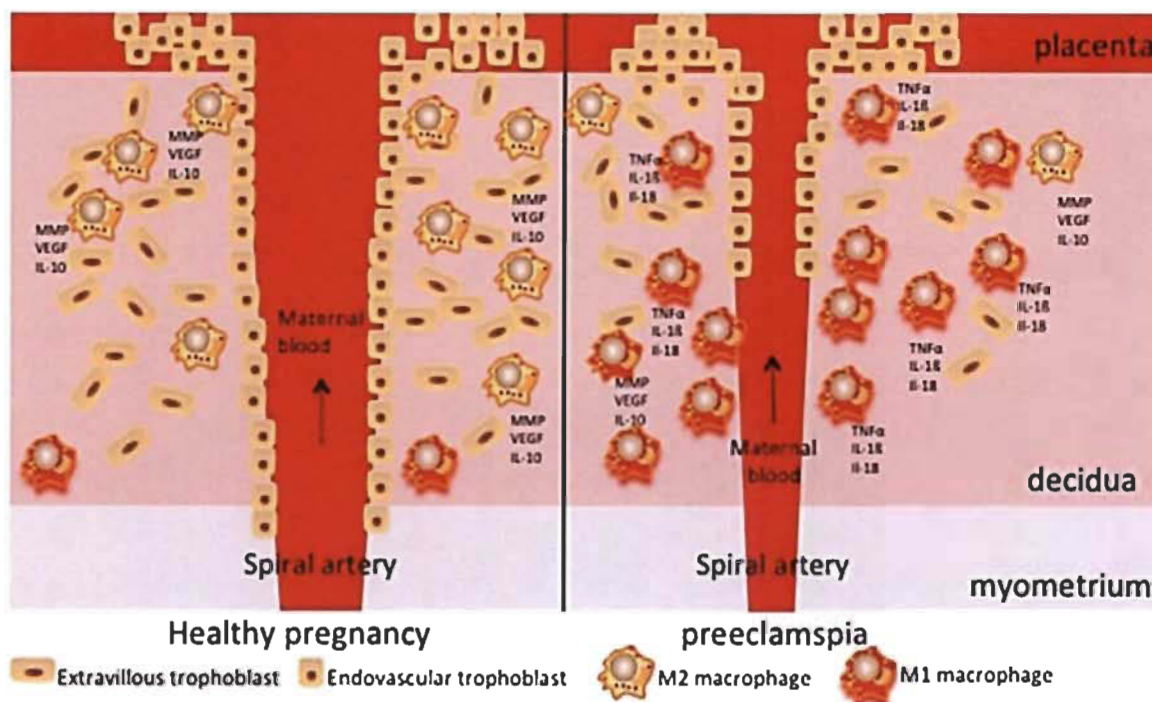


Figure 1.10 Représentation schématique de la distribution de macrophages M1 et M2 à proximité des artères spiralées dans la grossesse normale et prééclampsique.

Durant la grossesse normale, les macrophages adoptent majoritairement le phénotype M2 à proximité des artères spiralées, ce qui favorise leur remodelage et l'apport sanguin adéquat au fœtus. Dans la décidue d'une patiente souffrant de PE, un nombre augmenté de macrophages de type M1 a été mis en évidence. Ceux-ci pourraient produire une quantité accrue de facteurs pro-inflammatoires comme TNF α , IL-1 β ou IL-18. Faas et al. [196].

1.4.4 Les cytokines de l'interface fœto-maternelle

1.4.4.1 La cytokine IFN γ

L'IFN γ joue un rôle important dans l'établissement de la grossesse. Il a été démontré avec des souris déficientes en IFN γ ou en IFNGR1 que la maturation des cellules uNK et le remodelage des artères spiralées de l'endomètre étaient compromis en l'absence de signalisation fonctionnelle à l'IFN γ . Le rétablissement du phénotype était possible par la supplémentation d'IFN γ [197]. De plus, un modèle alymphoïde, dans lequel les cellules uNK sont absentes, présente des symptômes similaires. Une greffe de moelle osseuse provenant de souris produisant de l'IFN γ arrive à renverser le phénotype également [198].

Ces résultats indiquent que la production d'IFN γ par les cellules uNK est primordiale, à tout le moins chez la souris, pour la réceptivité de l'utérus à l'embryon. Les cellules uNK humaines seraient similaires aux cellules uNK murines et sécrètent IFN γ [199]. Par ailleurs, IFNGR1 est exprimé par l'épithélium utérin, suggérant que ces cellules sont des cibles de l'IFN γ [200]. Une méta-analyse récente a trouvé une association, bien que modeste, à des variants génétiques de plusieurs cytokines, dont l'IFN γ , avec des avortements spontanés fréquents et idiopathiques [201]. Bien que IFN γ semble important pour l'établissement de la grossesse chez l'humain, les analyses génétiques (microarrays) faites avec des endomètres humains n'ont pas montré d'augmentation significative de la production de cette cytokine pendant la phase de réceptivité utérine, seulement une augmentation de certains de ses gènes cibles [202]. Une autre étude, s'intéressant principalement aux cellules NK, a montré que les cellules uNK humaines diffèrent des cellules NK circulantes pour l'expression de gènes régulés par l'IFN γ , ainsi que pour des facteurs angiogéniques [203]. En plus de leur rôle sur le remodelage des artères spirales et sur la maturation des cellules uNK, l'IFN γ aurait un rôle dans la limitation de l'invasion trophoblastique. *In vitro*, l'invasion des trophoblastes (isolés des placentas du premier trimestre, cellules JEG-3 dérivées d'un choriocarcinome humain) est réduite significativement par l'ajout de IFN γ dans des essais d'invasion de matrigel [182, 204, 205]. Verma et ses collègues [181] ont montré récemment avec un modèle différent (HTR8/SVneo), que la diminution de l'invasion trophoblastique était médiée par Stat1 et possiblement par la régulation du *basic leucine zipper transcription factor 2* (BATF2), un gène connu pour réduire l'invasion et la migration de cellules cancéreuses. En outre, une augmentation sérique des concentrations d'IFN γ est observée chez les femmes souffrant de PE, une pathologie caractérisée par une sous-invasion trophoblastique, un remodelage incomplet des artères spiralées et une augmentation de la pression artérielle [206]. Ces résultats suggèrent que la production d'IFN γ doit être régulée finement pour éviter des complications gestationnelles liées à sa sous- ou surproduction.

1.4.4.2 La cytokine GM-CSF

Dans le tractus reproducteur féminin, le GM-CSF est principalement synthétisé dans les cellules épithéliales des glandes utérines et sa production est régulée par les

fluctuations hormonales du cycle œstral [207, 208]. Chez la souris, le GM-CSF est exprimé au moment de l'ovulation et ses niveaux sont augmentés en réponse au plasma séminal [209, 210]. L'expression de GM-CSF par les cellules épithéliales utérines reste élevée dans les jours suivant la fécondation et diminue au moment de l'implantation embryonnaire, probablement en réponse aux effets inhibiteurs de la progestérone [209]. Bien que réduite, la synthèse continue durant toute la grossesse du côté maternel du site d'implantation et dans le placenta [211]. L'absence de GM-CSF semble causer des défauts dans l'architecture du labyrinthe placentaire, ce qui lui suggère un rôle, direct ou indirect, dans le développement du placenta. Le retard de croissance fœtal observé dans les souris déficientes en GM-CSF serait expliqué dans ce cas par une réduction de l'apport en nutriment au fœtus [212]. De plus, GM-CSF semble impliqué dans l'immunité antimicrobienne, car on observe chez les souris déficientes en GM-CSF un plus grand nombre d'infections opportunistes de l'utérus, habituellement stérile [212]. Chez l'humain, une hausse des niveaux de GM-CSF dans le sérum de femmes enceintes est associée à un risque accru d'accouchement prématuré [213]. Dans un modèle murin inflammatoire de naissance prématuré, les niveaux sériques de GM-CSF sont également augmentés [214]. D'ailleurs, Christopher Nold et son équipe ont récemment montré que des anticorps bloquant le GM-CSF pouvaient réduire la naissance prématurée dans un modèle d'inflammation intra-utérine induite par le LPS chez la souris [215].

1.4.4.3 La cytokine LIF

LIF est produit maximalelement, chez la souris, durant la fenêtre d'implantation embryonnaire au jour 4 [216]. Des études réalisées avec des souris déficientes en LIF ont permis de montrer son importance à au moins deux niveaux pendant la gestation murine. LIF est essentiel à l'implantation embryonnaire, car les souris LIF^{-/-} ou LIFR^{-/-} sont infertiles par absence d'implantation [217, 218]. Les embryons de ces souris LIF^{-/-} peuvent toutefois être implantés dans des souris *wild-type* (WT) sans problème d'implantation ou de développement [217]. Chez la souris, LIF semble être essentiel pour rendre l'utérus réceptif à l'attachement et l'invasion du blastocyste (Figure 1.11) [217]. Dans les souris LIF^{-/-}, une seule injection de LIF au jour 4 suivant l'accouplement permet aux blastocystes

de s'implanter et aux souris de mener à terme leur portée [219]. Plus récemment, une ablation tissu spécifique du récepteur de LIF dans des utérus murins a confirmé ces découvertes, concluant que l'absence de LIF était responsable de l'échec d'implantation, et qu'il s'agissait essentiellement d'un défaut d'origine maternel [218]. Chez l'humain, bien que les preuves soient indirectes, une augmentation de l'expression de LIF au niveau de l'utérus est associée à l'implantation embryonnaire, ce qui suggère que LIF pourrait jouer un rôle dans la réceptivité de l'utérus au blastocyste chez l'humain également [220]. De plus, un lien entre la faible expression de cette cytokine et les échecs d'implantation a été observé [221].

Plusieurs facteurs peuvent induire l'expression de l'ARNm de LIF dans les tissus de l'appareil reproducteur féminin, dont l'œstrogène et le facteur de transcription p53 [91]. Tout comme les souris LIF^{-/-}, l'infertilité des souris femelles p53^{-/-} est associée à une absence d'implantation restaurée par un traitement avec du LIF exogène [98]. Les auteurs ont observé une baisse des niveaux basaux et induits de LIF, particulièrement au jour 4 *post coitus*. Une injection de LIF au jour 4 est suffisante, dans ce modèle aussi, pour restaurer l'implantation. Des travaux réalisés auprès de femmes souffrant d'échec répété d'implantation suggèrent que certains polymorphismes de p53 pourraient avoir un rôle négatif similaire dans la gestation humaine [98].

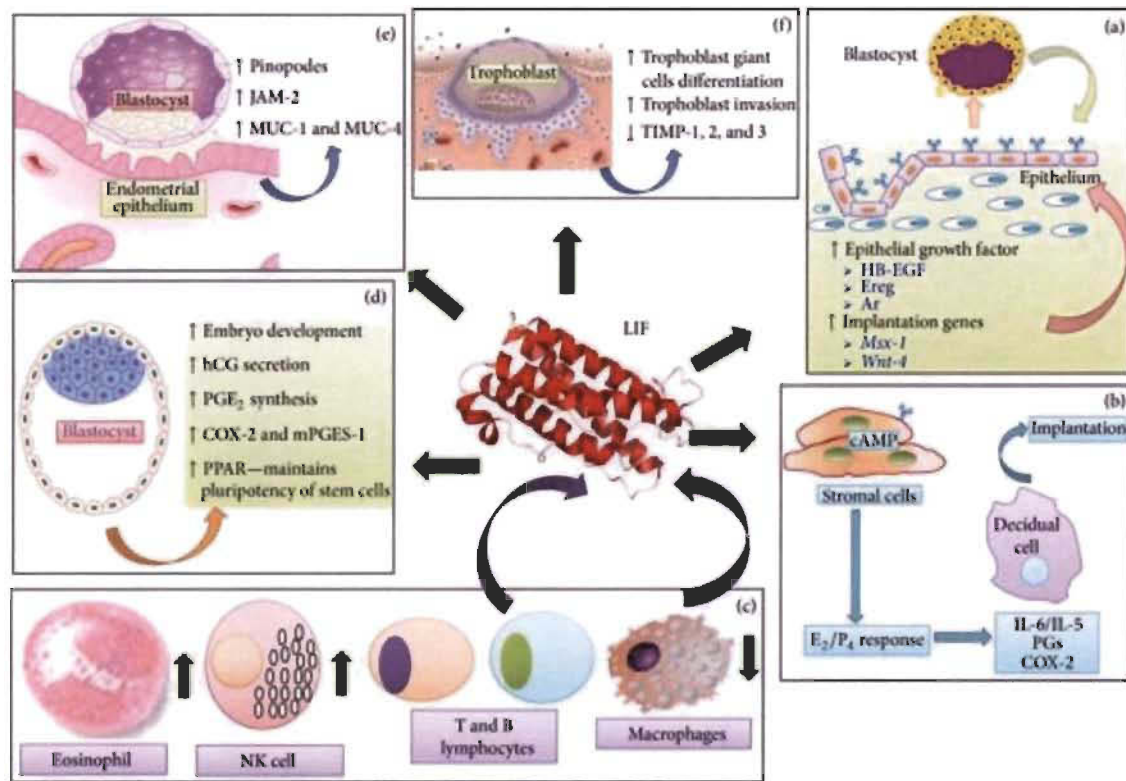


Figure 1.11 Résumé des rôles connus de LIF dans l'implantation embryonnaire.

LIF augmente l'expression d'EGF et d'autres gènes impliqués dans la réceptivité de l'endomètre. LIF, produit par l'endomètre et le blastocyste régule la croissance et le développement de l'embryon. Aussi, LIF stimule le processus de décidualisation en augmentant la production de cytokines et prostaglandines. LIF est impliqué dans les interactions embryon-endomètre en favorisant l'expression de pinopodes et molécules d'adhésion. LIF stimule la différenciation des trophoblastes et augmente la capacité de ceux-ci en envahir la décidue maternelle. Finalement, LIF est impliqué dans le recrutement de leucocytes participant à la réponse inflammatoire pendant l'implantation. Ereg : epirégulin, Ar : amphirégulin, E2 : œstrogène, P4 : progestérone, IL : interleukines, PGs : prostaglandines, COX : cyclo-oxygénase, NK, natural killer, PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*, PGE2 : prostaglandine E2, hCG : *human chorionic gonadotropin*, MUC : mucin, JAM : *junctional adhesion molecules*. Tirée de Salleh et al. [222].

L'ARNm de LIF est également produit dans les tissus utérins en réponse à un stress inflammatoire [91]. LIF y jouerait alors un rôle anti-inflammatoire et serait un des effecteurs de l'effet protecteur de la progestérone dans un modèle de perte embryonnaire précoce induit par le LPS chez la souris [223]. De plus, le LIF endogène protège des dommages tissulaires au foie et poumons induits par une endotoxémie au LPS dans un

modèle murin [224]. Chez l'humain, l'expression de LIF dans les tissus endométriaux est 1,26 fois plus basse chez les femmes ayant subi un avortement spontané d'étiologie inconnue [225]. De plus, une diminution de LIF dans le plasma maternel est associée à un risque d'avortement spontané lors de transfert d'embryons [226].

En plus de ses rôles clés sur l'implantation embryonnaire et la réponse inflammatoire, LIF agirait comme régulateur de croissance et différenciation sur les trophoblastes [227]. Des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire ont permis de montrer que LIF augmentait la fusion des cellules de trophoblastes BeWo en réponse à la forskoline [228]. LIF peut aussi stimuler l'invasion des cellules trophoblastiques [229, 230], et diminuer la production de β -hCG induite par la forskoline [227].

1.4.4.4 L'interleukine IL-10

L'IL-10 et son récepteur (IL10R1/R2) sont exprimés par de nombreux types cellulaires à l'interface fœto-maternelle, incluant les M ϕ s déciduaux et les cellules trophoblastiques [107-109]. Via l'activation de Stat3, elle est présumée jouer un rôle important dans la tolérance immunitaire à l'allogreffe fœtale en stimulant la production de HLA-G à la surface des monocytes et des trophoblastes [231] et dans la limitation de l'invasion trophoblastique, par la diminution de l'expression de MMP9 dans les syncytiotrophoblastes [107]. Par ailleurs, une étude réalisée par notre laboratoire a permis de mettre en évidence le rôle de LIF dans l'induction de la production d'IL-10 par les cellules trophoblastiques. Des milieux conditionnés de ces trophoblastes traités au LIF protègent des M ϕ s de l'activation pro-inflammatoire par la cytokine IFN γ . Entre autres, les facteurs solubles présents dans ces milieux conditionnés permettent de restaurer la motilité des M ϕ s activés avec l'IFN γ . On observe également que ces facteurs dérivés de trophoblastes stimulés avec LIF induisent une diminution de la transcription de l'ARNm de TNF α et une augmentation de la transcription de celui d'IL-10 dans les M ϕ s activés avec l'IFN γ . Le mécanisme d'action implique l'inhibition de l'activation de Stat1 et l'activation de Stat3 par IL-10 sécrétée par les trophoblastes en réponse à LIF [138].

1.5 Traitement des pathologies associées à l'inflammation intra-utérine

1.5.1 Généralités

Bien que l'inflammation soit nécessaire au bon établissement de la grossesse, la dérégulation de la réponse inflammatoire en période de gestation peut avoir des conséquences dévastatrices sur le fœtus. Comme mentionné précédemment, de nombreuses pathologies associées à la fonction reproductive féminine et la gestation, comme l'infertilité liée à l'endométriose, les fausses couches, la PE, le retard de croissance intra-utérin et la naissance prématurée sont associés à l'inflammation [232]. Il est estimé que, mondialement, plus de 72 millions de femmes sont infertiles, ce qui représente près de 10 % des femmes en âge de procréer [233]. La naissance prématurée et la PE sont les deux causes les plus fréquentes de morbidité périnatale et ont une prévalence de plus de 11 % [234] et 3-5 % [235, 236], respectivement [232]. La naissance prématurée se définit par l'accouchement avant 37 semaines de grossesse. Il a été démontré qu'une infection intra-utérine puisse être à l'origine de naissances prématurées : une chorioamniotite d'origine bactérienne serait la principale cause de la rupture prématurée des membranes et le travail prématuré spontané, qui ensemble représentent environ 50 à 65 % des accouchements avant 33 semaines au Québec (<http://www.premaquebec.ca>). Quant aux femmes atteintes, mais ne présentant pas d'infection, on soupçonne alors une activation « stérile » du système immunitaire, dans laquelle les facteurs pro-inflammatoires IFN γ , TNF α et GM-CSF seraient impliqués, comme dans l'inflammation d'origine bactérienne [177]. Cette inflammation stérile ne serait pas causée par la reconnaissance de signaux de danger associés à des pathogènes (PAMPs) comme le LPS, mais elle serait due à la présence des signaux de danger associés à la mort cellulaire ou les dommages tissulaires (DAMPs). Cependant, elle impliquerait des mécanismes similaires à une infection, dont l'activation du facteur de transcription NF κ B [232]. Elle pourrait être causée par une variété de facteurs, dont la prise d'alcool, le stress chronique, le stress oxydatif, la malnutrition, le diabète, l'obésité et des variations génétiques [232]. La PE, quant à elle, est caractérisée par une augmentation de la pression sanguine maternelle, une diminution de la perfusion du placenta et une hypoxie fœtale [237]. De plus, dans les modèles

animaux, une infection n'est pas nécessaire pour recréer les composantes principales de ces maladies gestationnelles [238].

1.5.2 Thérapies disponibles

Pour le moment, les traitements disponibles pour les pathologies gestationnelles liées à l'inflammation sont peu nombreux et inefficaces. Dans les cas d'inflammation liés à une infection, les antibiotiques ne sont pas suffisants pour prévenir la naissance prématurée, principalement parce que l'élimination du pathogène n'est pas assez rapide pour inhiber l'activation de M ϕ s, la relâche des cytokines pro-inflammatoires et l'activation du facteur de transcription NF κ B [239-241]. Pour les femmes ayant déjà accouché prématurément et ne présentant pas de signes d'infection, le seul acte médical approuvé pour diminuer le risque de naissance prématurée est l'administration de progestérone; son efficacité est toutefois limitée [240]. Dans les modèles murins, la déplétion des M ϕ s, mais pas celles des neutrophiles, permet de retarder la naissance prématurée induite par le LPS, ce qui suggère que ces cellules pourraient être une cible intéressante dans le développement de nouvelles thérapies [242]. Plus spécifiquement, l'inhibition de la voie NF κ B et le blocage de TLR4, ainsi que l'utilisation de nouvelles molécules anti-inflammatoires visant à inhiber la production de cytokines et chimiokines ont été proposées comme traitements potentiels [243-245].

La PE aurait aussi à son origine une activation dérégulée du système immunitaire maternel [246]. Elle est définie par une hypertension et une protéinurie après 20 semaines de grossesse et peut causer une défaillance du foie et des reins, des convulsions (éclampsie) et des anomalies de la coagulation chez la femme enceinte [247]. En excluant l'induction de l'accouchement, il n'y a aucun traitement efficace pour la PE à ce jour; les différentes approches thérapeutiques se concentrent sur la réduction des symptômes comme la diminution de la pression artérielle avec des médicaments antihypertensifs, ou la prévention des convulsions avec des composés comme le sulfate de magnésium [248]. Pour prévenir la PE chez les femmes à risque, les seuls traitements utilisés qui ont un effet, bien que modeste, sont la supplémentation en calcium et la prise d'aspirine à faible dose

[237]. La découverte de stratégies thérapeutiques préventives est alors un enjeu de santé publique [249]. Plusieurs molécules sont présentement en études précliniques ou cliniques pour prévenir la PE, le tableau 1.1 regroupe plusieurs de ces traitements potentiels.

Tableau 1.1

Résumé des stratégies thérapeutiques utilisées en recherche préclinique et clinique sur la prééclampsie (PE) et le retard de croissance intra-utérin (FGR) (2015)

Tiré de Cottrell et al. [250]

Treatment	Model	Effect (Reference)
<i>Preclinical studies</i>		
L-Arginine	Maternal nutrient restriction (FGR)	Increased fetal weight [251].
	Maternal hypoxia (FGR)	Increased fetal weight [252].
	sFlt-1 infused rat (PE)	Reduced blood pressure [253].
	<i>Clinical trials</i>	
	PE	Reduced blood pressure [254, 255].
	FGR	Increased fetal weight [256, 257].
<i>Preclinical studies</i>		
Sildenafil	COMT ^{-/-} mouse (PE)	Improved blood flow, increased fetal weight [258].
	Igf2-P0 mouse (FGR)	Increased fetal weight [258].
	L-NAME INFUSED RAT (PE)	Increased fetal weight [259].
	<i>Clinical Trials</i>	
	PE	Reduction in maternal blood pressures; non-significant increase in fetal weight [260].
	Early-onset FGR	Increased abdominal circumference [261].
	Severe early-onset FGR	Ongoing RCT, STRIDER [262].
<i>Preclinical studies</i>		
Tempol	eNOS ^{-/-} mouse (FGR)	Improved blood flow, increased fetal weight [263].
	BPH/5 mouse (PE)	Prevention of maternal hypertension and proteinuria, increased fetal weight [264].
<i>Clinical Trials</i>		
	No known clinical trials in pregnancy	

Treatment	Model	Effect (Reference)
	<i>Preclinical studies</i>	
	eNOS ^{-/-} mouse (FGR)	Increased fetal weight [265].
	COMT ^{-/-} mouse (PE)	Improved blood flow, increased fetal weight [265].
Resveratrol	<i>Clinical Trials</i> No known clinical trials in pregnancy; some evidence of potential adverse effects in non-human primates [266]	
	<i>Preclinical studies</i>	
	Maternal hypoxia (FGR)	Reduced oxidative damage and improved neurodevelopment [267].
Melatonin	Maternal nutrient restriction (FGR)	Increased birth weight [268].
	<i>Clinical Trials</i>	
	PE	Ongoing RCT [269].
	Early-onset FGR	Ongoing RCT [270].
	<i>Preclinical studies</i>	
	STOX-1 transgenic mouse (PE)	Reduced blood pressure/proteinuria [271].
Aspirin	<i>Clinical Trials</i>	
	Women at risk of PE	Systematic review of evidence to date indicates reduced risk of PE in women taking aspirin [272].
	<i>Preclinical studies</i>	
	RUPP model (PE)	Reduced maternal blood pressure, increased fetal weight [273].
Statins	sFlt-1 over-expressing mouse (PE)	Reduced maternal blood pressure, proteinuria and increased fetal weight [274].
	<i>Clinical Trials</i>	
	Severe PE	Ongoing RCT, StAmP trial; ISRCTN23410175.

1.5.2.1 Aspirine

L'aspirine, ou acide acétylsalicylique, est l'un des médicaments approuvés pour l'utilisation chez la femme enceinte. Cet agent peut aider à traiter les pathologies vasculaires comme la PE et le retard de croissance intra-utérin. Le mécanisme moléculaire d'action de l'aspirine est l'acétylation d'une sérine dans le site catalytique de COX-1, et dans une moindre mesure de COX-2, entravant la liaison de l'acide arachidonique, précurseur des prostaglandines (PGs). Ce blocage est dépendant de la dose, et irréversible [249]. Dans les trente dernières années, le potentiel de l'aspirine pour la prévention de la PE a été évalué par de nombreuses études cliniques, mais son efficacité est controversée [249]. Dans une méta-analyse publiée en 2010, Bujold et ses collègues ont mis en évidence un effet bénéfique de la prise d'aspirine à faible dose, mais seulement lorsque les patientes débutaient le traitement avant 16 semaines de grossesse [275]. Une autre méta-analyse, publiée en 2017 par le chercheur anglais Meher, n'a pas permis de confirmer que le moment optimal pour commencer le traitement était avant 16 semaines de grossesse; leur analyse suggère plutôt un bénéfice pour toutes les femmes à risque de PE et recommande leur prescription même après 16 semaines [276].

1.5.2.2 Calcium

L'utilisation de la supplémentation en calcium comme anti-inflammatoire a été considérée pour réduire le risque de développer la PE [277, 278]. Les débris relâchés dans la circulation sanguine maternelle par les placentas pré-éclamptiques sont considérés comme dangereux/toxiques et activent les cellules endothéliales [279]. Le mécanisme d'action du calcium n'est pas d'empêcher le largage de débris par des explants de placenta en réponse à une inflammation induite par IL-6. Toutefois, l'équipe de DeSousa a mis en évidence un mécanisme du calcium impliquant plutôt une forte diminution de l'activation des cellules endothéliales en réponse à cette cytokine, aux débris de trophoblastes nécrotiques ou aux facteurs solubles présents dans le sérum de femmes pré-éclamptiques [280, 281]. Ce mécanisme d'action pourrait expliquer les résultats encourageants des études cliniques utilisant le calcium pour prévenir les symptômes associés à la PE,

mais des études cliniques de plus grande envergure sont requises afin de s'assurer du bénéfice de ce traitement préventif [248].

1.5.2.3 Héparine à faible poids moléculaire (low molecular weight heparin; LMWH)

Plusieurs études cliniques suggèrent que l'utilisation de LMWH, habituellement prescrit pour prévenir les complications gestationnelles liées aux thromboembolies veineuses, pourrait réduire le risque et la sévérité de la PE, en plus de réduire l'impact de cette pathologie sur la santé des nouveau-nés [282]. Le mécanisme d'action serait indépendant de l'effet anticoagulant de l'héparine, mais il reste encore méconnu [283]. Encore une fois, des études contredisant ces résultats sont parues récemment [284, 285] et mettent en évidence les difficultés dans la recherche sur des thérapies pour prévenir ces pathologies gestationnelles inflammatoires.

1.6 Hypothèse

L'étude des mécanismes d'activation et de régulation du système immunitaire maternel est d'une importance cruciale afin de réduire les conséquences sur les nouveau-nés issus de grossesses compliquées et de trouver des cibles moléculaires pour le traitement ou la prévention. La découverte de nouvelles molécules anti-inflammatoires, ainsi que l'utilisation de molécules naturelles comme le LIF, sont utiles autant pour comprendre ces mêmes mécanismes que pour le développement de futures thérapies qui pourrait permettre de réduire le poids des complications gestationnelles liées à l'inflammation. Dans ce contexte, nous pensons que l'étude des voies d'activation pro-inflammatoires des macrophages et cellules du trophoblaste ciblées par des molécules naturelles ou synthétiques comme LIF ou les dérivés de l'acide aminobenzoïque DAB-1 et -2 (AL-361 et AL-549) vont offrir de nouvelles pistes pour le développement de thérapies pour les maladies gestationnelles à composante inflammatoire.

1.7 Objectifs et méthodologie

1.7.1 Étude de l'activité anti-inflammatoire de LIF dans des macrophages et cellules trophoblastiques *in vitro*

Comme les Mφs et les cellules trophoblastiques expriment des récepteurs pour l'IFN γ (IFNGR1 et IFNGR2) [38, 286] et le GM-CSF (GMR α et GMR β) [71] tout au long de la grossesse, la présente étude visait à déterminer si et comment le LIF module le comportement des Mφs et des cellules du trophoblaste en réponse à l'activation des voies de signalisation IFN γ -Stat1 et GM-CSF-Stat5. De plus, nous avons étudié le rôle régulateur du LIF sur la fonction des cellules trophoblastiques en interaction paracrine avec les Mφs inflammatoires.

1.7.2 Description de l'activité anti-inflammatoire d'un nouveau composé chimique avec potentiel anticancer

Le second projet consistait à déterminer le potentiel anti-inflammatoire de DAB-1 qui a été produit par le laboratoire du Dr Gervais Bérubé, professeur à l'Université du Québec à Trois-Rivières. La molécule a été décomposée en ses principaux constituants de base (Figure 1.11) pour étudier l'impact de chacun sur son activité inflammatoire.

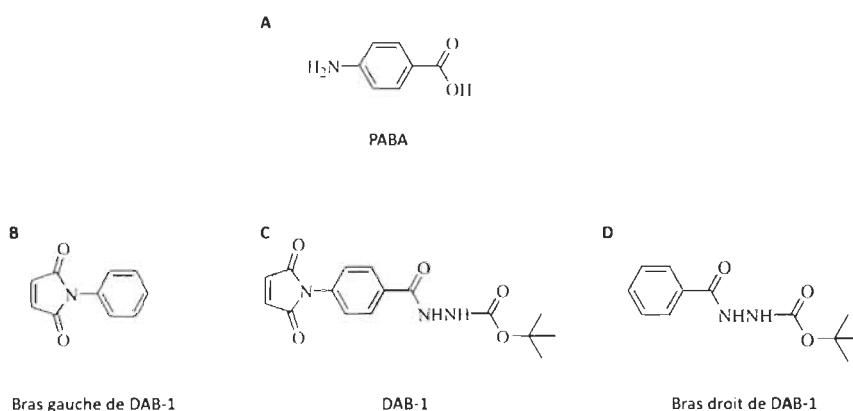


Figure 1.12 Structure de DAB-1.

(A) Structure de l'acide aminobenzoïque, la base de DAB-1 (B) Structure de la molécule utilisée pour tester l'effet de la portion gauche de DAB-1 (C) Structure de DAB-1 (D) Structure de la portion droite de DAB-1. Adaptée de Hamelin-Morrisette et al. [287].

Initialement, DAB-1 a été identifié comme anti-inflammatoire à partir d'une banque de molécules en se basant sur sa capacité à inhiber la production de NO dans des cellules en culture. La production de ce médiateur inflammatoire soluble est en effet déclenchée en réponse à des signaux comme l'IFN γ et le LPS qui activent les voies Stat1 et NF κ B; la découverte de nouveaux composés ayant une telle activité pourrait permettre de franchir un pas supplémentaire vers le traitement de maladies à composantes inflammatoires, comme certains cancers et maladies gestationnelles.

1.7.3 Étude sur l'activité anti-inflammatoire DAB-1 *in vivo*

Le dernier projet abordé dans la présente thèse, et présenté en annexe, visait à déterminer si DAB-1 pouvait réguler, *in vivo*, l'activation ou la différenciation des macrophages péritonéaux de souris; l'activation pro-inflammatoire des M ϕ s étant souvent au cœur des pathologies gestationnelles à composante inflammatoire. Cette molécule a été injectée dans la cavité péritonéale de souris, et son effet a été étudié sur les M ϕ s péritonéaux isolés. De plus, le potentiel anti-inflammatoire *in vivo* de DAB-1 a été testé dans un modèle d'inflammation de la patte induite par la carraghénane.

Le chapitre II contient une étude portant sur l'effet anti-inflammatoire de LIF sur les Mφs et cellules trophoblastiques humaines.

CHAPITRE II

LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR REGULATES THE ACTIVATION OF INFLAMMATORY SIGNALS IN MACROPHAGES AND TROPHOBLAST CELLS

Jovane Hamelin-Morrisette, Angham Dallagi, Julie Girouard, Yassine Oufkir, Cathy Vaillancourt, Céline Van Themsche, Christian Carrier, and Carlos Reyes-Moreno

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Molecular Immunology*. L'article a été accepté pour publication en janvier 2020. La référence complète pour sa version finale est : Mol Immunol. 2020 Apr;120:32-42.

2.1 Contribution des auteurs

Jovane HM a panifié et réalisé les expériences et rédigé le manuscrit, Angham D a réalisé une expérience de signalisation, Julie G a aidé à la réalisation d'expériences et fourni de l'aide pour l'optimisation de celles-ci. Yassine O a préparé le résumé graphique, Cathy V a fourni les cellules HTR8 et révisé le manuscrit, Céline VT a fourni du matériel et révisé le manuscrit, Christian C a recruté les patients donneurs pour l'isolation de monocytes sanguins humains et Carlos RM a dirigé les recherches et aidé à la rédaction du manuscrit en plus d'en faire la révision.

2.2 Résumé de l'article

La cytokine pléiotropique *leukemia inhibitory factor* (LIF) est un facteur gestationnel clé, connu pour son rôle dans l'établissement de la gestation, notamment chez la souris et l'humain. Son rôle dans la régulation dans l'axe LIF-trophoblast-IL-10 dans lequel celui-ci, à travers l'induction de la production d'IL-10 par les trophoblastes, permet la désactivation des macrophages (Mφs) après stimulation avec des cytokines

pro-inflammatoires comme l'interféron gamma (IFN γ). Dans cette étude, l'objectif était de déterminer si LIF pouvait, directement, réguler le comportement de M ϕ s en réponse à des stress pro-inflammatoires. Nous avons découvert que LIF module les effets activateurs de l'IFN γ et du *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) dans les M ϕ s et les trophoblastes en réduisant la phosphorylation des facteurs de transcription *signal transducer and activator of transcription-1* (Stat1) et -5 (Stat5). L'activation des M ϕ s avec IFN γ inhibe leur migration, mais cet effet immobilisant était éliminé par un traitement avec LIF. L'effet de LIF sur ces M ϕ s pourrait en partie être expliqué par l'activation de Stat3. D'une façon similaire, IFN γ inhibe l'invasion des cellules trophoblastiques, ce qui était renversé par un prétraitement avec LIF. De plus, les M ϕ s incubés en présence de GM-CSF avaient un effet inhibiteur sur l'invasion des trophoblastes en coculture, ce qui était encore une fois renversé par un traitement des M ϕ s avec LIF. La culture de trophoblastes en présence de GM-CSF, ou de milieux conditionnés de M ϕ s traités avec GM-CSF, augmentait la production de l'hormone *human chorionic gonadotropin* (hCG) et cette augmentation était entravée par le traitement des trophoblastes ou des M ϕ s avec LIF, possiblement par l'activation de Stat3, l'inhibition de Stat1 et-5, ainsi que les *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2). Cette étude permet de mettre en évidence pour la première fois le rôle de directe de LIF comme molécule naturelle à caractère anti-inflammatoire agissant sur les M ϕ s et les trophoblastes.

2.3 Article complet (anglais) : *Leukemia inhibitory factor* regulates the activation of inflammatory signals in macrophages and trophoblasts cells

Abstract

The pleiotropic cytokine *leukemia inhibitory factor* (LIF) is a key gestational factor known to establish dynamic cellular and molecular cross talk at the feto–maternal interface. Previously, we described the regulatory role of the LIF–trophoblast–IL10 axis in the process of macrophage deactivation in response to pro-inflammatory cytokines. However, the direct regulatory effects of LIF on macrophage and trophoblast cell function remains elusive. In this study, we aimed to examine whether and how LIF regulates the behavior of macrophages and trophoblast cells in response to pro-inflammatory stress factors. We found that LIF modulated the activating effects of interferon gamma (IFN γ) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in macrophages and trophoblast cells by reducing the phosphorylation levels of signal transducer and activator of transcription-1 (Stat1) and -5 (Stat5). Cell activation with IFN γ inhibited cell invasion and migration but this immobilizing effect was abrogated when macrophages and trophoblast cells were deactivated with LIF; macrophage cell motility restitution could in part be explained by the positive effects of LIF in Stat3 activation. Moreover, we have found that cell invasion of trophoblast cells is inhibited when they were cocultured with GM-CSF-differentiated, IFN γ -stimulated macrophages. In contrast, conditioned media from GM-CSF-stimulated macrophages as well as exogenous GM-CSF both increased trophoblast beta-human chorionic gonadotropin (β -hCG) production and release. All these effects, however, were inhibited when macrophages and/or trophoblast cells were exposed to LIF, probably through inhibition of Stat1, Stat5 and ERK 1/2 protein kinases inhibition. Overall, this *in vitro* study reveals for the first time the anti-inflammatory and pro-gestational activities of LIF by acting directly on macrophages and trophoblast cells.

Key words: cytokine; cell signaling; gestational factors; interferon gamma; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

Introduction

It is proposed that activation of the maternal innate immune system is necessary not only to protect the fetus against a variety of pathogens during gestation, but also for the acquisition of uterine receptivity, embryo implantation, and triggering of parturition (Salamonsen et al. 2016, Schumacher et al. 2018). In this context, cytokines are vital for the communication between the embryo and the maternal immune system and successful establishment of pregnancy and normal delivery (Dimitriadis et al. 2005). One of the key cytokines essential for successful implantation is leukemia inhibitory factor (LIF), the most pleiotropic member of the interleukin-6 family of cytokines (Rosario and Stewart 2016). Through signaling via the gp130-LIFR β receptor complex and Stat3 activation, LIF is known to establish dynamic cellular and molecular cross talk at the feto–maternal interface (Rosario and Stewart 2016). Solid evidence for the important role of LIF in implantation comes from studies using LIF knockout model in which LIF-deficient female mice exhibited failure of implantation that was restored upon LIF administration (Stewart et al. 1992). In order to prepare the uterine endometrium for embryo implantation, LIF stimulates stromal decidualization, regulates trophoblast cell differentiation and invasiveness through the uterine stroma (Rosario and Stewart 2016), and is involved in the recruitment of specific subpopulations of leucocytes that participates in inflammatory response during implantation, notably macrophages (M ϕ s) and natural killer (NK) cells (Cheng et al. 2001). Uterine expression of LIF is also proposed to play a significant role in uterine receptivity and embryo implantation in human (Hambartsoumian 1998, Rosario and Stewart 2016, Camargo-Diaz et al. 2017).

Besides its pregnancy-promoting function in mammals, LIF is one of the most important cytokines playing pivotal roles in the modulation of local and systemic inflammation (Gadient and Patterson 1999). In the immune system, the anti-inflammatory activity of LIF is necessary for a normal host reaction to tissue injury and against pathogen-derived molecules released in sepsis (Banner et al. 1998, Weber et al. 2005, Hunt et al. 2013). For instance, LIF confers protection against endotoxemia induced by the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) by enhancing interleukin 10 (IL10) and inhibiting tumor necrosis factor alpha (TNF α) synthesis and release by M ϕ s (Weber et al.

2005). In the LPS-induced abortion model, many effects of LPS in tissue injury and early embryo loss are induced through ligation of Toll-like receptor 4 (TLR4) and interferon gamma (IFN γ)-dependent activation of nitric oxide (NO)-secreting M ϕ s (Haddad et al. 1995, Haddad et al. 1997). In this mouse model of pregnancy loss, uterine/decidual LIF has been proposed to play a potential role as a mediator molecule in the protective effect of progesterone against LPS-induced fetal demise by decreasing NO levels *in vivo* (Aisemberg et al. 2013).

In the human decidua, LIF is highly produced by M ϕ s and NK cells (Sharkey et al. 1999). The LIF receptors in contrast are expressed not only in the decidua but also in both villous and extravillous trophoblast (Sharkey et al. 1999). Important to note, compelling evidence indicates that the trophoblast may function as an immune-modulatory organ able to organize the maternal immune response to bacterial infection during pregnancy through differentiation and activation of immune cells present at the implantation site (Guleria and Pollard 2000, Koga et al. 2009). However, the influence of LIF on the behavior of trophoblasts and M ϕ s in response to pro-inflammatory stress factors is poorly studied and documented. In fact, during early gestation, the functional phenotype of uterine/decidual M ϕ s is locally modified to accomplish pregnancy-associated tasks that include establishment of immune tolerance, regulation of trophoblast invasion, and remodeling of the uterine spiral arteries (Svensson-Arvelund and Ernerudh 2015, Jiang et al. 2018). Nevertheless, aberrant maternal inflammation resulting from pathogen infection and immune intolerance to fetal antigens can affect the tight control that balances normal uterine/decidual M ϕ function, and lead to negative consequences for pregnancy (Ning et al. 2016, Faas and De Vos 2018).

Among the M ϕ programming factors described in the human pregnant uterus, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IFN γ are primary inducers of pro-inflammatory type-1 M ϕ differentiation and activation (Mantovani et al. 2005, Zhang et al. 2017). At the cellular level, IFN γ and GM-CSF mediate their effects through the activation of the transcription factors signal transducer and activator of transcription 1 and 5 (Stat1 and Stat5), respectively (Robertson 2007, Murphy et al. 2009).

In the reproductive tract, IFN γ plays critical roles in the maintenance of decidual and placental tissues, the initiation of endometrial vasculature remodeling, and the process of angiogenesis at implantation sites (Murphy et al. 2009). GM-CSF is another gestational cytokine playing pivotal roles in embryo implantation, invasion of trophoblast cells and the differentiation of leukocytes controlling maternal immune tolerance (Robertson 2007). Both M ϕ s and trophoblast cells express receptors for IFN γ and GM-CSF throughout pregnancy (Robertson 2007, Murphy et al. 2009). However, high expression of GM-CSF and IFN γ as well as aberrant activation of uterine/decidual M ϕ s are associated with gestational complications in humans. For instance, elevated GM-CSF and IFN γ expressions were detected in plasma, leukocytes and decidual tissues in pregnant women with preeclampsia compared to healthy pregnant controls (Hayashi et al. 2004, Huang et al. 2010, Ozkan et al. 2014). Therefore, the presence of activated M ϕ s was associated with decreased trophoblast invasion and spiral artery remodeling in preeclampsia (Ning et al. 2016, Faas and De Vos 2018).

Based on the above observations, we previously proposed to investigate the interplay between LIF and trophoblast cells in the modulation of M ϕ functional phenotype. By using *in vitro* M ϕ and trophoblast differentiation models (Dufresne et al. 2011, Dumas et al. 2012, Leduc et al. 2012), we demonstrated for the first time that soluble factors from LIF-differentiated syncytiotrophoblast generate IFN γ -activated M ϕ s with reduced TNF α expression and impaired cytotoxic function and proliferation (Dallagi et al. 2015). This paracrine effect was found to be mediated by the immunosuppressive cytokine IL10 via sustained Stat3 activation and repression of IFN γ -induced Stat1 activation. Because both M ϕ s and trophoblast cells express receptors for IFN γ (IFNG-R1 and IFNG-R2) and GM-CSF (GM-R α and GM-R β) throughout pregnancy (Robertson 2007, Murphy et al. 2009), the present study aims to determine whether and how LIF modulates the behavior of M ϕ s and trophoblast cells in response to the activation of IFN γ -Stat1 and GM-CSF-Stat5 signaling pathways. Moreover, we investigate the regulatory role of LIF on the behavior/function of trophoblast cells in paracrine interactions with pro-inflammatory M ϕ s.

Materials and Methods

Reagents, chemicals and antibodies

All cell culture media, cell separation media, serum and reagents were purchased from Wisent (St-Bruno, Canada). Polycarbonate membrane cell culture inserts for transwell migration assays, cell culture plates and flasks were from Corning. Cultrex® basement membrane extract was from Trevigen (Gaithersburg, USA) and the modified Boyden chamber (HTS Transwell System) was from Corning (New York, USA). The cytokines LIF, GM-CSF and IFN γ were from Peprotech (Montreal, Canada). The beta form of human chorionic gonadotrophin (β -hCG) ELISA kit was purchased from DRG International Inc. (NJ, USA). The chemicals dimethyl sulfoxide (DMSO), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), and forskolin, the monoclonal peroxidase-conjugated mouse anti- β -actin antibody, as well as all electrophoresis grade chemicals were from Sigma Chemical Company (Oakville, Canada). Trizol reagent and PCR primers were from Invitrogen (Burlington, Canada). Taq DNA polymerase and M-MuLV reverse transcriptase were from New England Biolabs (Pickering, Canada). Cocktails of proteases and phosphatases inhibitors were from BioShop Canada (Burlington, Canada). The rabbit polyclonal antibodies against phospho (p) Stat1 (pY701; #9171), Stat1 (#9172), pStat3 (pY705; #9145), Stat3 (#4904), pStat5 (pY694; #9359), Stat5 (#9358) pERK1/2 (#9101), and ERK1/2 (#9102) were purchased from Cell Signaling Technologies (Danvers, USA) and the horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG came from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, Canada). The chemiluminescence detection kit was from Thermo Fisher Scientific (Montreal, Canada).

Preparation of monocyte-derived macrophages

Monocyte-derived M ϕ s were prepared from peripheral blood monocytes and the human monocytic leukemia cell line THP1 (ATCC number TIB-202). Human blood donations were from the haemato-oncologic service of the Centre Hospitalier Affilié Universitaire Régional de Trois-Rivières (CHAUR-TR, Trois-Rivières, QC, Canada), as approved by the Institutional Review Board of CHAUR-TR. Most of the blood donors

in the current study were male donors (70%) and both non-smokers and non-alcoholic (90%). Exclusion criteria included history of chronic immunosuppression, anti-inflammatory use, and history of hepatitis B infection. Isolation and purity (95-98%) of blood monocytes were performed as previously described (Dufresne et al. 2011, Dumas et al. 2012, Dallagi et al. 2015). Briefly, adherent mononuclear cells were recovered using Lymphocyte Separation Medium (Ficoll) and cultured for 5 days to induce M ϕ s differentiation with 10 ng/ml GM-CSF. At day one, the purity of monocyte-derived macrophages (MDM ϕ s) was approximately 95-98% as assessed by the detection of CD14 by flow cytometry (Dufresne et al. 2011, Dumas et al. 2012, Dallagi et al. 2015). In some experiences, THP1 cells were differentiated in the presence of 50 nM PMA for 24 h and stimulated with 10 ng/ml GM-CSF to induce monocyte-to-M ϕ differentiation as we previously described (Dufresne et al. 2011, Dumas et al. 2012, Dallagi et al. 2015). MDM ϕ s from peripheral blood monocytes and THP1 cells were maintained as monolayers in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C and were grown in 10% FBS-RPMI media.

Trophoblast cell culture

The human cell lines BeWo (ATCC number CCL-98) and HTR-8/SVneo (ATCC number CRL-3271) were cultured in RPMI-1640 cell culture media supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES and 50 μ g/ml gentamicin (referred as 5% FBS-RPMI media). Cells were maintained as monolayers in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. BeWo cell line was derived from a human placental choriocarcinoma while HTR-8/SVneo cell line was developed using first trimester extravillous trophoblast infected with simian virus 40 large T antigen (Hannan et al. 2010). These cell lines are largely used to study trophoblast functions including cell fusion, migration and invasion (Hannan et al. 2010). To avoid any changes in cell behavior during the course of the study, the experiments using BeWo and HTR-8/SVneo cells were restricted at relative early passage only.

Cell signaling studies

In a first set of experiments, MDM ϕ s were pretreated for 3 h with either 5 ng/mL IFN γ or 5 ng/mL GM-CSF, and then stimulated with LIF for 15 min, 30 min, 60 min, and 90 min. PBS was used as control (vehicle). To further investigate the regulatory role of LIF in the activation of trophoblast IFN γ –Stat1 and GM-CSF–Stat5 signaling pathways, BeWo trophoblast cells were pretreated with 50 ng/mL LIF for 48 h, and then activated with either 5 U/mL IFN γ or 5 ng/mL GM-CSF for 15 min and 30 min. Cell lysates were prepared and analyzed by immunoblotting as described (Dufresne et al. 2011, Dumas et al. 2012, Leduc et al. 2012, Dallagi et al. 2015). Briefly, protein samples were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto a PVDF membrane. Blots were first probed with rabbit polyclonal antibodies against pStat1, pStat3, pStat5 and pERK1/2 (all at 1:2000) overnight at 4 °C. Blots were then incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (1:3000) for 1 h at room temperature. The same blots were stripped and then probed with anti-Stat1, anti-Stat3, anti-Stat5 and anti-ERK1/2 Abs (all at 1:1000). All probed molecules were visualized using a scientific grade imaging system (Alpha Innotech FluorChem FC2 Imaging System).

Motility assay

The *in vitro* scratch wound healing assay was performed to study the effects of LIF in cell migration of IFN γ -activated M ϕ s (Dallagi et al. 2015). Briefly, MDM ϕ s (3×10^5 cells/ml) were seeded into 24-well tissue culture plates to achieve a monolayer with about 70%–80% confluence. The cell monolayers were scraped with a p200 pipet tip in a straight line in one direction to create a ‘scratch’. To obtain the same field during image acquisition, another straight line was scratched perpendicular to the first wound line to create a cross in each well. The debris was removed, and the edge of the scratch was smoothed by washing the cells once with Hank’s buffer. The cells were then cultured in 5 ng/mL IFN γ for 3 h, washed and incubated with or without 50 ng/mL LIF for 72 h. Using the cross as a reference point, the plate was placed under an inverted fluorescence microscope and images of the scratch were acquired at $t = 0$ h and $t = 72$ h. The number

of motile cells was determined using the Java-based image processing program ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA), and the relative cell motility was expressed as a ratio of motile cells at $t = 72 \text{ h}/t = 0 \text{ h}$ within the initial wound. Five fields were taken randomly for each different treatment.

RNA isolation and mRNA quantitation

Total cellular RNA was isolated using TRIzol (InVitrogen, Montreal, Canada) and Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, Burlington, Canada) following the manufacturer's instructions. The mRNA expression profile was evaluated by standard reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) as we previously described (Dufresne et al. 2011, Dumas et al. 2012, Leduc et al. 2012, Dallagi et al. 2015). The PCR reaction conditions were chosen when amplification of mRNA was in the middle of the exponential amplification phase to avoid mRNA amplification close to plateau and saturation. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression was used as internal standard. Primers for amplification were 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3' (sense, S) and 5'-TGAGCTTGACAAAGTGGTCG-3' (antisense, AS) for GAPDH; and 5'-GCACGACGTCTTCCAGTACC-3' (S) and 5'-CAGGATGTCATAGGTCACGTAGC-3' (AS) for MMP9.

Transwell micro-invasion assays

Trophoblast cell invasion was measured by assessment of BeWo and HTR8/SVneo cell migration rate through an artificial basement membrane in a modified Boyden chamber as described (Dufresne et al. 2011, Dumas et al. 2012). The Boyden system consisted of cell culture inserts seeded in 24-well plates. The cell culture inserts include a 10- μm thin transparent polycarbonate filter with 0.8 μm pores diameter which were coated on ice with a diluted Cultrex® Basement Membrane Extract (BME) solution (3 mg/mL) to form a reconstituted basement membrane upon polymerization at 37 °C. The polycarbonate filter with 0.8 μm pores diameter is too small to left the cells move to

the bottom of the lower wells. Thus, non-invading cells into the BME coat were gently scraped away with a cotton swab. The cells that migrated down to the polycarbonate filter were then fixed with formalin, stained with 100 ng/mL Hoescht 33258 dye, visualized by fluorescence microscopy and counted. To investigate the effects of IFN γ on the invasiveness of LIF-stimulated trophoblast cells, BeWo and HTR8/SVneo cells were first stimulated with PBS or 50 ng/mL LIF for 48 h, and plated on BME-coated transwell inserts. Trophoblast cells in the upper well of the chamber were then cultured for 48 h in 5% FBS-RPMI media supplemented with 5 ng/mL IFN γ . The lower chamber of the transwell insert was replenished with 5% FBS-RPMI media without IFN γ . In a second set of experiments, we examine the influence of LIF in the induction of trophoblast cell invasiveness during paracrine interactions with GM-CSF-differentiated, IFN γ -activated M ϕ s. In this assay, THP-1-derived GM-CSF-differentiated M ϕ s were activated for 3 h with IFN γ before stimulation with PBS or LIF for 24 h. M ϕ s were then cultured as monolayers in the lower chamber of the Boyden system. Trophoblast cells were plated in the upper chamber on BME-coated transwell inserts and incubated in the presence of M ϕ s for 48 h. In both series of experiments, the images of invasive cells attached to the bottom of the membrane were acquired by confocal microscopy after 48 h of incubation. Five fields were taken randomly for each different treatment to evaluate the number of invasive cells per field.

Quantification of secreted β -human chorionic gonadotrophin (β -hCG)

In order to evaluate the influence of LIF on the production of soluble factors by pro-inflammatory M ϕ s and on paracrine M ϕ -trophoblast interactions, the production of β -hCG was evaluated in forskolin-differentiated BeWo cells that were pretreated with conditioned media from M ϕ s differentiated with 5 ng/mL GM-CSF in the absence or the presence of 50 ng/mL LIF. Conditioned media (CM) was prepared from GM-CSF-differentiated M ϕ s as described (Dufresne et al. 2011, Dumas et al. 2012). In addition, to evaluate the function of LIF-stimulated trophoblast cells challenged with pro-inflammatory cytokines, the production of β -hCG was evaluated in BeWo cells differentiated with forskolin in the absence or the presence of LIF, and then activated with

GM-CSF. PBS (phosphate buffered saline) was used as control (vehicle). β -hCG quantifications were assessed using β -hCG ELISA kits as we previously described (Leduc et al. 2012). Briefly, cells were plated in 24-well plates at a cell density of 4.5×10^4 cells/500 μ L/well and incubated overnight in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS. DMSO as vehicle, 50 ng/ml LIF, 10 μ M forskolin and a combination of LIF and forskolin was added for 48 h in 5% FBS-RPMI media. At the end of the treatments period, the media was collected, clarified by low-speed centrifugation (500 g) and kept at -20°C until β -hCG quantification as described (Leduc et al. 2012). Assay was performed in triplicates and repeated three times.

Statistical analyses

For all experiments, data were presented as mean \pm SD from at least two independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferonni post-test using Prism software, version 3.03 (GraphPad). The null hypothesis of no difference of means between groups was analyzed via Tukey tests. p values of ≤ 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results

Inhibitory impact of LIF on IFN γ -Stat1 and GM-CSF-Stat5 signaling pathways in human macrophages

In a previous study, we demonstrated that LIF has an indirect effect on the behavior of IFN γ -activated M ϕ s, via the regulatory action of IL10 produced by the syncytiotrophoblast (Dallagi et al. 2015). In the present study, we first investigated whether exposure to LIF modulates the effects of IFN γ - and GM-CSF-induced activation of MDM ϕ s. Figures 1 and 2 (panels A and C) show representative activation status of Stat1, Stat3, and Stat5 in PBS-stimulated (control) and LIF-stimulated MDM ϕ s following activation for 3 h with IFN γ and GM-CSF, respectively. As shown in figure 1B, exposure to LIF for a period of 30 minutes or more inhibited IFN γ -induced phosphorylation of

Stat1, which was maximal at 30 and 60 minutes. Similarly, figure 2B shows that exposure to LIF for a period of 15 minutes or more inhibited GM-CSF-induced phosphorylation of Stat5. Therefore, LIF can directly inhibit the activation of IFN γ -Stat1 and GM-CSF-Stat5 signaling pathways in MDM ϕ s. At the same time, LIF induced the phosphorylation of Stat3 in IFN γ - or GM-CSF-activated MDM ϕ s (Fig. 1C and Fig. 2C, respectively). LIF-induced Stat3 activation was time-dependent and was optimal at $t = 90$ min, the levels of pStat3 being increased by 284 folds in IFN γ -activated MDM ϕ s (Fig. 1D) and by 22 folds in GM-CSF-activated MDM ϕ s (Fig. 2D).

Involvement of LIF in the regulation of cell motility and MMP-9 mRNA expression in resting and IFN γ -activated macrophages

We have previously established that IFN γ stimulation is associated with a lower chemotactic responsiveness and motility in human M ϕ s (Dallagi et al. 2015). Since LIF can inhibit IFN γ -induced activation of Stat1 in these cells (Fig. 1), we evaluated the influence of LIF on the regulation of MDM ϕ motility by IFN γ using wound healing assay (Figs. 3A and 3B). The relative number of motile cells was expressed as a ratio of motile cells at $t = 48$ h/ $t = 0$ h within the initial wound. In the absence of IFN γ , MDM ϕ s are inherently motile and LIF increases this motility by an extent of 36% (Fig. 3B). As expected, MDM ϕ s become less motile in response to IFN γ stimulation. However, the percent of motile cells within the wound increases by an extent of 71% when they were exposed to LIF following IFN γ treatment, returning to the same motility level as control-treated cells (Fig. 3B).

It is well established that up-regulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is essential for M ϕ migration and invasion (Lu and Wahl 2005, Gong et al. 2008). To further characterize the effect of LIF on the mobility of IFN γ -treated MDM ϕ , we investigated whether IFN γ inhibits MMP-9 expression and the influence of LIF on this process. The RT-PCR technique was performed to evaluate the relative levels of MMP-9 transcription in MDM ϕ s pretreated with IFN γ and LIF (Fig. 3C). We found that IFN γ decreased the transcription levels of MMP-9 (Fig. 3C), by 54% after an 18-hour cell

culture period (Fig. 3D). However, while LIF alone did not affect MMP-9 mRNA expression, LIF re-established the basal level of MMP-9 gene transcription in IFN γ -activated MDM ϕ s.

Regulatory effect of LIF in IFN γ /Stat1 and GM-CSF/Stat5 signaling pathways in BeWo trophoblast cells

Next, knowing that LIF can inhibit IFN γ -induced activation of Stat1 and GM-CSF-induced activation of Stat5 in MDM ϕ s (Fig. 1), we aimed to determine if LIF could have a similar direct effect on BeWo villous trophoblast like cells, by inhibiting the activation of IFN γ -Stat1 and GM-CSF-Stat5 signaling pathways. Figure 4 shows the impact of a pretreatment with LIF on the activation status of Stat1 and Stat5 in BeWo cells in response to IFN γ (Fig. 4A) and GM-CSF (Fig. 4B), respectively. After a 15-min treatment with IFN γ , the levels of pStat1 were increased by 151 folds in control-pretreated cells but only by 60 folds in LIF-pretreated cells (Fig. 4C). In the same way, after a 30-min treatment with IFN γ the levels of pStat1 were increased by 393 folds in control-pretreated cells but only by 91 folds in LIF-pretreated cells (Fig. 4C). LIF exerts a similar negative regulatory effect on GM-CSF-Stat5 signaling pathway (Fig. 4D), the levels of pStat5 being increased after GM-CSF treatment in control-pretreated cells were efficiently decreased in LIF-pretreated cells.

Influence of LIF on the invasiveness of IFN γ -stimulated trophoblast cells

Previous studies have shown that activation of IFN γ -Stat1 signaling pathway is associated with decreased invasiveness in human trophoblast cells (Penton-Rol et al. 1998, Karmakar et al. 2004). Since LIF can inhibit IFN γ -induced activation of BeWo trophoblastic cells (Fig. 4), we examined whether LIF could restore the invasiveness of IFN γ -activated BeWo cells. As shown in figures 5A and 5C, treatment with IFN γ decreased *in vitro* invasiveness of BeWo cells but this effect was completely abolished following a pre-treatment with LIF; in fact, the samples that had been exposed to LIF and IFN γ contained a significantly higher number of invasive cells than any control samples.

The same observations were made in HTR8/SVneo cells, which are non-cancerous/immortalized first trimester invasive placental cells (Fig. 5B and 5C).

Influence of LIF on cell invasiveness of trophoblast cells by soluble factors from GM-CSF-differentiated M ϕ s

Because the expression of pro-inflammatory cytokines GM-CSF and IFN γ , and the presence of activated M ϕ s is associated with decreased trophoblast invasion (Ning et al. 2016, Faas and De Vos 2018), we next determined the impact of LIF on the invasiveness of trophoblast cells cocultured with GM-CSF-differentiated, IFN γ -activated M ϕ s (Fig. 6). A set of micro-invasion assays depicted in Fig. 6A was designed to investigate the regulatory role of LIF in the invasiveness of trophoblast HTR8/SVneo cells cocultured with GM-CSF-differentiated, IFN γ -activated M ϕ s (Fig. 6B and 6C). HTR8/SVneo cells were used in this experiment due to their higher invasive capacity compared to BeWo cells (Fig. 5). As shown in Figure 6C, the number of invasive HTR8/SVneo trophoblast cells decreased when they were cocultured with GM-CSF-differentiated M ϕ s that were activated with IFN γ , but when LIF was added to the M ϕ s during their differentiation, their activation with IFN γ no longer had an inhibitory impact on the invasiveness of the trophoblast cells.

Implication of LIF in the regulation of β -hCG production in resting and GM-CSF-activated trophoblast BeWo cells

Based on the fact that both soluble factors from pro-inflammatory M ϕ s and pro-inflammatory cytokines may influence the hormonal function of trophoblast cells (Yanushpolsky et al. 1993, Jiang et al. 2006), we investigated the impact of LIF on the regulation of trophoblast β -hCG production (a marker of trophoblast differentiation/syncytialization) by conditioned media from GM-CSF-differentiated M ϕ s (Fig. 7), and in resting and GM-CSF-activated trophoblast cells (Fig. 8). In a first set of experiments depicted in Fig. 7A, we measured β -hCG production by forskolin-differentiated trophoblast BeWo cells grown in the conditioned media (CM) from LIF-treated, GM-CSF-differentiated M ϕ s. Our results indicated that exposure to LIF of

GM-CSF-differentiated M ϕ s reduces their secretion of soluble factors capable of stimulating β -hCG production by BeWo cells, whether the latter are induced to differentiate with forskolin or not afterwards (Fig. 7B).

Next, on the basis that LIF can inhibit GM-CSF-induced activation of Stat5 in BeWo cells (Fig. 4), we investigate the direct effects of GM-CSF on the production of trophoblast β -hCG. BeWo cells were thus differentiated with forskolin (FK) in the absence (- LIF) or the presence (+ LIF) of LIF for 24 h, before they were stimulated with either PBS (control) or GM-CSF (Fig. 8A). As we previously described (Leduc et al. 2012), addition of LIF during the differentiation of BeWo cells inhibited forskolin-induced secretion of β -hCG. In the present study, we observed that the presence of LIF during the differentiation phase also inhibits β -hCG production in GM-CSF-stimulated BeWo cells (Fig. 8B). Moreover, because previous studies demonstrated that hCG secretion in cytokine-activated trophoblast cells is dependent on activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK1/2 (Jiang et al. 2006), we have investigated whether GM-CSF activates ERK1/2 and if LIF negatively regulates this pathway in FK-differentiated BeWo cells (Fig 8C). As shown in figure 8D, the levels of pERK1/2 were highly increased in control-pretreated cells but they were efficiently reduced in LIF-pretreated cells.

Discussion

We previously reported that, in response to LIF, villous cytotrophoblast can promote the differentiation of M1 M ϕ s into an anti-inflammatory/regulatory M2 phenotype (Dallagi et al. 2015). Our hypothesis was supported by our findings that LIF induces in villous cytotrophoblast the production of anti-inflammatory IL10 cytokine, which in turn, generates GM-CSF differentiated, IFN γ -activated M ϕ s with enhanced IL10 expression while reduced TNF α expression and cytotoxic function. This study was conducted to determine whether and how LIF directly modulates the behavior of trophoblast cells and M ϕ s in response to the activation of pro-inflammatory signaling pathways.

Indeed, one of our major discoveries is that LIF directly interferes with the intracellular signals induced by pro-inflammatory cytokines in both M ϕ s and trophoblast cells. The population of uterine/decidual M ϕ s is exceptional in its ability to support the development of the semi-allogeneic embryo while being active and functional to protect the placenta and the fetus from a variety of pathogens during gestation (Svensson-Arvelund and Ernerudh 2015, Ning et al. 2016, Faas and De Vos 2018, Jiang et al. 2018). However, exacerbated pro-inflammatory response of uterine/decidual M ϕ s may result from a maternal immune response against father-derived fetal antigens or infectious pathogens (Kemp 2014, Ning et al. 2016, Faas and De Vos 2018). This loss in the regulation of pro-inflammatory M ϕ function is attributed to an overproduction of inflammatory stressors, such as TNF α , IFN γ , GM-CSF and NO (Haddad et al. 1995, Haddad et al. 1997, Hayashi et al. 2004, Huang et al. 2010, Ozkan et al. 2014). Regulation of the IFN γ -Stat1 and GM-CSF-Stat5 signaling pathways activation in human M ϕ s and trophoblast may be thus physiologically important considering their deleterious effects regarding trophoblast and placental development, and thereby on the developing embryo (Hayashi et al. 2004, Huang et al. 2010, Ozkan et al. 2014, Banerjee and Resat 2016). The physiological relevance of our findings is also important considering the central role the decidual M ϕ s and the trophoblast cells may play during normal and pathological pregnancy (Guleria and Pollard 2000, Koga et al. 2009). Based on our previous study (Dallagi et al. 2015), our present findings, and the fact that a substantial number of decidual M ϕ s (~ 25%) is found in close proximity to trophoblast cells of the placenta (Jiang et al. 2018), it is possible that trophoblast plays a key role in the process of M ϕ deactivation during the period of pregnancy maintenance. LIF may play a key role in this process by preserving the immune regulatory role of trophoblast through integration and modulation of normal and pathological inflammatory signals during gestation.

In line with previous studies (Karmakar et al. 2004, Renaud et al. 2007), we provide further evidence that human trophoblast cell invasion is inhibited in response to IFN γ as well as soluble factors from GM-CSF-differentiated, IFN γ -activated M ϕ s. Important to note, our study demonstrates that LIF interferes with the invasion-inhibitory effect exerted on HTR8/SVneo cells by IFN γ as well as activated pro-inflammatory M ϕ s.

This regulatory action may be mediated through two different mechanisms: direct suppression of IFN γ -induced Stat1 activation after LIF-induced Stat3 activation (Ito et al. 1999) and, as other and we have shown, via the deactivating effect of IL10 on cytokine-activated M ϕ s and trophoblast cells (Renaud et al. 2007, Dallagi et al. 2015).

Uterine M ϕ s are also expected to be motile within both the decidua and the fetal membranes as they express higher levels of genes that promote activation of migration (Svensson-Arvelund and Ernerudh 2015, Ning et al. 2016, Faas and De Vos 2018, Jiang et al. 2018). The discovery that IFN γ inhibits M ϕ motility is in accordance with previous studies showing that IFN γ stimulation induces a robust motility-inhibitory effects in human M ϕ s via suppressive expression of the chemotactic CCL2 receptor CCR2 (Penton-Rol et al. 1998), and probably by a suppressive effect on MMP-9 expression through a mechanism involving Stat1 activation (Zhou et al. 2003). We found that LIF efficiently antagonize the blocking effects of IFN γ on M ϕ motility and MMP-9 production, probably via a mechanism dependent on Stat3 activation and suppression of IFN γ -induced Stat1 activation. This finding is physiologically important considering that the number of uterine M ϕ s remains relatively constant throughout gestation, and that circulating blood monocytes are expected to be continuously recruited to the decidua by both stromal and trophoblast cells in response to diverse chemotactic factors (Svensson-Arvelund and Ernerudh 2015, Ning et al. 2016, Faas and De Vos 2018, Jiang et al. 2018).

Another important finding is that we demonstrated for the first time that LIF negatively regulates GM-CSF–Stat5 signaling pathway activation in human M ϕ s. To note, similar to the suppression of IFN γ -induced Stat1 activation in M ϕ s, this inhibitory effect of LIF on Stat5 activation was mirrored by an increased level of phosphorylated Stat3. Mechanistically, we can speculate that Stat3 is a common cell signaling regulator induced by LIF to control the activation of IFN γ –Stat1 and GM-CSF–Stat5 signaling pathways. This mechanism can be similar to that of IL10 in the deactivation process of M ϕ s (Ito et al. 1999). In fact, it is well established that IL10 can directly inhibit Stat-dependent gene expression induced in IFN γ -activated M ϕ s by

suppressing the tyrosine phosphorylation of Stat1 through Stat3-dependent expression of the protein suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) (Ito et al. 1999). Thus, the physiological importance for LIF in downregulating the GM-CSF–Stat5 signaling pathway could be placed in the context of recent studies demonstrating that the presence of GM-CSF-activated M ϕ s was associated with increased trophoblast apoptosis (Wu et al. 2012), and decreased trophoblast invasion and spiral artery remodeling in preeclampsia (Ning et al. 2016, Faas and De Vos 2018). This detrimental action of activated M ϕ s on trophoblast cell survival and function is proposed to be the result of paracrine interactions with (first trimester) decidual cells aberrantly activated with pro-inflammatory cytokines (e.g. IL1 β and TNF α), which in turn produced high amounts of CSF cytokines (Wu et al. 2012). Future studies will be required to investigate whether LIF inhibits the production of GM-CSF and M-CSF in IL1 β - and TNF α -activated decidual cells.

Moreover, our study shows that LIF is important to modulate the levels of trophoblast hCG production that were increased in response to soluble factors from GM-CSF-differentiated M ϕ s and exogenous GM-CSF. On the regulatory action of LIF in GM-CSF-differentiated M ϕ s, our results are in line with primary studies showing that GM-CSF signaling through STAT5 is critical for the expression of STAT5 target genes during M1 M ϕ differentiation (Lehtonen et al. 2002, Lacey et al. 2012). Among the factors produced by GM-CSF-differentiated M ϕ s (Lacey et al. 2012), TNF α was identified as one of the major factors inducing the production and release of trophoblast hCG (Yanushpolsky et al. 1993, Jiang et al. 2006). Our previous study established that LIF, via IL10, generates GM-CSF differentiated M ϕ s with reduced TNF α expression and enhanced IL10 expression (Dallagi et al. 2015). Thus, we propose that LIF, through inhibition of STAT5 activation, reduces the production of TNF α by M1 M ϕ s, thereby decreasing the production of hCG by the BeWo trophoblast cells. On the effects of GM-CSF in trophoblast hCG production and the regulatory role of LIF, the mechanism we can propose is a little more complex because the production of hCG in forskolin-differentiated trophoblast was shown to be dependent on ERK1/2 pathway activation, but not other relevant pathways such as STAT3 (Jiang et al. 2006). However, it is well established that after interaction with the corresponding heterodimeric receptor complexes

comprising GM-R α and GM-R β subunits, GM-CSF induces phosphorylation of the β -chain in two distinct domains. One of these domains induces the activation of JAK2-STAT5 pathway, and the other induces the ERK1/2 and the PI3K/Akt pathways (Dijkers et al. 1999). We found that LIF inhibits GM-CSF-induced ERK1/2 activation in forskolin-differentiated BeWo cells, and this could explain why LIF negatively regulates trophoblast hCG production induced by GM-CSF. The physiological relevance of these findings is significant considering that during gestation in humans, higher levels of hCG are associated with pregnancy-related disorders, and it is widely used in predicting Down syndrome, preeclampsia, and gestational trophoblastic diseases (Cole 2009, Stenman and Alftan 2013). Using forskolin-differentiated BeWo cells as villous cytotrophoblast model, we have previously shown that LIF generated a strong reduction in hCG release while it exerts a synergistic effect toward cell fusion (Leduc et al. 2012). Thus, it would be interesting to consider the possible use of this cytokine for therapeutic purposes. Since LIF stimulates cytotrophoblast fusion but reduces the production of the hormone, it seems that this cytokine could limit the adverse consequences of a defect in the formation of syncytium linked to pregnancy-related disorders, such as preeclampsia and trisomy 21 (Cole 2009, Stenman and Alftan 2013).

The present study has some limitations that should be considered. First, the conclusions are based on *in vitro* experiments. In fact, as for the majority of studies on human reproduction, this is due mainly to ethical restrictions and limited availability of human tissue. Nevertheless, the *in vitro* data is consistent with previous *in vitro* studies and *in vivo* observations. Second, while MDM ϕ s were generated from the peripheral blood, we used only trophoblast cell lines in the experiments rather than primary cultures of trophoblast cells. Nonetheless, the main regulatory mechanism of LIF on human MDM ϕ s and the monocyte-like cell line THP1 cells is also operative in human trophoblast cell lines challenged with pro-inflammatory stimulus. Indeed, our experiments need to be extended further using first trimester placenta-derived trophoblast to fully appreciate the anti-inflammatory functions of LIF on cytokine-activated villous and extra-villous trophoblasts. Moreover, in the future, we will ascertain whether these mechanisms actually operate *in vivo*.

Conclusion

Our results reveal for the first time the inhibitory effect of LIF on IFN γ - and GM-CSF-induced Stat signaling pathways in M ϕ s and trophoblast cells. In M ϕ s that were exposed to IFN γ or GM-CSF, the ability of LIF to activate Stat3 suggests that LIF could inhibit IFN γ -Stat1 and GM-CSF-Stat5 signaling pathways in M ϕ s in a Stat3-dependent manner. Our results also show that exposure to LIF entirely prevents the inhibition of human trophoblast cells invasion by IFN γ and restore IFN γ -inhibited motility of M ϕ s. Moreover, we demonstrated that exposure to LIF of GM-CSF-differentiated and IFN γ -activated M ϕ s reduces their ability to inhibit the invasiveness of cocultured trophoblast cells. Finally, we further documented the regulatory role of LIF on the behavior/function of trophoblast cells in response to GM-CSF and in paracrine interaction with GM-CSF-differentiated and IFN γ -activated M ϕ s.

In summary, the present findings reveal a unique regulatory role for LIF in the paracrine interplay between cytokine-activated M ϕ s and trophoblast cells, and a key role for LIF in the regulation of responses to inflammatory cytokines, not only in M ϕ s but also in trophoblast cells. We propose that the regulatory action of LIF is mediated via both, direct inhibition of pro-inflammatory pathways activation in M ϕ s and trophoblast cells, and indirect action of immune modulating molecules expressed under the control of LIF.

Conflicts of Interest

The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [NSERC; number RGPIN/6516-2014 to C.R.-M.] and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies-Réseau Québécois en

Reproduction (FQRNT-RQR; number INRS-CIRD-DC). J.H.-M. holds a doctoral fellowship from the NSERC. The RQR-CREATE scholarships program supported A.D. We thank Andres Felipe Romero Rodriguez and Charles Dion for technical assistance on some of the biochemical analyses and biological assays.

References

- Aisemberg, J., Vercelli, C. A., Bariani, M. V., Billi, S. C., Wolfson, M. L., and Franchi, A. M., 2013. Progesterone is essential for protecting against LPS-induced pregnancy loss. LIF as a potential mediator of the anti-inflammatory effect of progesterone. *PLoS One*. 8, e56161. DOI: 10.1371/journal.pone.0056161.
- Banerjee, K., and Resat, H., 2016. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *International journal of cancer*. 138, 2570-2578. DOI: 10.1002/ijc.29923.
- Banner, L. R., Patterson, P. H., Allchorne, A., Poole, S., and Woolf, C. J., 1998. Leukemia inhibitory factor is an anti-inflammatory and analgesic cytokine. *J Neurosci*. 18, 5456-5462.
- Camargo-Diaz, F., Garcia, V., Ocampo-Barcenas, A., Gonzalez-Marquez, H., and Lopez-Bayghen, E., 2017. Colony stimulating factor-1 and leukemia inhibitor factor expression from current-cycle cannula isolated endometrial cells are associated with increased endometrial receptivity and pregnancy. *BMC Womens Health*. 17, 63. DOI: 10.1186/s12905-017-0418-7.
- Cheng, J. G., Chen, J. R., Hernandez, L., Alvord, W. G., and Stewart, C. L., 2001. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 8680-8685.
- Cole, L. A., 2009. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reprod Biol Endocrinol*. 7, 8. DOI: 10.1186/1477-7827-7-8.
- Dallagi, A., Girouard, J., Hamelin-Morrisette, J., Dadzie, R., Laurent, L., Vaillancourt, C., Lafond, J., Carrier, C., and Reyes-Moreno, C., 2015. The activating effect of IFN-gamma on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation. *Cell Mol Immunol*. 12, 326-341. DOI: 10.1038/cmi.2014.50.
- Dijkers, P. F., van Dijk, T. B., de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L., and Coffey, P. J., 1999. Regulation and function of protein kinase B and MAP kinase activation by the IL-5/GM-CSF/IL-3 receptor. *Oncogene*. 18, 3334-3342. DOI: 10.1038/sj.onc.1202678.
- Dimitriadis, E., White, C. A., Jones, R. L., and Salamonsen, L. A., 2005. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update*.

- Dufresne, M., Dumas, G., Asselin, E., Carrier, C., Pouliot, M., and Reyes-Moreno, C., 2011. Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells. *Mol Immunol.* 48, 1556-1567. DOI: 10.1016/j.molimm.2011.04.022.
- Dumas, G., Dufresne, M., Asselin, E., Girouard, J., Carrier, C., and Reyes-Moreno, C., 2012. CD40 pathway activation reveals dual function for macrophages in human endometrial cancer cell survival and invasion. *Cancer immunology, immunotherapy.* 62, 273-283. DOI: 10.1007/s00262-012-1333-2.
- Faas, M. M., and De Vos, P., 2018. Innate immune cells in the placental bed in healthy pregnancy and preeclampsia. *Placenta.* 69, 125-133. DOI: 10.1016/j.placenta.2018.04.012.
- Gadient, R. A., and Patterson, P. H., 1999. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells.* 17, 127-137. DOI: 10.1002/stem.170127.
- Gong, Y., Hart, E., Shchurin, A., and Hoover-Plow, J., 2008. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest.* 118, 3012-3024. DOI: 10.1172/JCI32750.
- Guleria, I., and Pollard, J. W., 2000. The trophoblast is a component of the innate immune system during pregnancy. *Nat Med.* 6, 589. DOI: 10.1038/75074.
- Haddad, E. K., Duclos, A. J., Anteck, E., Lapp, W. S., and Baines, M. G., 1997. Role of interferon gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss. *Cell Immunol.* 181, 68-75. DOI: 10.1006/cimm.1997.1199.
- Haddad, E. K., Duclos, A. J., and Baines, M. G., 1995. Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells. *J Exp Med.* 182, 1143-1151.
- Hambartsoumian, E., 1998. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol.* 39, 137-143.
- Hannan, N. J., Paiva, P., Dimitriadis, E., and Salamonsen, L. A., 2010. Models for Study of Human Embryo Implantation: Choice of Cell Lines?1. *Biol Reprod.* 82, 235-245. DOI: 10.1095/biolreprod.109.077800.
- Hayashi, M., Hamada, Y., and Ohkura, T., 2004. Elevation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the placenta and blood in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 190, 456-461. DOI: 10.1016/j.ajog.2003.07.032.

- Huang, S. J., Zenclussen, A. C., Chen, C. P., Basar, M., Yang, H., Arcuri, F., Li, M., Kocamaz, E., Buchwalder, L., Rahman, M., Kayisli, U., Schatz, F., Toti, P., and Lockwood, C. J., 2010. The implication of aberrant GM-CSF expression in decidual cells in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Pathol.* 177, 2472-2482. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091247.
- Hunt, L. C., Upadhyay, A., Jazayeri, J. A., Tudor, E. M., and White, J. D., 2013. An anti-inflammatory role for leukemia inhibitory factor receptor signaling in regenerating skeletal muscle. *Histochem Cell Biol.* 139, 13-34. DOI: 10.1007/s00418-012-1018-0.
- Ito, S., Ansari, P., Sakatsume, M., Dickensheets, H., Vazquez, N., Donnelly, R. P., Larner, A. C., and Finbloom, D. S., 1999. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood.* 93, 1456-1463.
- Jiang, K., Chen, Y., and Jarvis, J. N., 2006. hCG Secretion in human choriocarcinoma JAR cells is MAPK but not Stat3 dependent: contributions of TNFalpha and IL-1beta to inflammation-induced hCG secretion. *Placenta.* 27, 853-860. DOI: 10.1016/j.placenta.2005.04.013.
- Jiang, X., Du, M. R., Li, M., and Wang, H., 2018. Three macrophage subsets are identified in the uterus during early human pregnancy. *Cell Mol Immunol.* 15, 1027-1037. DOI: 10.1038/s41423-018-0008-0.
- Karmakar, S., Dhar, R., and Das, C., 2004. Inhibition of cytotrophoblastic (JEG-3) cell invasion by interleukin 12 involves an interferon gamma-mediated pathway. *J Biol Chem.* 279, 55297-55307. DOI: 10.1074/jbc.M407013200.
- Kemp, M. W., 2014. Preterm Birth, Intrauterine Infection, and Fetal Inflammation. *Front Immunol.* 5. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00574.
- Koga, K., Aldo, P. B., and Mor, G., 2009. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. *J Obstet Gynaecol Res.* 35, 191-202. DOI: 10.1111/j.1447-0756.2008.00963.x.
- Lacey, D. C., Achuthan, A., Fleetwood, A. J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G. M., Chang, M. W., Beckman, S. K., Cook, A. D., and Hamilton, J. A., 2012. Defining GM-CSF- and Macrophage-CSF-Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models. *The Journal of Immunology.* 188, 5752. DOI: 10.4049/jimmunol.1103426.
- Leduc, K., Bourassa, V., Asselin, E., Leclerc, P., Lafond, J., and Reyes-Moreno, C., 2012. Leukemia inhibitory factor regulates differentiation of trophoblastlike BeWo cells through the activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP kinase-signaling pathways. *Biol Reprod.* 86, 54. DOI: 10.1095/biolreprod.111.094334.

- Lehtonen, A., Matikainen, S., Miettinen, M., and Julkunen, I., 2002. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol.* 71, 511-519.
- Lu, Y., and Wahl, L. M., 2005. Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKK α /NF- κ B pathway. *J Leukoc Biol.* 78, 259-265. DOI: 10.1189/jlb.0904498.
- Mantovani, A., Sica, A., and Locati, M., 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* 23, 344-346.
- Murphy, S. P., Tayade, C., Ashkar, A. A., Hatta, K., Zhang, J., and Croy, B. A., 2009. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol Reprod.* 80, 848-859. DOI: 10.1095/biolreprod.108.073353.
- Ning, F., Liu, H., and Lash, G. E., 2016. The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 75, 298-309. DOI: 10.1111/aji.12477.
- Ozkan, Z. S., Simsek, M., Ilhan, F., Deveci, D., Godekmerdan, A., and Sapmaz, E., 2014. Plasma IL-17, IL-35, interferon gamma, SOCS3 and TGF- β levels in pregnant women with preeclampsia, and their relation with severity of disease. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 27, 1513-1517. DOI: 10.3109/14767058.2013.861415.
- Penton-Rol, G., Polentarutti, N., Luini, W., Borsatti, A., Mancinelli, R., Sica, A., Sozzani, S., and Mantovani, A., 1998. Selective Inhibition of Expression of the Chemokine Receptor CCR2 in Human Monocytes by IFN- γ . *J Immunol.* 160, 3869-3873.
- Renaud, S. J., Macdonald-Goodfellow, S. K., and Graham, C. H., 2007. Coordinated regulation of human trophoblast invasiveness by macrophages and interleukin 10. *Biol Reprod.* 76, 448-454. DOI: 10.1095/biolreprod.106.055376.
- Robertson, S. A., 2007. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 287-298. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2007.04.008.
- Rosario, G. X., and Stewart, C. L., 2016. The Multifaceted Actions of Leukaemia Inhibitory Factor in Mediating Uterine Receptivity and Embryo Implantation. *Am J Reprod Immunol.* 75, 246-255. DOI: 10.1111/aji.12474.
- Salamonsen, L. A., Evans, J., Nguyen, H. P., and Edgell, T. A., 2016. The Microenvironment of Human Implantation: Determinant of Reproductive Success. *Am J Reprod Immunol.* 75, 218-225. DOI: 10.1111/aji.12450.

- Schumacher, A., Sharkey, D. J., Robertson, S. A., and Zenclussen, A. C., 2018. Immune Cells at the Fetomaternal Interface: How the Microenvironment Modulates Immune Cells To Foster Fetal Development. *J Immunol.* 201, 325-334. DOI: 10.4049/jimmunol.1800058.
- Sharkey, A. M., King, A., Clark, D. E., Burrows, T. D., Jokhi, P. P., Charnock-Jones, D. S., Loke, Y. W., and Smith, S. K., 1999. Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod.* 60, 355-364.
- Stenman, U. H., and Alfthan, H., 2013. Determination of human chorionic gonadotropin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 27, 783-793. DOI: 10.1016/j.beem.2013.10.005.
- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., and Abbondanzo, S. J., 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature.* 359, 76-79. DOI: 10.1038/359076a0.
- Svensson-Arvelund, J., and Ernerudh, J., 2015. The Role of Macrophages in Promoting and Maintaining Homeostasis at the Fetal-Maternal Interface. *Am J Reprod Immunol.* 74, 100-109. DOI: 10.1111/aji.12357.
- Weber, M. A., Schnyder-Candrian, S., Schnyder, B., Quesniaux, V., Poli, V., Stewart, C. L., and Ryffel, B., 2005. Endogenous leukemia inhibitory factor attenuates endotoxin response. *Lab Invest.* 85, 276-284. DOI: 10.1038/labinvest.3700216.
- Wu, Z. M., Yang, H., Li, M., Yeh, C. C., Schatz, F., Lockwood, C. J., Di, W., and Huang, S. J., 2012. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts. *Placenta.* 33, 188-194. DOI: 10.1016/j.placenta.2011.12.007.
- Yanushpolsky, E. H., Ozturk, M., Polgar, K., Berkowitz, R. S., and Hill, J. A., 1993. The effects of cytokines on human chorionic gonadotropin (hCG) production by a trophoblast cell line. *J Reprod Immunol.* 25, 235-247.
- Zhang, Y. H., He, M., Wang, Y., and Liao, A. H., 2017. Modulators of the Balance between M1 and M2 Macrophages during Pregnancy. *Front Immunol.* 8, 120. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00120.
- Zhou, M., Zhang, Y., Ardans, J. A., and Wahl, L. M., 2003. Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8. *J Biol Chem.* 278, 45406-45413. DOI: 10.1074/jbc.M309075200.

Figure Legends

Figure 1. LIF inhibits Stat1 but stimulates Stat3 phosphorylation in IFN γ -activated macrophages. (A, C) Representative images and (B, D) graphical analysis of the immunodetection of phosphorylated Stat1 and Stat3. * $p < 0.05$ denotes significant difference between samples.

Figure 2. LIF inhibits Stat5 but stimulates Stat3 phosphorylation in GM-CSF-activated macrophages. (A, C) Representative images and (B, D) graphical analysis of the immunodetection of phosphorylated Stat5 and Stat3. * $p < 0.05$ denotes significant difference between samples.

Figure 3. LIF restores the cell motility and MMP-9 gene expression in IFN γ -activated macrophages. (A) Representative images and (B) graphical analysis of scratch wound healing assays. (C) Representative images and (D) graphical analysis of RT-PCR analysis. Different superscripts denote significant differences between samples ($p < 0.05$).

Figure 4. LIF inhibits Stat1 and Stat5 phosphorylation in IFN γ - and GM-CSF-stimulated trophoblast, respectively. (A, B) Representative images and (C, D) graphical analysis of the immunodetection of phosphorylated Stat1 and Stat5. * $p < 0.05$ denotes significant difference between samples.

Figure 5. LIF restores IFN γ -inhibited invasiveness of trophoblast cells. (A, B) Representative images and (C) graphical analysis of the microinvasion assays. All observations were performed at 400 \times magnification. Nsd; no significant difference. * $p < 0.05$ denotes significant difference compared with control (PBS).

Figure 6. Influence of LIF on the regulation of trophoblast cell invasiveness by GM-CSF-differentiated, IFN γ -activated macrophages. (A) A schematic of the protocol, (B) representative images and (C) graphical analysis of the microinvasion assays. All observations were performed at 630 \times magnification. Different superscripts denote significant differences between samples ($p < 0.05$).

Figure 7. Impact of LIF on the regulation of trophoblast β -hCG production by soluble factors from GM-CSF-differentiated macrophages. (A) A schematic of the protocol, and (B) graphical analysis of β -hCG dosage. Relative β -hCG expression was expressed as fold induction related to basal level (GM-CSF + PBS + DMSO). Different superscripts denote significant differences between samples ($p < 0.05$).

Figure 8. LIF regulates the behavior secretory phenotype of trophoblast cells challenged with inflammatory GM-CSF, possibly by regulating Stat5 and ERK1/2 pathways activation. (A) Schematic of trophoblast cell differentiation protocol and (B) graphical analysis of β -hCG dosage. (C) Representative images and (D) graphical analysis of cell signaling study. * $p < 0.05$ denotes significant difference between samples.

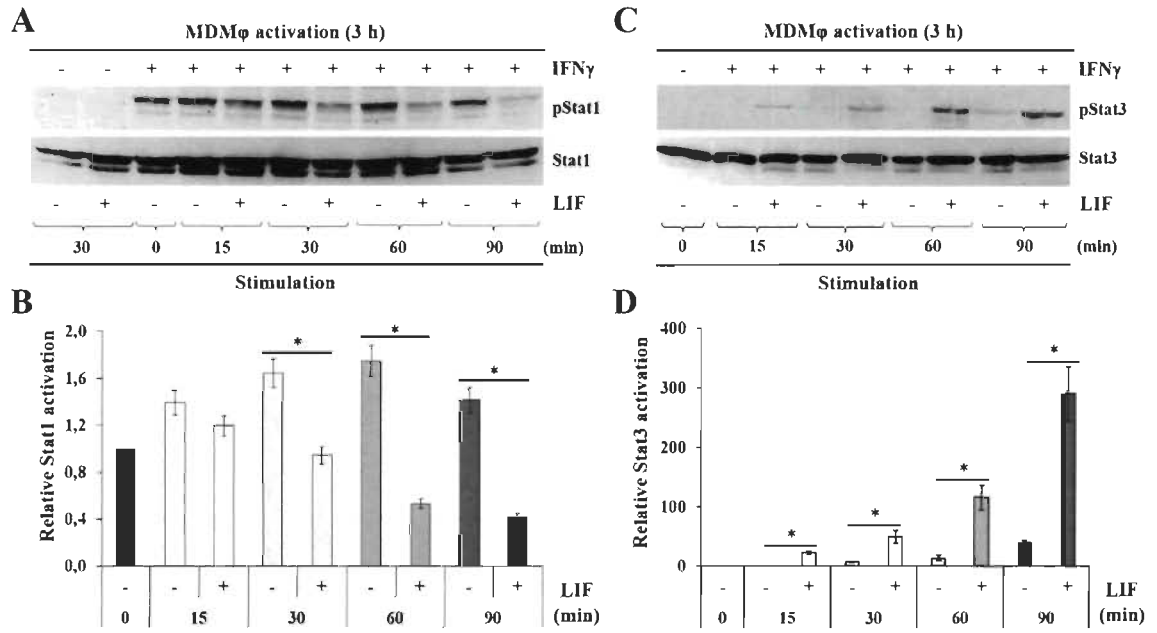


Figure 1

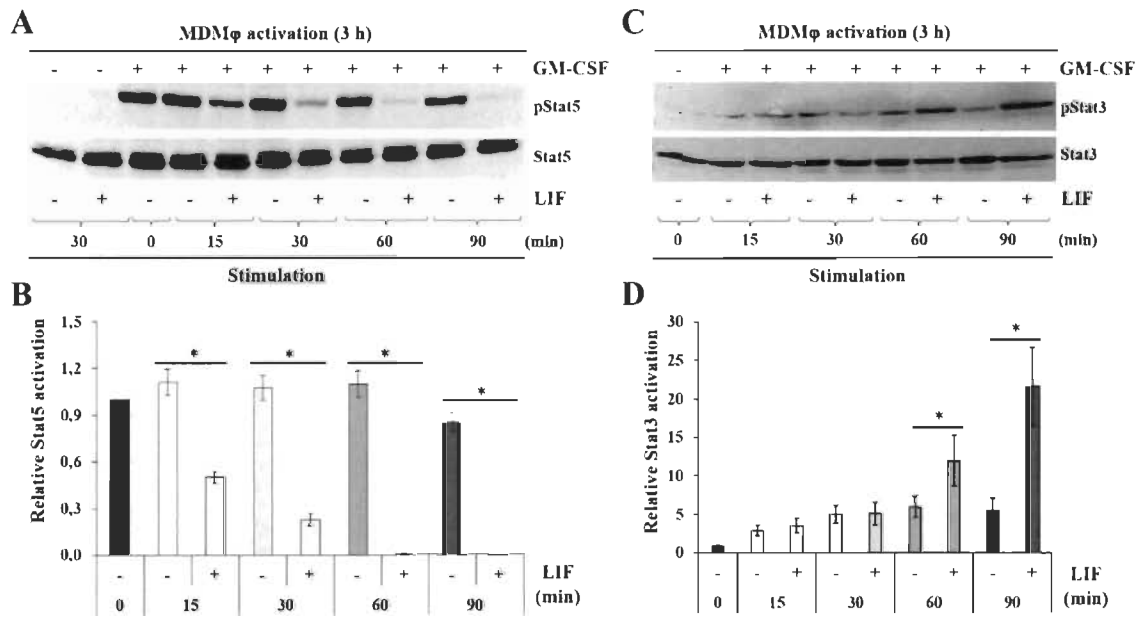


Figure 2

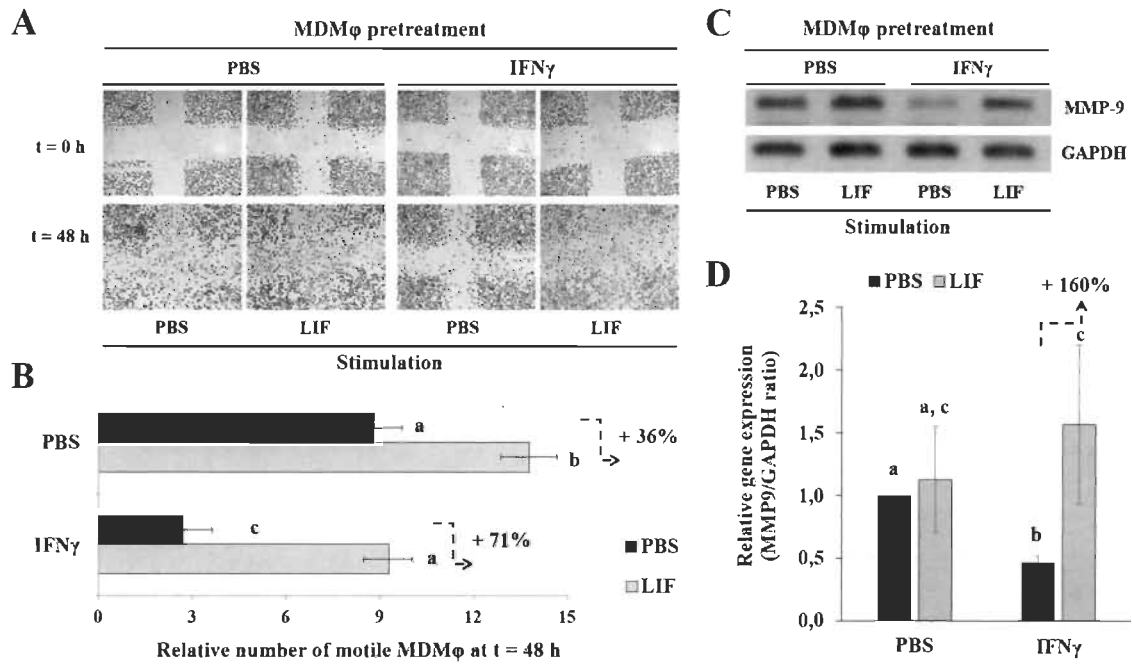


Figure 3

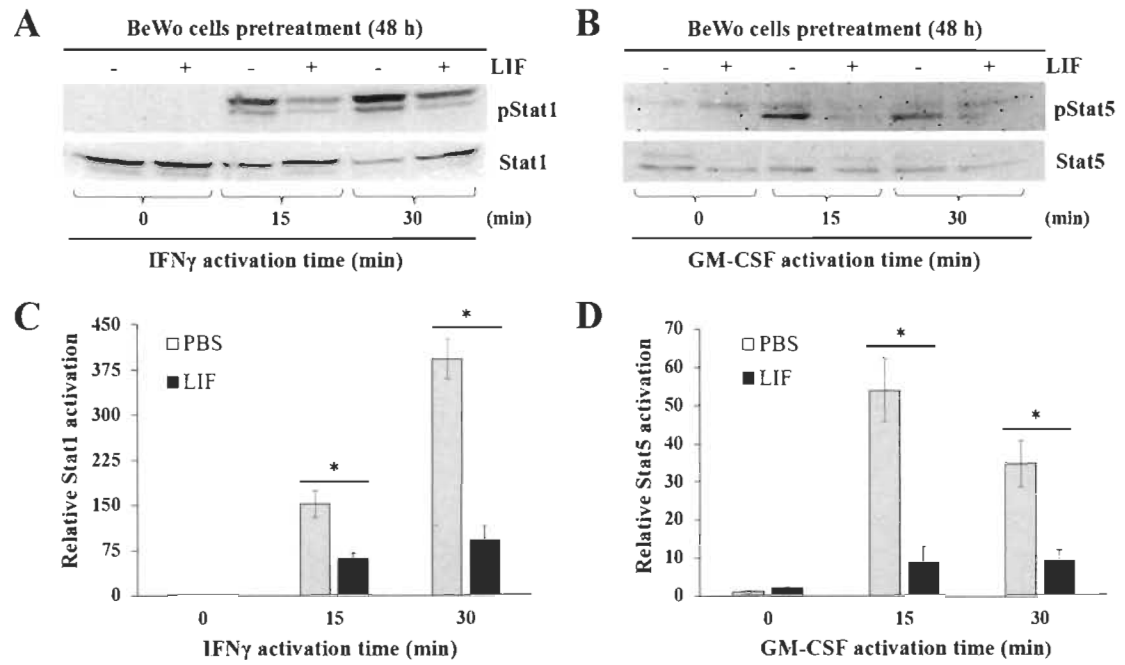


Figure 4

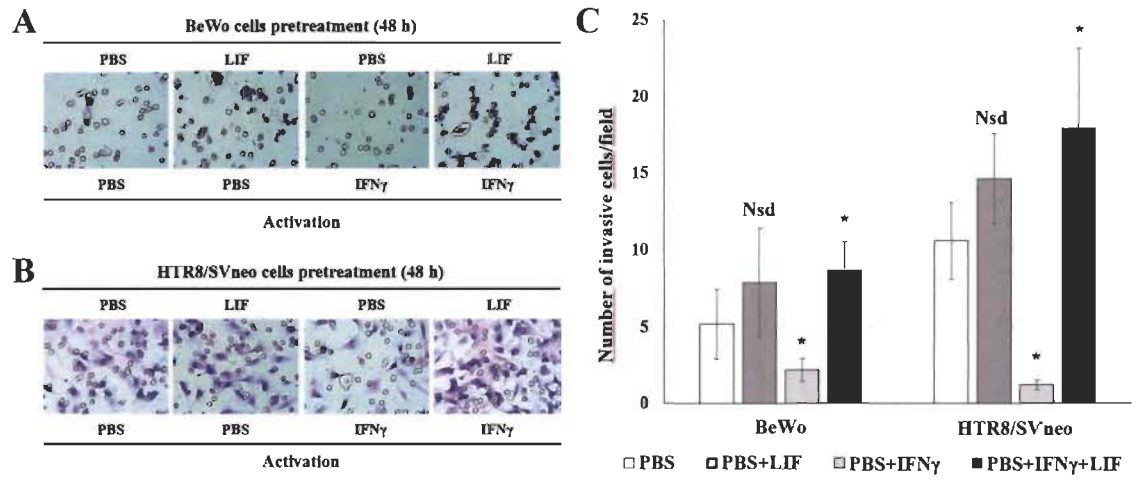


Figure 5

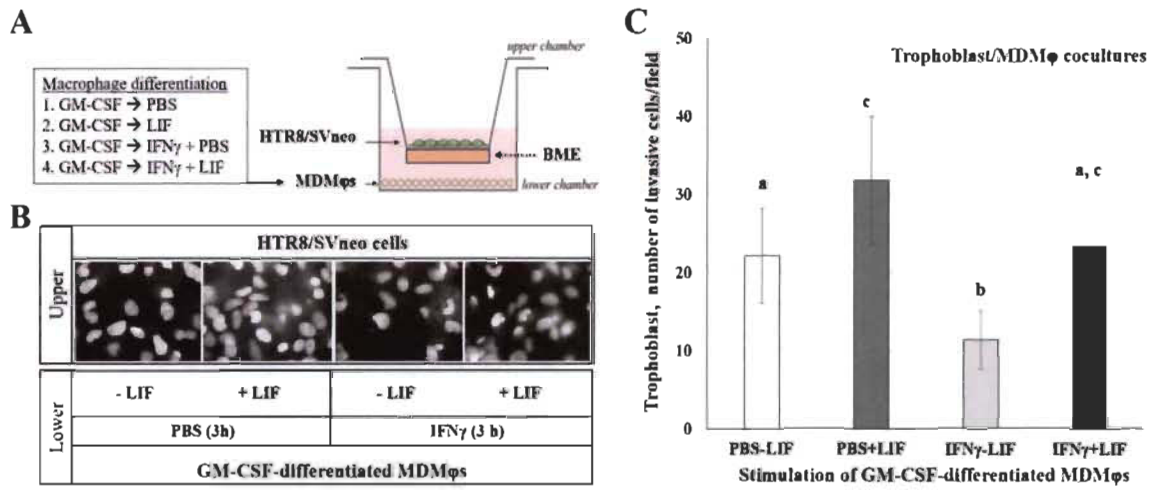


Figure 6

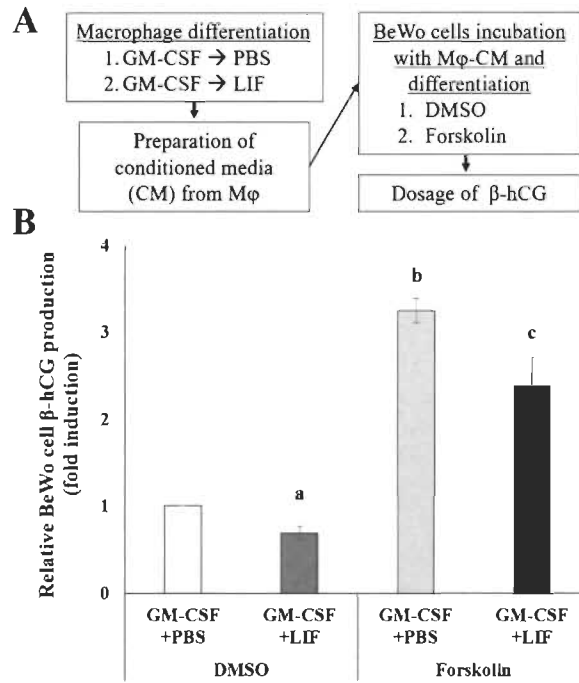


Figure 7

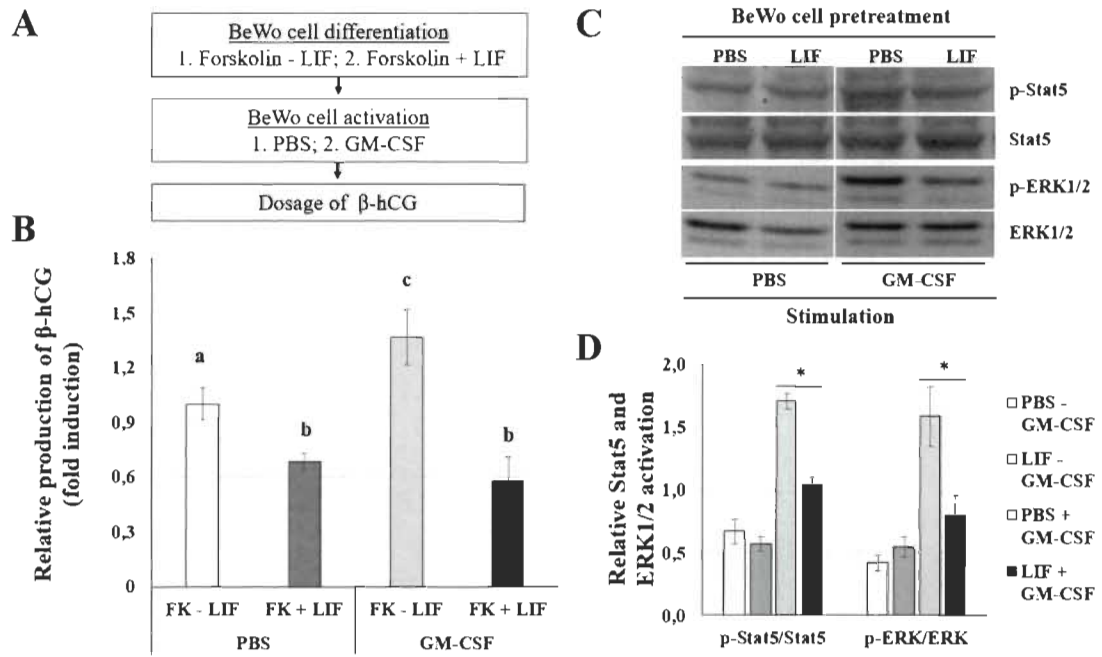
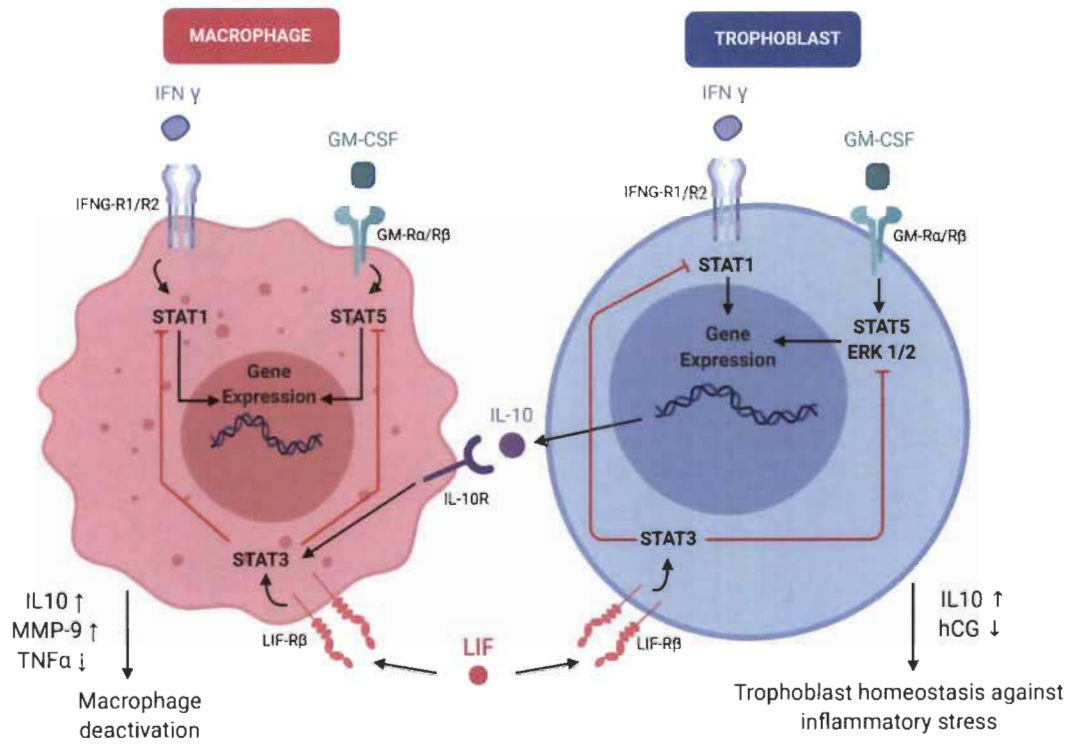


Figure 8

Graphical abstract



Le chapitre III contient une étude portant sur l'effet anti-inflammatoire de DAB-1 sur des Mφs.

CHAPITRE III

IDENTIFICATION OF AN ANTI-INFLAMMATORY DERIVATIVE WITH ANTI-CANCER POTENTIAL: THE IMPACT OF EACH OF ITS STRUCTURAL COMPONENTS ON INFLAMMATORY RESPONSES IN MACROPHAGES AND BLADDER CANCER CELLS

Jovane Hamelin-Morrisette, Suzie Cloutier, Julie Girouard, Denise Belgorosky, Ana María Eiján, Jean Legault, Carlos Reyes-Moreno, and Gervais Bérubé

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *European Journal of Medicinal Chemistry*. L'article a été accepté pour publication le 10 avril 2015. La référence complète pour cette publication est : Eur J Med Chem.2015;96:259-68.

3.1 Contribution des auteurs

Jovane HM a planifié et réalisé les expériences en lien avec les études biologiques et aidé à la rédaction du manuscrit, Suzie C a synthétisé les molécules, Julie G a aidé à la réalisation d'expériences et fourni de l'aide pour l'optimisation de celles-ci. Denise B a participé aux expériences avec les cellules MB49-I, Ana María E a fourni les cellules MB49-I et révisé le manuscrit, Jean L a participé aux études préliminaires sur les molécules à l'étude, Carlos RM a dirigé les recherches biologiques et rédigé la section biologie du manuscrit en plus d'en faire la révision, Gervais B a dirigé la synthèse des composés chimiques et écrit la section chimie du manuscrit, en plus de participer à la révision.

3.2 Résumé de l'article

L'inflammation joue un rôle crucial dans de nombreux types de cancer et elle est impliquée dans leur initiation et leur promotion. L'inflammation est maintenant reconnue comme un facteur de risque important pour des cancers comme ceux de la vessie, de la prostate et du sein. La découverte de nouveaux composés anti-inflammatoires pourrait avoir un impact majeur non seulement sur le traitement de ces cancers à composante inflammatoire, mais aussi sur leur prévention. Nous avons identifié un nouveau composé (1), appelé DAB-1 dans le reste de la thèse, présentant une activité anti-inflammatoire. Dans le but de mieux comprendre son action biologique, nous l'avons décomposé en ses différentes composantes et déterminé leur contribution respective à l'effet anti-inflammatoire de la molécule entière. Nous avons découvert que seule la combinaison entre la fonction maleimide et *tert*-butyloxycarbonylhydrazinamide a des propriétés anti-inflammatoires. Le dérivé (1) arrive à réduire les effets d'IFN γ et IL-6 sur des M ϕ s humains par 38 % et 64 % à une concentration de 10 μ M, tel qu'indiqué par une diminution de la phosphorylation de Stat1 et Stat3, respectivement. L'expression des marqueurs de surface *cluster of differentiation 40* (CD40) et CMH-II induits par IFN γ a été réduite de 87 % et 49 % après un prétraitement de 3 h avec (1) à 10 μ M. Des études de motilité cellulaire ont aussi révélé que (1), toujours à 10 μ M, pouvait réduire la motilité induite par l'IL-6 de 92 % comparativement aux M ϕ s non traités avec l'anti-inflammatoire. Le composé (1) arrive également à réduire la réponse pro-inflammatoire à la combinaison IFN γ + TNF α de la lignée cellulaire de M ϕ s murins J774A.1, telle que reflétée par la production de NO dans le milieu de culture. Ces travaux décrivent pour la première fois l'effet anti-inflammatoire du composé (1) sur des M ϕ s humains et murins, et pavent la voie à des études plus approfondies afin de comprendre plus en détail le mécanisme d'action de cette molécule.

3.3 Article complet (anglais) : Identification of an anti-inflammatory derivative with anti-cancer potential: The impact of each of its structural components on inflammatory responses in macrophages and bladder cancer cells

Abstract

Inflammation plays a crucial role in many types of cancer and is known to be involved in their initiation and promotion. As such, it is presently recognized as an important risk factor for several types of cancers such as bladder, prostate and breast cancers. The discovery of novel anti-inflammatory compounds can have a huge implication not only for the treatment of cancer but also as preventive and protective treatment modalities. We have recently identified a new compound (**1**) that presents interesting anti-inflammatory activity. In order to better understand its biological action, we have divided the molecule in its basic components and verified their respective contribution towards the anti-inflammatory response of the whole molecule. We have discovered that only the combination of the maleimide function together with the *tert*-butyloxycarbonylhydrazinamide function lead to important anti-inflammatory properties. The main derivative **1** can decrease the activating effects of $\text{INF}\gamma$ or IL6 on human (hM ϕ s) macrophage by 38% or by 64% at a concentration of 10 μM as indicated by a decrease of STAT1 or STAT3 activation. The expression of pro-inflammatory markers CD40 and MHCII in $\text{INF}\gamma$ stimulated hM ϕ s were reduced by 87% and 49%, respectively with a 3 h pretreatment of **1** at 10 μM . The cell motility assay revealed that **1** at 10 μM can reduce relative cell motility induced by IL6 by 92% in comparison with the untreated control hM ϕ monolayers. Compound **1** reduced by 91% the inflammatory response induced by the cytokines ($\text{INF}\gamma$ + $\text{TNF}\alpha$) in the macrophage-like J774A.1 cells at a concentration of 25 μM , as measured by the detection of NO production with the Griess reagent. Furthermore, upon removal of the *tert*-butyloxycarbonyl protective group the unprotected derivative as a hydrochloride salt (**1A**) retains interesting anti-inflammatory activity and was found to be less toxic than the parent compound (**1**).

Keywords. inflammation; bladder cancer; interferon gamma; interleukine 6; macrophage; MTT assay; STAT pathway; nitric oxide.

Introduction

Bladder cancer (BCa) is the second most common tumor of urogenital tract. In fact, it is the seventh most frequent cancer in the world and the fourth in developed countries [1]. In Canada, BCa ranked fifth among all cancer cases diagnosed in the Canadian population with about 8,000 new cases diagnosed during 2014 [2]. Most of detectable BCa tumors are initially non-muscle-invasive at diagnosis and are generally curable by means of surgical resection. For BCa patients with non-muscle-invasive tumors, intravesical immunotherapy with the immunomodulator Bacillus Calmette-Guerin (BCG) or chemotherapeutic agents is recommended for reducing the risk of tumor recurrence [3]. However, the current treatments are still far from satisfactory due to low response rate and/or severe side effects [4]. In fact, it is estimated that about 27-30% of new cases diagnosed will die from that disease due to recurrent tumors exhibiting a lethal phenotype characterized by high histological grade and muscle invasion [1, 2].

At present, as the mechanisms of acquisition of highly malignant phenotype of BCa tumors are not yet well understood, very few therapeutic alternatives have been proposed and tested in the clinic. Nevertheless, compelling data actually suggest that chronic inflammation acts as an important mediator of human carcinogenesis and cancer disease progression [5-10]. In the case of BCa, evolution into different stages of cancer development is strongly associated with episodes of chronic inflammation caused by tobacco smoke, urinary tract infections or chronic cystitis [11-13]. For instance, higher levels of pro-inflammatory cytokines and tumor-infiltrating macrophages (M ϕ s) were found to be associated with more aggressive tumors, low responsiveness to intravesical BCG therapy, and poor prognosis [5-7, 14-18]. In our recent studies, *in vitro* models of functional interactions between human cancer cells and two different subtypes of human M ϕ s, pro-inflammatory M ϕ -1 and anti-inflammatory M ϕ -2, were developed in an attempt to investigate the role of polarized M ϕ s in human cancer cell behavior changes [19, 20]. Our findings that both types of M ϕ s can regulate tumor cell survival and invasion further support the idea that, via alterations in the expression of inflammatory mediators and

inflammatory cell function, the inflammatory microenvironment may contribute to the development of a highly malignant phenotype of tumors *in vivo* [19, 20].

Among the major regulator of systemic and local inflammation, the cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interleukin 6 (IL6) have been shown to promote BCa development [5]. In theory, TNF α and IL6 exert pro-tumoral effects on tumor cells through activation of the transcription factors nuclear factor kappa B (NF κ B) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), respectively [21]. The signaling pathways TNF α /NF κ B and IL6/STAT3 were identified as the main factors that transform the intra-tumoral leukocytes into pro-tumor cells [5]. Such functional phenotype control is critical to prevent tumor immune surveillance and instead, to turn away the responses of adaptive and innate immune cells toward the promotion of highly invasive, lethal forms of BCa.

Nitric oxide (NO), another important component of the inflammatory response, is often deregulated and associated with numerous types of malignancies, including BCa [22-26]. It is known that NO can have dichotomous effects on tumor growth, depending on its concentration, time of exposure and tumor microenvironment. These dual effects of NO on cancer arise from its ability to regulate different events such as induction of DNA damage, suppression of DNA repair enzymes, posttranslational modifications of proteins, enhancement of cell proliferation, inhibition of apoptosis and antitumor immunity [23-25]. It is known that one of the isoforms of the enzyme that produces NO (inducible nitric oxide synthase (iNOS)) is not expressed in normal bladder, but is detected in approximately 50% of bladder tumors, being a poor prognosis factor associated with tumor invasion in patients with BCa [26]. Treatment with an inhibitor of NO production in a murine model, inhibited properties *in vitro* and *in vivo*, related to tumor growth, progression, and viability [22]. Among anticancer strategies, the modulation of NO production for therapeutic benefit has gained interest over the past decade [23, 27].

Considering the critical functions of inflammatory mediators in BCa growth, dissemination and resistance to cell death, they represent potential drug targets to improve

the efficacy of immunotherapy and chemotherapy agents. The use of chemopreventive agents against inflammatory mediators or key transcription factors involved in the inflammatory proteins expression might thus be a promising approach to decrease cancer development [6, 21, 23, 27, 28].

Recently, it was reported that veratric acid, a natural benzoic acid derivative, possesses anti-oxidant, anti-inflammation and blood pressure-lowering effects [29]. Based on the latter study, it was decided to screen a series of benzoic acid analogs made in our laboratory for their potential anti-inflammatory activity. It was discovered that a maleimide-hydrazinecarboxylic acid *tert*-butyl ester derivative possesses good anti-inflammatory properties. This compound was an important intermediate for the construct of heterobifunctional cross-linking reagents allowing the synthesis of doxorubicin-monoclonal antibody immunoconjugates [30, 31]. Hence, in order to better understand its unsuspected biological anti-inflammatory action, the molecule was divided into its various components that were individually tested on NO production in bladder cancer cells (MB49-I) along with the product of interest. This study aims at establishing the possible repurposing to this molecule as an anti-inflammatory. This communication reports the synthesis and biological properties of this new anti-inflammatory compound (**1**), its unprotected analog (**1A**) and that of its various structural components (see Fig. 1).

Results and discussion

Chemistry

Using *para*-amino benzoic acid (**2**) as the starting material derivative **1** was made in a three-step reaction sequence (Scheme 1) [30]. *Para*-amino benzoic acid (**2** or **PABA**) was first reacted with maleic anhydride (**MA**) in dry acetone to give the diacid (**3**) with 90% yield. Cyclisation to form the maleimide was accomplished with acetic anhydride and sodium acetate to give compound **4** with 89% yield after hydrolysis of the mixed anhydride intermediate with water. Finally, activation of acid **4** with *iso*-butyl chloroformate in the presence of pyridine was done followed by treatment with *tert*-butyl

carbazate gave the desired anti-inflammatory derivative **1** with 54% yield. Deprotection of **1** with hydrochloric acid in ether gave the hydrochloride salt **1A** with 46% yield after recrystallization.

The left and right hands of derivative **1** were also synthesized in order to assess the respective contribution of the remaining functional group towards the observed anti-inflammatory activity. The left hand of **1** was prepared in a two-step reaction sequence from aniline (**5**). The reaction of aniline (**5**) with **MA** followed by cyclisation of the amido-acid intermediate gave the desired maleimide **7** in about 38% overall yield. The right hand of **1** was also prepared in a single step from benzoic acid upon activation with *iso*-butyl chloroformate followed by treatment with *tert*-butyl carbazate to yield compound **9** in 48% yield. Of note, these reactions were not optimized as derivatives **7** and **9** were only needed in small quantities to assess their anti-inflammatory properties in comparison to **1** and **1A**. The compounds were characterized by their respective infrared (IR), nuclear magnetic resonance spectroscopy (proton and carbon NMR) and by high resolution mass analysis.

Evaluation of anti-inflammatory properties in activated macrophages

This set of experiments were planned to investigate whether the main two derivatives **1** and **1A** have the ability to modulate the activating effects of potent pro-inflammatory cytokines, namely $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, and IL6, on the behavior of human (hM ϕ s) and murine (mM ϕ s) macrophages. $\text{INF}\gamma$, through the activation of the transcription factor signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), is known to induce the expression of several pro-inflammatory genes in M ϕ s, such as the cytokines $\text{TNF}\alpha$ and IL6, and the cell surface receptors cluster of differentiation 40 (CD40) and the major histocompatibility complex II (MHC-II) [32]. The cytokine IL6 is a key regulator of systemic and local inflammation [33, 34]. Functionally, IL6 mediates its effects through the binding of IL6 receptor subunits IL6R and gp130 which leads to the activation of STAT3 [35]. Activation of the IL6/STAT3 signaling pathway is critical to M ϕ migration

and differentiation [36]. On the other hand, TNF α and IFN γ are considered as the most important cytokines involved in NO production by mouse M ϕ s [37].

Figure 2a shows representative activation status of STAT1 by IFN γ and STAT3 by IL6 in hM ϕ s pretreated for 30 min with derivatives **1A** and **1**. hM ϕ s express low basal levels of pSTAT1 and pSTAT3 (t = 0 min) when pretreated with derivatives **1A** or **1** (Fig. 1a). Very little or no variation in total STAT1 and STAT3 expressions was observed, irrespective of the treatments. As expected, IFN γ activates STAT1, the levels of pSTAT1 being increased with IFN γ at t = 30 min (Fig. 2b). These increased effects in pSTAT1 were efficiently reduced when hM ϕ s were pretreated with **1A** (from 14.8 folds to 12.4 folds at 10 μ M, and 5.1 folds at 50 μ M) and even more with **1** (from 9.9 folds to 6.1 folds at 10 μ M, and 2.8 folds at 50 μ M). Similar to pSTAT1 by IFN γ , the induction of pSTAT3 by IL6 was significantly reduced when hM ϕ s were pretreated with **1A** (from 23.1 folds to 19.7 folds at 10 μ M, and 14.2 folds at 50 μ M) and even more with **1** (from 32.9 folds to 11.9 folds at 10 μ M, and 4.9 folds at 50 μ M).

To further investigate the influence of derivatives **1** and **1A** on the biological responses induced by inflammatory mediators in hM ϕ s, two set of experiments were designed to evaluate the expression level of the pro-inflammatory markers CD40 and MHC-II in IFN γ -stimulated hM ϕ s, by flow cytometry, and cell motility in IL6-stimulated hM ϕ s, by the scratch wound healing assay. Consistently with the pro-inflammatory role of IFN γ , M ϕ CD40 and MHC-II expressions were enhanced by 16.7 folds and 15.3 folds, respectively (Fig. 3). However, the rise in CD40 expression in IFN γ -activated M ϕ s was blocked when they were pretreated with **1A** (9.5 folds) and even more with **1** (2.2 folds). For MHC-II, the expression inductions were reduced to 11.8 folds with **1A** and 7.8 folds with **1**. Scratch assays were performed to further demonstrate the deactivating effects of derivatives **1** and **1A** on IL6-activated hM ϕ s (Fig. 4a). We found that stimulation with exogenous IL6 for 48 h significantly enhanced hM ϕ motility, the ratio of motile cells being increased up to 177% compared with control cells (Fig. 4b). However, the stimulatory effect of IL6 on cell motility was significantly blocked when hM ϕ s were pretreated with

derivatives **1A** and **1**; the relative number of motile cells being decreased to 53.7% of control with **1A**, and to 13.5% of control with **1** (Fig. 4b).

Finally, anti-inflammatory activity was assessed by measuring NO production in mM ϕ s stimulated by two potent pro-inflammatory signals, INF γ and TNF α , and using the Griess reaction method according to the published procedure [22]. In brief, the NO produced by the cells is converted into nitrite ion (NO $_2^-$). The latter is reacted with the Griess reagent to form an azo dye that can be spectrophotometrically quantitated based on its absorbance at 548 nm. As shown in figure 5, in response to combined INF γ +TNF α activation, the production of NO were increased by 8.7 folds (from 7 ± 3 μ M in unstimulated cells up to 61 ± 9 μ M in stimulated cells). However, when mM ϕ s were activated after pretreatment with derivatives **1A** and **1** both at a concentration of 10 μ M, NO production was only induced by 6.6 folds (45.9 μ M) and 4.7 folds (32.8 μ M), respectively. Also, in the presence of derivatives **1A** and **1** at a concentration of 50 μ M, the induction of NO production was respectively reduced to 2.7 folds (18.6 μ M) and 0.8 folds (5.5 μ M). These results represent a reduction of about 69% and 91%, respectively of the inflammatory response induced by the cytokines (Fig. 5).

Taken together, these results clearly demonstrated that the main derivatives **1** and **1A** presents significant anti-inflammatory activities, and that the anti-inflammatory properties of **1** are obviously greater than that of **1A**.

Evaluation of anti-proliferative activities in tumor cells

In this set of experiments, the anti-proliferative activity of the compounds **1** and **1A** in the murine BCa cell line MB49-I was evaluated *in vitro* using the MTT cell viability/proliferation assay as previously described [19, 20, 38, 39]. The MTT assay was performed in cells stimulated with INF γ and TNF α , over an incubation period of 24 h, after pretreatment with vehicle (DMSO) and the compounds **1** and **1A**. Relative cell viability data are presented as values of absorbance units (AU) measured at 580 nm.

As shown in figure 6, derivative **1** was significantly more toxic than its analog **1A**. Indeed, the results demonstrate that pro-inflammatory stimulation inhibits MB49-I cell proliferation, the value of absorbance at $t = 24$ h being 0.55 AU and 0.35 AU, respectively in the absence and in the presence of $\text{INF}\gamma + \text{TNF}\alpha$ stimulation. In $\text{INF}\gamma$ - and $\text{TNF}\alpha$ -stimulated cells, derivative **1** is not toxic at a concentration of 10 μM or less but induces a significant reduction in cell proliferation of about 19% at 25 μM , 45% at 37.5 μM and 50% at 50 μM (Fig. 3A). In contrast to **1**, derivative **1A** remains not toxic up to a concentration of 37.5 μM with $\text{INF}\gamma + \text{TNF}\alpha$ stimulation (Fig. 6).

Evaluation of anti-inflammatory properties of the structural components of compound **1**

The next objective of this study was to evaluate individually the anti-inflammatory properties of the various structural components (**MA**, **2**, **3**, **4**, **6**, **7** and **9**, see scheme 1) of compound **1**. In this set experiments, the various derivatives were tested for their ability to modulate NO production in BCa cells (MB49-I) stimulated by $\text{INF}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$ relative to control cells (with cytokines $\text{INF}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$ alone). The results found in figure 7 show that combined $\text{INF}\gamma + \text{TNF}\alpha$ induces an 11-fold increase in the production of NO (from 6 ± 2 μM in unstimulated tumor cells up to 65 ± 7 μM in stimulated tumor cells). Of note, at a concentration of 50 μM , the induction of NO production was respectively reduced to 2-folds (12 μM) in the presence of **1**, and 4-folds (23 μM) in the presence of **1A**. These results represent a reduction of about 81% and 72%, respectively of the inflammatory response induced by the cytokines. However, it is worth mentioning that the observed reduction of 81% for derivative **1** might be produced by a combination of both cytotoxic and anti-inflammatory activity (see figure 6). Also, in the presence of derivatives **1** and **1A** at a concentration of 10 μM , NO production induction was reduced to 7-folds (39 μM) and 9-folds (51 μM), respectively. Interestingly, the reagents **MA** and **2** (PABA) and the synthetic intermediates **3**, **4** and **6** do not present any anti-inflammatory properties (Fig. 7). Furthermore, derivative **7** bearing only the maleimide function (left hand of **1**) and derivative **9** bearing only the *tert*-butyloxycarbonyl function (right hand of **1**) did not show any anti-inflammatory activity (Fig. 7). Hence, the combination of the maleimide

function together with the hydrazine amide (either BOC protected (**1**) or as a hydrochloride salt (**1A**)) are necessary for anti-inflammatory activity.

Conclusion

In this study, we prepared and characterized several compounds in order to better understand the anti-inflammatory activity of derivatives **1** and **1A**. It is now apparent that the anti-inflammatory activity requires the presence of the maleimide function together with a hydrazine amide function for optimal activity. It is also proven that the various precursor intermediates (**3**, **4**, **6**), reagents (**2**, **PABA**) and maleic anhydride (**MA**) as well as the left hand (**7**) and right hand (**9**) of the main anti-inflammatory compound **1** were inactive. Significant reductions of STAT1 or STAT3 activation by several pro-inflammatory cytokines were observed with compounds **1** and **1A**. Also, significant decreased of CD40 and MHC-II expressions were observed using **1** and **1A**. Cell motility assays also revealed that **1** and **1A** can induce a drastic reduction of motility as illustrated by a 92% reduction in cell motility at 10 μ M for derivative **1**. Relative cell viability revealed that derivative **1A** was less toxic than derivative **1**. Taken together, these results suggest that the development of such type of anti-inflammatory derivative must include the basic carbon skeleton of **1A** as it was proven less toxic than its precursor derivative **1**. Hence, this simple compound might be of interest as a non-toxic anti-inflammatory derivative to investigate the role of inflammation in BCa and other cancers in the future. The results confirm the anti-inflammatory properties of **1**, its analog **1A** and provide an alternative use for **1** that was initially prepared as a heterobifunctional cross-linking reagent. Further studies using an *in vivo* mouse model for BCa invasion and metastasis are currently underway to demonstrate the anticancer effects of these new anti-inflammatory molecules. Once completed, the results from these studies will be reported elsewhere.

Experimental protocols

Biological evaluation

Cell culture

Biological assays were performed using the human monocytic cell line THP1, the murine macrophage-like cell line J774A.1, and the murine BCa cell line MB49-I. The cells were maintained in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and containing 1 mM sodium pyruvate, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) and 50 µg/mL gentamycin (referred as 10% FBS RPMI-1640). The cells were maintained at 37 °C in a moisture-saturated atmosphere containing 5% CO₂.

THP1 cells and J774A.1 cells are the most widely used cell lines to investigate the function and differentiation of monocytes and Mφs in response to various inflammatory mediators [40, 41]. Undifferentiated THP1 cells resemble primary monocytes/Mφs isolated from healthy donors or donors with inflammatory diseases, such as diabetes mellitus and atherosclerosis [42]. After treatment with phorbol esters, THP1 cells differentiate into Mφ-like cells which mimic native monocyte-derived Mφs in several respects [43]. As we previously described, green fluorescent protein-expressing (GFP)-THP1 cells were cultured for 18 h in 50 nM phorbol 12-myristate 13-acetate to induce monocyte-to-Mφ differentiation [19, 20, 39]. The J774A.1 cell line was kindly provided by Dr Tatiana Scorza (Université du Québec à Montréal, Canada). This cell line is a macrophage-like cell model which produce large amount of NO in response to IFN γ , TNF α , bacterial infection and bacterial products, such as lipopolysaccharide (LPS) [40]. The cell line MB49-I is a highly invasive and tumorigenic BCa cell model that was developed by successive *in vivo* passages of MB49 primary tumors [44].

Cell signaling studies

THP1-derived hMφs (750×10^3 cells/mL) were pretreated for 30 min with vehicle (DMSO) or compounds **1** and **1A** (both at 10 μ M and 50 μ M), and then washed and recovered immediately ($t = 0$ min) or after 30 min of activation with 50 U/mL IFN γ and 25 ng/mL IL6. Cell lysates were prepared and analyzed by immunoblotting as described [19, 20, 39, 45]. Briefly, protein samples were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto a PVDF membrane. Blots were first probed with rabbit polyclonal antibodies against phospho-STAT1 (pSTAT1) and pSTAT3 (both at 1:2000) overnight at 4 °C. Blots were then incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (1:3000) for 1 h at room temperature. The same blots were stripped and then probed with anti-STAT1 and anti-STAT3 Abs (both at 1:1000). In both cases, probed molecules were visualized using an enhancement chemiluminescence detection kit (Thermo Fisher Scientific).

Surface antigen expression analysis

To study membrane receptor expression, THP1-derived hMφs (750×10^4 cells/mL) were pretreated for 3 h with DMSO or compounds **1** (10 μ M) and **1A** (25 μ M), and then left untreated (control) or treated for 48 h with 50 U/mL IFN γ . The expression level of MHC-II and CD40 was evaluated by flow cytometry as described [19, 20, 39].

Motility assays

The *in vitro* scratch wound healing assay was performed to study the effects of compounds **1** (10 μ M) and **1A** (25 μ M) in IL6-induced hMφ cell migration, as described [46]. Briefly, THP1-derived hMφs (750×10^3 cells/mL) were seeded into 24-well tissue culture plate to reach ~70-80% confluence as a monolayer. The cell monolayers were scraped in a straight line in one direction to create a "scratch" with a p200 pipet tip. To obtain the same field during the image acquisition, another straight line was scratched perpendicular to the first wound line to create a cross in each well. Cell debris were

removed and the edges of the scratch were smoothed by washing the cells once with 1 mL of Hank's buffer. Cell monolayers were pretreated for 3 h with vehicle (DMSO) or compounds **1** (10 μ M) and **1A** (25 μ M), and then left untreated (control) or treated for 48 h with 25 ng/mL IL6. Using the cross as reference points the plate was placed under an inverted fluorescence microscope, and the images of the scratch were acquired at $t = 0$ h and $t = 48$ h. The number of motile cells was determined using Java-based image processing program ImageJ (National Institutes of Health) and relative cell motility was expressed as percent (%) of control of motile cells at $t = 48$ h relative to motile cells within the initial wound (at $t = 0$ h).

Evaluation of NO production by the Griess reagent method

The MB49-I cells and the J774A.1 cells (25×10^3 cells/well) were grown and pretreated, as indicated, with various anti-inflammatory derivatives, precursors and mono-functional derivatives for a period of 3 h. Afterwards the cells were washed twice with 10% FBS RPMI-1640 and then activated to produce NO for a period of 24 h with cytokines INF γ and TNF α . NO production was measured using the Griess reagent method as previously described [22]. This method involves the detection of nitrite ions (NO_2^-) formed by the spontaneous oxidation of NO under physiological conditions. According the manufacture procedure (Life Technologies; # G-7921), equal volumes of sulfanilic acid and N-(1-naphthyl)ethylenediamine are mixed together to form the Griess reagent. In the presence of NO_2^- , sulfanilic acid is converted to a diazonium salt, which in turn is coupled to N-(1-naphthyl)ethylenediamine to produce a pink coloration that is measured with a spectrophotometer (Biotek, synergy HT) at 548 nm.

Evaluation of cell proliferation by the MTT assay

To evaluate the anti-proliferative activity, cell viability/proliferation MTT assays were performed as previously described [19, 20, 38, 39, 45]. Briefly, MB49-I cells (5×10^3 cells/well) were plated in 96-well plates in 100 μ L 10% FBS RPMI-1640 and cultured for 24 h at 37 $^\circ$ C and 5% CO_2 . Cells were pretreated for a period of 3 h with

vehicle (DMSO) or derivatives **1** and **1A** at 0, 10, 25, 37.5, and 50 μM , and then incubated for 24 h in the absence or the presence of $\text{INF}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$. At the end of the culture period, 10 μL of 5 mg/mL methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) solution was added to each well. After a 3-h incubation period with MTT reagent, 100 μL of MTT solubilization buffer (10% SDS in 10 mM HCl) was added and plates were placed overnight in the cell incubator before absorbance measure. The optical density was read at 580 nm using the Microplate Reader Manager (from Bio-Rad Laboratories).

Chemistry

Anhydrous reactions were performed under an inert atmosphere of nitrogen. The starting material, reactant and solvents were obtained commercially and were used as such or purified and dried by standard means [47]. Organic solutions were dried over magnesium sulfate (MgSO_4), filtered and evaporated on a rotary evaporator under reduced pressure. All reactions were monitored by UV fluorescence. Commercial TLC plates were Sigma T 6145 (polyester silica gel 60 \AA , 0.25 mm). Flash column chromatography was performed according to the method of Still et al. on Merck grade 60 silica gel, 230-400 mesh [48]. All solvents used in chromatography were distilled.

The infrared spectra were taken on a Nicolet Impact 420 FT-IR spectrophotometer. Mass spectral assays were obtained using a MS model 6210, Agilent technology instrument. The high resolution mass spectra (HRMS) were obtained by TOF (time of flight) using ESI (electrospray ionization) using the positive mode (ESI+) (Université du Québec à Montréal). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Varian 200 MHz NMR apparatus. Samples were dissolved in deuterated acetone (acetone- d_6) or deuterated dimethylsulfoxide (DMSO- d_6) for data acquisition using the residual solvent signal as internal standard (acetone, δ 2.05 ppm for ^1H NMR and δ 29.84 ppm for ^{13}C NMR; dimethylsulfoxide, δ 2.50 ppm for ^1H NMR and δ 39.52 ppm for ^{13}C NMR). Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm), the coupling constants (J) are expressed in hertz (Hz). Multiplicities are described by the following abbreviations:

s for singlet, d for doublet, t for triplet, m for multiplet, #m for several multiplets and, br s for broad singlet.

Synthesis of anti-inflammatory 1 and 1A

Synthesis of derivatives 3, 4 and 1

The synthesis of derivatives **3**, **4** and **1** were performed as described earlier for the same or similar types of compounds [30, 31, 49, 50]. Only, derivatives **4** and **1** were fully characterized earlier [30, 31]. So, the spectral data of intermediate **3** and derivative **1A** are given herein. Note: The complete spectral data of **4** and **1** are also provided in order to facilitate the comparison between the various molecules described in this manuscript.

Step 1: Synthesis of 4-(3-carboxy-acryloylamino)-benzoic acid (**3**)

Briefly, *para*-aminobenzoic acid (**2**, 5.34 g, 38.93 mmol) was dissolved in dry acetone (6 mL) to which was added methanol (1 mL). Maleic anhydride (1.05 eq.) dissolved in dry acetone was added to the first solution. The reaction mixture was stirred for a period of 2 h allowing sufficient time for the complete precipitation of the diacid **3**. The precipitate was filtered and washed twice with acetone (2 x 2 mL) and dried in a desiccator overnight. The crude diacid **3** (9.16 g, 90%) was sufficiently pure to be used without further purification at the next step. IR (ν , cm^{-1}): 3500-2500 (CO_2H), 1686 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR (DMSO-d_6 , δ ppm): 12.79 (br s, 2 H, 2 x CO_2H), 10.58 (s, 1H, NH), 7.89 and 7.71 (2 x d, $J = 8.6$ Hz, 4H, aromatic), 6.48 and 6.30 (2 x d, $J = 2.2$ Hz, 2H, maleimide); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , δ ppm): 167.4, 167.3, 164.1, 143.2, 132.1, 130.9 (2), 130.6, 126.0, 119.2 (2); ESI+ HRMS: ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{NO}_5 = 236.0553$; found = 236.0558.

Step 2: Synthesis of 4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-benzoic acid (**4**)

The diacid **3** (2.01 g, 8.54 mmol) was treated with acetic anhydride (4.0 mL, 36.28 mmol) and anhydrous sodium acetate (350 mg, 4.27 mmol) and the mixture heated

at 50 °C for 2 h. Afterwards, the solution was evaporated to dryness and stirred with water at 70 °C for a period of 2 h. The resulting precipitate was filtered and dried in a desiccator overnight to yield 1.65 g (89%) of maleimide **4**. The spectral data of this derivative correspond to those reported in the literature [30]. IR (ν , cm^{-1}): 3475-2600 (CO_2H), 1715 ($\text{C}=\text{O}$), 1704 ($\text{C}=\text{O}$); ^1H NMR (acetone- d_6 , δ ppm): 8.14 and 7.57 (2 x d, $J = 8.6$ Hz, 4H, aromatic), 7.08 (s, 2H, maleimide); ^{13}C MNR (acetone- d_6 , δ ppm) 169.3 (2), 166.2, 136.2, 134.7 (2), 130.1 (2), 129.3, 125.8 (2); ESI+ HRMS: (M+H)⁺ calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{NO}_4 = 218.0448$; found = 218.0447.

Step 3: Synthesis of *N'*-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-benzoyl]-hydrazinecarboxylic acid *tert*-butyl ester (**1**)

Derivative **1** was synthesized using a modified procedure reported by Willner et al. [51] as it is also described by Lau et al. [31]. A cooled suspension (0 °C) of molecule **4** (211 mg, 0.97 mmol) in methylene chloride (4.5 mL) was treated with triethylamine (190 μL , 1.36 mmol) and isobutyl chloroformate (175 μL , 1.34 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 0 °C and at room temperature (22 °C) for about 1 h. Afterwards, *tert*-butyl carbazate (128 mg, 0.97 mmol) dissolved in methylene chloride (0.8 mL) was added dropwise to the mixture and stirred for an additional 12 h at 22 °C. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (55 mL) and methylene chloride (20 mL) and washed twice with saturated NaHCO_3 (2 x 50 mL), twice with 0.1 N HCl (2 x 50 mL), twice with saturated NaCl (2 x 50 mL), and finally with H_2O (50 mL). The organic phase was dried (MgSO_4) and evaporated to give crude derivative **1**. The product was purified by flash chromatography, using a mixture of hexanes / acetone (3/2), to yield 173 mg (54%) of **1**. The spectral data of this derivative correspond to those reported in the literature [31]. IR (ν , cm^{-1}): 3360-3240 (NH), 3087 ($\text{C}=\text{C}$), 2988 (CH, aliphatic), 1733 ($\text{C}=\text{O}$), 1706 ($\text{C}=\text{O}$). ^1H NMR (acetone- d_6 , δ ppm): 9.05 (s, 1H, NH), 8.02 and 7.53 (2 x d, $J = 8.6$ Hz, 4H, aromatic), 7.07 (s, 2H, maleimide), 2.84 (br s, 1H, NH), 1.45 (s, 9H, 3 x CH_3); ^{13}C RMN (acetone- d_6 , δ ppm): 169.3 (2), 166.0, 155.7, 135.1, 134.6 (2), 131.6, 127.9 (2), 125.9 (2), 79.6, 27.5 (3); ESI+ HRMS: (M+Na)⁺ calculated for

$C_{16}H_{17}N_3NaO_5 = 354.1060$; found = 354.1072; (M -2-methylpropene +H)+ calculated for $C_{12}H_{11}N_3O_5 = 276.0620$; found = 276.0627.

Synthesis of derivative 4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-benzoic acid hydrazide hydrochloride (1A)

The hydrolysis of **1** was performed using a similar procedure reported by Heindel et al. for the cleavage of maleimidoacetic acid (*tert*-butyloxycarbonyl) hydrazide with hydrochloric acid to form maleimidoacetic acid hydrazide hydrochloride [52]. To a solution of **1** (2.41 g, 7.27 mmol) dissolved in dry dioxane (30 mL) was added a solution of hydrochloric acid (60 mL, 1.0 M in diethyl ether, 60 mmol). The mixture was stirred at room temperature for a period of 5 hours. Afterwards, 150 mL of hexanes were added to complete the precipitation of the hydrochloride salt **1A**. The crude precipitated was filtered, washed with hexanes and recrystallized twice with a mixture of methanol / isopropyl alcohol / hexanes (8 / 3 / 10) to yield 1.7 g (46%) of the desired material. IR (ν , cm^{-1}): 3200-2500 (CO_2H), 3269 (NH), 1702 (C = O), 1693 (C = O); 1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 8.06 and 7.52 (2 x d, $J = 8.8$ Hz, 4H, aromatic), 7.21 (s, 2H, maleimide); ^{13}C MNR (DMSO- d_6 , δ ppm) 170.0 (2), 165.6, 135.9, 135.4 (2), 129.6, 129.0 (2), 126.8 (2); ESI+ HRMS: (M+H)+ calculated for $C_{11}H_{10}N_3O_3 = 232.0717$; found = 232.0717 and ESI+ HRMS: (M+H)+ calculated for $C_{11}H_{11}ClN_3O_3 = 268.0483$; found = 268.0483.

Synthesis of derivatives 6, 7 and 9

Synthesis of derivative 7

Step 1: Synthesis of 3-phenylcarbamoyl-acrylic acid (**6**)

Following the procedure described earlier for the preparation of derivative **3** using aniline (3.0 g, 2.96 mL, 32.4 mmol), MA (3.33 g, 34.0 mmol) and dry acetone (21 mL). The precipitated was filtered and washed with dry acetone (2 x 3 mL) and dried in a desiccator overnight. The reaction yielded acid **6** (5.36 g, 86%) that was used as such in the next step. IR (ν , cm^{-1}): 3273 and 3208 (N-H), 3230-2900 (CO_2H), 1694 cm^{-1} (C = O);

^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 12.87 (br s, 1 H, CO_2H), 10.37 (s, 1H, NH), 7.60, 7.31 and 7.07 (3 x m, 2H, 2H and 1H, aromatic), 6.46 and 6.28 (2 x d, $J = 12.1$ Hz, 2H, maleimide); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm): 167.3, 163.7, 139.0, 132.1, 130.9, 129.3 (2), 124.3, 120.0 (2); ESI+ HRMS: (M+H) $^+$ calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{NO}_3 = 192.0655$; found = 192.0650.

Step 2: Synthesis of 1-phenyl-pyrrole-2,5-dione (7)

Following the procedure described above for the preparation of derivative **4** using acid **6** (823 mg, 4.28 mmol), acetic anhydride (2.10 mL, 22.2 mmol), sodium acetate (175 mg, 2.13 mmol), 50 °C for 2 h, then H_2O (80 mL), 70 °C for 2 h. The final product was filtered, dried overnight in a desiccator to give 325 mg (44%) of final product. This compound is also commercially available from Sigma-Aldrich Inc. IR (ν , cm^{-1}): 1703 (C = O); ^1H NMR (acetone- d_6 , δ ppm): 7.75, 7.34 and 7.13 (3 x m, 2H, 2H and 1H, aromatic), 6.43 (s, 2H, maleimide); ^{13}C MNR (acetone- d_6 , δ ppm) 163.1 (2), 138.7, 133.4 (2), 128.8 (2), 124.2, 119.8 (2); ESI+ HRMS: (M+H) $^+$ calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_2 = 174.0550$; found = 174.0554.

Synthesis of derivative *N'*-benzoyl-hydrazinecarboxylic acid *tert*-butyl ester (9)

Following the procedure described earlier for the preparation of derivative **1** using benzoic acid (321 mg, 2.62 mmol), triethylamine (513 μL , 3.68 mmol), isobutyl chloroformate (480 μL , 3.68 mmol), *tert*-butyl carbazate (347 mg, 2.62 mmol) and methylene chloride (8 mL in total). The crude material was purified by flash chromatography using a mixture of hexanes / ethyl acetate (9/1 and 7/3) to yield the desired material **9** (300 mg, 48%). IR (ν , cm^{-1}): 3475-3150 (NH), 3070 (C = C), 2979 (CH, aliphatic), 1713 (C = O), 1659 (C = O). ^1H NMR (acetone- d_6 , δ ppm): 9.43 (s, 1H, NH), 7.92 and 7.50 (2 x m, 5H, aromatic), 2.84 (br s, 1H, NH), 1.44 (s, 9H, 3 x CH_3); ^{13}C RMN (acetone- d_6 , δ ppm): 166.5, 155.7, 133.1, 131.7, 128.4 (2), 127.3 (2), 79.5, 27.5 (3); ESI+ HRMS: (M+Na) $^+$ calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{NaO}_3 = 259.1053$; found = 259.1058; (M -2-methylpropene +H) $^+$ calculated for $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3 = 181.0613$; found = 181.0612.

Statistical analyses

For all biological assays, data were presented as mean \pm SD from three independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferonni post-test using Prism software, version 3.03 (GraphPad, San Diego, CA). *p* values of ≤ 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), and the Réseau Québécois en Reproduction (RQR) to C. Reyes-Moreno. S. Cloutier is a recipient of a NSERC undergraduate summer scholarship award. J. Hamelin-Morrisette is supported by the RQR-CREATE scholarships program. J. Girouard holds a postdoctoral fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). D. Belgorosky holds a doctoral scholarship from the Emerging Leaders in the Americas Program from Canada.

References

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2015, CA: a cancer journal for clinicians, 65 (2015) 5-29.
- [2] Canadian Cancer Society's Advisory Committee on Cancer Statistics. Canadian Cancer Statistics 2014. , Toronto, ON: Canadian Cancer Society, (2014).
- [3] S. Brandau, H. Suttman, Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement, Biomed Pharmacother, 61 (2007) 299-305.
- [4] S.J. Dovedi, B.R. Davies, Emerging targeted therapies for bladder cancer: a disease waiting for a drug, Cancer metastasis reviews, 28 (2009) 355-367.
- [5] D.B. Thompson, L.E. Siref, M.P. Feloney, R.J. Hauke, D.K. Agrawal, Immunological basis in the pathogenesis and treatment of bladder cancer, Expert review of clinical immunology, 11 (2015) 265-279.
- [6] Z. Zhu, Z. Shen, C. Xu, Inflammatory pathways as promising targets to increase chemotherapy response in bladder cancer, Mediators of inflammation, 2012 (2012) 528690.
- [7] D.S. Michaud, Chronic inflammation and bladder cancer, Urol Oncol, 25 (2007) 260-268.
- [8] A. Ben-Baruch, Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators, Semin Cancer Biol, 16 (2006) 38-52.
- [9] L.M. Coussens, Z. Werb, Inflammation and cancer, Nature, 420 (2002) 860-867.
- [10] F. Colotta, P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda, A. Mantovani, Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability, Carcinogenesis, 30 (2009) 1073-1081.
- [11] A.F. Kantor, P. Hartge, R.N. Hoover, A.S. Narayana, J.W. Sullivan, J.F. Fraumeni, Jr., Urinary tract infection and risk of bladder cancer, Am J Epidemiol, 119 (1984) 510-515.
- [12] C. La Vecchia, E. Negri, B. D'Avanzo, R. Savoldelli, S. Franceschi, Genital and urinary tract diseases and bladder cancer, Cancer Res, 51 (1991) 629-631.

- [13] D.L. Lamm, R.F. Gittes, Inflammatory carcinoma of the bladder and interstitial cystitis, *J Urol*, 117 (1977) 49-51.
- [14] T. Cai, S. Mazzoli, F. Meacci, G. Tinacci, G. Nesi, E. Zini, R. Bartoletti, Interleukin-6/10 ratio as a prognostic marker of recurrence in patients with intermediate risk urothelial bladder carcinoma, *J Urol*, 178 (2007) 1906-1911;discussion 1911-1902.
- [15] S. Brandau, Tumor associated macrophages: predicting bacillus Calmette-Guerin immunotherapy outcomes, *J Urol*, 181 (2009) 1532-1533.
- [16] T. Hanada, M. Nakagawa, A. Emoto, T. Nomura, N. Nasu, Y. Nomura, Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer, *Int J Urol*, 7 (2000) 263-269.
- [17] C. Ayari, H. LaRue, H. Hovington, M. Decobert, F. Harel, A. Bergeron, B. Tetu, L. Lacombe, Y. Fradet, Bladder tumor infiltrating mature dendritic cells and macrophages as predictors of response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy, *European urology*, 55 (2009) 1386-1395.
- [18] H. Takayama, K. Nishimura, A. Tsujimura, Y. Nakai, M. Nakayama, K. Aozasa, A. Okuyama, N. Nonomura, Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma in situ after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation, *J Urol*, 181 (2009) 1894-1900.
- [19] M. Dufresne, G. Dumas, E. Asselin, C. Carrier, M. Pouliot, C. Reyes-Moreno, Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells, *Mol Immunol*, 48 (2011) 1556-1567.
- [20] G. Dumas, M. Dufresne, E. Asselin, J. Girouard, C. Carrier, C. Reyes-Moreno, CD40 pathway activation reveals dual function for macrophages in human endometrial cancer cell survival and invasion, *Cancer Immunol Immunother*, 62 (2013) 273-283.
- [21] B.B. Aggarwal, R.V. Vijayalekshmi, B. Sung, Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15 (2009) 425-430.
- [22] D. Belgorosky, Y. Langle, B. Prack Mc Cormick, L. Colombo, E. Sandes, A.M. Eijan, Inhibition of nitric oxide is a good therapeutic target for bladder tumors that express iNOS, *Nitric Oxide*, 36 (2014) 11-18.

- [23] A.J. Burke, F.J. Sullivan, F.J. Giles, S.A. Glynn, The yin and yang of nitric oxide in cancer progression, *Carcinogenesis*, 34 (2013) 503-512.
- [24] S.P. Hussain, P. He, J. Subleski, L.J. Hofseth, G.E. Trivers, L. Mechanic, A.B. Hofseth, M. Bernard, J. Schwank, G. Nguyen, E. Mathe, D. Djurickovic, D. Haines, J. Weiss, T. Back, E. Gruys, V.E. Laubach, R.H. Wiltrout, C.C. Harris, Nitric oxide is a key component in inflammation-accelerated tumorigenesis, *Cancer Res*, 68 (2008) 7130-7136.
- [25] I. Jung, E. Messing, Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression, *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, 7 (2000) 325-334.
- [26] E.O. Sandes, C. Lodillinsky, Y. Langle, D. Belgorosky, L. Marino, L. Gimenez, A.R. Casabe, A.M. Eijan, Inducible nitric oxide synthase and PPARgamma are involved in bladder cancer progression, *J Urol*, 188 (2012) 967-973.
- [27] D. Vasudevan, D.D. Thomas, Insights into the diverse effects of nitric oxide on tumor biology, *Vitam Horm*, 96 (2014) 265-298.
- [28] M. Coimbra, S.A. Kuijpers, S.P. van Seters, G. Storm, R.M. Schiffelers, Targeted delivery of anti-inflammatory agents to tumors, *Current pharmaceutical design*, 15 (2009) 1825-1843.
- [29] W.-S. Choi, P.-Y. Shin, J.-H. Lee, G.-D. Kim, The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells, *Cellular Immunol*, 280 (2012) 164-170.
- [30] A. Lau, G. Berube, C.H. Ford, Conjugation of doxorubicin to monoclonal anti-carcinoembryonic antigen antibody via novel thiol-directed cross-linking reagents, *Bioorg Med Chem*, 3 (1995) 1299-1304.
- [31] A. Lau, G. Berube, C.H. Ford, M. Gallant, Novel doxorubicin-monoclonal anti-carcinoembryonic antigen antibody immunoconjugate activity in vitro, *Bioorg Med Chem*, 3 (1995) 1305-1312.
- [32] U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, J.C. Howard, Cellular responses to interferon-gamma, *Annual review of immunology*, 15 (1997) 749-795.
- [33] S.M. Hurst, T.S. Wilkinson, R.M. McLoughlin, S. Jones, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, G.M. Fuller, N. Topley, S.A. Jones, Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation, *Immunity*, 14 (2001) 705-714.

- [34] Z. Xing, J. Gauldie, G. Cox, H. Baumann, M. Jordana, X.F. Lei, M.K. Achong, IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses, *J Clin Invest*, 101 (1998) 311-320.
- [35] P.C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen, F. Schaper, Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochem J*, 374 (2003) 1-20.
- [36] T. Clahsen, F. Schaper, Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration, *Journal of leukocyte biology*, 84 (2008) 1521-1529.
- [37] D. Frankova, Z. Zidek, IFN-gamma-induced TNF-alpha is a prerequisite for in vitro production of nitric oxide generated in murine peritoneal macrophages by IFN-gamma, *European journal of immunology*, 28 (1998) 838-843.
- [38] J. Carmichael, W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna, J.B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res*, 47 (1987) 936-942.
- [39] A. Dallagi, J. Girouard, J. Hamelin-Morrisette, R. Dadzie, L. Laurent, C. Vaillancourt, J. Lafond, C. Carrier, C. Reyes-Moreno, The activating effect of IFN-gamma on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation, *Cell Mol Immunol*, (2014).
- [40] S. Lemaire, M.P. Mingeot-Leclercq, P.M. Tulkens, F. Van Bambeke, Study of macrophage functions in murine J774 cells and human activated THP-1 cells exposed to oritavancin, a lipoglycopeptide with high cellular accumulation, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58 (2014) 2059-2066.
- [41] J. Auwerx, The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation, *Experientia*, 47 (1991) 22-31.
- [42] Z. Qin, The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature, *Atherosclerosis*, 221 (2012) 2-11.
- [43] M. Daigneault, J.A. Preston, H.M. Marriott, M.K. Whyte, D.H. Dockrell, The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages, *PloS one*, 5 (2010) 0008668.
- [44] V.T. Fabris, C. Lodillinsky, M.B. Pampena, D. Belgorosky, C. Lanari, A.M. Eijan, Cytogenetic characterization of the murine bladder cancer model MB49 and the derived invasive line MB49-I, *Cancer Genet*, 205 (2012) 168-176.

- [45] K. Leduc, V. Bourassa, E. Asselin, P. Leclerc, J. Lafond, C. Reyes-Moreno, Leukemia Inhibitory Factor Regulates Differentiation of Trophoblast-Like BeWo Cells Through the Activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP Kinase-Signaling Pathways, *Biol Reprod*, (2011).
- [46] M.B. Menon, N. Ronkina, J. Schwermann, A. Kotlyarov, M. Gaestel, Fluorescence-based quantitative scratch wound healing assay demonstrating the role of MAPKAPK-2/3 in fibroblast migration, *Cell Motil Cytoskeleton*, 66 (2009) 1041-1047.
- [47] B. Wiemer, D. D. Perrin and W. L. F. Armarego: Purification of Laboratory Chemicals. 3. Aufl., Oxford. Pergamon Press, 1988, 391 S., ISBN 0-08-034714-2, *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 17 (1989) 632-632.
- [48] W.C. Still, M. Kahn, A. Mitra, Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *The Journal of Organic Chemistry*, 43 (1978) 2923-2925.
- [49] S. Yoshitake, Y. Yamada, E. Ishikawa, R. Masseyeff, Conjugation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and rabbit antibodies using N-hydroxysuccinimide ester of N-(4-carboxycyclohexylmethyl)-maleimide, *Eur J Biochem*, 101 (1979) 395-399.
- [50] P. Hermentin, R. Doenges, P. Gronski, K. Bosslet, H.P. Kraemer, D. Hoffmann, H. Zilg, A. Steintraesser, A. Schwarz, L. Kuhlmann, et al., Attachment of rhodosaminylanthracycline-type anthracyclines to the hinge region of monoclonal antibodies, *Bioconjug Chem*, 1 (1990) 100-107.
- [51] D. Willner, P.A. Trail, S.J. Hofstead, H.D. King, S.J. Lasch, G.R. Braslawsky, R.S. Greenfield, T. Kaneko, R.A. Firestone, (6-Maleimidocaproyl)hydrazone of doxorubicin. A new derivative for the preparation of immunoconjugates of doxorubicin, *Bioconjugate Chemistry*, 4 (1993) 521-527.
- [52] N.D. Heindel, H.R. Zhao, R.A. Egolf, C.H. Chang, K.J. Schray, J.G. Emrich, J.P. McLaughlin, D.V. Woo, A novel heterobifunctional linker for formyl to thiol coupling, *Bioconjug Chem*, 2 (1991) 427-430.

Legend of Figures and scheme

Figure 1. Molecular structure of *N'*-[4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-benzoyl]-hydrazinecarboxylic acid *tert*-butyl ester (**1**) and of 4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-benzoic acid hydrazide hydrochloride (or 4-maleimidbenzoic acid hydrazide hydrochloride) (**1A**).

Figure 2. Representative images (**a**) and graphical analysis (**b**) showing the immunodetection of phosphorylated STAT1 and STAT3 in hMφs pretreated for 30 min with vehicle (DMSO) or compounds **1** and **1A**, and then washed and recovered immediately ($t = 0$) or after 30 min of activation with either 50 U/mL IFN γ or 25 ng/mL IL6. The ratio of phosphorylated/no phosphorylated proteins was calculated from densitometric analysis of each sample to evaluate the relative activation of pSTAT1 or pSTAT3. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denote significant differences between treatments.

Figure 3. Representative images (**a**) and graphical analysis (**b**) showing flow cytometry analysis to determine the expression level of MHC-II and CD40 surface antigens in resting and IFN γ -activated hMφs untreated and pretreated with compounds **1** (10 μ M) and **1A** (25 μ M). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denote significant differences between treatments.

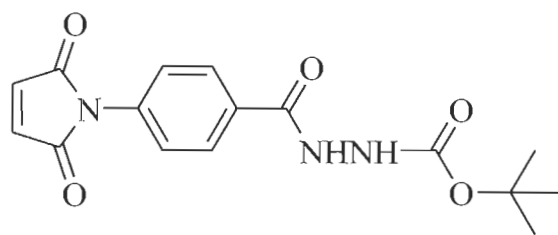
Figure 4. Representative images (**a**) and graphical analysis (**b**) showing scratch wound healing assays performed in hMφ monolayers cultured for 3 h with vehicle (DMSO) or compounds **1** (10 μ M) and **1A** (25 μ M), and then activated for 48 h with vehicle (PBS) or 25 ng/mL IL6. The images of the scratch were acquired at $t = 0$ h and $t = 48$ h by fluorescence microscopy. Five fields were taken randomly for each different treatment. All observations were performed at 5 \times magnification. Cell motility was expressed as percent (%) of control of motile cells at $t = 48$ h relative to motile cells at $t = 0$ h. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denote significant differences between treatments.

Figure 5. Graphical representation of NO production in the macrophage-like J774A.1 cells following a pro-inflammatory stimulation by IFN γ and TNF α after pretreatment with vehicle (DMSO) and the derivatives **1** and **1A**. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denote significant differences between treatments.

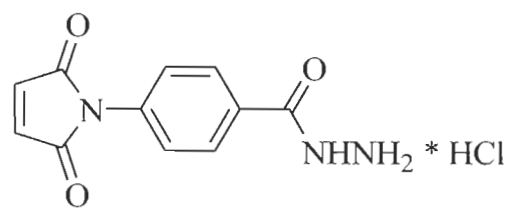
Figure 6. Graphical representation of relative cell viability on the murine BCa cell line MB49-I following a pro-inflammatory stimulation by IFN γ and TNF α after pretreatment with vehicle (DMSO) and anti-inflammatory derivatives **1** and **1A** at different concentrations. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denote significant differences between treatments.

Figure 7. Graphical representation of NO production by the murine BCa cell line MB49-I following a pro-inflammatory stimulation by IFN γ and TNF α after pretreatment with vehicle (DMSO) and derivatives **1** and **1A** and various precursor intermediates (**3**, **4**, **6**), reagents (**2**, PABA) and maleic anhydride (**MA**) as well as the left hand (**7**) and right hand (**9**) of the main anti-inflammatory compound **1**. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ denote significant differences between treatments.

Scheme 1. Reagents and conditions: a) Maleic anhydride (**MA**), dry acetone, methanol, 22 °C, 1 h; b) 1) Ac₂O, AcONa, 50 °C, 2 h; 2) H₂O, 70 °C, 2 h; c) 1) *iso*-butyl chloroformate, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h and 22 °C, 1 h; 2) *tert*-butyl carbazate, CH₂Cl₂, 22 °C, 12 h; d) HCl, dioxane, 22 °C, 5 h.



(1)



(1A)

Figure 1

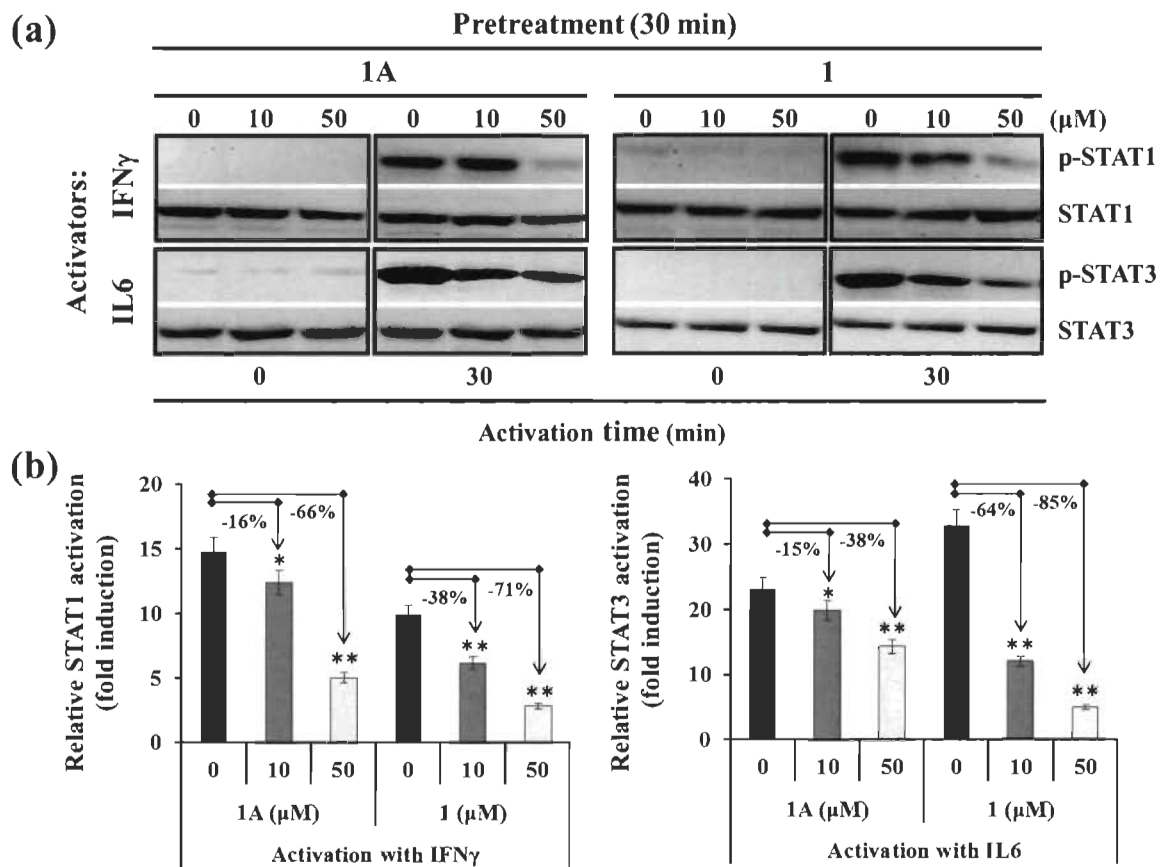


Figure 2

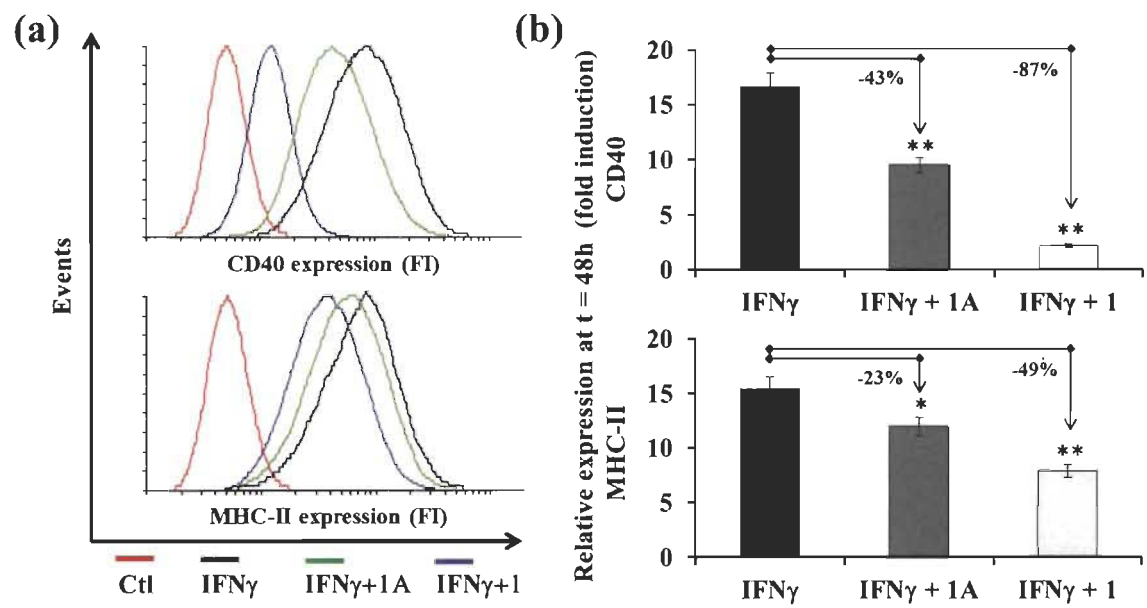


Figure 3

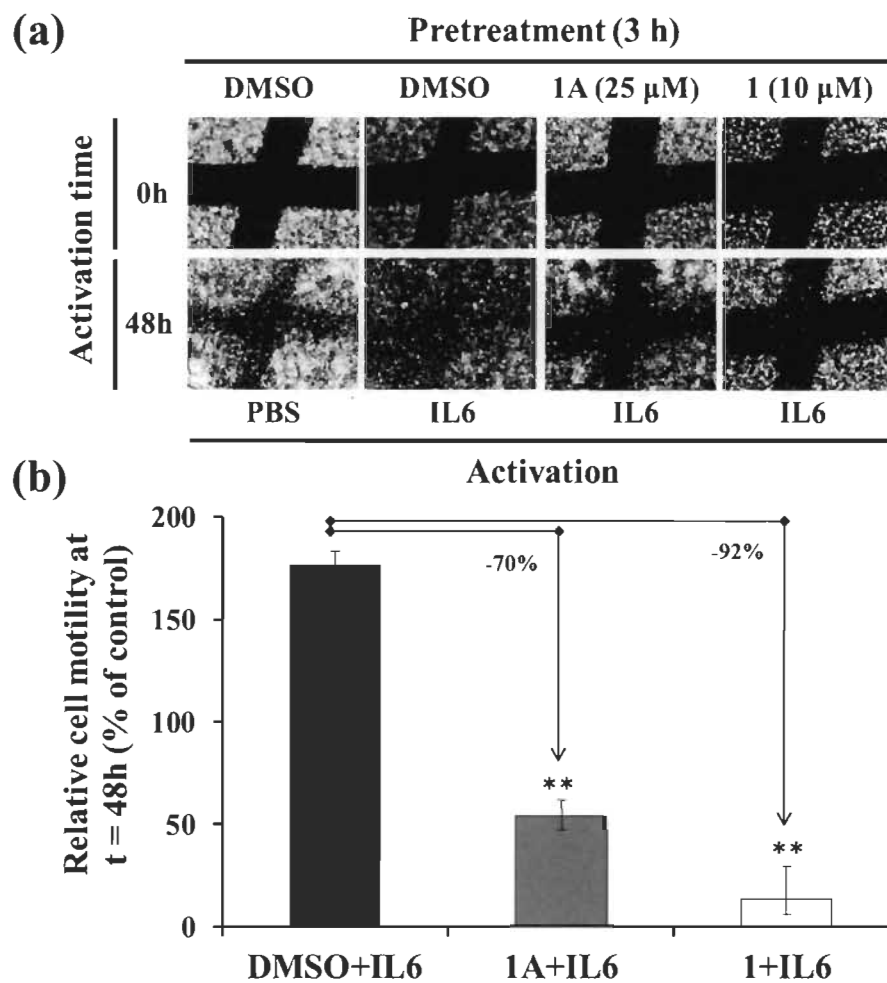


Figure 4

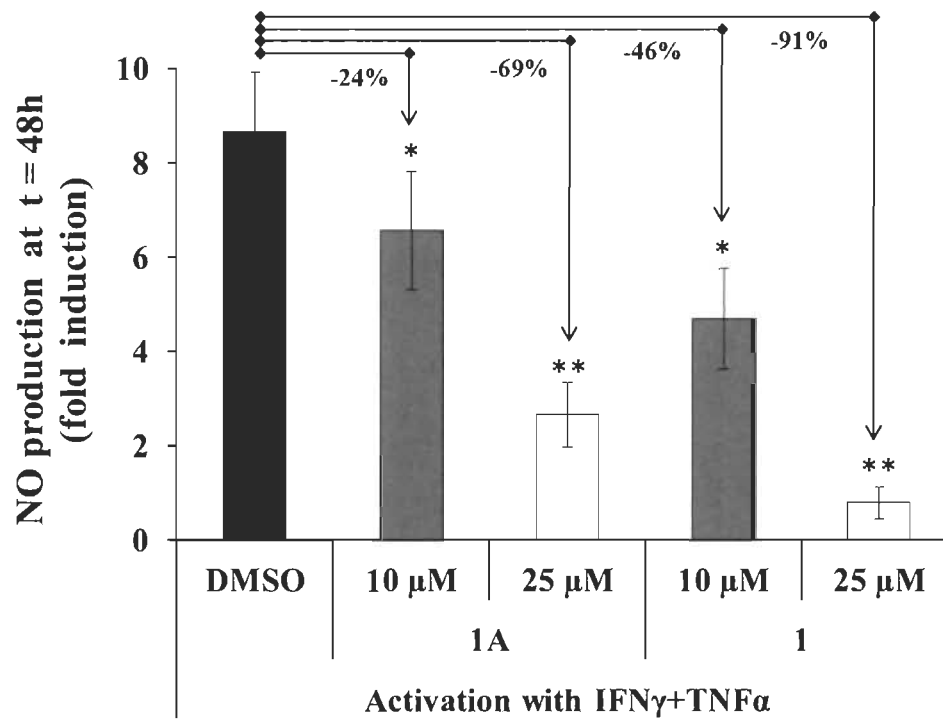


Figure 5

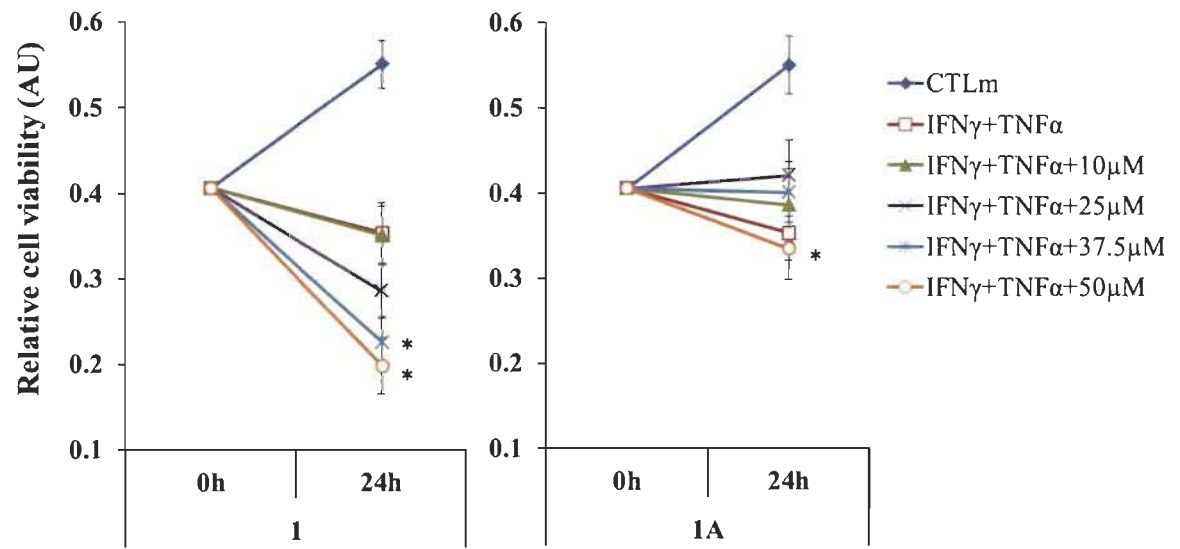


Figure 6

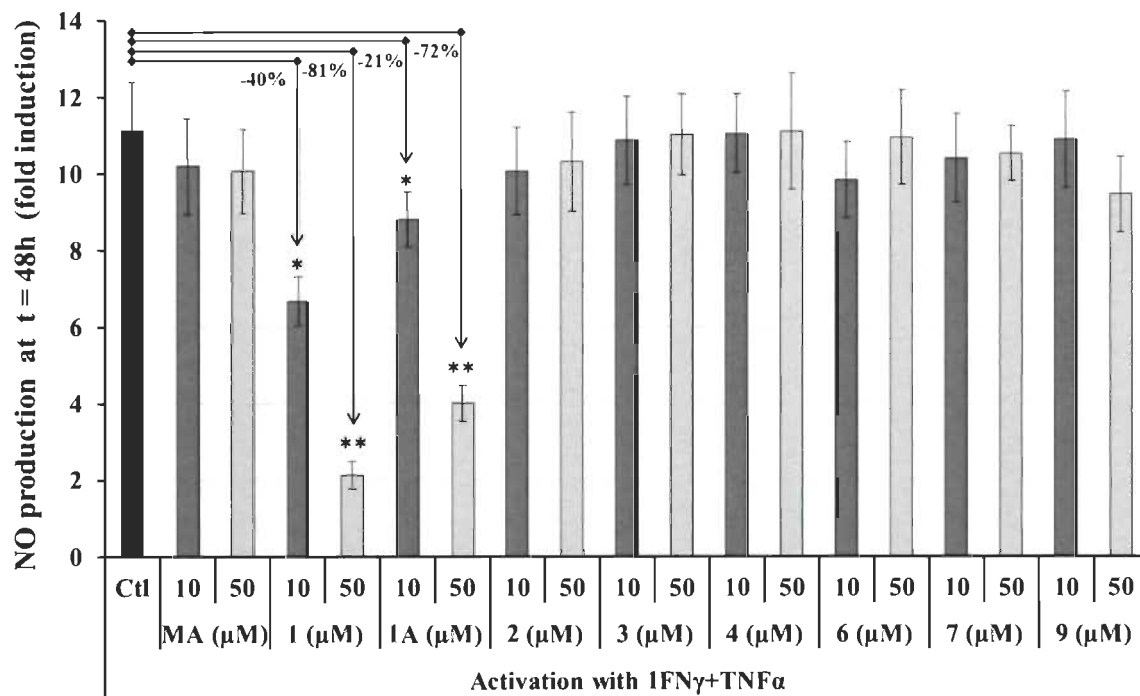
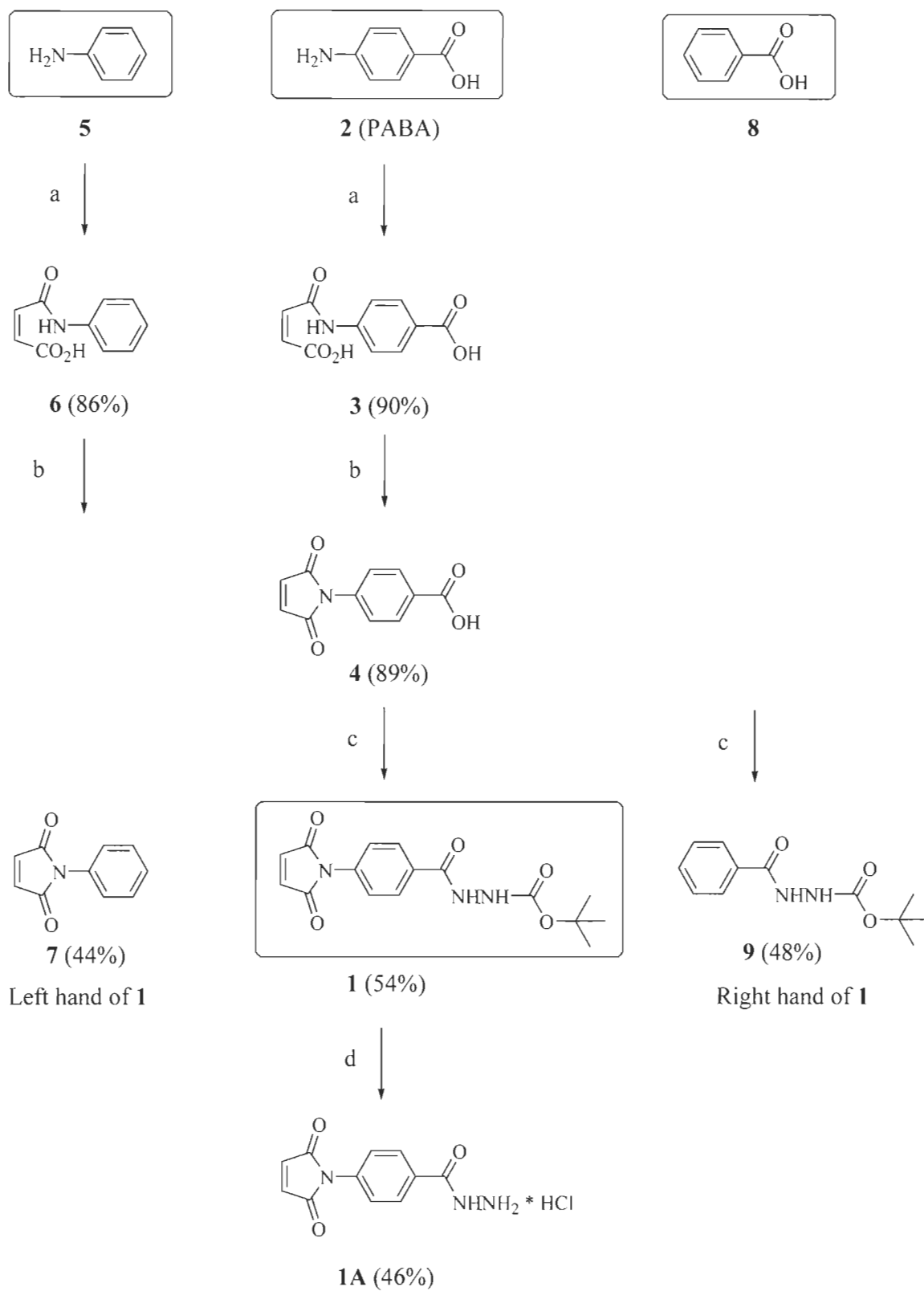


Figure 7



Scheme 1

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La recherche sur la reproduction chez l'humain est d'une importance cruciale pour permettre au plus grand nombre la possibilité de porter la vie. Comme mentionné précédemment, la proportion de femmes infertiles dans le monde est importante : selon les estimations actuelles, près de 10 % des femmes en âge de procréation éprouvent de problèmes de fertilité [233]. De nombreuses pathologies gestationnelles ont une composante inflammatoire, et il est actuellement proposé que l'utilisation de molécules anti-inflammatoires pourrait augmenter le succès reproductif, ou du moins réduire les conséquences à court et à long terme sur la qualité de vie des enfants nés de ces grossesses compliquées. Le but des recherches réalisées dans le cadre de cette thèse était d'étudier le potentiel et les mécanismes de deux molécules, l'une naturelle l'autre synthétique, dans l'inhibition de l'activation pro-inflammatoire de M ϕ s par des stimuli communément associés à des pathologies gestationnelles.

Afin de mieux intégrer les études de cette thèse à l'état actuel de connaissances sur l'infertilité féminine, la discussion portera sur les nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement des pathologies gestationnelles à composantes inflammatoires, sur l'utilité potentielle de LIF et DAB-1, ainsi que sur le potentiel mécanisme d'action de ces deux molécules.

4.1 Thérapies actuellement à l'étude

Étant donné le fait que l'inflammation et les infections sont les plus communes causes de l'extrême prématurité, c'est-à-dire la naissance entre 24 et 27 semaines de gestation, le ciblage de l'activation du système immunitaire dans la prévention et le traitement de la naissance prématurée est une stratégie attrayante [288]. La prématurité

reste la première cause de mort périnatale et la seconde cause de mortalité infantile, après la pneumonie, chez les enfants en bas de 5 ans [289], mais bien qu'un effort de recherche important ait été fourni dans les trois dernières décennies afin de comprendre les mécanismes sous-jacents et de trouver des traitements, l'incidence de la naissance prématurée reste inchangée dans les pays industrialisés (Figure 4.1) [288, 290].

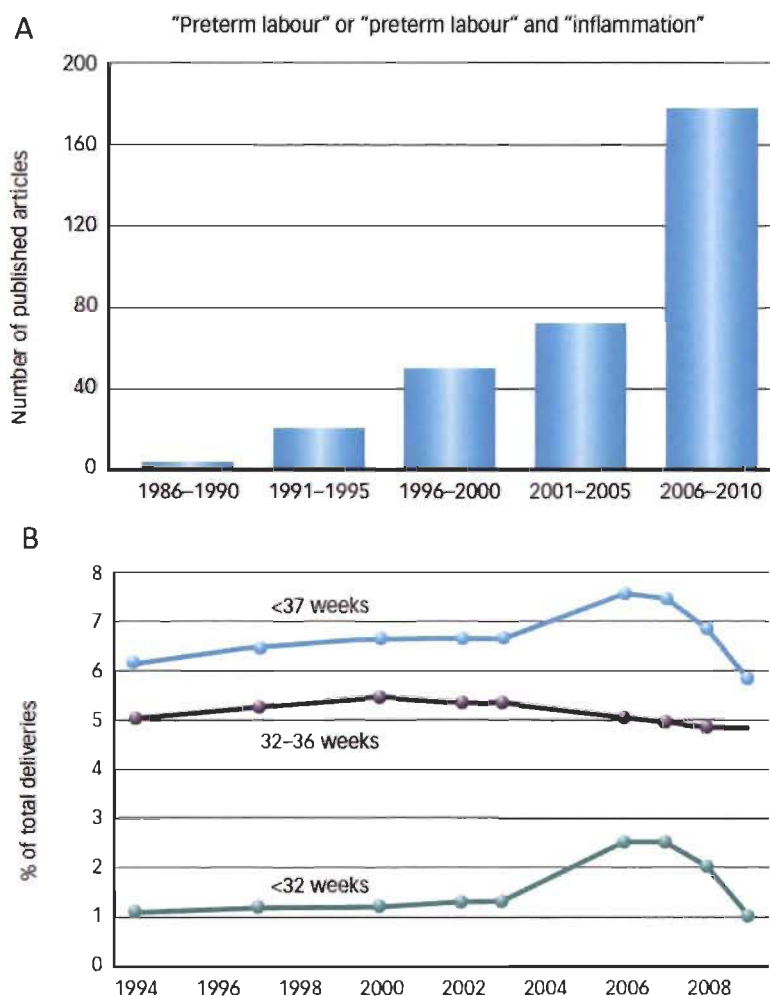


Figure 4.1 Recherche sur la composante inflammatoire de la naissance prématurée entre 1986 et 2010 et statistiques sur la naissance prématurée.

Bien que les études sur les mécanismes inflammatoires associés à la naissance prématurée soient de plus en plus nombreuses, aucune réduction dans l'incidence de celle-ci n'a été observée au Royaume-Uni depuis le début des années 2000. Tirée de Sykes et al. [288].

4.1.1 Progestérone

L'une des thérapies couramment utilisées pour prévenir la naissance prématurée est l'administration de progestérone (P₄). Plusieurs études ont montré que la P₄ pouvait retarder l'accouchement chez des femmes à risque d'accouchements prématurés [291-293]. Le mécanisme d'action par lequel la P₄ arrive à retarder la naissance ne soit pas complètement élucidé, bien qu'il soit généralement accepté que celle-ci réprime l'expression de facteurs impliqués dans la contraction du myomètre comme la connexine 43, MMP9 et COX-2 [294]. De plus, il est fort possible que l'effet anti-inflammatoire de la progestérone endogène contribue au maintien d'un environnement immunologique favorable au fœtus [288]. Comme l'expression de LIF est sous le contrôle de la progestérone, Aisemberg et al. ont proposé que cette cytokine puisse être un médiateur de l'effet protecteur de la progestérone dans un modèle murin de perte embryonnaire précoce [223]. Dans ce modèle, l'administration de LPS aux souris gestantes faisait diminuer les niveaux d'expression du récepteur de la progestérone dans l'utérus et semblait contribuer à la perte embryonnaire. LIF, à lui seul, arrivait à réduire les niveaux de NO produit en réponse au LPS dans des explants d'utérus murins [223]. Rappelons que la production de NO induite par le LPS est sous le contrôle de l'activation du TLR4 et du facteur de transcription NFκB, tous deux associés à la perte embryonnaire précoce et la naissance prématurée, même en l'absence d'infection (c.-à-d. une inflammation stérile). L'administration de P₄ aux patientes à risque d'accouchement prématuré semble donc appropriée. Toutefois, l'efficacité de cette approche semble limitée aux femmes ayant accouché prématurément de façon spontanée avant 34 semaines de gestation et sans rupture des membranes et, aux mieux, réduit d'un tiers le risque de naissance prématurée récurrente [295, 296].

4.1.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens

L'utilisation d'agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (*nonsteroidal anti-inflammatory drugs*; NSAIDs) a aussi été considéré dans le traitement de la naissance prématurée, principalement par son effet inhibiteur sur l'enzyme COX-2, facteur limitant

de la production des prostaglandines. Comme les prostaglandines sont impliquées dans la maturation cervicale et la contraction utérine, l'inhibition de leur production semble être un traitement valide pour retarder l'accouchement. Plusieurs agents anti-inflammatoires non stéroïdiens ont fait l'objet d'études cliniques, dont l'aspirine [297-299] et l'indométacine [300], mais ils ont offert des résultats mitigés. Ils arrivent à retarder l'accouchement de 48 h, le temps d'administrer des corticostéroïdes afin de permettre la maturation des poumons du fœtus, mais les bénéfices sur la santé fœtale de l'administration de ces composés anti-inflammatoires n'ont pas pu être démontrés [301]. De plus, leur utilisation est indiquée seulement pour les femmes à très haut risque d'accouchement prématuré, principalement en raison d'effets secondaires sur le fœtus [294]. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de COX-2 a montré que, bien que les effets secondaires sur les fœtus associés aux inhibiteurs non spécifiques de COX soient diminués, le risque de prématurité était paradoxalement augmenté [302].

D'autres composés comme des antagonistes de l'ocytocine, des bloqueurs des canaux calciques et β -mimétiques ont été testés afin de bloquer les contractions utérines et de retarder la naissance, mais tout comme pour les inhibiteurs de COX, le fait de retarder le travail n'arrive habituellement pas à contrecarrer les conséquences néfastes des inflammations intra-utérines et fœtales déjà en place et ayant déjà causé des dommages irréversibles sur la santé des enfants à naître [301]. Des molécules anti-inflammatoires comme le LIF et DAB-1 ayant un mécanisme d'action différent de l'inhibition des COX pourraient alors, certainement, diminuer l'inflammation à l'origine de la naissance prématurée, plutôt que de simplement retarder l'accouchement.

4.1.3 Prostaglandines anti-inflammatoires

Bien que les PGs soient habituellement associées à l'inflammation et, dans le cas de la gestation, à l'initiation du travail, plusieurs membres de cette famille ont des effets anti-inflammatoires. Par exemple, dans un modèle *in vitro* utilisant des fibroblastes synoviaux isolés de patients atteints d'arthrite rhumatoïde, la PGE₂ inhibe la translocation nucléaire de p50, une sous-unité du facteur de transcription NF κ B, en plus de diminuer

l'affinité avec laquelle ce facteur de transcription se lie à l'ADN [303]. La PGD₂, produite par des trophoblastes villosités en réponse à des stimuli inflammatoires *in vitro*, a aussi une activité anti-inflammatoire en inhibant la production d'IL-6 par ces mêmes cellules [304]. La PG 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15d-PGJ₂) a un effet anti-inflammatoire par l'inhibition de NF κ B dans les amniocytes, les myocytes et les monocytes sanguins dans des cultures *in vitro* [301]. Ces résultats suggèrent un intérêt comme potentiels agents thérapeutiques, mais aucune étude clinique n'a été réalisée à ce jour avec cette molécule en raison de son insolubilité et instabilité en solution aqueuse [305]; seulement sont rapportées des études avec des cellules et explants, ainsi que des essais *in vivo* réalisés avec des modèles animaux [306-308]. DAB-1, par son inhibition de l'activation de NF κ B dans les M ϕ s humains (résultats non présentés), pourrait alors être une molécule candidate intéressante pour traiter l'inflammation menant à la naissance prématurée.

4.2 Le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules anti-inflammatoires

Un effort de recherche considérable est déployé pour trouver de nouvelles molécules anti-inflammatoires, d'origine naturelle ou de synthèse, depuis quelques décennies. Ces molécules ont des mécanismes d'action divers et peuvent diminuer l'inflammation en inhibant un ou plusieurs enzymes, protéines, facteurs ou hormones impliqués dans le processus inflammatoire. Cependant, l'industrie pharmaceutique n'a pas investi dans le développement de nouvelles molécules pour le traitement de pathologies gestationnelles, probablement dû au risque de toxicité pour le fœtus [250]. Il est donc primordial de mieux comprendre les mécanismes moléculaires menant aux complications gestationnelles et d'identifier de nouvelles molécules ayant le potentiel d'agir sur ces cibles.

4.2.1 Nouvelles cibles moléculaires pour le traitement des complications gestationnelles à composante inflammatoire

Dans le contexte d'inflammation gestationnelle, les cibles intéressantes à inhiber par une approche pharmacologique sont principalement COX-2 et iNOS, produisant respectivement les PGs et le NO impliqués dans la perte embryonnaire précoce et

l'accouchement prématuré. À ces stratégies s'ajoutent également d'autres molécules indiquées pour le traitement d'autres pathologies inflammatoires et qui pourraient avoir une utilité dans le traitement de ces pathologies gestationnelles (Tableau 1.1).

NFκB est aussi considéré comme une cible intéressante à inhiber pour à la fois retarder la naissance et réduire l'exposition du fœtus à l'inflammation, laquelle peut avoir des conséquences dévastatrices sur la santé de l'enfant à long terme [301]. Le facteur de transcription NFκB, médiateur central de la réponse inflammatoire dans les leucocytes [309], contrôle l'expression de plusieurs gènes associés à l'initiation du travail, notamment ceux codant pour COX-2, le récepteur de l'ocytocine. L'existence du *fœtal inflammatory response syndrome* (FIRS) a été proposée par Gotsch en 2007 qui a décrit l'état inflammatoire systémique des fœtus et l'élévation sérique d'IL-6 [310]. Les mêmes voies de signalisation impliquées dans la naissance prématurée, comme l'activation du facteur de transcription NFκB, semblent jouer un rôle dans les dommages cérébraux causés par l'inflammation chez le fœtus [311].

4.2.2 Le potentiel de DAB-1 pour traiter l'inflammation

Les DABs testés dans notre laboratoire pourraient, ultimement, faire partie de ces molécules appelées à traiter l'inflammation gestationnelle, en monothérapie ou en combinaison avec des molécules actuellement utilisées en clinique. Nos études montrent que les DABs réduisent efficacement l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires dans les Mφs comme IFNγ/Stat1 et IL-6/Stat3 (Chapitre III), ainsi que l'expression de l'enzyme iNOS et la production de NO induites par le LPS (Annexe A) dans divers types cellulaires non limités au système immunitaire. Dans les Mφs murins, une forte activation d'iNOS et une production excessive de NO est au cœur du mécanisme de la perte embryonnaire précoce dans le modèle murin d'avortement induit par le LPS [312], et une expression ou activité accrue de l'enzyme iNOS pourrait contribuer à la pathogenèse de la PE chez l'humain [313]. Aucune molécule présentement approuvée pour les femmes enceintes n'inhibe l'activité d'iNOS, mais DAB-1, en diminuant son expression, pourrait s'avérer un outil thérapeutique utile.

Selon les résultats présentés dans l'annexe A, DAB-1 peut réduire la production de NO dans les Mφs murins en réponse au LPS et des travaux non présentés nous ont permis de déterminer que l'inhibition de l'activation de NFκB était probablement responsable de la baisse d'expression d'iNOS et de la production de NO dans ces Mφs. Le traitement avec DAB-1, en régulant négativement NFκB, pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante, non seulement pour éviter la perte embryonnaire précoce induite par les hauts niveaux d'activation de la voie iNOS/NO lors d'infections, mais aussi en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires et les dommages au fœtus associés à l'activation dérégulée de NFκB dans l'accouchement prématuré. De plus, DAB-1 inhibe STAT3 activé par IL-6 (Chapitre 3), dont le gène est fortement régulé par NFκB. Ainsi, si DAB-1 était administré de façon concomitante avec des inhibiteurs de COX, cette nouvelle thérapie double aurait le potentiel de retarder le travail tout en diminuant les dommages au fœtus induit par l'inflammation intra-utérine ou fœtale.

Le mécanisme moléculaire d'action des DABs étant encore inconnu, des études supplémentaires seront nécessaires afin de connaître le potentiel de cette molécule pour traiter l'inflammation gestationnelle. Les études réalisées par notre laboratoire sont toutefois encourageantes; l'étude de toxicité subchronique de DAB-1 ayant démontré que la viabilité et le fonctionnement des organes vitaux de souris n'ont pas été affectés par le traitement avec les DABs [314]. De plus, nous avons démontré que les DABs, à des doses non toxiques, exercent un effet anti-inflammatoire dans le modèle d'inflammation aigüe induite par la carraghénane au niveau de la patte des souris, probablement en inhibant l'expression d'iNOS et la production de NO (Figure A.2; Annexe A). Évidemment, des tests devront être réalisés sur des modèles murins de pathologies gestationnelles, comme celui d'avortement induit par le LPS, pour déterminer si les DABs réduisent efficacement la perte embryonnaire. Nous devons aussi déterminer s'il y a un effet sur le développement normal des souriceaux.

4.2.3 DAB-1 dans le traitement d'autres pathologies

De façon plus générale, le ciblage des voies pro-inflammatoires IFN γ /Stat1 et NF κ B/iNOS a un intérêt thérapeutique plus large que pour l'inflammation gestationnelle, par exemple pour le traitement des maladies cardiovasculaires [315] et du cancer [316]. Seulement une molécule inhibant potentiellement l'activation de Stat1 est actuellement approuvée par la FDA [317], et, bien que plusieurs molécules sur le marché semblent avoir un effet sur la voie NF κ B, aucune n'est utilisée en clinique spécifiquement pour cela [318]. Une molécule permettant d'inhiber Stat1 et NF κ B pourrait, par exemple, être utilisée en combinaison avec un agent chimiothérapeutique comme le cisplatine et permettre de diminuer le développement de la chimiorésistance qui est dans plusieurs cas associée à l'activation de ces deux facteurs de transcription [319, 320].

De plus, comme de nombreux cancers se développent à la suite d'une inflammation chronique, l'utilisation d'anti-inflammatoires serait pertinente pour la prévention de ces types de maladies. Des méta-analyses récentes ont d'ailleurs mis en évidence les effets préventifs de l'aspirine dans la réduction de l'incidence [321], de la mortalité [322] et de la métastase [322] des cancers gastro-intestinaux et d'autres cancers, en particulier les adénocarcinomes [323]. Le mécanisme généralement accepté implique l'effet de ces anti-inflammatoires sur la production des prostaglandines, mais il est probablement dû à une combinaison d'effets au niveau du microenvironnement tumoral dont l'inhibition de la synthèse et la relâche de TNF α par les M ϕ s [324, 325]. Bien que DAB-1 ne puisse inhiber COX-2 (Annexe A), il inhibe l'activation de NF κ B par le TNF α dans les cellules tumorales [314] et dans les M ϕ s (résultats non publiés), en plus de réduire l'expression de gènes induits par TNF α dont l'enzyme iNOS [314]. Le traitement préventif ou curatif du cancer avec DAB-1 sera alors à considérer en clinique, seul ou en combinaison avec l'aspirine ou des inhibiteurs de COXs.

4.2.4 Pistes sur les mécanismes d'actions de DAB-1

La recherche du mécanisme moléculaire d'action de DAB-1 est en cours dans notre laboratoire. Toutefois, nous avons des indices nous permettant de spéculer sur de probables cibles de cette molécule. Comme rapporté dans l'article présenté au chapitre II et dans les résultats présentés dans l'annexe A, DAB-1 inhibe l'activation de Stat1 par l'IFN γ , celle de Stat3 par l'IL-6 ainsi que l'expression d'iNOS et la production de NO induites par la combinaison IFN γ et LPS. De plus, des résultats produits par notre laboratoire, mais non présentés dans cette thèse, ont permis de montrer que la phosphorylation d'I κ B par TNF α , de Stat5 par GM-CSF et de Stat6 par IL-4 sont également inhibés avec par un prétraitement avec cet anti-inflammatoire.

Un mécanisme qui pourrait expliquer l'effet de DAB-1 sur plusieurs voies de signalisation serait une perturbation de la fluidité membranaire ou une déstructuration de radeaux lipidiques membranaires (*lipid rafts*), ces structures ayant été identifiées par la découverte de portions de la membrane plasmique résistantes aux détergents anioniques comme le Triton X-100 [326]. Ces derniers seraient des îlots riches en cholestérol faisant partie de la membrane cellulaire et ayant un rôle dans la signalisation cellulaire en regroupant et séparant les composantes des récepteurs. Par exemple, les récepteurs IFNGR1 et IFNGR2, après la liaison avec IFN γ , seraient rapidement relocalisés dans les *lipid rafts* [327]. Des M ϕ s murins infectés par *Leishmania donovani* subissent une déplétion du cholestérol membranaire, ce qui entraîne un arrêt de la signalisation à l'IFN γ . Les auteurs ont montré qu'en fournissant du cholestérol aux cellules par des liposomes, la signalisation à l'IFN γ était restaurée [328]. Il a également été démontré que le recrutement du récepteur de TNF α (TNFR1) dans les *lipid rafts* est essentiel pour activer NF κ B [329]. De plus, une formation déficiente des *lipid rafts* chez des patients atteints de myélodysplasie est associée à une réduction de la signalisation à GM-CSF dans leurs neutrophiles [330]. Nous n'avons pas de données appuyant cette hypothèse pour le moment ni de connaissances sur l'identité des récepteurs ou molécules liés par DAB-1 ou leur localisation cellulaire, mais des projets en développement dans notre laboratoire se pencheront sur la possibilité que DAB-1 perturbe la fluidité membranaire.

Un autre mécanisme qui pourrait être impliqué dans l'effet de DAB-1 observé sur les cellules est l'activation ou la stabilisation des molécules entravant la signalisation des Stat1 et de Stat5, comme les protéines SOCS ou les phosphatases comme les PTPs. De plus, l'activité des kinases spécifiques comme les protéines JAK1 et JAK3 de la voie de Stat1 et Stat5, par exemple, pourrait être affectée. Ces pistes devront être considérées dans la recherche du mécanisme d'action des DABs.

4.3 LIF comme traitement anti-inflammatoire naturel

4.3.1 Implantation et inflammation

L'environnement immunitaire local est maintenant considéré comme indicateur du succès de l'implantation embryonnaire, surtout lors du transfert d'embryons après une fertilisation *in vitro* [331]. En effet, il a été démontré qu'une blessure préalable à la fertilisation *in vitro* au niveau de l'endomètre par une biopsie ou un curetage doublait les chances d'une grossesse réussie [332]. Dans ce contexte, l'utilisation d'anti-inflammatoires préalablement à la conception peut s'avérer un facteur de risque pour l'avortement spontané, ou fausse couche. L'implantation embryonnaire étant associée avec une inflammation intra-utérine, il a été rapporté que la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens avant la conception augmentait de 2,7 à 7 fois le risque de fausse couche [160, 333].

Bien que la blessure à l'endomètre soit aujourd'hui pratique courante pour augmenter le succès de ces procédures de procréation assistée lors d'échecs répétés d'implantation [334], une autre procédure potentiellement plus efficace a été proposée pour induire la réponse inflammatoire. D'après les conclusions encourageantes de plusieurs études rapportant un effet bénéfique de l'administration de monocytes sanguins autologues (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMCs) pour augmenter le succès de l'implantation [335, 336], une équipe en Grèce a récemment publié une étude pilote qui s'intéressait à l'utilisation de PBMCs autologues traités *ex vivo* avec de la *corticotropin-releasing hormone* (CRH) [334]. Comme prévu, ils ont observé une amélioration du

succès de l'implantation chez les femmes traitées. Il n'a pas pu être déterminé si, en revanche, seule l'administration de PBMCs comparativement aux PBMC traités avec hCG ou CRH était utile chez les femmes ayant eu plusieurs échecs d'implantation [334], le mécanisme d'action exact par lequel les PBMCs agissent dans ce cas n'ayant pas été élucidé à ce jour. Il a toutefois été suggéré que les PBMCs pourraient préparer le stroma décidualisé à l'invasion du blastocyste et favoriser un profil immunitaire contribuant à l'infiltration de ce stroma par les cellules trophoblastiques [337].

4.3.2 LIF comme traitement pour augmenter le succès de l'implantation

LIF a été utilisé dans au moins une étude clinique visant à déterminer si, par l'injection sous-cutanée de LIF recombinant, le succès de l'implantation et de la grossesse subséquente pouvait être amélioré. Bien que la supplémentation en LIF n'ait pas eu d'effet négatif sur les enfants à naître, les auteurs ont observé une réduction du nombre d'embryons implantés chez les femmes ayant reçu le traitement (17,6 %), comparativement au placebo (34 %) [338]. Il est possible que la dose, la cinétique ou la méthode d'administration ne soient pas optimales, alors il serait nécessaire de faire plus d'études pour conclure.

4.3.3 LIF comme traitement potentiel pour les complications gestationnelles autre que l'échec d'implantation

LIF est impliqué dans plusieurs événements gestationnels précédant et suivant l'implantation embryonnaire comme la décidualisation [339], la croissance du blastocyste [340], l'invasion du trophoblaste [341] et le recrutement de certaines populations de cellules immunitaires [342]. Si les autres rôles de LIF sont tout aussi importants, seulement son rôle dans la modulation immune et l'invasion du trophoblaste sera discuté dans la présente section.

4.3.3.1 LIF comme régulateur des leucocytes utérins

LIF aurait un rôle à jouer sur la présence et la fonction des Mφs utérins en période de gestation. Des études avec des souris déficientes en LIF ont permis de montrer que la décidue de ces souris présente des différences notables au niveau des populations leucocytaires au même stade gestationnel : les utérus de souris LIF^{-/-} comportaient un nombre inférieur de Mφs et leur localisation était différente par rapport à la décidue des souris WT [343]. Dans ce cas, LIF agirait, directement ou indirectement, de chimioattractant. Une hausse de l'expression de l'ARNm de LIF a aussi été détectée dans les leucocytes déciduaux de femmes enceintes, ce qui suggère que LIF pourrait médier les interactions entre ces cellules et les trophoblastes invasifs [81, 344]. Le modèle théorique de Gil Mor et al. propose que les trophoblastes, par la sécrétion de facteurs à proximité et dans la circulation sanguine maternelle, recrutent des cellules immunitaires, les éduquent et induisent dans celles-ci une réponse favorisant leur développement [171]. Dans ce contexte, des études antérieures réalisées dans notre laboratoire ont montré que les trophoblastes stimulés avec LIF produisent de facteurs solubles capables d'influencer le profil des Mφs [138]. Ces Mφs répondaient moins aux signaux pro-inflammatoires comme l'IFN γ et étaient plus mobiles. Le mécanisme d'action de cette régulation des Mφs peut s'expliquer, en partie, par l'induction de la production d'IL-10 par les trophoblastes en réponse au traitement avec LIF; des anticorps bloquant IL-10 ont réussi à inhiber partiellement ces effets (Figure 4.2) [138]. De plus, les résultats présentés au chapitre II suggèrent que LIF peut, directement, avoir un effet régulateur sur l'activation du Mφ par l'IFN γ , alors il est possible que LIF soit un autre facteur produit par les trophoblastes qui agirait en concert avec IL-10 pour inhiber l'activation de Stat1 dans les Mφs. Cette piste sera explorée dans le futur.

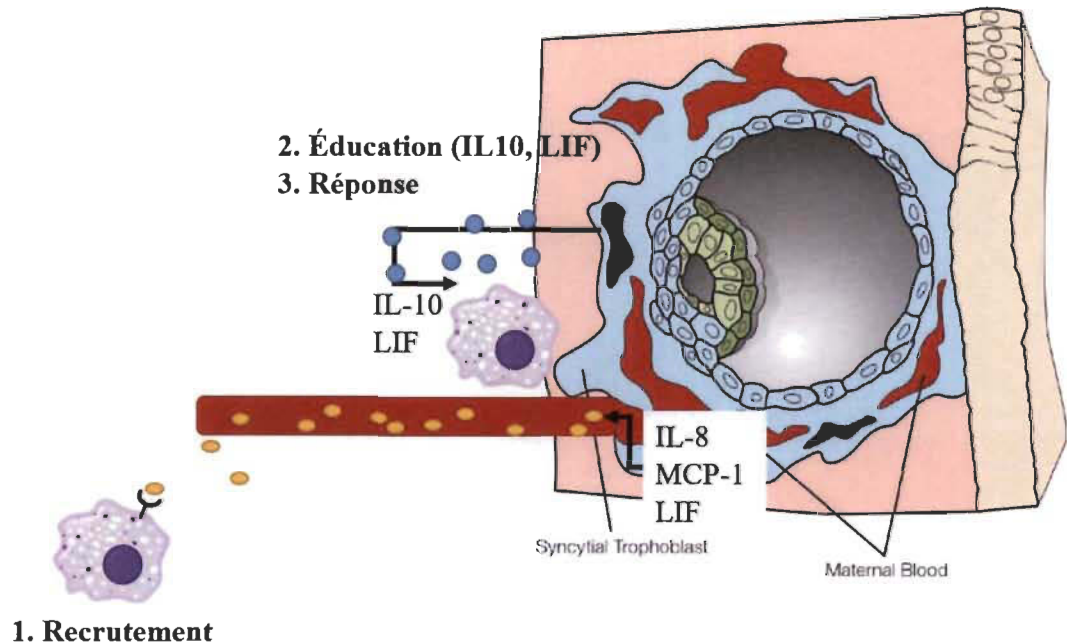


Figure 4.2 Rôle du trophoblaste dans le recrutement et l'éducation des Mφ utérins.

En se basant sur le modèle théorique de Gil Mor [171] et les travaux réalisés par Dallagi et al. [138] et Hamelin-Morrisette et al. (présenté au chapitre II), LIF aurait un rôle à jouer dans le recrutement du Mφ et dans la modification de son profil inflammatoire en inhibant son activation par la cytokine $IFN\gamma$, présente dans l'environnement fœto-maternel et qui induit un phénotype pro-inflammatoire et toxique pour le trophoblaste. Cette activation pro-inflammatoire est associée à plusieurs pathologies gestationnelles. Image basée sur Mor et al. [171].

4.3.3.2 LIF et invasion trophoblastique

Les cellules trophoblastiques envahissent la décidue maternelle, suivant l'implantation embryonnaire. Ce processus implique la dégradation de la matrice extracellulaire et les membranes basales par l'action d'enzymes protéolytiques comme MMP2, MMP9 et MMP14 [341]. LIF, par son activation de Stat3, stimule l'invasion des trophoblastes [187]. Suman et son équipe, après une étude avec des trophoblastes immortalisés HTR8/SVneo, ont déterminé que le traitement avec LIF augmentait l'expression de pappalysin 1 et diminuait celle des inhibiteurs naturels des MMPs, TIMP (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*) 1, 2 et 3 [345]. L'équipe de Amy Winship a été la première à montrer le rôle de LIF comme médiateur dans l'invasion

trophoblastique durant le développement du placenta de souris *in vivo* [344]. Dans un modèle murin, l'inhibition de LIF à la mi-gestation provoque une invasion anormale des cytotrophoblastes extravilloux et un remodelage incomplet des artères spiralées. Chez l'humain, une invasion anormale du trophoblaste et un remodelage déficient des artères spiralées sont associés à des complications gestationnelles comme la PE et le retard de croissance intra-utérin [346]. Les résultats présentés dans le chapitre II suggèrent que l'effet de LIF sur les M ϕ s peut avoir une action indirecte sur l'invasion des trophoblastes. Ceux-ci, lorsque cultivés avec des M ϕ s activés avec IFN γ , perdaient de leur potentiel invasif. L'incubation avec des M ϕ s traités avec IFN γ , mais désactivés avec LIF permettait un retour de leur potentiel invasif. Dans un contexte où le remodelage des artères spiralées utérines implique la présence d'IFN γ [38, 347], et où cette même cytokine entrave l'invasion du trophoblaste et cause un phénotype des M ϕ s ne supportant pas cette invasion, LIF pourrait favoriser l'invasion adéquate du trophoblaste et protéger contre des complications gestationnelles comme la PE et le retard de croissance intra-utérin causés par une invasion insuffisante du trophoblaste [38].

4.3.4 Pistes sur les mécanismes d'action multiples et contexte-dépendants de LIF

4.3.4.1 Mécanismes de LIF sur la régulation des M ϕ s

LIF aurait un potentiel thérapeutique par son effet anti-inflammatoire. Il est actuellement étudié comme agent neuroprotecteur qui pourrait servir à diminuer les conséquences d'un accident vasculaire cérébral (AVC). Dans une étude récente, il a été démontré que LIF réduisait la production de cytokines pro-inflammatoires tout en augmentant la production de cytokines anti-inflammatoires par les monocytes sanguins et les M ϕ s tissulaires, protégeant ainsi les neurones d'une dégénérescence à la suite d'une ischémie initiale [348]. Tout comme les auteurs de cette étude, nos études démontrent que LIF réduit la production de TNF α par les M ϕ s activés par IFN γ [349], mais il est fort probable que nous détecterons aussi une diminution de la production d'autres cytokines pro-inflammatoires ou une augmentation de cytokines anti-inflammatoires par les M ϕ s après traitement avec LIF. Par contre, la faible demi-vie *in vivo* de LIF recombinant

pourrait limiter son potentiel thérapeutique, mais plusieurs méthodes existent pour remédier à cela, dont la liaison de la cytokine à une autre molécule comme le polyéthylène glycol [350] ou des fragments d'anticorps humanisés [351]. Plus récemment, des stratégies prometteuses d'encapsulation dans de nanoparticules ont été proposées et pourraient prolonger grandement les effets de la cytokine [348], en plus d'offrir la possibilité de cibler certains types cellulaires [352].

LIF est aussi étudié dans un contexte du cancer. Dans ce cas, le traitement avec LIF ne serait pas une solution, car LIF induit, chez le M ϕ , un phénotype TAM-*like*, mais ces études offrent des pistes sur le mécanisme d'action de LIF [353]. Les TAMs dérivent de monocytes sanguins circulant et sont présents dans le microenvironnement tumoral. Ils forment un sous-type de M ϕ s-M2 qui possède des propriétés immunosuppressives; ils n'expriment que de faibles niveaux de molécules co-stimulatrices à leur surface (CD80 et CD86) et un niveau élevé d'une molécule inhibitrice de la réponse adaptative (B7-H4) [354]. Les TAMs produisent aussi des facteurs comme le VEGF, MMP9 et IL-10, favorisant l'angiogenèse, l'invasion et l'évasion du système immunitaire par les cellules tumorales [355-357]. L'équipe de Jeannin propose que, comme LIF est produit de façon constitutive dans l'utérus et les poumons, il induit un phénotype promouvant la tolérance immune. Toutefois, lors d'infections, il doit y avoir un interrupteur afin de réactiver le potentiel microbicide des M ϕ s [353]. Dans le contexte de la repolarisation de ces M ϕ s en M1, ce phénotype étant considéré comme souhaitable pour diminuer la progression tumorale, les auteurs ont utilisé IFN γ [353]. Ceux-ci ont montré que, bien que LIF pouvait induire le phénotype TAM-*like* dans les M ϕ s traités, IFN γ arrivait à repolariser ceux-ci en M ϕ s-M1. Dans un contexte gestationnel, il serait intéressant d'utiliser un anti-inflammatoire comme le LIF qui ne mettrait pas en péril les défenses de la mère, sans quoi le fœtus pourrait être compromis en cas d'infection.

4.3.4.2 Mécanisme moléculaire de LIF sur la régulation de Stat1

Les résultats présentés au chapitre II suggèrent que LIF peut diminuer l'activation de Stat1 induit par l'IFN γ . Quelques études se sont penchées sur la potentielle interaction

entre les facteurs de transcriptions Stat1 et Stat3, qui jouent des rôles antagonistes dans les cellules. Par exemple, il a été démontré, par la production de cellules Stat3^{-/-}, que l'activation de Stat1 était prolongée en l'absence de Stat3 [358]. Cela suggère qu'un des rôles de Stat3, dans les cellules normales, est de réguler l'activité de Stat1 [359]. Un mécanisme récemment identifié par lequel Stat3 pourrait réguler l'activation de Stat1 est celui établi par l'action de la protéine désSUMOylante SEMP1 (Sentrin/SUMO-specific protease 1) sur la phosphatase PTP1B [360]. Dans les Mφs déficients en SEMP1, il y a une baisse marquée de l'activation de la voie Stat1 par IFN γ [360]. Il semble que, dans ce modèle, l'absence de SEMP1 cause un haut niveau de SUMOylation de PTP1B et que celle-ci perd son activité déphosphorylante sur Stat3. Cette suractivation de Stat3 mène à une réduction de l'activation de Stat1 par l'induction de l'expression de SOCS3, ce qui, conséquemment, réduit la signalisation à l'IFN γ .

Sans que ce mécanisme puisse expliquer comment l'activation de Stat1 est modulée par LIF dans les Mφs de notre modèle, il a été rapporté que Stat3 se lie au promoteur du gène de Stat1 et régule négativement son expression, du moins dans un modèle de lymphome diffus à grandes cellules B [361]. De plus, l'expression dans ces cellules d'une forme mutée et constitutivement active de Stat3 permet d'inhiber l'expression des gènes sous le contrôle de l'IFN γ , notamment IRF7 et IRF9 (*interferon-regulatory factor-7* et *-9*), en plus de supprimer la phosphorylation de Stat1. Il n'est pas impossible, alors que LIF puisse diminuer l'expression de gènes stimulée par IFN γ /Stat1 en diminuant l'expression de Stat1 en plus de diminuer son activation dans les Mφs; c'est une piste qu'il nous reste à explorer.

4.3.4.3 Mécanisme moléculaire de LIF sur la régulation de Stat5

Dans les cellules T normales, la stimulation avec IL-6 ou IL-21 induit l'activation de Stat3 et une diminution très rapide de la phosphorylation constitutive de Stat5 [362]. Dans les cellules T Stat3-déficientes, un niveau de phosphorylation constitutif de Stat5 supérieur aux cellules de phénotype sauvage était observé [362]. Dans ce modèle, Stat3 semble aussi jouer un rôle essentiel pour contrecarrer les effets d'IL-2 sur

l'activation de Stat5. Il compétitionnerait directement avec Stat5 pour la liaison avec l'ADN et inhiberait l'activité transcriptionnelle de Stat5 [362]. Les auteurs n'ont toutefois pas réussi à identifier le mécanisme précis permettant la régulation de l'activité de Stat5 dans ces cellules.

Les Mφs traités avec GM-CSF adoptent un phénotype M1 et expriment des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires comme TNF α , IL-21 et IL-23 et de chimiokines comme les *CC chemokine ligands* (CCL) -1, -5, -22 et -24 [363, 364]. De plus, dans ces cellules, l'activation de NF κ B et d'AP-1 induite par le LPS est augmentée. Dans plusieurs modèles murins, le blocage de la signalisation initiée par GM-CSF mène à une diminution du recrutement de monocytes et neutrophiles, ce qui diminue les dommages tissulaires induits par l'inflammation médiée par ces cellules [364, 365]. La diminution de la réponse à GM-CSF induite par un traitement avec LIF dans les Mφs pourrait donc réduire la synthèse de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires en plus de protéger contre l'inflammation induite par des toxines bactériennes comme le LPS.

4.4 Limitations et perspectives

4.4.1 Limitations au sujet des études sur le LIF

Nos études réalisées avec LIF ont permis de montrer son rôle dans l'inhibition de la signalisation pro-inflammatoire induite par l'IFN γ et le GM-CSF dans les Mφs et les cellules trophoblastiques. Cependant, les conclusions de cette étude sont basées sur des expériences *in vitro* et par conséquent certaines limites expérimentales ou conceptuelles devraient être prises en considération pour l'interprétation des résultats. De toute évidence, nous devons vérifier si ces mécanismes fonctionnent réellement *in vivo*. Néanmoins, les données obtenues *in vitro* sont cohérentes avec les études *in vitro* précédentes et les observations *in vivo*. D'autre part, alors que les Mφs ont été générés à partir de monocytes sanguins humain, nous n'avons utilisé que des lignées cellulaires trophoblastiques dans les expériences plutôt que des cultures primaires de cellules trophoblastiques. Par contre, le principal mécanisme de régulation du LIF sur les Mφs

humains fonctionne également dans les lignées cellulaires trophoblastiques humaines soumises à un stimulus pro-inflammatoire [349]. Bien que le modèle HTR8/SVneo soit intéressant pour étudier les mécanismes d'invasion trophoblastique, ces cellules sont immortalisées et leur physiologie en est quelque peu modifiée. Ainsi, pour apprécier pleinement les fonctions anti-inflammatoires du LIF sur les trophoblastes villosités et extravillosités activés par les cytokines, nos expériences doivent être étendues davantage en utilisant des trophoblastes dérivés du placenta du premier trimestre.

4.4.2 Projets futurs utilisant LIF

Les études qui seront entreprises au sujet de LIF dans notre laboratoire auront pour but de déterminer si la cytokine peut être utilisée comme molécule anti-inflammatoire dans le contexte gestationnel chez la souris et protéger contre les dommages fœtaux induits par l'inflammation.

Nos résultats initiaux avec des Mφs péritonéaux de souris traitées avec LIF (non présentés) nous ont permis de déterminer que LIF avait le potentiel de s'opposer à l'activation induite par le LPS, *in vitro*. Ainsi, les Mφs isolés de souris injectées avec LIF ne produisaient presque pas de NO en réponse à cette toxine bactérienne, comparativement aux Mφs isolés de souris contrôles. Pour les études *in vivo* subséquentes, nous nous proposons de causer une inflammation utérine en injectant du LPS afin d'étudier le potentiel de LIF pour moduler l'activation des Mφs utérins. Des souris vierges et gestantes seront utilisées. De plus, nous voulons utiliser le modèle d'inflammation de la patte par la carraghénane afin de déterminer si des injections de LIF pourraient réduire l'enflure (œdème plantaire) en réduisant l'expression et/ou l'activité des enzymes iNOS et COX-2. Comme mentionné précédemment, la courte demi-vie de LIF dans le sang est un défi pour s'assurer d'avoir une quantité suffisante de la cytokine afin d'exercer son effet, mais l'utilisation de souris déficientes en LIF [217] ou d'anticorps bloquants la cytokine couplée au polyéthylène glycol [366] sont des solutions à considérer.

4.4.3 Limitations au sujet des études sur DAB-1

Bien que le potentiel thérapeutique des DABs soit très prometteur, de nombreuses études devront être réalisées avant de se rendre aux études cliniques. Des études *in vitro* sont en cours dans notre laboratoire afin de déterminer de façon plus précise les mécanismes d'action de ces molécules sur les Mφs. De plus, bien que seuls des résultats obtenus avec la première génération de DABs soient présentés au chapitre III et dans l'annexe A, nous étudions le potentiel d'une vingtaine de DABs de seconde et troisième génération dans le but de trouver des molécules ayant une activité supérieure et une toxicité moindre par rapport à DAB-1. Ceci nous permettra d'utiliser des doses inférieures à celles actuellement employées dans nos études *in vivo*. À ce jour, certains DABs de 2^e et de 3^e générations ont été injectés chez des souris vierges sans observer d'effets toxiques sur le foie et certains autres organes.

4.4.4 Projets futurs utilisant DAB-1

L'objectif principal des études en cours et futures dans notre laboratoire au sujet de DAB-1 aura pour but de déterminer si cette nouvelle molécule peut être utilisée comme anti-inflammatoire dans le contexte gestationnel chez la souris et protéger contre les dommages fœtaux induits par l'inflammation, en plus de déterminer si elle a un potentiel comme médicament anticancer.

En plus des études similaires à celles qui seront entreprises avec le LIF dans les souris gestantes traitées au LPS, l'utilisation combinée de DAB-1 et LIF pourrait être considérée. Bien que DAB-1 inhibe l'activation de Stat3 par le LIF (résultats non présentés), notre laboratoire envisage d'utiliser les molécules en traitement séquentiel : DAB-1 servirait à diminuer rapidement l'inflammation induite par le LPS tandis que LIF, utilisé un ou deux jours plus tard, pourrait favoriser le retour à l'homéostasie et à la tolérance immune.

Un autre des potentiels intéressants des DABs est pour le traitement de cancers à composante inflammatoire. Nous avons observé que les souris porteuses de tumeurs du cancer vésical et traitées avec DAB-1 survivaient plus longtemps, avaient beaucoup moins de métastases pulmonaires et des tumeurs plus petites que les souris traitées avec le véhicule [314]. Nos études actuellement en cours démontrent que les DABs inhibent la motilité et l'invasion de plusieurs lignées cancéreuses. Nous étudions aussi présentement le potentiel de DAB-1 à sensibiliser les cellules cancéreuses du sein aux agents chimiothérapeutiques. En effet, l'activation des voies de signalisation NFκB et Stat3 est en partie responsable de l'expression de gènes favorisant la chimiorésistance; le prétraitement avec les DABs pourrait alors sensibiliser les cellules cancéreuses à des agents comme le cisplatine et, par la même occasion, permettre la diminution des doses et des effets secondaires observés lors du traitement avec ces agents toxiques.

4.5 Conclusion générale

Dans les travaux présentés aux chapitres II et III et dans l'annexe A, le but était d'évaluer le potentiel thérapeutique de deux molécules, le LIF et DAB-1, pour leur activité anti-inflammatoire. Les voies de signalisation communément associées à l'inflammation gestationnelle ont été étudiées et ces travaux pavent la voie à des études *in vivo* visant à déterminer leur potentiel comme traitement pour des pathologies inflammatoires gestationnelles diverses, mais aussi dans des modèles de cancers associés à l'inflammation.

L'infertilité reste une préoccupation majeure dans notre société et les pathologies gestationnelles comme la PE et la naissance prématurée sont encore les causes les plus communes de morbidité et mortalité périnatale dans le monde industrialisé [289]. Étant donné les considérations éthiques entravant la découverte de nouveaux traitements pour ces pathologies, le développement de molécules anti-inflammatoires et leur approbation pour la population générale seront nécessaires. La majorité des traitements approuvés chez la femme enceinte sont la supplémentation de composés déjà présents dans l'alimentation comme le calcium, ou produits naturellement par l'organisme chez la

femme enceinte, comme la P₄ ou le LIF. Sinon, comme les femmes enceintes ne sont habituellement pas incluses dans les études cliniques, c'est par la collecte de données sur leur exposition à diverses molécules qu'il sera possible de statuer sur la dangerosité potentielle des médicaments sur la grossesse [367].

Tout de même, les recherches sur les mécanismes anti-inflammatoires régulés par le LIF et les DABs sont importantes pour trouver des nouvelles pistes et mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'activation des Mφs, cellules au cœur de la réponse inflammatoire et du développement de nombreuses pathologies humaines, notamment le cancer, les maladies cardiaques, immunitaires, et neurodégénératives, et bien sûr l'infertilité féminine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, *A brief journey through the immune system*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(7): p. 1274-81.
2. Litman, G.W. and M.D. Cooper, *Why study the evolution of immunity?* Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 547-8.
3. Hato, T. and P.C. Dagher, *How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(8): p. 1459-69.
4. Sattler, S., *The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1003**: p. 3-14.
5. Jeong, J.H., C.Y. Lee, and D.K. Chung, *Probiotic Lactic Acid Bacteria and Skin Health*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2016. **56**(14): p. 2331-7.
6. Nicod, L.P., *Lung defences: an overview*. European Respiratory Review, 2005. **14**(95): p. 45-50.
7. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
8. Fernandez, M., et al., *Microbial "social networks"*. BMC Genomics, 2015. **16 Suppl 11**: p. S6.
9. Dale, D.C., L. Boxer, and W.C. Liles, *The phagocytes: neutrophils and monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 935-45.
10. Albegger, K.W., *[Structure and function of the mononuclear phagocytic system (MPS) in chronic rhinosinusitis. A light and electron microscopic investigation (author's transl)]*. Arch Otorhinolaryngol, 1976. **214**(1): p. 27-48.
11. Dinarello, C.A., *Cytokines as endogenous pyrogens*. J Infect Dis, 1999. **179 Suppl 2**: p. S294-304.
12. Trinchieri, G. and A. Sher, *Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(3): p. 179-90.

13. Rock, K.L., E. Reits, and J. Neefjes, *Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules*. Trends Immunol, 2016. **37**(11): p. 724-737.
14. van Furth, R., et al., *The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells*. Bull World Health Organ, 1972. **46**(6): p. 845-52.
15. Yona, S., et al., *Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 79-91.
16. Watanabe, S., et al., *The role of macrophages in the resolution of inflammation*. J Clin Invest, 2019. **129**(7): p. 2619-2628.
17. Murray, P.J., *Macrophage Polarization*. Annu Rev Physiol, 2017. **79**: p. 541-566.
18. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6166-73.
19. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
20. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
21. Fairweather, D. and D. Cihakova, *Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity*. J Autoimmun, 2009. **33**(3-4): p. 222-30.
22. Medzhitov, R., *Inflammation 2010: new adventures of an old flame*. Cell, 2010. **140**(6): p. 771-6.
23. Barnig, C., et al., *Activation of Resolution Pathways to Prevent and Fight Chronic Inflammation: Lessons From Asthma and Inflammatory Bowel Disease*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1699.
24. Dalli, J. and C.N. Serhan, *Pro-Resolving Mediators in Regulating and Conferring Macrophage Function*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1400.
25. Iqbal, A.J., et al., *Human CD68 promoter GFP transgenic mice allow analysis of monocyte to macrophage differentiation in vivo*. Blood, 2014. **124**(15): p. e33-44.
26. Headland, S.E. and L.V. Norling, *The resolution of inflammation: Principles and challenges*. Semin Immunol, 2015. **27**(3): p. 149-60.

27. Serhan, C.N., et al., *Lipid mediators in the resolution of inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014. 7(2): p. a016311.
28. Chandrasekharan, J.A. and N. Sharma-Walia, *Lipoxins: nature's way to resolve inflammation*. J Inflamm Res, 2015. 8: p. 181-92.
29. Perretti, M. and F. D'Acquisto, *Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2009. 9(1): p. 62-70.
30. Bannenberg, G. and C.N. Serhan, *Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update*. Biochim Biophys Acta, 2010. 1801(12): p. 1260-73.
31. Sugimoto, M.A., et al., *Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset?* Front Immunol, 2016. 7: p. 160.
32. Jabbour, H.N., et al., *Inflammatory pathways in female reproductive health and disease*. Reproduction, 2009. 138(6): p. 903-19.
33. Zhang, J.M. and J. An, *Cytokines, inflammation, and pain*. Int Anesthesiol Clin, 2007. 45(2): p. 27-37.
34. Xie, W.R., et al., *Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia*. Neuroscience, 2006. 142(3): p. 809-22.
35. Wheelock, E.F., *Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin*. Science, 1965. 149(3681): p. 310-1.
36. Bach, E.A., M. Aguet, and R.D. Schreiber, *The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling*. Annu Rev Immunol, 1997. 15: p. 563-91.
37. Hardy, M.P., et al., *Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes*. Genomics, 2004. 84(2): p. 331-45.
38. Murphy, S.P., et al., *Interferon gamma in successful pregnancies*. Biol Reprod, 2009. 80(5): p. 848-59.
39. Fung, K.Y., et al., *Interferon-epsilon protects the female reproductive tract from viral and bacterial infection*. Science, 2013. 339(6123): p. 1088-92.
40. Zhou, F., *Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation*. Int Rev Immunol, 2009. 28(3-4): p. 239-60.

41. Hoeksema, M.A., et al., *IFN-gamma priming of macrophages represses a part of the inflammatory program and attenuates neutrophil recruitment*. J Immunol, 2015. **194**(8): p. 3909-16.
42. Igarashi, K., et al., *Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(20): p. 14333-6.
43. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
44. Greenlund, A.C., et al., *Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process*. Immunity, 1995. **2**(6): p. 677-87.
45. Suman, P., S.S. Malhotra, and S.K. Gupta, *LIF-STAT signaling and trophoblast biology*. JAKSTAT, 2013. **2**(4): p. e25155.
46. Blouin, C.M. and C. Lamaze, *Interferon gamma receptor: the beginning of the journey*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 267.
47. Lim, C.P. and X. Cao, *Structure, function, and regulation of STAT proteins*. Mol Biosyst, 2006. **2**(11): p. 536-50.
48. Chen, L., et al., *Inhibition of cellular Shp2 activity by a methyl ester analog of SPI-112*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(6): p. 801-10.
49. Lin, C.F., et al., *Escape from IFN-gamma-dependent immunosurveillance in tumorigenesis*. J Biomed Sci, 2017. **24**(1): p. 10.
50. Liao, N.P.D., et al., *The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1558.
51. Feng, J., et al., *Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(5): p. 2497-501.
52. Gauzzi, M.C., et al., *Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20494-500.
53. Ito, S., et al., *Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1456-63.

54. Liu, B., et al., *Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10626-31.
55. Begitt, A., et al., *SUMO conjugation of STAT1 protects cells from hyperresponsiveness to IFN γ* . Blood, 2011. **118**(4): p. 1002-7.
56. Liu, B., et al., *PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(9): p. 891-8.
57. Burgess, A.W., J. Camakaris, and D. Metcalf, *Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium*. J Biol Chem, 1977. **252**(6): p. 1998-2003.
58. Hamilton, J.A. and A. Achuthan, *Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease*. Trends Immunol, 2013. **34**(2): p. 81-9.
59. Becher, B., S. Tugues, and M. Greter, *GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation*. Immunity, 2016. **45**(5): p. 963-973.
60. Guthridge, M.A., et al., *Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors*. Stem Cells, 1998. **16**(5): p. 301-13.
61. Croxford, A.L., et al., *The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2⁺ Monocytes and Licenses Autoimmunity*. Immunity, 2015. **43**(3): p. 502-14.
62. van de Laar, L., P.J. Coffey, and A.M. Woltman, *Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy*. Blood, 2012. **119**(15): p. 3383-93.
63. Panopoulos, A.D. and S.S. Watowich, *Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis*. Cytokine, 2008. **42**(3): p. 277-88.
64. Wicks, I.P. and A.W. Roberts, *Targeting GM-CSF in inflammatory diseases*. Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(1): p. 37-48.
65. Codarri, L., et al., *ROR γ mat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 560-7.

66. El-Behi, M., et al., *The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(6): p. 568-75.
67. Greter, M., et al., *GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells*. *Immunity*, 2012. **36**(6): p. 1031-46.
68. Guilliams, M., et al., *Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF*. *J Exp Med*, 2013. **210**(10): p. 1977-92.
69. Hamilton, J.A., *GM-CSF as a target in inflammatory/autoimmune disease: current evidence and future therapeutic potential*. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015. **11**(4): p. 457-65.
70. Schneider, C., et al., *Induction of the nuclear receptor PPAR-gamma by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(11): p. 1026-37.
71. Robertson, S.A., *GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007. **18**(3-4): p. 287-98.
72. Bogunovic, M., et al., *Origin of the lamina propria dendritic cell network*. *Immunity*, 2009. **31**(3): p. 513-25.
73. Martens, N., et al., *Suppressor of cytokine signaling 7 inhibits prolactin, growth hormone, and leptin signaling by interacting with STAT5 or STAT3 and attenuating their nuclear translocation*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(14): p. 13817-23.
74. Bachmann, J., et al., *Division of labor by dual feedback regulators controls JAK2/STAT5 signaling over broad ligand range*. *Mol Syst Biol*, 2011. **7**: p. 516.
75. Yu, C.L., Y.J. Jin, and S.J. Burakoff, *Cytosolic tyrosine dephosphorylation of STAT5. Potential role of SHP-2 in STAT5 regulation*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(1): p. 599-604.
76. Able, A.A., J.A. Burrell, and J.M. Stephens, *STAT5-Interacting Proteins: A Synopsis of Proteins that Regulate STAT5 Activity*. *Biology (Basel)*, 2017. **6**(1).
77. Pircher, T.J., et al., *Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Interacts with Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 5a*. *Molecular Endocrinology*, 1999. **13**(4): p. 555-565.

78. Hsiao, W.Y., et al., *Dual-Specificity Phosphatase 4 Regulates STAT5 Protein Stability and Helper T Cell Polarization*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145880.
79. Hosui, A., et al., *Loss of STAT5 causes liver fibrosis and cancer development through increased TGF- β and STAT3 activation*. The Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(4): p. 819-831.
80. Nicola, N.A. and J.J. Babon, *Leukemia inhibitory factor (LIF)*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(5): p. 533-44.
81. Sharkey, A.M., et al., *Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy*. Biol Reprod, 1999. **60**(2): p. 355-64.
82. Aghajanova, L., et al., *Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium*. Fertil Steril, 2003. **79 Suppl 1**: p. 808-14.
83. Ni, H., et al., *Expression of leukemia inhibitory factor receptor and gp130 in mouse uterus during early pregnancy*. Mol Reprod Dev, 2002. **63**(2): p. 143-50.
84. Vanderlocht, J., et al., *Leukemia inhibitory factor is produced by myelin-reactive T cells from multiple sclerosis patients and protects against tumor necrosis factor-alpha-induced oligodendrocyte apoptosis*. J Neurosci Res, 2006. **83**(5): p. 763-74.
85. Stahl, N., et al., *Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components*. Science, 1994. **263**(5143): p. 92-5.
86. Lang, R., *Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection*. Immunobiology, 2005. **210**(2-4): p. 63-76.
87. Su, N., et al., *The role of ERK and Smad2 signal pathways in the alternatively activated macrophages induced by TGF-beta1 and high-ambient glucose*. J Recept Signal Transduct Res, 2018. **38**(1): p. 27-30.
88. Valledor, A.F., et al., *Selective roles of MAPKs during the macrophage response to IFN-gamma*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4523-9.
89. Valledor, A.F., et al., *The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 7403-9.

90. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 59-71.
91. Yue, X., L. Wu, and W. Hu, *The regulation of leukemia inhibitory factor*. Cancer Cell Microenviron, 2015. **2**(3).
92. Wu, L., et al., *HIF-2alpha mediates hypoxia-induced LIF expression in human colorectal cancer cells*. Oncotarget, 2015. **6**(6): p. 4406-17.
93. Wetzler, M., et al., *Constitutive expression of leukemia inhibitory factor RNA by human bone marrow stromal cells and modulation by IL-1, TNF-alpha, and TGF-beta*. Exp Hematol, 1991. **19**(5): p. 347-51.
94. Penuelas, S., et al., *TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma*. Cancer Cell, 2009. **15**(4): p. 315-27.
95. Palmqvist, P., et al., *IL-1beta and TNF-alpha regulate IL-6-type cytokines in gingival fibroblasts*. J Dent Res, 2008. **87**(6): p. 558-63.
96. Knight, D.A., et al., *Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor in human lung. Distribution and regulation of LIF release*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(4): p. 834-41.
97. Sherwin, J.R., et al., *Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(9): p. 2185-95.
98. Hu, W., et al., *p53 regulates maternal reproduction through LIF*. Nature, 2007. **450**(7170): p. 721-4.
99. Salas, E.M., et al., *LIF, a Novel STAT5-Regulated Gene, Is Aberrantly Expressed in Myeloproliferative Neoplasms*. Genes Cancer, 2011. **2**(5): p. 593-6.
100. Umemiya-Okada, T., et al., *Expression and regulation of the leukemia inhibitory factor/D factor gene in human T-cell leukemia virus type 1 infected T-cell lines*. Cancer Res, 1992. **52**(24): p. 6961-5.
101. Liang, Y.X., et al., *The high concentration of progesterone is harmful for endometrial receptivity and decidualization*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 712.
102. Derigs, H.G. and H.S. Boswell, *LIF mRNA expression is transcriptionally regulated in murine bone marrow stromal cells*. Leukemia, 1993. **7**(4): p. 630-4.

103. Chakraborty, A., et al., *Phorbol-12-myristate-13-acetate-mediated stabilization of leukemia inhibitory factor (lif) mRNA: involvement of Nucleolin and PCBP1*. *Biochem J*, 2017. **474**(14): p. 2349-2363.
104. Mannino, M.H., et al., *The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer*. *Cancer Lett*, 2015. **367**(2): p. 103-7.
105. Commins, S., J.W. Steinke, and L. Borish, *The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(5): p. 1108-11.
106. Boonstra, A., et al., *Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals*. *J Immunol*, 2006. **177**(11): p. 7551-8.
107. Roth, I. and S.J. Fisher, *IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion*. *Dev Biol*, 1999. **205**(1): p. 194-204.
108. Kotenko, S.V., et al., *Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex*. *EMBO J*, 1997. **16**(19): p. 5894-903.
109. Szonyi, B.J., et al., *Interleukin-10 receptors are expressed by basement membrane anchored, alpha(6) integrin(+) cytotrophoblast cells in early human placenta*. *Mol Hum Reprod*, 1999. **5**(11): p. 1059-65.
110. Finbloom, D.S. and K.D. Winestock, *IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes*. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1079-90.
111. Herrero, C., et al., *Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma*. *J Immunol*, 2003. **171**(10): p. 5034-41.
112. Hedrich, C.M. and J.H. Bream, *Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease*. *Immunol Res*, 2010. **47**(1-3): p. 185-206.
113. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 683-765.
114. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. *J Immunol*, 1991. **147**(11): p. 3815-22.

115. Dokka, S., et al., *Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(6): p. L1196-202.
116. Van Dyken, S.J. and R.M. Locksley, *Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 317-43.
117. Mongelli, M., M. Wilcox, and J. Gardosi, *Estimating the date of confinement: ultrasonographic biometry versus certain menstrual dates*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(1 Pt 1): p. 278-81.
118. Jukic, A.M., et al., *Length of human pregnancy and contributors to its natural variation*. Hum Reprod, 2013. **28**(10): p. 2848-55.
119. Treloar, A.E., et al., *Variation of the human menstrual cycle through reproductive life*. Int J Fertil, 1967. **12**(1 Pt 2): p. 77-126.
120. Reed, B.G. and B.R. Carr, *The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
121. Fraser, I.S., et al., *Pituitary gonadotropins and ovarian function in adolescent dysfunctional uterine bleeding*. J Clin Endocrinol Metab, 1973. **37**(3): p. 407-14.
122. Lenton, E.A., et al., *Normal variation in the length of the follicular phase of the menstrual cycle: effect of chronological age*. Br J Obstet Gynaecol, 1984. **91**(7): p. 681-4.
123. Groome, N.P., et al., *Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(4): p. 1401-5.
124. Gellersen, B. and J.J. Brosens, *Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure*. Endocr Rev, 2014. **35**(6): p. 851-905.
125. Vinketova, K., M. Mourdjeva, and T. Oreshkova, *Human Decidual Stromal Cells as a Component of the Implantation Niche and a Modulator of Maternal Immunity*. J Pregnancy, 2016. **2016**: p. 8689436.
126. Dimitriadis, E., et al., *Relaxin and prostaglandin E(2) regulate interleukin 11 during human endometrial stromal cell decidualization*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3458-65.

127. Sawai, K., et al., *Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor: regulation by decidual cytokines and steroid hormones*. Biol Reprod, 1997. **56**(5): p. 1274-80.
128. Telgmann, R., et al., *Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 929-37.
129. Carlino, C., et al., *Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3108-15.
130. Shuya, L.L., et al., *Leukemia inhibitory factor enhances endometrial stromal cell decidualization in humans and mice*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25288.
131. Ashkar, A.A., et al., *Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 2937-44.
132. van den Heuvel, M.J., et al., *Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human*. Immunol Invest, 2005. **34**(3): p. 273-93.
133. Xiong, S., et al., *Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation*. J Clin Invest, 2013. **123**(10): p. 4264-72.
134. Knofler, M. and J. Pollheimer, *Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling*. Front Genet, 2013. **4**: p. 190.
135. Wang, Y. and S. Zhao, in *Vascular Biology of the Placenta*. 2010: San Rafael (CA).
136. Malassine, A., J.L. Frendo, and D. Evain-Brion, *A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model*. Hum Reprod Update, 2003. **9**(6): p. 531-9.
137. Srisuparp, S., Z. Strakova, and A.T. Fazleabas, *The role of chorionic gonadotropin (CG) in blastocyst implantation*. Arch Med Res, 2001. **32**(6): p. 627-34.
138. Dallagi, A., et al., *The activating effect of IFN-gamma on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation*. Cell Mol Immunol, 2015. **12**(3): p. 326-41.

139. Gohner, C., T. Plosch, and M.M. Faas, *Immune-modulatory effects of syncytiotrophoblast extracellular vesicles in pregnancy and preeclampsia*. Placenta, 2017. **60 Suppl 1**: p. S41-S51.
140. Wright, A., et al., *Trisomy 21 is associated with variable defects in cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway*. Am J Med Genet A, 2004. **130A(4)**: p. 354-64.
141. Bulla, R., et al., *VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast-endothelial cell interaction in decidual spiral arteries*. Exp Cell Res, 2005. **303(1)**: p. 101-13.
142. Librach, C.L., et al., *92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts*. J Cell Biol, 1991. **113(2)**: p. 437-49.
143. Lanier, L.L., *Natural killer cells fertile with receptors for HLA-G?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96(10)**: p. 5343-5.
144. Benirschke, K., G.J. Burton, and R.N. Baergen, *Pathology of the Human Placenta*. 6 ed. 2012: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. XVIII, 941.
145. Fournier, T., J. Guibourdenche, and D. Evain-Brion, *Review: hCGs: different sources of production, different glycoforms and functions*. Placenta, 2015. **36 Suppl 1**: p. S60-5.
146. Shi, Q.J., et al., *Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts*. Endocrinology, 1993. **132(3)**: p. 1387-95.
147. Yang, M., Z.M. Lei, and V. Rao Ch, *The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium*. Endocrinology, 2003. **144(3)**: p. 1108-20.
148. Gudermann, T., M. Birnbaumer, and L. Birnbaumer, *Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells*. J Biol Chem, 1992. **267(7)**: p. 4479-88.
149. Frendo, J.L., et al., *Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation*. Mol Cell Biol, 2003. **23(10)**: p. 3566-74.
150. Zygmunt, M., et al., *Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87(11)**: p. 5290-6.

151. Ambrus, G. and C.V. Rao, *Novel regulation of pregnant human myometrial smooth muscle cell gap junctions by human chorionic gonadotropin*. *Endocrinology*, 1994. **135**(6): p. 2772-9.
152. Dong, M., et al., *The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules--a proteomic analysis*. *Cell Physiol Biochem*, 2008. **21**(5-6): p. 463-72.
153. Rabie, N.Z. and E.F. Magann, *Human chronic gonadotropin concentrations in very early pregnancy and subsequent preeclampsia*. *Womens Health (Lond)*, 2014. **10**(5): p. 483-5.
154. Chen, J.C., et al., *Seminal plasma induces global transcriptomic changes associated with cell migration, proliferation and viability in endometrial epithelial cells and stromal fibroblasts*. *Hum Reprod*, 2014. **29**(6): p. 1255-70.
155. Schjenken, J.E. and S.A. Robertson, *Seminal Fluid Signalling in the Female Reproductive Tract: Implications for Reproductive Success and Offspring Health*. *Adv Exp Med Biol*, 2015. **868**: p. 127-58.
156. Pandya, I.J. and J. Cohen, *The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa*. *Fertil Steril*, 1985. **43**(3): p. 417-21.
157. Thompson, L.A., et al., *The leukocytic reaction of the human uterine cervix*. *Am J Reprod Immunol*, 1992. **28**(2): p. 85-9.
158. Introini, A., et al., *Seminal plasma induces inflammation and enhances HIV-1 replication in human cervical tissue explants*. *PLoS Pathog*, 2017. **13**(5): p. e1006402.
159. Romero, R., et al., *Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury*. *Nutr Rev*, 2007. **65**(12 Pt 2): p. S194-202.
160. Li, D.K., L. Liu, and R. Odouli, *Exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and risk of miscarriage: population based cohort study*. *BMJ*, 2003. **327**(7411): p. 368.
161. Griffith, O.W., et al., *Embryo implantation evolved from an ancestral inflammatory attachment reaction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(32): p. E6566-E6575.

162. Mendelson, C.R., A.P. Montalbano, and L. Gao, *Fetal-to-maternal signaling in the timing of birth*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2017. **170**: p. 19-27.
163. Hardy, D.B., et al., *Progesterone receptor plays a major antiinflammatory role in human myometrial cells by antagonism of nuclear factor-kappaB activation of cyclooxygenase 2 expression*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(11): p. 2724-33.
164. Dong, X., et al., *p54nrb is a transcriptional corepressor of the progesterone receptor that modulates transcription of the labor-associated gene, connexin 43 (Gjal)*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(8): p. 1147-60.
165. Olson, D.M., *The role of prostaglandins in the initiation of parturition*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2003. **17**(5): p. 717-30.
166. Soloff, M.S., et al., *In situ analysis of interleukin-1-induced transcription of cox-2 and il-8 in cultured human myometrial cells*. Endocrinology, 2004. **145**(3): p. 1248-54.
167. Cox, S.M., M.L. Casey, and P.C. MacDonald, *Accumulation of interleukin-1beta and interleukin-6 in amniotic fluid: a sequela of labour at term and preterm*. Hum Reprod Update, 1997. **3**(5): p. 517-27.
168. Thomson, A.J., et al., *Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process*. Hum Reprod, 1999. **14**(1): p. 229-36.
169. Osman, I., et al., *Leukocyte density and pro-inflammatory cytokine expression in human fetal membranes, decidua, cervix and myometrium before and during labour at term*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(1): p. 41-5.
170. Condon, J.C., et al., *Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(4): p. 764-75.
171. Mor, G., et al., *Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. **1221**: p. 80-7.
172. Sales, K.J. and H.N. Jabbour, *Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium*. Reproduction, 2003. **126**(5): p. 559-67.

173. Gupta, S., et al., *Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility*. Fertil Steril, 2008. **90**(2): p. 247-57.
174. von Wolff, M., et al., *Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(7): p. 627-34.
175. Laird, S.M., et al., *A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage*. Hum Reprod Update, 2003. **9**(2): p. 163-74.
176. Heyborne, K.D., et al., *Interleukin-10 in amniotic fluid at midtrimester: immune activation and suppression in relation to fetal growth*. Am J Obstet Gynecol, 1994. **171**(1): p. 55-9.
177. Romero, R., et al., *The role of inflammation and infection in preterm birth*. Semin Reprod Med, 2007. **25**(1): p. 21-39.
178. Christiaens, I., et al., *Inflammatory processes in preterm and term parturition*. J Reprod Immunol, 2008. **79**(1): p. 50-7.
179. Redman, C.W., G.P. Sacks, and I.L. Sargent, *Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **180**(2 Pt 1): p. 499-506.
180. Rinehart, B.K., et al., *Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **181**(4): p. 915-20.
181. Verma, S., R. Pal, and S.K. Gupta, *Decrease in invasion of HTR-8/SVneo trophoblastic cells by interferon gamma involves cross-communication of STAT1 and BATF2 that regulates the expression of JUN*. Cell Adh Migr, 2018. **12**(5): p. 432-446.
182. Lash, G.E., et al., *Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels*. FASEB J, 2006. **20**(14): p. 2512-8.
183. Goldman-Wohl, D. and S. Yagel, *Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia*. Mol Cell Endocrinol, 2002. **187**(1-2): p. 233-8.
184. Kaufmann, P., S. Black, and B. Huppertz, *Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia*. Biol Reprod, 2003. **69**(1): p. 1-7.

185. Wortman, A.C. and J.M. Alexander, *Placenta accreta, increta, and percreta*. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2013. **40**(1): p. 137-54.
186. Graham, C.H., et al., *Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta*. *Exp Cell Res*, 1994. **214**(1): p. 93-9.
187. Poehlmann, T.G., et al., *Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3*. *Placenta*, 2005. **26 Suppl A**: p. S37-41.
188. Jovanovic, M. and L. Vicovac, *Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line*. *Placenta*, 2009. **30**(4): p. 320-8.
189. Malik, A., R. Pal, and S.K. Gupta, *Interdependence of JAK-STAT and MAPK signaling pathways during EGF-mediated HTR-8/SVneo cell invasion*. *PLoS One*, 2017. **12**(5): p. e0178269.
190. Jaiswal, M.K., et al., *V-ATPase upregulation during early pregnancy: a possible link to establishment of an inflammatory response during preimplantation period of pregnancy*. *Reproduction*, 2012. **143**(5): p. 713-25.
191. Mor, G., et al., *Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site*. *Ann N Y Acad Sci*, 2011. **1221**: p. 80-7.
192. Heikkinen, J., et al., *Phenotypic characterization of human decidual macrophages*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **131**(3): p. 498-505.
193. Lidstrom, C., et al., *Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua*. *Am J Reprod Immunol*, 2003. **50**(6): p. 444-52.
194. Tsai, Y.C., et al., *Medroxyprogesterone acetate drives M2 macrophage differentiation toward a phenotype of decidual macrophage*. *Mol Cell Endocrinol*, 2017. **452**: p. 74-83.
195. Svensson-Arvelund, J. and J. Ernerudh, *The Role of Macrophages in Promoting and Maintaining Homeostasis at the Fetal-Maternal Interface*. *Am J Reprod Immunol*, 2015. **74**(2): p. 100-9.
196. Faas, M.M., F. Spaans, and P. De Vos, *Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 298.

197. Ashkar, A.A. and B.A. Croy, *Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy*. Biol Reprod, 1999. **61**(2): p. 493-502.
198. Ashkar, A.A., J.P. Di Santo, and B.A. Croy, *Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 259-70.
199. Saito, S., et al., *Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua*. Int Immunol, 1993. **5**(5): p. 559-63.
200. Tabibzadeh, S., *Evidence of T-cell activation and potential cytokine action in human endometrium*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **71**(3): p. 645-9.
201. Pereza, N., et al., *Systematic review and meta-analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion*. Fertil Steril, 2017. **107**(1): p. 150-159 e2.
202. Kao, L.C., et al., *Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation*. Endocrinology, 2002. **143**(6): p. 2119-38.
203. Hanna, J., et al., *Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface*. Nat Med, 2006. **12**(9): p. 1065-74.
204. Karmakar, S., R. Dhar, and C. Das, *Inhibition of cytotrophoblastic (JEG-3) cell invasion by interleukin 12 involves an interferon gamma-mediated pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55297-307.
205. Hu, Y., et al., *Decidual NK cells alter in vitro first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role for IFN-gamma*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8522-30.
206. Sargent, I.L., A.M. Borzychowski, and C.W. Redman, *NK cells and human pregnancy--an inflammatory view*. Trends Immunol, 2006. **27**(9): p. 399-404.
207. Robertson, S.A., G. Mayrhofer, and R.F. Seamark, *Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice*. Biol Reprod, 1992. **46**(6): p. 1069-79.
208. Robertson, S.A., G. Mayrhofer, and R.F. Seamark, *Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse*. Biol Reprod, 1996. **54**(1): p. 183-96.

209. Robertson, S.A., *Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract*. Cell Tissue Res, 2005. **322**(1): p. 43-52.
210. Tremellen, K.P., R.F. Seamark, and S.A. Robertson, *Seminal transforming growth factor beta1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus*. Biol Reprod, 1998. **58**(5): p. 1217-25.
211. Crainie, M., L. Guilbert, and T.G. Wegmann, *Expression of novel cytokine transcripts in the murine placenta*. Biol Reprod, 1990. **43**(6): p. 999-1005.
212. Robertson, S.A., et al., *Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice*. Biol Reprod, 1999. **60**(2): p. 251-61.
213. Curry, A.E., et al., *First-trimester maternal plasma cytokine levels, pre-pregnancy body mass index, and spontaneous preterm delivery*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2009. **88**(3): p. 332-42.
214. Basraon, S.K., et al., *Can statins reduce the inflammatory response associated with preterm birth in an animal model?* Am J Obstet Gynecol, 2012. **207**(3): p. 224 e1-7.
215. Nold, C., et al., *Block of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Prevents Inflammation-Induced Preterm Birth in a Mouse Model for Parturition*. Reprod Sci, 2019. **26**(4): p. 551-559.
216. Bhatt, H., L.J. Brunet, and C.L. Stewart, *Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11408-12.
217. Stewart, C.L., et al., *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 76-9.
218. Cheng, J., et al., *Tissue-Specific Ablation of the LIF Receptor in the Murine Uterine Epithelium Results in Implantation Failure*. Endocrinology, 2017. **158**(6): p. 1916-1928.
219. Chen, J.R., et al., *Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis*. Endocrinology, 2000. **141**(12): p. 4365-72.

220. Cullinan, E.B., et al., *Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 3115-20.
221. Wu, M., et al., *The low expression of leukemia inhibitory factor in endometrium: possible relevant to unexplained infertility with multiple implantation failures*. Cytokine, 2013. **62**(2): p. 334-9.
222. Salleh, N. and N. Giribabu, *Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 201514.
223. Aisemberg, J., et al., *Progesterone is essential for protecting against LPS-induced pregnancy loss. LIF as a potential mediator of the anti-inflammatory effect of progesterone*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56161.
224. Weber, M.A., et al., *Endogenous leukemia inhibitory factor attenuates endotoxin response*. Lab Invest, 2005. **85**(2): p. 276-84.
225. Popravka, E.S., et al., *Role of LIF Cytokine and CD34 Angiogenesis Marker in Non-Developing Pregnancy*. Bull Exp Biol Med, 2017. **163**(6): p. 772-776.
226. Gremlich, S., et al., *LIF and sIL-2R plasma concentrations in IVF patients on the day of embryo transfer: predictive markers of IVF outcome*. J Reprod Immunol, 2012. **94**(2): p. 175-82.
227. Kojima, K., et al., *Expression of leukemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts*. Hum Reprod, 1995. **10**(7): p. 1907-11.
228. Leduc, K., et al., *Leukemia inhibitory factor regulates differentiation of trophoblastlike BeWo cells through the activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP kinase-signaling pathways*. Biol Reprod, 2012. **86**(2): p. 54.
229. Fitzgerald, J.S., et al., *Signal transduction in trophoblast invasion*. Chem Immunol Allergy, 2005. **88**: p. 181-199.
230. Fitzgerald, J.S., et al., *Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(11): p. 2284-96.

231. Moreau, P., et al., *IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes*. Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 803-11.
232. Nadeau-Vallee, M., et al., *Sterile inflammation and pregnancy complications: a review*. Reproduction, 2016. **152**(6): p. R277-R292.
233. Boivin, J., et al., *International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care*. Hum Reprod, 2007. **22**(6): p. 1506-12.
234. Blencowe, H., et al., *Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births*. Reprod Health, 2013. **10 Suppl 1**: p. S2.
235. Ananth, C.V., K.M. Keyes, and R.J. Wapner, *Pre-eclampsia rates in the United States, 1980-2010: age-period-cohort analysis*. BMJ, 2013. **347**: p. f6564.
236. Chaiworapongsa, T., et al., *Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(8): p. 466-80.
237. Ramos, J.G.L., N. Sass, and S.H.M. Costa, *Preeclampsia*. Rev Bras Ginecol Obstet, 2017. **39**(9): p. 496-512.
238. Gomez-Lopez, N., et al., *Intra-Amniotic Administration of HMGB1 Induces Spontaneous Preterm Labor and Birth*. Am J Reprod Immunol, 2016. **75**(1): p. 3-7.
239. Olson, D.M., et al., *Emerging tocolytics: challenges in designing and testing drugs to delay preterm delivery and prolong pregnancy*. Expert Opin Emerg Drugs, 2008. **13**(4): p. 695-707.
240. Boyle, A.K., et al., *Preterm birth: Inflammation, fetal injury and treatment strategies*. J Reprod Immunol, 2017. **119**: p. 62-66.
241. Lindstrom, T.M. and P.R. Bennett, *The role of nuclear factor kappa B in human labour*. Reproduction, 2005. **130**(5): p. 569-81.
242. Gonzalez, J.M., et al., *Complement activation triggers metalloproteinases release inducing cervical remodeling and preterm birth in mice*. Am J Pathol, 2011. **179**(2): p. 838-49.
243. Ng, P.Y., D.J. Ireland, and J.A. Keelan, *Drugs to block cytokine signaling for the prevention and treatment of inflammation-induced preterm birth*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 166.

244. Stinson, L.F., et al., *Effects of cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs on inflammatory activation in ex vivo human and ovine fetal membranes*. *Reproduction*, 2014. **147**(3): p. 313-20.
245. Shynlova, O., et al., *Inhibition of infection-mediated preterm birth by administration of broad spectrum chemokine inhibitor in mice*. *J Cell Mol Med*, 2014. **18**(9): p. 1816-29.
246. Harmon, A.C., et al., *The role of inflammation in the pathology of preeclampsia*. *Clin Sci (Lond)*, 2016. **130**(6): p. 409-19.
247. Askie, L.M., et al., *Antiplatelet agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data*. *Lancet*, 2007. **369**(9575): p. 1791-1798.
248. DeSousa, J., et al., *The anti-inflammatory effect of calcium for preventing endothelial cell activation in preeclampsia*. *J Hum Hypertens*, 2016. **30**(5): p. 303-8.
249. Atallah, A., et al., *Aspirin for Prevention of Preeclampsia*. *Drugs*, 2017. **77**(17): p. 1819-1831.
250. Cottrell, E.C. and C.P. Sibley, *From Pre-Clinical Studies to Clinical Trials: Generation of Novel Therapies for Pregnancy Complications*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(6): p. 12907-24.
251. Lassala, A., et al., *Parenteral administration of L-arginine prevents fetal growth restriction in undernourished ewes*. *J Nutr*, 2010. **140**(7): p. 1242-8.
252. Vosatka, R.J., P.M. Hassoun, and K.B. Harvey-Wilkes, *Dietary L-arginine prevents fetal growth restriction in rats*. *Am J Obstet Gynecol*, 1998. **178**(2): p. 242-6.
253. Murphy, S.R., et al., *L-arginine supplementation abolishes the blood pressure and endothelin response to chronic increases in plasma sFlt-1 in pregnant rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012. **302**(2): p. R259-63.
254. Rytlewski, K., et al., *Effects of prolonged oral supplementation with l-arginine on blood pressure and nitric oxide synthesis in preeclampsia*. *Eur J Clin Invest*, 2005. **35**(1): p. 32-7.
255. Facchinetti, F., et al., *L-arginine infusion reduces blood pressure in preeclamptic women through nitric oxide release*. *J Soc Gynecol Investig*, 1999. **6**(4): p. 202-7.

256. Sieroszewski, P., J. Suzin, and A. Karowicz-Bilinska, *Ultrasound evaluation of intrauterine growth restriction therapy by a nitric oxide donor (L-arginine)*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2004. **15**(6): p. 363-6.
257. Xiao, X.M. and L.P. Li, *L-Arginine treatment for asymmetric fetal growth restriction*. Int J Gynaecol Obstet, 2005. **88**(1): p. 15-8.
258. Stanley, J.L., et al., *Sildenafil citrate rescues fetal growth in the catechol-O-methyl transferase knockout mouse model*. Hypertension, 2012. **59**(5): p. 1021-8.
259. Herraiz, S., et al., *Sildenafil citrate improves perinatal outcome in fetuses from pre-eclamptic rats*. BJOG, 2012. **119**(11): p. 1394-402.
260. Samangaya, R.A., et al., *A randomised, double-blinded, placebo-controlled study of the phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil for the treatment of preeclampsia*. Hypertens Pregnancy, 2009. **28**(4): p. 369-82.
261. von Dadelszen, P., et al., *Sildenafil citrate therapy for severe early-onset intrauterine growth restriction*. BJOG, 2011. **118**(5): p. 624-8.
262. Ganzevoort, W., et al., *STRIDER: Sildenafil Therapy In Dismal prognosis Early-onset intrauterine growth Restriction--a protocol for a systematic review with individual participant data and aggregate data meta-analysis and trial sequential analysis*. Syst Rev, 2014. **3**: p. 23.
263. Stanley, J.L., et al., *Effect of the anti-oxidant tempol on fetal growth in a mouse model of fetal growth restriction*. Biol Reprod, 2012. **87**(1): p. 25, 1-8.
264. Hoffmann, D.S., et al., *Chronic tempol prevents hypertension, proteinuria, and poor fetoplacental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia*. Hypertension, 2008. **51**(4): p. 1058-65.
265. Poudel, R., et al., *Effects of resveratrol in pregnancy using murine models with reduced blood supply to the uterus*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64401.
266. Roberts, V.H., et al., *Beneficial and cautionary outcomes of resveratrol supplementation in pregnant nonhuman primates*. FASEB J, 2014. **28**(6): p. 2466-77.
267. Miller, S.L., et al., *Antenatal antioxidant treatment with melatonin to decrease newborn neurodevelopmental deficits and brain injury caused by fetal growth restriction*. J Pineal Res, 2014. **56**(3): p. 283-94.

268. Richter, H.G., et al., *Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy*. J Pineal Res, 2009. **46**(4): p. 357-64.
269. Hobson, S.R., et al., *Phase I pilot clinical trial of antenatal maternally administered melatonin to decrease the level of oxidative stress in human pregnancies affected by pre-eclampsia (PAMPR): study protocol*. BMJ Open, 2013. **3**(9): p. e003788.
270. Alers, N.O., et al., *Antenatal melatonin as an antioxidant in human pregnancies complicated by fetal growth restriction--a phase I pilot clinical trial: study protocol*. BMJ Open, 2013. **3**(12): p. e004141.
271. Doridot, L., et al., *Preeclampsia-like symptoms induced in mice by fetoplacental expression of STOX1 are reversed by aspirin treatment*. Hypertension, 2013. **61**(3): p. 662-8.
272. Henderson, J.T., et al., in *Low-Dose Aspirin for the Prevention of Morbidity and Mortality From Preeclampsia: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force*. 2014: Rockville (MD).
273. Bauer, A.J., et al., *Pravastatin attenuates hypertension, oxidative stress, and angiogenic imbalance in rat model of placental ischemia-induced hypertension*. Hypertension, 2013. **61**(5): p. 1103-10.
274. Kumasawa, K., et al., *Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(4): p. 1451-5.
275. Bujold, E., et al., *Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis*. Obstet Gynecol, 2010. **116**(2 Pt 1): p. 402-14.
276. Meher, S., et al., *Antiplatelet therapy before or after 16 weeks' gestation for preventing preeclampsia: an individual participant data meta-analysis*. Am J Obstet Gynecol, 2017. **216**(2): p. 121-128 e2.
277. Duley, L., et al., *Magnesium sulphate versus diazepam for eclampsia*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(12): p. CD000127.
278. Hofmeyr, G.J., et al., *Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems*. Cochrane Database Syst Rev, 2014(6): p. CD001059.

279. Johansen, M., et al., *Trophoblast deportation in human pregnancy--its relevance for pre-eclampsia*. *Placenta*, 1999. **20**(7): p. 531-9.
280. Chen, Q., et al., *Calcium supplementation prevents endothelial cell activation: possible relevance to preeclampsia*. *J Hypertens*, 2013. **31**(9): p. 1828-36.
281. Chen, Q., et al., *Pre-treatment with calcium prevents endothelial cell activation induced by multiple activators, necrotic trophoblastic debris or IL-6 or preeclamptic sera: possible relevance to the pathogenesis of preeclampsia*. *Placenta*, 2013. **34**(12): p. 1196-201.
282. Rodger, M.A., et al., *Meta-analysis of low-molecular-weight heparin to prevent recurrent placenta-mediated pregnancy complications*. *Blood*, 2014. **123**(6): p. 822-8.
283. Wat, J.M., et al., *Effects of glycol-split low molecular weight heparin on placental, endothelial, and anti-inflammatory pathways relevant to preeclampsia*. *Biol Reprod*, 2018. **99**(5): p. 1082-1090.
284. Haddad, B., et al., *Enoxaparin and Aspirin Compared With Aspirin Alone to Prevent Placenta-Mediated Pregnancy Complications: A Randomized Controlled Trial*. *Obstet Gynecol*, 2016. **128**(5): p. 1053-1063.
285. Groom, K.M., et al., *Enoxaparin for the prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction in women with a history: a randomized trial*. *Am J Obstet Gynecol*, 2017. **216**(3): p. 296 e1-296 e14.
286. Banerjee, S., et al., *Placental expression of interferon-gamma (IFN-gamma) and its receptor IFN-gamma R2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in preeclampsia*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(2): p. 944-52.
287. Hamelin-Morrisette, J., et al., *Identification of an anti-inflammatory derivative with anti-cancer potential: The impact of each of its structural components on inflammatory responses in macrophages and bladder cancer cells*. *Eur J Med Chem*, 2015. **96**: p. 259-68.
288. Sykes, L., et al., *Targeting Immune Activation in the Prevention of Pre-term Labour*. *European Clinics in Obstetrics and Gynaecology*, 2011. **6**: p. 100-106.
289. Liu, L., et al., *Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000*. *Lancet*, 2012. **379**(9832): p. 2151-61.

290. Blencowe, H., et al., *National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications*. Lancet, 2012. **379**(9832): p. 2162-72.
291. Meis, P.J., et al., *Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate*. N Engl J Med, 2003. **348**(24): p. 2379-85.
292. da Fonseca, E.B., et al., *Prophylactic administration of progesterone by vaginal suppository to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women at increased risk: a randomized placebo-controlled double-blind study*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **188**(2): p. 419-24.
293. Fonseca, E.B., et al., *Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix*. N Engl J Med, 2007. **357**(5): p. 462-9.
294. MacIntyre, D.A., et al., *Prevention of preterm labour via the modulation of inflammatory pathways*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012. **25 Suppl 1**: p. 17-20.
295. Brancazio, L.R., A.P. Murtha, and R.P. Heine, *Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate*. N Engl J Med, 2003. **349**(11): p. 1087-8; author reply 1087-8.
296. Norwitz, E.R. and A.B. Caughey, *Progesterone supplementation and the prevention of preterm birth*. Rev Obstet Gynecol, 2011. **4**(2): p. 60-72.
297. Silver, R.M., et al., *Low-dose aspirin and preterm birth: a randomized controlled trial*. Obstet Gynecol, 2015. **125**(4): p. 876-84.
298. Andrikopoulou, M., et al., *Low-dose aspirin is associated with reduced spontaneous preterm birth in nulliparous women*. Am J Obstet Gynecol, 2018. **219**(4): p. 399 e1-399 e6.
299. van Vliet, E.O., et al., *Antiplatelet Agents and the Prevention of Spontaneous Preterm Birth: A Systematic Review and Meta-analysis*. Obstet Gynecol, 2017. **129**(2): p. 327-336.
300. Reinebrant, H.E., et al., *Cyclo-oxygenase (COX) inhibitors for treating preterm labour*. Cochrane Database Syst Rev, 2015(6): p. CD001992.
301. Sykes, L., et al., *Anti-inflammatory prostaglandins for the prevention of preterm labour*. 2014. **148**(2): p. R29.

302. Groom, K.M., et al., *TOCOX--a randomised, double-blind, placebo-controlled trial of rofecoxib (a COX-2-specific prostaglandin inhibitor) for the prevention of preterm delivery in women at high risk*. BJOG, 2005. **112**(6): p. 725-30.
303. Gomez, P.F., et al., *Resolution of Inflammation: Prostaglandin E Dissociates Nuclear Trafficking of Individual NF- κ B Subunits (p65, p50) in Stimulated Rheumatoid Synovial Fibroblasts*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(10): p. 6924-6930.
304. Helliwell, R.J., et al., *Gestational age-dependent up-regulation of prostaglandin D synthase (PGDS) and production of PGDS-derived antiinflammatory prostaglandins in human placenta*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(2): p. 597-606.
305. Sykes, L., et al., *Anti-inflammatory prostaglandins for the prevention of preterm labour*. Reproduction, 2014. **148**(2): p. R29-40.
306. Sykes, L., et al., *Chemoattractant receptor homologous to the T helper 2 cell (CRTH2) is not expressed in human amniocytes and myocytes*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50734.
307. Lindstrom, T.M. and P.R. Bennett, *15-Deoxy- δ 12,14-prostaglandin j2 inhibits interleukin-1 β -induced nuclear factor- κ b in human amnion and myometrial cells: mechanisms and implications*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3534-43.
308. Pirianov, G., et al., *The cyclopentenone 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J(2) delays lipopolysaccharide-induced preterm delivery and reduces mortality in the newborn mouse*. Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 699-706.
309. Liu, T., et al., *NF-kappaB signaling in inflammation*. Signal Transduct Target Ther, 2017. **2**.
310. Gotsch, F., et al., *The fetal inflammatory response syndrome*. Clin Obstet Gynecol, 2007. **50**(3): p. 652-83.
311. Yuan, T.M., et al., *Intrauterine infection/inflammation and perinatal brain damage: role of glial cells and Toll-like receptor signaling*. J Neuroimmunol, 2010. **229**(1-2): p. 16-25.
312. Athanassakis, I., et al., *Inhibition of nitric oxide production rescues LPS-induced fetal abortion in mice*. Nitric Oxide, 1999. **3**(3): p. 216-24.

313. Amaral, L.M., et al., *Maternal iNOS genetic polymorphisms and hypertensive disorders of pregnancy*. J Hum Hypertens, 2012. **26**(9): p. 547-52.
314. Girouard, J., et al., *Molecular therapy with derivatives of amino benzoic acid inhibits tumor growth and metastasis in murine models of bladder cancer through inhibition of TNFalpha/NFKappaB and iNOS/NO pathways*. Biochem Pharmacol, 2019: p. 113778.
315. Szelag, M., et al., *Targeted inhibition of STATs and IRFs as a potential treatment strategy in cardiovascular disease*. Oncotarget, 2016. **7**(30): p. 48788-48812.
316. Herrington, F.D., R.J. Carmody, and C.S. Goodyear, *Modulation of NF-kappaB Signaling as a Therapeutic Target in Autoimmunity*. J Biomol Screen, 2016. **21**(3): p. 223-42.
317. Zhou, X.X., P.J. Gao, and B.G. Sun, *Pravastatin attenuates interferon-gamma action via modulation of STAT1 to prevent aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009. **36**(4): p. 373-9.
318. Miller, S.C., et al., *Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action*. Biochem Pharmacol, 2010. **79**(9): p. 1272-80.
319. Chuang, S.E., et al., *Basal levels and patterns of anticancer drug-induced activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), and its attenuation by tamoxifen, dexamethasone, and curcumin in carcinoma cells*. Biochem Pharmacol, 2002. **63**(9): p. 1709-16.
320. Stronach, E.A., et al., *HDAC4-regulated STAT1 activation mediates platinum resistance in ovarian cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(13): p. 4412-22.
321. Algra, A.M. and P.M. Rothwell, *Effects of regular aspirin on long-term cancer incidence and metastasis: a systematic comparison of evidence from observational studies versus randomised trials*. Lancet Oncol, 2012. **13**(5): p. 518-27.
322. Rothwell, P.M., et al., *Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality, and non-vascular death: analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials*. Lancet, 2012. **379**(9826): p. 1602-12.
323. Umar, A., et al., *Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention*. Semin Oncol, 2016. **43**(1): p. 65-77.

324. Harizi, H. and N. Gualde, *Dendritic cells produce eicosanoids, which modulate generation and functions of antigen-presenting cells*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2002. **66**(5-6): p. 459-66.
325. Slattery, M.L., et al., *Tumor necrosis factor-related genes and colon and rectal cancer*. Int J Mol Epidemiol Genet, 2011. **2**(4): p. 328-38.
326. Blank, N., et al., *A fast, simple and sensitive method for the detection and quantification of detergent-resistant membranes*. J Immunol Methods, 2002. **271**(1-2): p. 25-35.
327. Subramaniam, P.S. and H.M. Johnson, *Lipid microdomains are required sites for the selective endocytosis and nuclear translocation of IFN-gamma, its receptor chain IFN-gamma receptor-1, and the phosphorylation and nuclear translocation of STAT1alpha*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1959-69.
328. Sen, S., et al., *Restoration of IFNgammaR subunit assembly, IFNgamma signaling and parasite clearance in Leishmania donovani infected macrophages: role of membrane cholesterol*. PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002229.
329. Legler, D.F., et al., *Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation*. Immunity, 2003. **18**(5): p. 655-64.
330. Fuhler, G.M., et al., *The reduced GM-CSF priming of ROS production in granulocytes from patients with myelodysplasia is associated with an impaired lipid raft formation*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(2): p. 449-57.
331. Li, S., et al., *Intrauterine administration of hCG-activated autologous human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) promotes live birth rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure*. J Reprod Immunol, 2017. **119**: p. 15-22.
332. Barash, A., et al., *Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patients undergoing in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2003. **79**(6): p. 1317-22.
333. Nakhai-Pour, H.R., et al., *Use of nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and the risk of spontaneous abortion*. CMAJ, 2011. **183**(15): p. 1713-20.
334. Makrigiannakis, A., et al., *Intrauterine CRH-treated PBMC in repeated implantation failure*. Eur J Clin Invest, 2019. **49**(5): p. e13084.

335. Yoshioka, S., et al., *Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer*. Hum Reprod, 2006. **21**(12): p. 3290-4.
336. Kalantaridou, S.N., et al., *Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: an update*. J Reprod Immunol, 2010. **85**(1): p. 33-9.
337. Fujiwara, H., *Do circulating blood cells contribute to maternal tissue remodeling and embryo-maternal cross-talk around the implantation period?* Mol Hum Reprod, 2009. **15**(6): p. 335-43.
338. Brinsden, P.R., et al., *Recombinant human leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent unexplained implantation failure*. Fertil Steril, 2009. **91**(4 Suppl): p. 1445-7.
339. Wang, W., et al., *Regulation of human endometrial stromal proliferation and differentiation by C/EBPbeta involves cyclin E-cdk2 and STAT3*. Mol Endocrinol, 2012. **26**(12): p. 2016-30.
340. Stewart, C.L., *Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo*. Mol Reprod Dev, 1994. **39**(2): p. 233-8.
341. Staun-Ram, E. and E. Shalev, *Human trophoblast function during the implantation process*. Reprod Biol Endocrinol, 2005. **3**: p. 56.
342. Guzeloglu-Kayisli, O., U.A. Kayisli, and H.S. Taylor, *The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions*. Semin Reprod Med, 2009. **27**(1): p. 62-79.
343. Schofield, G. and S.J. Kimber, *Leukocyte subpopulations in the uteri of leukemia inhibitory factor knockout mice during early pregnancy*. Biol Reprod, 2005. **72**(4): p. 872-8.
344. Winship, A., et al., *Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Inhibition during Mid-Gestation Impairs Trophoblast Invasion and Spiral Artery Remodelling during Pregnancy in Mice*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0129110.
345. Suman, P., N. Shembekar, and S.K. Gupta, *Leukemia inhibitory factor increases the invasiveness of trophoblastic cells through integrated increase in the expression of adhesion molecules and pappalysin 1 with a concomitant decrease in the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*. Fertil Steril, 2013. **99**(2): p. 533-42.

346. Aplin, J.D., *Developmental cell biology of human villous trophoblast: current research problems*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(2-3): p. 323-9.
347. Hurt-Camejo, E., et al., *CD44, a cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, mediates binding of interferon-gamma and some of its biological effects on human vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18957-64.
348. Davis, S.M., et al., *Leukemia Inhibitory Factor-Loaded Nanoparticles with Enhanced Cytokine Metabolic Stability and Anti-Inflammatory Activity*. Pharm Res, 2018. **35**(1): p. 6.
349. Hamelin-Morrisette, J., et al., *Leukemia inhibitory factor regulates the activation of inflammatory signals in macrophages and trophoblast cells*. Mol Immunol, 2020. **120**: p. 32-42.
350. Delgado, C., G.E. Francis, and D. Fisher, *The uses and properties of PEG-linked proteins*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1992. **9**(3-4): p. 249-304.
351. Strom, T.B. and M. Koulmanda, *Cytokine related therapies for autoimmune disease*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(6): p. 676-81.
352. Park, J., et al., *Modulation of CD4+ T lymphocyte lineage outcomes with targeted, nanoparticle-mediated cytokine delivery*. Mol Pharm, 2011. **8**(1): p. 143-52.
353. Jeannin, P., D. Duluc, and Y. Delneste, *IL-6 and leukemia-inhibitory factor are involved in the generation of tumor-associated macrophage: regulation by IFN-gamma*. Immunotherapy, 2011. **3**(4 Suppl): p. 23-6.
354. Kryczek, I., et al., *B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma*. J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 871-81.
355. Zou, W., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 263-74.
356. Mantovani, A., P. Allavena, and A. Sica, *Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression*. Eur J Cancer, 2004. **40**(11): p. 1660-7.
357. Condeelis, J. and J.W. Pollard, *Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis*. Cell, 2006. **124**(2): p. 263-6.
358. Costa-Pereira, A.P., et al., *Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8043-7.

359. Avalle, L., et al., *STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance*. JAKSTAT, 2012. **1**(2): p. 65-72.
360. Yu, T., et al., *SENP1 regulates IFN-gamma-STAT1 signaling through STAT3-SOCS3 negative feedback loop*. J Mol Cell Biol, 2017. **9**(2): p. 144-153.
361. Lu, L., et al., *Gene regulation and suppression of type I interferon signaling by STAT3 in diffuse large B cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(3): p. E498-E505.
362. Olson, M.R., et al., *STAT3 Impairs STAT5 Activation in the Development of IL-9-Secreting T Cells*. J Immunol, 2016. **196**(8): p. 3297-304.
363. Fleetwood, A.J., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 5245-52.
364. Ushach, I. and A. Zlotnik, *Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage*. J Leukoc Biol, 2016. **100**(3): p. 481-9.
365. Campbell, I.K., et al., *Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3639-44.
366. Terakawa, J., et al., *Embryo implantation is blocked by intraperitoneal injection with anti-LIF antibody in mice*. J Reprod Dev, 2011. **57**(6): p. 700-7.
367. Korth-Bradley, J.M., *Industry Perspective of Drug Development for Pregnant/Breastfeeding Women*. Clin Pharmacol Ther, 2016. **100**(1): p. 19-21.
368. Haddad, E.K., A.J. Duclos, and M.G. Baines, *Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells*. J Exp Med, 1995. **182**(4): p. 1143-51.
369. Clark, D.A., M.R. McDermott, and M.R. Szewczuk, *Impairment of host-versus-graft reaction in pregnant mice. II. Selective suppression of cytotoxic T-cell generation correlates with soluble suppressor activity and with successful allogeneic pregnancy*. Cell Immunol, 1980. **52**(1): p. 106-18.
370. Chaouat, G., et al., *Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy*. J Reprod Fertil, 1990. **89**(2): p. 447-58.

371. Naume, B., et al., *Gene expression and secretion of cytokines and cytokine receptors from highly purified CD56+ natural killer cells stimulated with interleukin-2, interleukin-7 and interleukin-12*. Eur J Immunol, 1993. **23**(8): p. 1831-8.
372. Burchett, S.K., et al., *Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes*. J Immunol, 1988. **140**(10): p. 3473-81.
373. Ding, A.H., C.F. Nathan, and D.J. Stuehr, *Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production*. J Immunol, 1988. **141**(7): p. 2407-12.
374. Ogando, D.G., et al., *The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice*. Reproduction, 2003. **125**(1): p. 95-110.
375. Gross, G., et al., *Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **278**(6): p. R1415-23.
376. Besinger, R.E., et al., *Randomized comparative trial of indomethacin and ritodrine for the long-term treatment of preterm labor*. Am J Obstet Gynecol, 1991. **164**(4): p. 981-6; discussion 986-8.
377. *Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes. NIH Consensus Development Panel on the Effect of Corticosteroids for Fetal Maturation on Perinatal Outcomes*. JAMA, 1995. **273**(5): p. 413-8.
378. Posadas, I., et al., *Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression*. Br J Pharmacol, 2004. **142**(2): p. 331-8.
379. Wang, C., et al., *Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum*. BMC Immunol, 2013. **14**: p. 6.
380. Layoun, A., M. Samba, and M.M. Santos, *Isolation of murine peritoneal macrophages to carry out gene expression analysis upon Toll-like receptors stimulation*. J Vis Exp, 2015(98): p. e52749.
381. Lin, Y.Y., et al., *Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of the Marine-Derived Compound Excavatolide B Isolated from the Culture-Type Formosan Gorgonian Briareum excavatum*. Mar Drugs, 2015. **13**(5): p. 2559-79.

ANNEXE A

ÉTUDE DE L'EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DE DAB-1 *IN VIVO*

En lien avec le troisième objectif, qui était de déterminer si les DABs peuvent réduire l'activation de Mφs péritonéaux de souris lorsque qu'injectés *in vivo*, une série d'expériences supplémentaires a été réalisée et est décrite dans la présente annexe. Un modèle murin d'inflammation a été utilisé pour confirmer les résultats *in vitro* obtenus avec DAB-1 et étudier ses effets sur des marqueurs moléculaires associés à des maladies gestationnelles tel que iNOS/NO et COX-2 et bien décrits dans des modèles murins de ces pathologies.

A.1 Implication de iNOS/NO et COX-2 dans les modèles murins de pathologies gestationnelles

A.1.1 Perte embryonnaire précoce

Beaucoup d'information sur les mécanismes causant la perte embryonnaire précoce ont été obtenues antérieurement avec l'accouplement de souris CBA/J x DBA/2 [368]. Les femelles CBA/J ont un taux de résorption embryonnaire spontané de 20 à 25 % [369]. L'implication de cytokines comme TNF α , IFN γ et IL-2 a été rapportée [370]. IL-2 induit la production de IFN γ par les cellules NK [371], qui à son tour, stimule les Mφs à produire du TNF α [372] et du NO [373]. Dans le modèle murin CBA/J x DBA/2, ces mêmes cytokines augmentent le taux de résorption des embryons [370]. Dans un modèle de perte embryonnaire précoce induite par le LPS, dans lequel 100 % des embryons sont expulsés 48 h après exposition, l'administration d'aminoguanidine, un inhibiteur de l'activité d'iNOS, empêche complètement la perte embryonnaire [374].

A.1.2 Naissance prématurée

Les niveaux des prostaglandines PGE₂ et PGF_{2α} augmentent au moment de l'accouchement, à la fois dans les tissus fœtaux et dans le liquide amniotique [375]. Dans les modèles murins d'inflammation induite par le LPS, la naissance prématurée des souriceaux est accompagnée de la production de PGs, particulièrement la PGF_{2α} [375]. Dans ce même modèle, l'inhibition spécifique de COX-1 ou COX-2 retarde d'au moins 24 h l'accouchement induit par le LPS pour 80 % des femelles en retournant les niveaux de PGs près des valeurs physiologiques basales [375]. Toutefois, seulement 25 % de ces femelles avaient des fœtus viables. Rappelons que chez l'humain, le traitement avec des agents anti-inflammatoires bloquant la production de PGs de façon non spécifique entraîne aussi des effets secondaires indésirables à la mère et au fœtus, même s'ils arrivent aussi à retarder un peu la naissance [376, 377].

A.2 Inflammation de la patte chez la souris

Le modèle *in vivo* que nous avons utilisé pour la détermination du potentiel anti-inflammatoire des molécules à l'étude est celui de l'œdème de la patte induit par la carraghénane, un glucide d'origine végétale. La réaction inflammatoire causée par la carraghénane est biphasique, les six premières heures étant caractérisées par l'expression d'iNOS et la production de NO, alors que la seconde phase, s'étalant sur les 48 à 72 heures suivant l'injection de carraghénane, est due à une forte expression de COX-2 et une augmentation de la production de la prostaglandine PGE₂ (Figure A.1) [378]. L'utilisation de ce modèle permet de déterminer simultanément le potentiel anti-inflammatoire de molécules pour réguler la production de NO et de PGs.

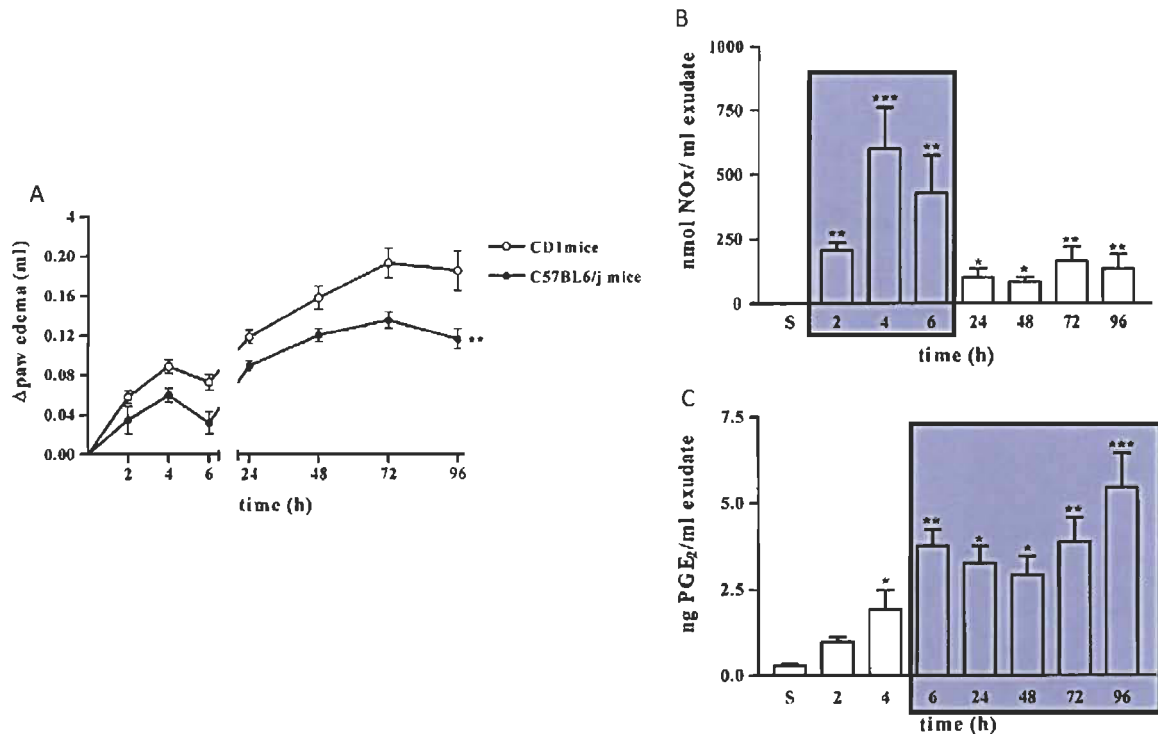


Figure A.1 Modèle murin d'inflammation de la patte.

A) Comparaison entre l'enflure causée par la carraghénane dans les souris C57BL/6J et CD-1. Les souris CD-1 présentent un œdème plus important que les souris C57BL/6J pour la même quantité de carraghénane injectée. B) Dosage de l'oxyde nitrique dans l'exsudat de pattes inflammées. Les premières 6 h de l'inflammation présentent une production de NO. C) Dosage de PGE₂ dans les pattes inflammées. La présence de prostaglandines est impliquée dans la 2^e phase de l'inflammation, à partir de 6 h jusqu'à 72 h après l'injection de carraghénane. Adaptée de Posadas et al. [378].

A.3 Objectifs

Le principal objectif des études présentées dans cette annexe visait à déterminer si DAB-1 pouvait réguler, *in vivo*, l'inflammation induite par le LPS ou la carraghénane, deux composés pro-inflammatoire activant les voies iNOS/NO et COX-2/PGs. Le mécanisme moléculaire d'action de DAB-1 étant à ce jour inconnu, l'étude de la régulation de voies inflammatoires impliquée dans les maladies gestationnelles dans des modèles *in vivo* était essentielle afin de confirmer le potentiel thérapeutique de DAB-1 dans ce type de pathologie.

A.4 Matériel et méthode

A.4.1 Réactifs, milieux de culture et anticorps

Les milieux de culture, le sérum et les réactifs ont été achetés chez Wisent (St-Bruno, Canada). La cytokine IFN γ provenait de Peprotech (Montréal, Canada). Le LPS O55:B5, le dimethyl sulfoxyde (DMSO) et l'anticorps monoclonal murin dirigé contre β -actine, la γ -carraghénane, la formaline de même que les réactifs pour l'électrophorèse proviennent de Sigma Chemical Company (Oakville, Canada). Le kit de dosage du nitrite était de chez Cedarlane (Burlington, Ontario). Les cocktails d'inhibiteurs de protéases et phosphatases étaient de BioShop Canada (Burlington, Canada). L'anticorps monoclonal murin dirigé contre la protéine COX-2 (#12282), l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à Alexa Fluor 488 (#4412) et le milieu de montage Prolong Gold Anti-fade avec DAPI étaient de chez Cell Signaling Technologies (Danvers, USA). L'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre iNOS (ab15323) a été acheté chez Abcam (Toronto, Canada). L'anticorps secondaire IgG anti-lapin couplé à la peroxydase du raifort provenait de Bio-Rad Laboratories (Mississauga, Canada). Le kit de détection par chimiluminescence était de chez Thermo Fisher Scientific (Montréal, Canada). Les seringues et aiguilles étaient de BD (Mississauga, Canada). Le microscope confocal utilisé est le TSC SP8 de Leica (Concord, Ontario).

A.4.2 Dosage de l'oxyde nitrique produit par des macrophages péritonéaux murins traités *in vivo* avec DAB-1

Parmi les cultures primaires de M ϕ s murins, les M ϕ s péritonéaux sont plus matures et ont un phénotype plus stable que ceux dérivés de la moelle osseuse ou de la rate [379]. Ils peuvent être récoltés par lavages de la cavité péritonéale de souris [380]. Dans l'expérience présentée à la figure A.2, les souris ont été injectées avec 100 μ L de DAB-1 à 150 μ M par voie intrapéritonéale (IP) 1 h avant le sacrifice. Les M ϕ s récoltés ont été mis en plaque, puis activés ou non avec 100 ng/mL de LPS pendant 24 h. Le NO a été dosé dans le milieu de culture par la réaction de Greiss.

A.4.3 Enflure de la patte induite par la carraghénane dans un modèle murin

Pour cette expérience, une inflammation a été causée dans la patte de souris CD-1 femelles avec une injection de 50 μL d'une solution de carraghénane à 1 % v/v dans la région plantaire de l'une des deux pattes arrière. Des injections IP de 100 μL de DAB-1 à 150 μM ont été administrées 1h avant l'injection de carraghénane, puis 2 h, 24 h et 48 h après. L'œdème a été mesuré 2 h, 4 h, 24 h, 48 h et 72 h après l'injection de l'agent pro-inflammatoire avec un micromètre à l'endroit pointé à la figure A.2. Les mesures présentées à la figure A.3 représentent la différence d'épaisseur, en millimètre, entre la patte avant l'injection de la carraghénane et la patte enflée pour chacun des temps d'expérimentation indiqués.

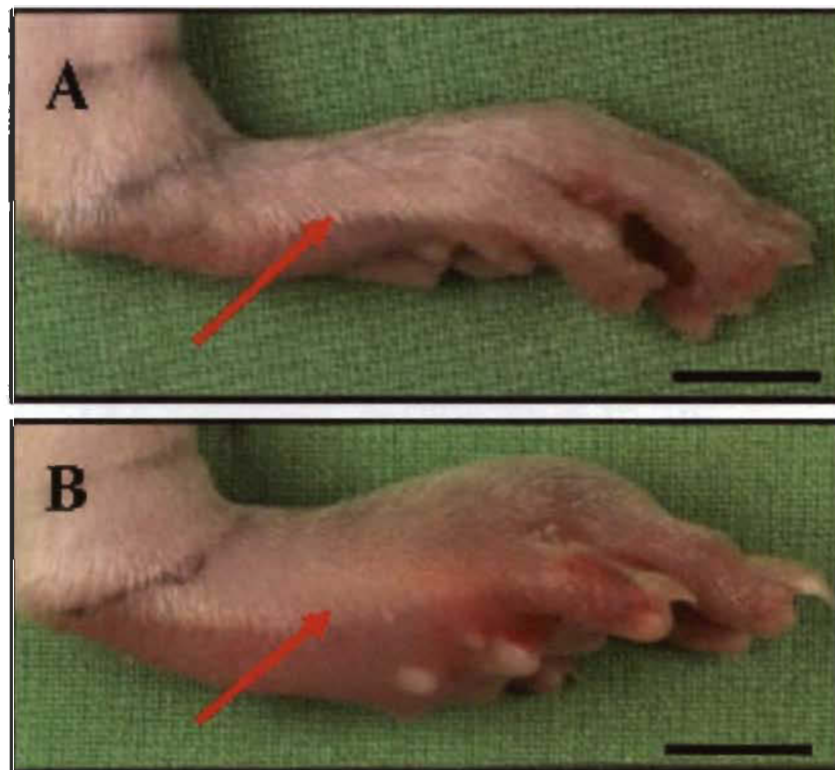


Figure A.2 Mesure de l'enflure de la patte.

La flèche rouge indique l'endroit où l'épaisseur de la patte (A) non enflée et (B) enflée a été mesurée avec l'aide du micromètre. Adaptée de Lin et al. [381].

A.4.4 Analyse par Western blot de la présence protéique d'iNOS et COX-2

Pour l'analyse d'expression des protéines COX-2 et iNOS, 8×10^5 cellules RAW264,7 ont été mises en plaque et incubées pour adhésion pendant la nuit. Elles ont par la suite été prétraitées pendant 30 minutes avec DAB-1 à $15 \mu\text{M}$ et traitées avec 100 ng/mL de LPS pendant 24 h, puis récoltées et lysées aux ultrasons en présence d'un tampon contenant du Triton X-100. Une électrophorèse a été réalisée avec $40 \mu\text{g}$ de protéines pour chaque échantillon. L'immunodétection avec des anticorps spécifiques pour iNOS, COX-2 et β -actine a été effectuée comme décrit précédemment [138]. L'analyse densitométrique a été réalisée avec le logiciel ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

A.4.5 Marquage de iNOS et COX-2 dans les macrophages péritonéaux murins traités avec DAB-1 *in vivo*

Le même protocole que pour l'expérience A.4.4 a été utilisé pour cette étude, à la différence que les M ϕ s ont été mis en culture sur des lamelles de verre, puis activés pendant une période de 24 h avec du LPS à 100 ng/mL pour induire l'expression des protéines iNOS et COX-2. Le PBS a été utilisé comme contrôle. Les M ϕ s ont par la suite été fixés avec de la formaline pendant 20 min à température ambiante, puis perméabilisés 20 minutes à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ avec du méthanol, avant d'être marqués toute la nuit à $4 \text{ }^\circ\text{C}$ avec des anticorps spécifiques pour iNOS (1 : 50) et COX-2 (1 : 800). L'anticorps secondaire (1 : 1000) a été incubé pendant 1 h à température ambiante à l'obscurité. Les lamelles ont été montées avec du Prolong Gold Anti-fade contenant du DAPI, puis visualisée à l'aide d'un microscope confocal avec un objectif 63x.

A.4.6 Analyses statistiques

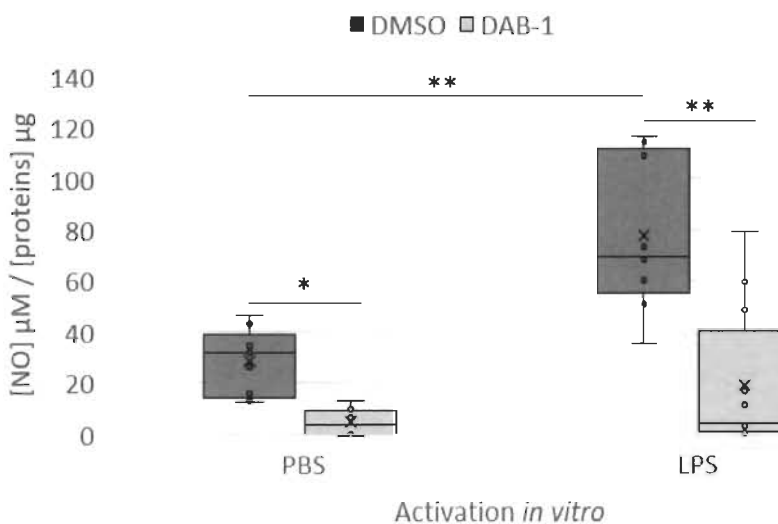
Pour toutes les expériences, la moyenne des données \pm écart type est présentée dans les graphiques, et représente au moins deux expériences distinctes. Les données ont été analysées par le test *one-way* ANOVA suivi du post-test de Holm en utilisant le logiciel

Prism, version 3.03 (GraphPad). Les valeurs de $p \leq 0.05$ ont été considérées comme indiquant une différence significative entre les conditions.

A.5 Résultats

A.5.1 L'injection intrapéritonéale de DAB-1 réduit significativement l'oxyde nitrique produit par les macrophages péritonéaux

Pour déterminer le potentiel anti-inflammatoire de DAB-1 *in vivo*, des souris ont été injectées avec 15 nmol de DAB-1, puis les M ϕ s péritonéaux ont été isolés, puis activés *in vitro* avec 100ng/mL de LPS pendant 24 h. La figure A.3 montre que les M ϕ s non activés issus de la cavité péritonéale de souris CD-1 exprimaient un niveau basal de production de NO et celui-ci est diminué significativement ($p < 0,05$) chez les souris ayant reçu une injection avec DAB-1. Les niveaux induits par le LPS *in vitro* sont également grandement diminués ($p < 0,01$) chez les souris qui avaient reçu une l'injection avec DAB-1 ($n = 16$). Les concentrations sont ici exprimées en μM de NO par μg de protéine de la lyse cellulaire subséquente.



Production d'oxyde nitrique par des macrophages péritonéaux isolés de souris femelles CD-1 injectées IP avec 15 nmol de DAB-1 1 h avant le sacrifice, puis activés *in vitro* avec du 100 ng de LPS pendant 24 h (16 souris, 8 souris/groupe) * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

A.5.2 Le traitement avec DAB-1 diminue l'œdème de la patte induit par le carraghénane pendant la première phase de l'inflammation, mais pas dans la deuxième

Pour caractériser l'effet anti-inflammatoire de DAB-1, le modèle *in vivo* d'inflammation de la patte chez la souris a été utilisé. Les injections IP avec 15 nmol de DAB-1 réduisent significativement ($p < 0,01$) l'enflure de la patte à 4 h et 24 h après l'injection de carraghénane. À 2 h, il y a une tendance à la baisse, mais la différence n'est pas significative alors que pour les temps de 48 h et 72 h, la tendance est légèrement à la hausse, sans que la différence ne soit significative non plus (Figure A.4). L'enflure est mesurée en millimètres pour un total de 16 souris, avec 8 souris dans chaque groupe.

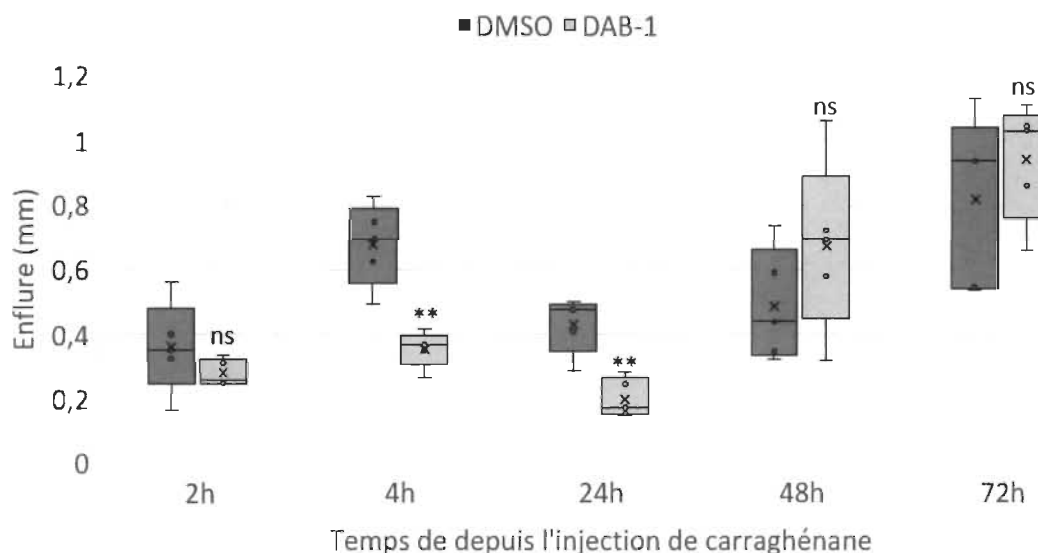


Figure A.4 Effet de DAB-1 dans un modèle d'inflammation de la patte. Œdème induit par la carraghénane dans des pattes de souris CD-1 femelles traitées ou non avec 150 μ M de DAB-1 24 h et 1 h avant l'injection de carraghénane, puis 2 h, 24 h et 48 h après. Les pattes ont été mesurées 2 h, 4 h, 24 h, 48 h et 72 h après l'induction de l'inflammation (16 souris, 8 souris/groupe) ** $p < 0.01$.

A.5.3 DAB-1 diminue l'expression d'iNOS induite par l'IFN γ et le LPS, mais pas celle de COX-2

Pour une première investigation des mécanismes sous-jacents aux résultats obtenus dans l'expérience d'inflammation de la patte, une analyse par Western blot a été réalisée

afin d'évaluer les niveaux protéiques d'iNOS et de COX-2, respectivement impliqués lors de la première et de la seconde phase de l'inflammation dans ce modèle (Figure A.5). L'analyse de la présence protéique d'iNOS et COX-2 dans la lignée cellulaire RAW264,7 révèle une différence significative seulement pour iNOS induit par le LPS ($p < 0,05$) et la combinaison LPS et IFN γ ($p < 0,01$) après un prétraitement *in vitro* avec DAB-1. Bien que la tendance soit à la hausse, la différence d'expression protéique de COX-2 n'est pas significative après le traitement avec DAB-1 dans les RAW264,7 activés avec LPS ou la combinaison de IFN γ et LPS ($n = 3$).

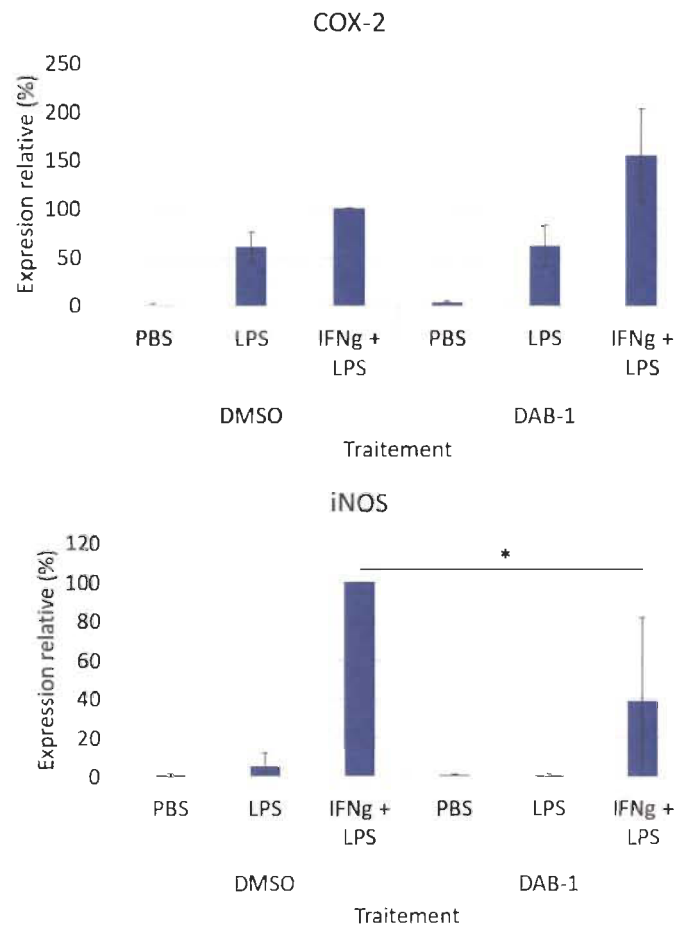
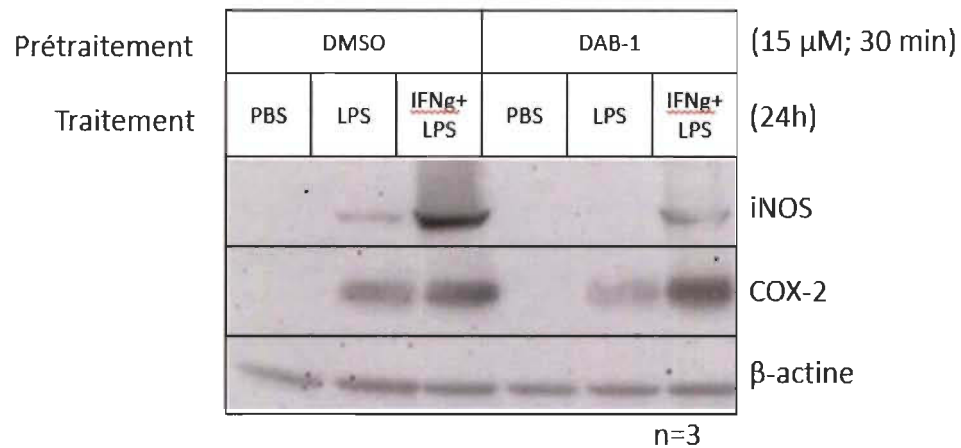


Figure A.5 DAB-1 dans la modulation de la présence protéique de iNOS et COX-2. Image représentative et analyse graphique de la présence protéique de iNOS et COX-2 dans les cellules RAW264,7 après un prétraitement avec DAB-1 à 15 μ M pendant 30 min et une induction subséquente avec 100 ng/mL de LPS pendant 24 h, ou une combinaison d'IFN γ et de LPS. * $p < 0.05$ ($n = 3$).

A.5.4 L'injection de DAB-1 réduit le marquage d'iNOS dans les macrophages péritonéaux activés avec LPS, mais pas celui de COX-2

Pour confirmer l'effet *in vitro* de DAB-1 sur la présence protéique d'iNOS et COX-2 obtenus dans la lignée cellulaire RAW264,7, une étude en immunofluorescence avec des Mφs péritonéaux de souris traités IP avec DAB-1 a été réalisée et est présentée à la figure A.6. Les niveaux basaux et induits d'iNOS par le LPS ont été diminués par le traitement avec DAB-1 (n = 16). Les niveaux de COX-2 semblent inchangés, qu'ils soient induits ou non par le LPS (n = 16).

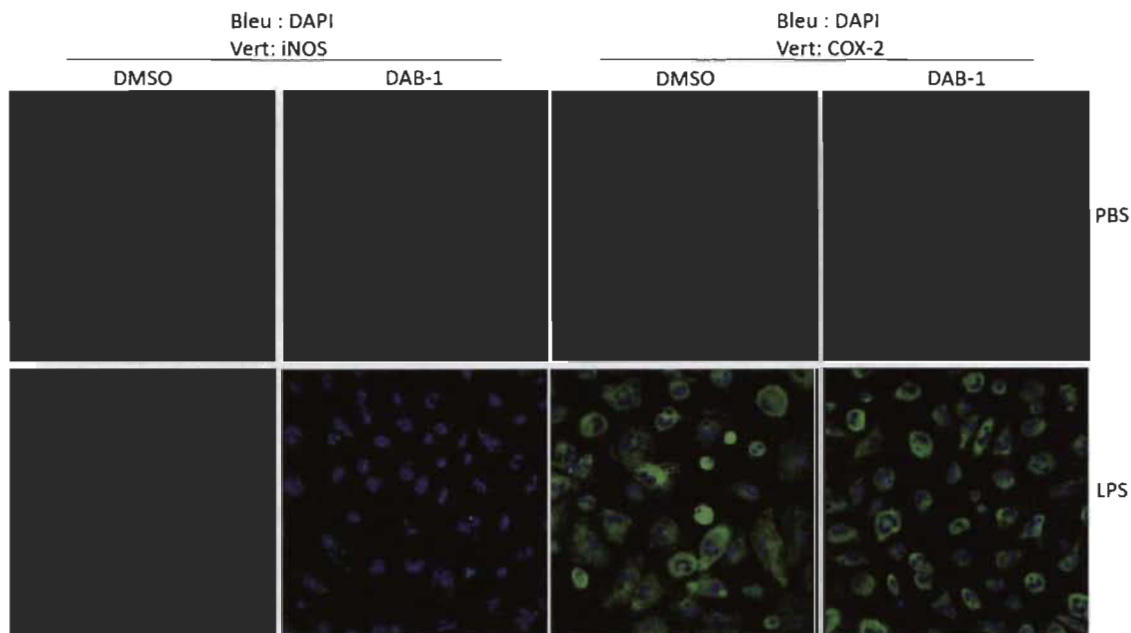


Figure A.6 Immunofluorescence de iNOS et COX-2 dans Mφs péritonéaux de souris traitées avec DAB-1.

Image représentative du marquage pour iNOS et COX-2 dans des Mφs péritonéaux isolés de souris CD-1 femelles injectées avec DMSO (témoin) ou 150 μ M de DAB-1 pendant 1 h avant le sacrifice, puis activés *in vitro* avec 100 ng/mL de LPS pendant 24 h (16 souris, 8 souris/groupe).

A.6 Conclusion

L'objectif de cette dernière étude était d'étudier l'effet de DAB-1 sur des voies pro-inflammatoires impliquées dans les complications gestationnelles *in vivo* et d'élucider

son mécanisme d'action sur les Mφs. Le modèle d'inflammation de la patte a permis de déterminer, simultanément, si DAB-1 avait un impact sur l'enflure plantaire de souris caractérisée par l'expression d'iNOS et de COX-2 et si DAB-1 régulait l'expression de ces deux enzymes dans les Mφs péritonéaux de souris témoins et traitées avec la carraghénane. Nous avons mis en évidence que DAB-1, *in vivo*, diminue l'expression autant basale qu'induite de la protéine iNOS, ainsi que la production de NO par ces cellules. De plus, l'enflure de la patte pendant la phase caractérisée par l'expression d'iNOS a été diminuée. Aucun effet, toutefois, n'a été détecté sur l'expression protéique de COX-2 dans les Mφs péritonéaux traités avec DAB-1 ni dans l'enflure de la patte pendant la phase impliquant COX-2. En résumé, nous avons pu confirmer que le mécanisme anti-inflammatoire de DAB-1, *in vivo*, impliquait l'inhibition de l'expression protéique d'iNOS et la production de NO par les Mφs murins, mais que ce composé anti-inflammatoire ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de COX-2.