

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
ANGHAM DALLAGI

RÔLE RÉGULATEUR DE L'AXE LIF/TROPHOBLASTE/IL10
SUR LE PHÉNOTYPE PRO-INFLAMMATOIRE DU
MACROPHAGE ACTIVÉ PAR L'IFN γ

DÉCEMBRE 2015

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.

REMERCIEMENTS

Travail dédié au souvenir de mon regretté beau-père...

Que Dieu t'accueille dans son éternel paradis...

Mes remerciements les plus sincères et les plus profonds vont tout d'abord à mon directeur de recherche, le Dr Carlos Reyes-Moreno. J'espère que vous puissiez trouver en ce travail une petite compensation de l'investissement que vous avez fait en moi et soyez assuré de ma grande reconnaissance. Merci de m'avoir guidée vers la voie de la recherche, grâce à votre expertise, je ne verrais plus jamais la relation mère embryon comme avant... Vous m'avez marquée, vous m'avez forgée.

Je remercie vivement mes collègues de laboratoire, Julie Girouard et Jovane Hamelin-Morissette pour leur aide significative et les moments passés ensemble dans une ambiance des plus agréables. Je tiens à remercier aussi toute personne ayant fourni une quelconque aide pour l'accomplissement de ce projet.

Mes chers parents, mes frères et ma superbe belle-mère Balboulina, je vous exprime sincèrement ma profonde gratitude pour avoir cru en moi et pour votre soutien moral qui m'a énormément motivée.

Merci à mon mari, je ne te remercierai jamais assez pour ta compréhension, tes encouragements et tout ton support afin de me laisser consacrer un maximum de temps à ce diplôme. Toi et mes deux trésors Aman et Zakaloulou, source de mon courage et persévérance le long de ma maîtrise, je vous offre ce travail en espérant que vous serez fiers de maman.

RESUMÉ

L'avortement spontané en début de grossesse est l'un des plus communs problèmes reproductifs chez les femmes en âge de procréer. L'étiologie d'un pourcentage indéniabie de ces cas est due à un défaut dans l'organisation de la réponse immunitaire, en particulier la fonctionnalité du macrophage utérin. C'est exceptionnel que les macrophages utérins possèdent la capacité de tolérer et de promouvoir le succès de l'implantation de l'allogreffe embryonnaire alors que, par définition, leurs fonctions sont de protéger la muqueuse contre les pathogènes. Toutefois, la suractivation de leurs voies pro-inflammatoires, notamment en réponse aux infections, constitue un défi majeur pour le système immunitaire maternel. En effet, une telle situation impose des mécanismes de régulation hautement efficaces pour garantir la survie de l'embryon face aux processus inflammatoires qui pourraient causer de graves complications, dont la perte embryonnaire précoce spontanée ou des naissances prématurées.

L'interféron gamma ($\text{IFN}\gamma$) et le facteur inhibiteur de leucémie (LIF), présents dans l'utérus gestant, sont des modulateurs clés des fonctions du macrophage utérin. L' $\text{IFN}\gamma$ est l'inducteur prototypique du phénotype pro-inflammatoire des macrophages tandis que les trophoblastes sont les principales cibles de l'action de LIF dans le placenta. LIF est reconnue aussi pour sa capacité à générer une réponse anti-inflammatoire et à produire des cellules immunes régulatrices et immunosuppressives. Les effets de l' $\text{IFN}\gamma$ sur les macrophages sont médiés par l'activation du facteur de transduction STAT1 et se traduisent par la réduction de la motilité cellulaire et l'augmentation de leur production/sécrétion de facteurs cytotoxiques et de l'expression de gènes pro-inflammatoires.

Le but de notre étude était d'examiner si et comment des facteurs solubles produits par les cellules du trophoblaste différenciées sans ou avec LIF régulent les effets de l' $\text{IFN}\gamma$ sur le comportement des macrophages. Nos résultats ont mis la lumière sur la capacité des facteurs solubles des trophoblastes différenciés en présence de LIF à inhiber l'activation de STAT1 chez les macrophages et inversement activer STAT3 en réponse à l' $\text{IFN}\gamma$. De plus, les facteurs solubles dérivés du trophoblaste diminuent la prolifération cellulaire, mais renforcent les réponses chimiotactiques et de migration des macrophages immobilisés par l' $\text{IFN}\gamma$ et que ces effets sont plus prononcés chez les trophoblastes différenciés en présence de LIF. Ainsi, les trophoblastes génèrent des macrophages activés par $\text{IFN}\gamma$ avec une expression réduite de gènes pro-inflammatoires ainsi qu'une fonction cytotoxique diminuée. Les résultats de signalisation en présence d'anticorps neutralisants anti-IL-10 et d'IL-10 exogène suggèrent que les actions des facteurs dérivés du trophoblaste sur le phénotype des macrophages pro-inflammatoires résultent de la capacité de l'IL-10 d'origine trophoblastique à soutenir l'activation de STAT3 et à supprimer l'activation de STAT1 induite par l' $\text{IFN}\gamma$.

Nos études *in vitro* sont les premières à démontrer une collaboration entre LIF, les trophoblastes et l'IL-10 dans la modulation de la réponse inflammatoire véhiculée par les macrophages en réponse aux cytokines pro-inflammatoires. Elles suggèrent ainsi que le trophoblaste serait capable d'initier des mécanismes de défense contre les effets néfastes des macrophages activés et contribuer au succès de la grossesse.

Mots-clés : avortement, facteur gestationnel, inflammation, macrophages, trophoblastes

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RESUMÉ	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
CHAPITRE I	
REVUE DES CONNAISSANCES	1
1.1 Mise en contexte de la problématique de l'étude	1
1.2 L'implantation embryonnaire.....	3
1.3 L'inflammation utérine et gestationnelle.....	5
1.3.1 La réponse inflammatoire en début de grossesse/gestation	5
1.3.2 Effet bénéfique d'une réponse inflammatoire régulée au cours de la grossesse précoce	7
1.3.3 Effet abortif de cellules et médiateurs pro-inflammatoires durant la grossesse précoce	13
1.4 Molécules immuno-régulatrices sur le site de l'implantation.....	19
1.4.1 L'IL-10, une cytokine compatible avec la grossesse	20
1.4.2 Le facteur inhibiteur de leucémie (LIF) essentiel au succès de la gestation	23
1.4.3 Les trophoblastes sont au centre de la communication entre l'embryon et les macrophages	28
1.5 Hypothèse de travail et objectifs.....	31
1.6 Les cellules BeWos comme modèle cellulaire	32
CHAPITRE II	
THE ACTIVATING EFFECT OF IFNγ ON MONOCYTES/MACROPHAGES IS REGULATED BY THE LIF-TROPHOBLAST-IL10 AXIS THROUGH STAT1 INHIBITION AND STAT3 ACTIVATION	33
Abstract	34
Introduction	35
Material and Methods	38

Reagents and chemicals.....	38
Isolation and purification of term villous cytotrophoblasts.....	39
Villous cytotrophoblast-like BeWo cell differentiation	40
Trophoblast conditioned media collection.....	40
Monocyte and macrophage differentiation.....	41
Migratory/chemotactic assay	42
Motility assay.....	42
Cell viability/proliferation assays.....	43
Protein immunodetection.....	44
RNA isolation and RT-PCR analyses.....	44
Surface antigen expression analysis	45
IL10 neutralization assays	45
Statistical analyses	45
Results.....	46
Villous cytotrophoblast-derived factors repress Stat1 activation but inversely sustain Stat3 activation in IFN γ -activated M ϕ s.....	46
Villous cytotrophoblast-derived IL10 sustain Stat3 activation in M ϕ s	46
Syncytiotrophoblast-derived factors affect cell proliferation but enhance the migratory response of IFN γ -activated monocytes/M ϕ s.....	47
IFN γ -induced Stat1 activation mediated M ϕ motility inhibition.....	49
Syncytiotrophoblast-derived factors modulate M ϕ pro-inflammatory markers expression	50
Syncytiotrophoblast-derived IL10 regulates pro-inflammatory M ϕ function	50
Exogenous IL10 regulates cell motility in IFN γ -activated M ϕ s.....	51
Discussion	51
Acknowledgments.....	55
References	56
Figures and Legends	63
CHAPITRE III	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	73
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	83

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Les étapes de l'implantation embryonnaire	5
1.2	Représentation schématique des interfaces d'interaction directes entre le placenta et les cellules immunes en début de grossesse	7
1.3	Les trois phases immunologiques de la grossesse	9
1.4	Différents types d'activation et d'activités physiologiques du macrophage .	10
1.5	Représentation schématique du mécanisme d'activation classique du macrophage pro-inflammatoire.....	16
1.6	STAT3 est le médiateur de l'action anti-inflammatoire de l'IL-10.....	22
1.7	Représentation schématique du mécanisme d'interaction de l'IL-10 avec son récepteur spécifique.....	23
1.8	La signalisation intracellulaire et les gènes induits par LIF chez les trophoblastes	26
1.9	Étapes de la théorie d'éducation du macrophage par le trophoblaste.....	30

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ARNm	Acide ribonucléique messenger
CCL	Chimiokine de type CC
CD	<i>Cluster of differentiation*</i>
CD14	Récepteur du LPS
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
CT	Cytotrophoblaste
CTEV	Cytotrophoblaste extravilleux
CTV	Cytotrophoblaste villeux
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E-CAD	E-cadhérine
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Facteur de croissance de l'épiderme)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isothiocyanate de fluorescéine)
GAS	<i>Interferon gamma activated site*</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophages-colony stimulating factor</i> (Facteur stimulant la croissance de colonies de granulocytes et de macrophages)
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i> (Antigène de leucocyte humain)
IFN γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
Inos	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (Forme inductible de l'oxyde nitrique synthase)
JAK/STAT	<i>Janus-activated kinase/signal transducers and activator of transcription*</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i> (Facteur inhibiteur de la leucémie)
LPS	Lipopolysaccharide

MDF-2	<i>Myeloid differentiation factor 2</i>
MTT	Bromure de 3 -(4 ,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
M ϕ -1	Macrophage pro-inflammatoire (de type 1)
M ϕ -2	Macrophage anti-inflammatoire (de type 2)
M ϕ s	Macrophages
NK	<i>Natural killers cells</i> (Cellules tueuses naturelles)
NO	<i>Nitric oxide</i> (Oxyde nitrique)
PBS	Phosphate buffered saline (Tampon phosphate salin)
PGE2	Prostaglandine E2
PMA	Phorbol12-myristate 13-acétate
pSTAT	Phospho-STAT
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> (Fluorure de polyvinylidène)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium*</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> (Transcriptase inverse-Réaction de polymérisation en chaîne)
SD	<i>Standard deviation</i> (Écart-type)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulphate de sodium)
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
ST	Syncytiotrophoblaste
TGF β 1	<i>Transforming growth factorβ1</i> (Facteur de croissance transformant β 1)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Récepteur de type Toll)
TNF α	<i>Tumo r necrosis factor α</i> (Facteur de nécrose tumorale α)
Treg	Lymphocyte T régulateur
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

* Il n'y a pas de terme correspondant en français.

CHAPITRE I

REVUE DES CONNAISSANCES

1.1 Mise en contexte de la problématique de l'étude

Parmi les nombreux défis auxquels fait face l'immunologie humaine, l'interaction entre le système immunitaire de la femme enceinte et son fœtus est extraordinairement complexe, mais d'une importance cruciale. De nos jours, malgré le développement indéniable des techniques de procréation naturelles ou médicalement assistées, l'efficacité de la reproduction humaine reste plutôt limitée. La perte précoce et spontanée du produit de conception, communément appelée « fausse couche », complique malheureusement 10 à 20 % des grossesses cliniques durant le premier trimestre et elle est souvent lourdement vécue par les parents. Survenant souvent en période péri-implantatoire, elle est la première cause d'urgence en gynécologie et touche une femme sur quatre durant sa période d'activité génitale [1].

Les recherches menées sur l'étiologie de cette complication gestationnelle ont permis de dresser un bilan étiologique dont 17 % des pertes embryonnaires sont attribuées à des problèmes endocrinologiques [2], 10-15 % à l'anatomie utérine [3], 5 % à des anomalies chromosomiques [4], 5 % à des infections et 3-5 % aux dysfonctionnements hormonaux. L'ensemble de tous ces mécanismes ne compte que pour 40-50 % des cas de perte embryonnaire spontanée. Ainsi, près de la moitié des pertes embryonnaires précoces ont des causes non identifiables, classées d'étiologie inconnue et dites idiopathiques. L'hypothèse d'une origine inconnue de ces nombreux cas a suscité un grand intérêt pour investiguer sur une étiologie immunologique possible. Aujourd'hui, le progrès scientifique dans ce domaine et dans la biologie moléculaire nous permet de mieux comprendre le rôle du système immunitaire dans les grossesses normales et a offert l'opportunité de découvrir le rôle de ces mêmes acteurs immunologiques dans les grossesses compliquées.

Plusieurs études réalisées sur des patientes présentant des avortements spontanés à répétition proposent que ces défauts gestationnels puissent résulter d'un déséquilibre de la réponse immune maternelle vis-à-vis l'embryon, notamment en cas d'infection [5]. Dans ce mémoire-article, le sujet de nos études porte sur notre compréhension actuelle de « l'immunité de la grossesse » dans le contexte de la réponse aux infections utérines et des conséquences néfastes d'une réponse inflammatoire non régulée sur le dialogue mère embryon.

Il est bien connu que des interactions entre les cellules immunes et les cellules embryonnaires sont requises pour établir une placentation et une adaptation immune normales [6]. Donc, une mauvaise adaptation du système immun maternel ou une réponse du système immun inné aux agents infectieux pourraient éventuellement constituer un facteur déclencheur de complications de grossesse et plus particulièrement les pertes spontanées d'embryon en début de grossesse. Des rapports cliniques ont démontré clairement une association entre ces complications gestationnelles et les infections intra-utérines [7, 8]. Ceci suggère que la réponse immune innée en cas d'infection pourrait affecter le déroulement normal de la grossesse malgré la résistance de l'embryon aux différents mécanismes de rejet en condition normale de grossesse. Étant une réponse normale de protection de l'hôte, la réponse inflammatoire à l'infection pourrait représenter un mécanisme important et assez fréquent impliqué dans les échecs de grossesse d'étiologie inconnue [9]. D'autre part, l'inflammation est reconnue aussi comme étant nécessaire pour une implantation embryonnaire normale puisque cette dernière est caractérisée par une hausse de médiateurs pro-inflammatoires. Par ailleurs, la déplétion ou le blocage de certains médiateurs pro-inflammatoires tels les macrophages en début de gestation chez les rongeurs conduit inévitablement à l'échec de l'implantation [10]. L'avancée des connaissances en immunologie de la reproduction a permis de constater que la grossesse est le résultat d'un équilibre complexe et évolutif des réponses pro- et anti-inflammatoires mettant en jeu de nombreux acteurs de l'immunologie, cellules et molécules.

Comme plusieurs cas d'échec de conception d'étiologie inconnue peuvent survenir en raison d'un défaut dans le dialogue entre le système immunitaire maternel local et l'embryon, approfondir nos connaissances sur les bases moléculaires et cellulaires de ces interactions en début de grossesse revêt un intérêt substantiel, ce concept étant le centre d'intérêt de nombreuses recherches actuelles.

1.2 L'implantation embryonnaire

L'implantation embryonnaire est un événement biologique unique, critique et assez complexe dont la réussite est tributaire d'un dialogue moléculaire étroitement régulé entre les cellules péri-embryonnaires et les cellules de la paroi utérine. Chez l'humain, l'implantation de l'embryon s'effectue au niveau de l'endomètre utérin, mais seulement pendant une période limitée et précise de réceptivité utérine maximale, appelée « fenêtre implantatoire » [11]. Cette période correspond chez la femme à la phase mi-sécrétoire entre les jours 19 et 23 du cycle menstruel [12]. Durant cette période et sous l'influence de l'embryon et de l'environnement hormonal, la muqueuse utérine subit diverses modifications structurales et moléculaires afin de permettre l'attachement de l'embryon [13], un processus connu sous le nom de la décidualisation [11]. Durant cette période de transition, le tissu conjonctif endométrial voit sa structure complètement modifiée le rendant plus « perméable » à l'infiltration trophoblastique et l'endomètre prend alors le nom de décidue ou caduque [14]. Six jours après la fécondation, la membrane pellucide, qui entoure l'œuf se rompt, le blastocyste en sort et les cellules du trophoblaste qui sont à sa surface vont entrer en contact avec l'endomètre décidualisé [12].

Comme l'illustre la figure 1.1, le trophoblaste représente la couche cellulaire périphérique de l'œuf, formée lorsque celui-ci est encore au stade de blastocyste (du 5^e au 7^e jour après la fécondation) et qui sera à l'origine du placenta [15]. De l'intérieur vers l'extérieur, le trophoblaste se compose du cytotrophoblaste (CT) formé de cellules souches progénitrices et duquel émergent différents types de trophoblastes spécialisés dépendamment de son évolution vers l'une des deux voies de

différentiation, soit la voie villeuse ou la voie extra-villeuse. De la première voie, résulte la formation d'une population de cytotrophoblastes villeux (CTV) fusionnés entre eux en une structure multinucléée appelée le syncytiotrophoblaste (ST) [16]. Le ST mène à l'établissement des villosités chorales flottantes qui sont en contact avec le sang maternel dans les chambres inter villeuses. Le ST offre alors une surface considérable d'échange d'ions et de nutriments entre la mère et l'embryon [17] tout en produisant des hormones peptidiques et stéroïdiennes [18]. De la deuxième voie, résulte la formation du CT extra-villeux (CTEV), une population trophoblastique mononucléée et hautement invasive qui se détache et migre vers les artères spiralées afin d'assurer le remodelage dynamique des vaisseaux sanguins maternels et l'ancrage du placenta [17, 19]. L'ensemble des cytotrophoblastes villeux et extra-villeux forme le chorion, la membrane externe de l'œuf. Au troisième mois, le trophoblaste prend le nom de placenta.

Chez la femme, l'implantation embryonnaire constitue un continuum de trois phases consécutives qui commence par l'apposition du blastocyste à la surface apicale de l'épithélium luminal endométrial, suivie par son adhésion et finalement par l'invasion de la paroi utérine par les CETV. Puisque cet événement se caractérise par l'infiltration de nombreux leucocytes d'origine maternelle, le trophoblaste sera alors confronté aux différents types leucocytaires de son microenvironnement (Figure 1.2) tout au long de son développement [20]. On comprend dès lors l'importance d'un dialogue moléculaire étroitement régulé entre le trophoblaste et la décidue au niveau de l'interface fœto-maternelle.

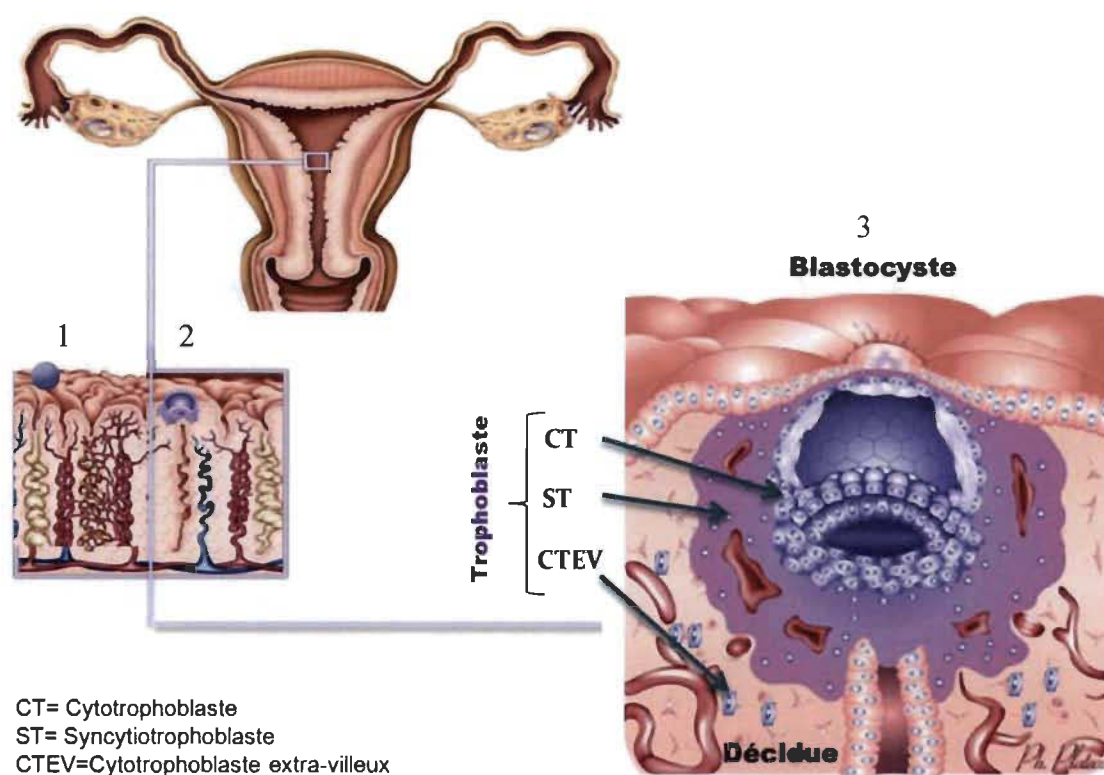


Figure 1.1 Les étapes de l'implantation embryonnaire.

1) L'apposition : Après rupture de la zone pellucide, le blastocyste entre en contact avec l'épithélium de l'endomètre (accolement du blastocyste).

2) La fixation : Le trophoblaste (couche superficielle) prolifère activement au point de fixation. Le tissu qui sépare le bouton embryonnaire du syncytiotrophoblaste reste constitué de cellules parfaitement individualisées formant le cytotrophoblaste. Les divisions nucléaires successives se font sans division cytoplasmique. Il en résulte un syncytium dérivé du cytotrophoblaste, le syncytiotrophoblaste.

3) L'invasion : Le syncytiotrophoblaste continue à proliférer en périphérie et secrète des enzymes protéolytiques qui permettent sa pénétration dans l'endomètre. *Tirée de [15].*

1.3 L'inflammation utérine et gestationnelle

1.3.1 La réponse inflammatoire en début de grossesse/gestation

Durant une grossesse humaine normale, le site d'implantation regorge de multiples cellules du système immunitaire inné, ce qui met en évidence que le système immunitaire maternel reconnaît et répond à la semi-allogreffe fœtale [21]. Les cellules immunitaires qui résident entre le placenta et l'utérus semblent jouer plusieurs rôles importants au cours

de la grossesse et peuvent contribuer différemment selon les signaux environnementaux soit au succès soit à l'échec de cette dernière.

C'est dans les heures qui suivent l'insémination que la hausse de sécrétion de facteurs pro-inflammatoires ayant des propriétés chimiotactiques induit le recrutement de leucocytes depuis le sang périphérique vers le site de l'implantation et leur accumulation au niveau du tissu stromal sous-épithéliale [22]. La composition cellulaire de la décidue devient alors très riche en cellules immunes maternelles spécialisées dominées par le système immunitaire inné, notamment en cellules tueuses naturelles utérines (uNK) et en macrophages (M ϕ s) [23, 24], puisque la proportion des lymphocytes est relativement basse (1-3 %) [25]. Au moment de l'implantation embryonnaire, les proportions des uNK et M ϕ s sont respectivement de 70 % et 30 % du total des leucocytes [26]. En avançant dans la grossesse, le nombre des cellules (uNK) décline et est pratiquement absent à terme [27, 28], alors que le nombre des M ϕ s reste constant tout au long de la gestation [29]. Ces cellules secrètent sur le site de l'implantation une panoplie d'effecteurs qui sont déterminants pour l'établissement de la grossesse.

Le processus de l'implantation est donc étroitement lié à plusieurs mécanismes qui déterminent autant son succès que son échec. En général, ces mécanismes reposent sur une réponse immunitaire adaptative cytotoxique diminuée, contournée, voire abrogée pour éviter le rejet de l'embryon, tandis que l'immunité adaptative régulatrice est plutôt renforcée [30, 31]. En revanche, les réponses immunitaires innées restent intactes et servent à deux fins : continuer à assurer la défense de l'hôte contre les infections et interagir avec les tissus fœtaux pour promouvoir la placentation et le succès de la grossesse [32]. Bien que ce soit un aspect essentiel de l'immunologie de la reproduction, il est également important de considérer la fonction fondamentale du système immunitaire inné de la mère dans la promotion de l'implantation embryonnaire et le maintien de la grossesse en cas d'une activité immunologique dérégulée.

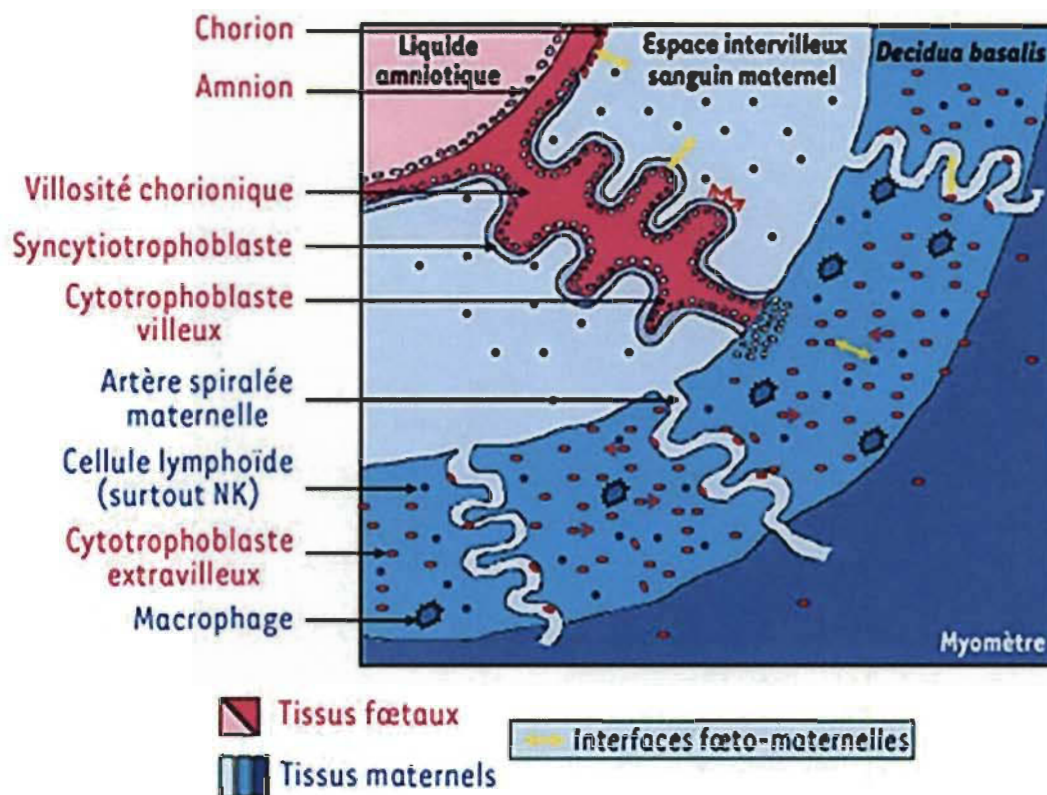


Figure 1.2 Représentation schématique des interfaces d'interaction directes entre le placenta et les cellules immunes en début de grossesse.

Le syncytiotrophoblaste est en contact direct avec le sang maternel de l'espace inter-villeux qui, tout comme le sang périphérique, comporte les différentes cellules effectrices du système immunitaire maternel, notamment les cellules NK, les monocytes et les macrophages. Les cellules du trophoblaste extra-villeux qui envahissent la *decidua basalis* sont en contact avec ces types de cellules du système immunitaire maternel. Les quatre interfaces fœto-maternelles sont indiquées par des doubles flèches jaunes : 1) syncytiotrophoblaste/espace intervilleux sanguin maternel; 2) cellules chorioniques/sang de l'espace intervilleux; 3) cytotrophoblaste extra-villeux/sang périphérique des artères spiralées maternelles, et 4) cytotrophoblaste extra-villeux/cellules maternelles de la *decidua basalis*. *Tirée de [20]*.

1.3.2 Effet bénéfique d'une réponse inflammatoire régulée au cours de la grossesse précoce

Une réponse inflammatoire contrôlée est essentielle à l'implantation embryonnaire. Les données actuelles prouvent indiscutablement le rôle vital que joue l'environnement pro-inflammatoire dans le maintien d'une grossesse saine du début à la

fin [33] en influençant les fonctions du trophoblaste [34] et en modulant les systèmes immun et endocrinien [35]. La période péri-implantatoire est caractérisée par la présence d'un environnement très varié en cytokines [36, 37], comme IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-15 et IFN γ . Toutefois et contrairement aux divers rôles qu'on leur a proposés, la majorité de ces cytokines est de nature pro-inflammatoire [38, 39].

Grâce à la présence de ces facteurs, l'environnement décidal peut alors soutenir la placentation via une autodestruction du stroma par le processus inflammatoire [40]. Schwartz et collaborateurs ont démontré que le processus d'invasion du tissu endométrial décidualisé par le trophoblaste ressemble beaucoup à une blessure ou un trauma mécanique qui nécessite une forte réponse inflammatoire pour guérir [41]. En s'implantant, l'embryon doit endommager le tissu de l'endomètre et remplacer l'endothélium et le muscle lisse vasculaire des vaisseaux sanguins maternels pour garantir un approvisionnement en sang adéquat. Toutes ces activités créent une « inflammation aiguë » [42], qui correspond à la première réponse de l'organisme lors des dommages aux tissus en présence de pathogènes et qui se caractérise par la production de nombreux médiateurs inflammatoires, ainsi que le mouvement accru de plasma et le recrutement des leucocytes du sang vers les tissus inflammés [42]. Un environnement inflammatoire est donc nécessaire pour garantir la réparation adéquate de l'épithélium utérin et l'élimination des débris cellulaires. En fait, l'ancienne école de pensée définissait une grossesse normale et continue comme un état Th2 purement anti-inflammatoire où la production de cytokines inflammatoires est supprimée [43]. Cependant, les tissus placentaires et décidiaux d'une grossesse normale expriment les deux polarisations de cytokines, pro et anti-inflammatoires dépendamment du stade de grossesse [44, 45]. Le premier trimestre est caractérisé par une forte montée pro-inflammatoire [46] qui s'atténue au cours du deuxième afin de permettre la croissance du fœtus puis enfin reprendre brutalement au troisième trimestre pour préparer le placenta à l'accouchement (Figure 1.3). Cette réponse inflammatoire du début de grossesse a bien prouvé son importance puisque plusieurs études ont démontré que sa suppression entraîne inévitablement la perte précoce de l'embryon [47]. Les études en immunologie de la reproduction des dernières années ont d'ailleurs

souligné l'importance vitale des cellules inflammatoires sur le site de l'implantation. Par exemple, le rôle des cellules uNK dans l'initiation du remodelage des artères spiralées souligne leur importance dans la grossesse précoce humaine [48]. Bien qu'elles puissent devenir un obstacle majeur à la survie de la semi-allogreffe fœtale, leur activation est pourtant essentielle puisqu'elles secrètent des facteurs angiogéniques bénéfiques pour l'embryon en développement tels le VEGF et le PGF (*placental growth factor*) [48]. Un déficit de leur activation est souvent associé à des désordres de grossesse, dont la restriction de croissance intra-utérine [49].

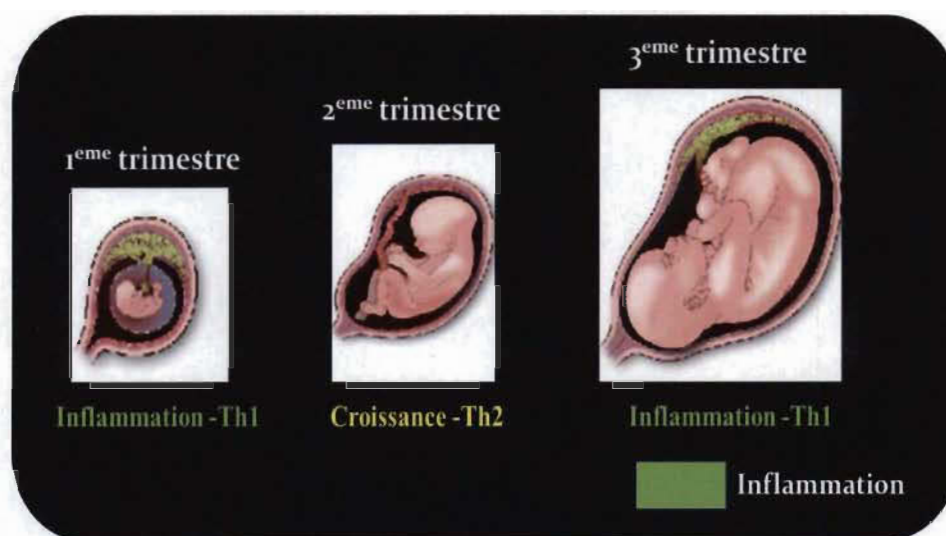


Figure 1.3 Les trois phases immunologiques de la grossesse.

Chaque trimestre de la grossesse est caractérisé par un environnement inflammatoire unique. Au cours du premier trimestre : phase pro-inflammatoire-Th1, requise pour assurer la réparation adéquate de l'épithélium utérin et l'élimination des débris cellulaires. Au cours du deuxième trimestre : phase anti-inflammatoire-Th2, requise pour assurer une croissance et un développement fœtal optimal et rapide; durant cette phase, il règne une symbiose entre le fœtus et le placenta. Au cours du troisième trimestre : phase pro-inflammatoire-Th1, requis pour déclencher l'accouchement par la promotion des contractions utérines, l'expulsion du bébé et le rejet du placenta. *Adaptée de [50].*

Tout comme les uNK, les macrophages peuvent exercer des effets bénéfiques sur le site de l'implantation. Par leur nature versatile, contrairement aux autres leucocytes, ils sont dotés d'une grande plasticité qui se reflète à travers leurs différents rôles fonctionnels et centraux dans divers processus immunologiques [51]. Au cours de

leur différenciation, leur programme fonctionnel est complètement modelé par le microenvironnement biologique local [52], ce qui leur confère un spectre phénotypique et fonctionnel varié et impressionnant. Par analogie à la dichotomie Th1/Th2 des cellules T auxiliaires, il existe un concept de polarisation de macrophages [53, 54].

En se basant sur la nature de leurs récepteurs et leur production cytokinique, la figure 1.4 montre les trois polarisations phénotypiques habituelles des macrophages : type-1 pro-inflammatoire (M ϕ s-1), type-2 anti-inflammatoire (M ϕ s-2) et régulateur (M ϕ -Reg) [55].

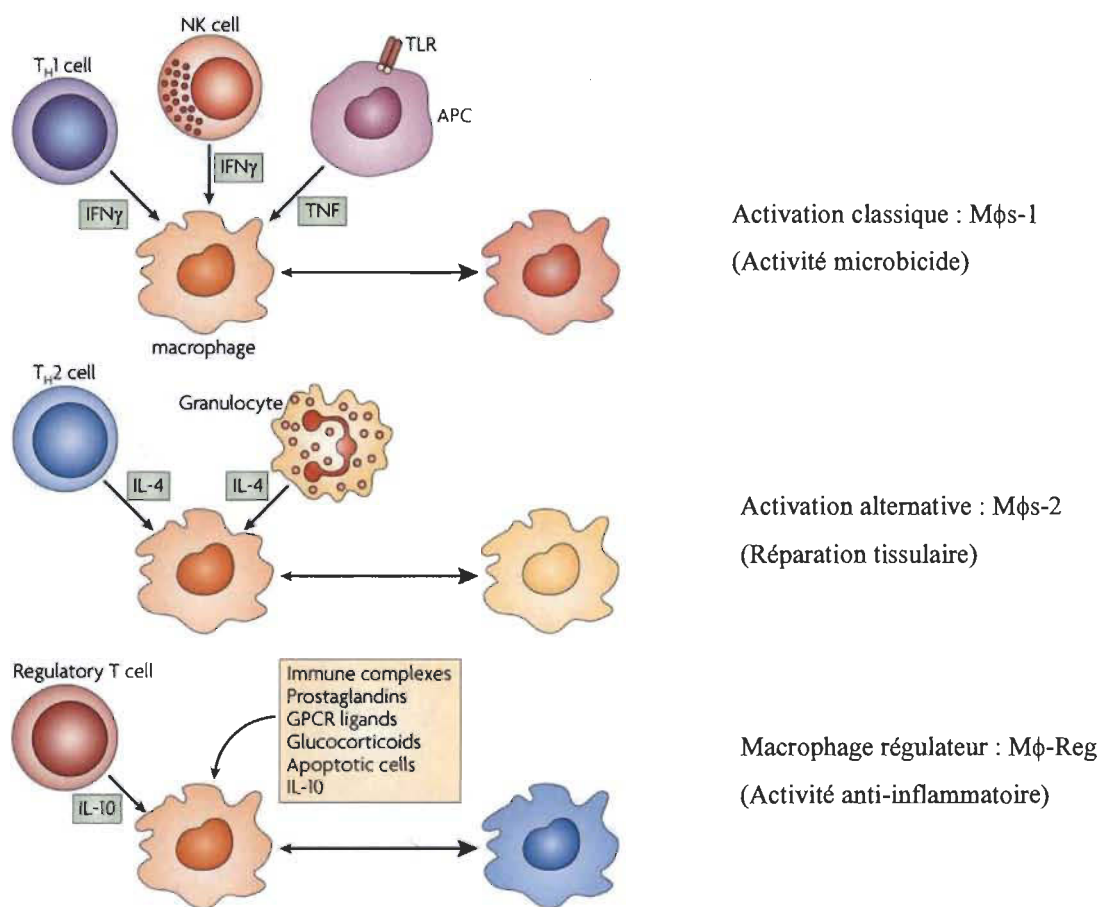


Figure 1.4 Différents types d'activation et d'activités physiologiques du macrophage.

Activation classique : en réponse soit à l'IFN γ produit par les lymphocytes T auxiliaire 1 (T_H1) au cours d'une réponse immunitaire adaptative, ou par les cellules NKs durant une réponse immunitaire innée, soit au TNF α produit par les CPA.

Activation alternative : en réponse à l'IL-4 produite par les cellules du Th2 au cours d'une réponse immune adaptative ou par les granulocytes durant une réponse innée.

Macrophage régulateur : généré en réponse à plusieurs stimuli tels les complexes immuns, prostaglandine, IL-10 ou glucocorticoïdes.
Adaptée de [56].

Dans le contexte de la grossesse précoce, les macrophages utérins sont connus pour détenir un rôle pivot à l'interface fœto-maternelle [57]. Leur dense infiltration et leur persistance tout le long de la grossesse suggèrent qu'ils ne sont pas que de simples phagocytes de cellules mortes. Ils seraient également impliqués dans des fonctions spécifiques associées à la grossesse et possiblement dans la modulation de la communication initiale entre les cellules maternelles et fœtales [58]. L'analyse histologique de tissus placentaires normaux à terme indique la présence de macrophages en grand nombre dans la majorité des cas dans le voisinage de cellules apoptotiques [59] et à proximité des tissus du trophoblaste ainsi que dans le stroma entourant les artères spiralées et le trophoblaste extra-villeux [60]. Il a été démontré que les macrophages utérins du premier trimestre adoptent progressivement un phénotype anti-inflammatoire confirmé par des analyses phénotypiques révélatrices de la présence de M ϕ s-2 et de M ϕ s-Reg [61]. Ce phénotype serait induit localement généralement par les cytokines de type Th2 telles les interleukines IL-4, IL-10 et IL-13 [54, 56, 62] ou par des hormones glucocorticoïdes [63]. Le M ϕ -Reg est fondamentalement différent des M ϕ -1 et M ϕ -2 et est activé en réponse à deux signaux d'activation [64]. Le premier signal comprend soit l'IL-10, les prostaglandines, des complexes immuns, des glucocorticoïdes ou des cellules apoptotiques tandis que le second signal est l'activation d'un TLR [64]. Comme les M ϕ -Reg produisent de grandes quantités d'IL-10, ceux-ci pourraient participer à l'environnement immunosuppresseur permettant de moduler la réponse inflammatoire aiguë et limiter les dommages tissulaires [65]. Cette polarisation confère alors aux macrophages, comme lors de la résolution de l'inflammation, des propriétés immunosuppressives et une fonction immunomodulatrice [66]. Cette fonction serait véhiculée via la production de divers facteurs de croissance, cytokines et médiateurs anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et le TGF β [54] la prostaglandine PGE2 et l'activité enzymatique de l'indolemine 2,3-dioxygénase IDO [67].

Parmi les fonctions que les macrophages utérins pourraient assurer nous pouvant compter le retrait des cellules apoptotiques qui résultent du renouvellement rapide associé à la croissance du placenta [24] et l'amplification du phénomène de tolérance immunitaire maternelle du fœtus semi-allogénique [67, 68]. En plus, ils coopèrent avec les cellules trophoblastiques durant les stades précoces par la production de protéases qui aideront à dégrader la matrice extracellulaire utérine [69]. À terme, ils participent à la régulation de la maturation cervicale et au déclenchement du travail par la production de cytokines pro-inflammatoires et de la prostaglandine E2. Ainsi, les macrophages M2 non seulement inhibent la réponse pro-inflammatoire de type M1, mais entraînent également la participation à la fois du milieu utérin et des autres éléments du système immunitaire maternel au succès de la grossesse [58, 70]. De façon analogue, les études menées par Robertson *et al.* sur un modèle murin déficient en macrophages (macrophages Knock Out) montrent qu'ils sont indiscutablement requis pour garder l'intégrité du corps jaune et donc la production de la progestérone essentielle pour l'établissement de la gestation [10]. Leur déplétion en gestation précoce aboutit à un échec complet de l'implantation [71].

Le TNF α est l'une des principales cytokines produites chez les macrophages en réponse à l'IFN γ et/ou le lipopolysaccharide (LPS) [72], une endotoxine dérivée de bactéries gram négatives. TNF α est une cytokine très puissante avec un spectre de fonction impressionnant [73]. Le TNF α est détectable tout au long de la grossesse dans le placenta, le liquide amniotique et la décidue [74, 75]. Bien qu'elle soit plutôt une cytokine pro-inflammatoire, beaucoup d'évidences démontrent que sa présence est essentielle au tout début de la grossesse [73]. À faible concentration physiologique, le TNF α est requis à l'interface fœto-maternelle pour réussir l'implantation embryonnaire [76] puisqu'il favorise la formation du syncytium et augmente la faculté invasive des cellules trophoblastiques, stimule entre autres la synthèse d'hormones [77], l'architecture placentaire, le développement folliculaire et embryonnaire et la différenciation.

Une autre cytokine pro-inflammatoire dont la présence est requise sur le site de l'implantation est l'IFN γ . Elle compte parmi les cytokines pro-inflammatoires les plus abondantes dans l'utérus en début de grossesse. Les cellules uNK en sont les principales productrices [78] surtout en réponse à l'IL-12 sécrétée par les macrophages activés [79]. L'IFN γ agit sur les uNK d'une manière autocrine les stimulant à en produire davantage en même temps que d'autres molécules telles le VEGF, l'angiotensine II et la PGF, ce qui contribue à créer un milieu pro-angiogénique sur le site d'implantation. L'IFN γ est connu pour réguler divers programmes immunologiques importants. Par exemple, une étude d'expression génique sur des cultures déciduales humaines a révélé une dominance de gènes inductibles par l'IFN γ [80, 81], ce qui témoigne de son rôle essentiel durant la grossesse précoce. En fait, chez la souris en gestation, la signalisation de l'IFN γ est une voie centrale dans l'initiation du remodelage de la vascularisation endométriale [82], dans l'angiogenèse sur le site d'implantation [83], dans le maintien de la composante déciduale et placentaire ainsi que dans la promotion de l'adhésion cellulaire et de la prolifération des muscles lisses [84]. Le site d'implantation de souris déficientes en IFN γ (*IFN γ null mice*) ou en son récepteur (*IFNGR1 null mice*) montre que la modification des artères spiralées n'a pas eu lieu [81] et elles présentent une nécrose déciduale répandue [82].

Ainsi, le premier trimestre de la grossesse est caractérisé par un environnement pro-inflammatoire jouant un rôle intégral dans la progression d'une grossesse saine.

1.3.3 Effet abortif de cellules et médiateurs pro-inflammatoires durant la grossesse précoce

L'activation des mécanismes immunitaires effecteurs maternels joue un rôle décisif dans la détermination du succès ou de l'échec de la grossesse précoce. Naturellement, la réponse immunitaire innée est un mécanisme par lequel l'organisme répond aux perturbations fonctionnelles dans les organes. Mais étant donné que le début de l'implantation est facilité par des processus inflammatoires, il est possible que la sur-sollicitation ou la dérégulation de cette même réponse puisse activer des mécanismes

nuisibles pour la survie embryonnaire [85]. Dans une certaine mesure, cette réponse joue un rôle majeur dans le déclenchement de la perte précoce de l'embryon, la restriction de la croissance intra-utérine et la pré-éclampsie [86].

Les macrophages

En contraste avec leurs rôles protecteurs et de soutien dans la grossesse normale, les macrophages peuvent être à l'origine d'une réponse de rejet embryonnaire précoce [87] étant donné qu'ils représentent l'un des principaux groupes cellulaires activés lors d'une inflammation et leur fonction en tant que cellules présentatrices d'antigènes et d'activatrices de la réponse immune adaptée [88]. Plusieurs études indiquent en fait qu'une infiltration accrue de macrophages maternels dans le site d'implantation est souvent associée à un mauvais pronostic puisque leur présence est considérée comme une alerte précoce de perte embryonnaire spontanée [89].

En général, une inflammation provoquée par des agents pathogènes ou des dommages tissulaires peut activer les macrophages résidents pour initier ou amplifier la production de cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs de l'inflammation. En cas d'une infection du tractus génital, l'inflammation provoquée est l'une des causes majeures de complications gestationnelles [8] tels l'avortement spontané ou les retards de croissance embryonnaire. Dans ce cas, l'infiltration excessive de M ϕ s semble être associée à une faible capacité d'invasion trophoblastique accompagnée d'une perturbation du remodelage des artères spirales [90, 91]. Le phénotype M ϕ -1 est déclenché par une stimulation par des produits microbiens comme le LPS, des signaux de danger ou un environnement de cytokines Th1 (IFN γ , TNF α) [92]. Lors de cette polarisation de type pro-inflammatoire, les macrophages M ϕ -1 deviennent agressifs, antiprolifératifs, cytotoxiques et anti-angiogéniques. Ces M ϕ -1 sont caractérisés par une expression accrue de certains récepteurs inflammatoires comme le CD14 (le récepteur du LPS) [93] et le CD40 (le récepteur de CD154) [94]. Ces deux récepteurs activés sont reconnus comme des puissants médiateurs clés de plusieurs réponses immunes et inflammatoires [95] par la production de médiateurs pro-inflammatoires comme l'acide

nitrique, les radicaux libres, le $TNF\alpha$, l'IL-12, l'IL-1 et l'IL-6 [54] causant des dommages aux tissus [96]. Par ailleurs, les macrophages $M\phi$ s-1 sont d'importants producteurs de chimiokines nécessaires au recrutement des cellules Th1, des cellules T cytotoxiques et des cellules NK. Il a été amplement démontré que l'IFN γ est la cytokine prototypique d'activation des $M\phi$ s de type-1 [97] puisqu'il représente la cytokine prédominante lors d'une réaction immune pro-inflammatoire (Figure 1.5).

Plusieurs études ont mis en évidence une relation entre l'infiltration de macrophages sur le site de l'implantation et une létalité embryonnaire précoce et spontanée chez des modèles murins de perte d'embryon [98] entre les jours 6 et 10 de gestation. En fait, le modèle CBAJ x DBA/2 a permis de démontrer que les cellules inflammatoires maternelles infiltrent le site d'implantation dans les 48 heures suivant l'implantation. Bien que le nombre relatif de macrophages et de cellules uNK reste constant en début de gestation (jusqu'au jour 8), leur nombre augmente significativement par la suite chez 20-30 % des souris, ce qui correspond à l'incidence de perte précoce d'embryon visible au jour 12. Bien que les cellules uNK ne soient pas cytolytiques, elles produisent la cytokine activatrice la plus puissante des macrophages de type-1, l'IFN γ .

L'IFN γ

Il est bien établi que les $M\phi$ s tissulaires sont au maximum de leur activité cytotoxique lorsqu'ils sont doublement activés par l'IFN γ et le LPS. La reconnaissance du LPS au niveau du $M\phi$ implique la liaison de LPS à son récepteur, un complexe composé de TLR4, de CD14 et de MD2 [99]. Au niveau moléculaire, l'IFN γ agit en synergie avec ce complexe et potentialise l'action du LPS via l'induction de l'expression de CD14 pour amorcer une activation optimale du macrophage M1 [100]. Cette activation se traduit par une induction de l'expression du CMH classe II, de CD40 et d'une production accrue de facteurs pro-inflammatoires surtout le $TNF\alpha$ et le NO (l'oxyde nitrique) en activant l'enzyme iNOS (*inducible nitric oxide synthase*). De même, l'IFN γ est connu pour être le principal inducteur de CD40 [101], un ligand

co-stimulateur, membre de la famille de TNF, dont l'activation chez les cellules présentatrice d'antigènes est cruciale pour monter une réponse immune adaptée de type Th1. À de fortes doses, l'IFN γ a donc la capacité d'amplifier la réponse inflammatoire de type-1. L'un des mécanismes est l'inhibition de la production de l'IL10, une cytokine connue pour ces fonctions immuno-régulatrices en période préimplantatoire [102, 103].

Ainsi, les effets combinés de TNF α et l'IFN γ sur les macrophages utérins peuvent endommager directement le conceptus [104] et par conséquent induire l'arrêt du développement embryonnaire et fœtal [105]. Ce processus pourrait expliquer les effets abortifs potentiels de ces deux cytokines dont la surproduction a été détectée chez des patientes présentant une perte précoce et inexplicquée de la grossesse comparativement à celles avec une grossesse continue [106, 107]. Donc obligatoirement la régulation de leur production ou de leur action à l'interface foeto-maternelle s'avère déterminante pour le déroulement normal de la grossesse.

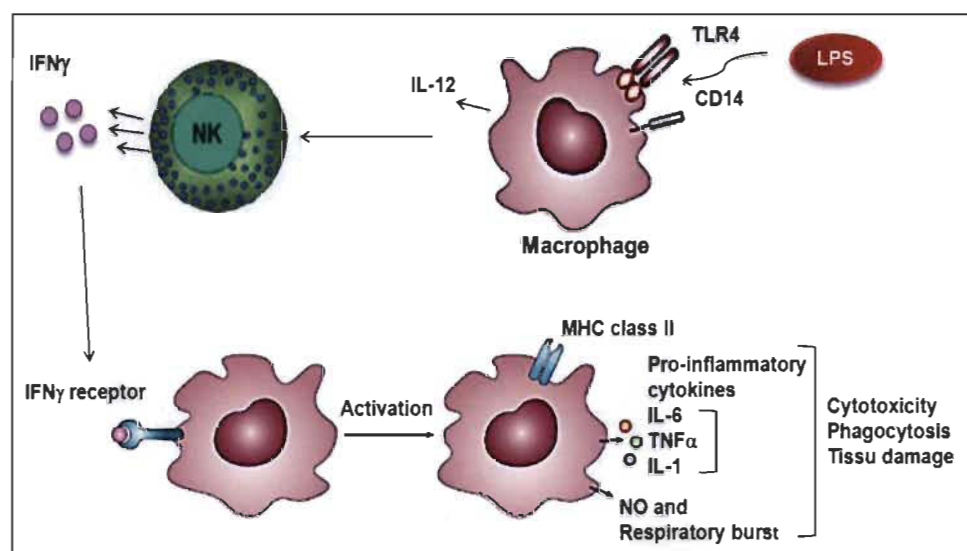


Figure 1.5 Représentation schématique du mécanisme d'activation classique du macrophage pro-inflammatoire.

L'activation du macrophage M1 nécessite un déclenchement par le TLR4 et un amorçage subséquent par l'IFN γ . Le LPS microbien capté par le complexe CD14-TLR4 induit l'expression de l'IL-12 chez le macrophage. L'IL-12 libérée stimule les cellules NKs qui répondent au stress et aux infections par la production précoce de l'IFN γ qui par la suite va amorcer le macrophage pour une activation optimale de ces propriétés pro-inflammatoires et cytotoxique. *Tirée de [97].*

L'activation du système immunitaire inné par les pathogènes via la stimulation des TLRs à la surface des Mφs se produit tôt dans ce processus et provoque une production excédentaire de cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF α , l'IL-6 et l'IL-1 β [108]. Le TNF α représente l'agent tumoricide et microbicide le plus important produit par les Mφs pro-inflammatoires activés [73] et de hauts niveaux de sa concentration semblent jouer un rôle dans différentes complications de grossesse [109]. Il est souvent associé à la résorption embryonnaire observée chez le modèle murin d'avortement spontané CBA/J (femelle) x DBA/2 (male) [110]. Seul ou en combinaison avec l'IFN γ , le TNF α est hautement cytotoxique pour le trophoblaste. Dans certaines circonstances, plusieurs mécanismes pro-abortifs ont été attribués au TNF α , par exemple, une altération de l'invasion endovasculaire trophoblastique et de la placentation [111], une diminution de l'expression de la β -hCG menant à une réduction de la fusion des cytotrophoblastes [112], et une induction de l'expression de gènes pro-apoptotiques au niveau des membranes fœtales humaines [87], ce qui accélérerait la dégradation des membranes et augmenterait la possibilité d'une rupture prématurée. Indirectement, le TNF α augmente également la probabilité des avortements précoces par l'activation des cellules uNK ou des macrophages [113].

Plusieurs études ont relié l'IFN γ au phénomène de perte de grossesse [114] en rapportant qu'il induit la résorption fœtale par ischémie, un résultat de la stimulation de l'expression du pro-coagulant fg12 [115]. La protéine gf12 est une prothrombinase sécrétée par les cellules endothéliales dont l'activation causerait le blocage du flux sanguin maternel vers l'embryon en cours d'implantation, ce qui provoquerait inévitablement l'avortement de l'embryon. Dans le modèle des souris prédisposées à l'avortement, CBA/J x DBA/2, il a été confirmé que de hauts niveaux d'IFN γ augmentent considérablement le taux de résorption fœtale [110] puisqu'il représente le signal primaire pour l'activation des macrophages pro-inflammatoires responsables de perte embryonnaire précoce induite par le LPS chez le modèle murin. Le taux de perte embryonnaire est amélioré aussitôt après l'administration d'un anticorps bloquant dirigé contre l'IFN γ ou de l'antisérum anti-NK [116], ce qui indique que l'IFN γ est un

médiateur important de ce phénomène. D'autres études ont démontré que les souris IFN γ déficientes (GKO) sont plus résistantes à la résorption embryonnaire induite par le LPS par rapport aux souris sauvages [116]. Ceci suggère que l'IFN γ est absolument requis pour véhiculer l'action du LPS et que les macrophages utérins des souris GKO gestantes n'étaient pas complètement activés même s'ils étaient capables de répondre au LPS. En plus, l'ARNm de l'IFN γ est exprimé en même temps que les ARNm des marqueurs d'activation des macrophages (TNF α et iNOS), indiquant que l'activation complète de ces phagocytes pourrait être consécutée à la production de l'IFN γ .

Plusieurs observations confirment que la perte précoce d'embryon est véhiculée par le déclenchement de la production des agents cytotoxiques chez les macrophages utérins activés. Ces nombreuses études démontrent par exemple que l'oxyde nitrique (NO), une molécule cytotoxique produite par le macrophage, est fortement impliqué dans le mécanisme associé à la perte précoce d'embryons [117]. En fait, une étude menée sur des leucocytes collectés de sites d'implantations de souris femelles gestantes CBA/J ayant accouplées à des males DBA/2 (20-30 % de perte embryonnaire précoce) montre que dans le cas d'embryon résorbé, le taux de production à la fois basal et induit par le LPS de NO est jusqu'à cinq fois plus élevé comparativement aux cas d'embryon non résorbés. Ce fait indique que les cellules déciduales étaient activées. De plus, plus de 20 % des embryons CBA/J présentaient une libération significative de NO au jour 12 de la gestation juste avant tout signe de cytopathologie embryonnaire [117]. Par ailleurs, le site d'implantation de ces souris montre une augmentation significative de cellules déciduales positives pour les marqueurs macrophagiques spécifiques Mac-1 (CD11b) et F4/80 ainsi que l'iNOS comparativement au site d'implantation de souris normales [118]. Ceci suggère fortement que les macrophages utérins pourraient être la source majeure de production de NO sur le site d'implantation responsable de l'arrêt précoce de la gestation. En outre, l'injection d'un inhibiteur sélectif d'iNOS réduit significativement la perte précoce d'embryon chez ce modèle murin d'avortement spontané. Ensemble, ces résultats mettent en évidence le rôle de NO comme une molécule effectrice dans la médiation de ce phénomène et prouve que l'activation *in situ* des macrophages utérins est un événement précoce précédant l'avortement spontané.

Donc cette accentuation de la réponse inflammatoire qui vise à éliminer les pathogènes pour protéger la mère contre l'infection sévère se fait malheureusement au détriment du maintien de la grossesse. C'est pourquoi la régulation du phénotype M1 et le contrôle de la magnitude de son activation au niveau de l'utérus gestant sont d'une importance primordiale pour éviter leurs effets délétères sur l'embryon. Ainsi, un équilibre Th1/Th2 paraît crucial entre les polarisations M1 et M2 afin de permettre la séquence bénéfique « stress, inflammation, résolution, réparation ». Un mauvais équilibre pourrait nuire au bon déroulement des processus biologiques comme discuté précédemment.

Au niveau moléculaire, l'activation de transcription de gènes par IFN γ se fait principalement via la voie de signalisation *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT) [97, 119]. Le récepteur de l'IFN γ , IFNGR, est composé de deux chaînes distinctes : R1 (alpha) and R2 (beta). La liaison de l'IFN γ à son récepteur active JAK1 et JAK2, qui par la suite phosphorylent le domaine intracellulaire de IFNGR. L'IFNGR phosphorylé fournit un site d'ancrage pour les monomères du facteur de transcription STAT1 localisés dans le cytoplasme [119]. Les protéines STAT1 seront par la suite phosphorylées sur leurs résidus tyrosine 701 par JAK1 et JAK2. Une fois phosphorylé, STAT1 forme des homodimères qui se déplacent vers le noyau pour activer la transcription de gènes contenant des séquences de réponse à l'IFN γ au niveau de leurs promoteurs [120]. Les souris déficientes en STAT1 démontrent clairement des réponses sévèrement altérées à l'IFN γ , qui se traduisent par un arrêt de l'expression de nombreux gènes sous son contrôle [121]. Par conséquent, ces souris deviennent hautement susceptibles aux infections virales et microbiennes et au développement spontané de tumeurs.

1.4 Molécules immuno-régulatrices sur le site de l'implantation

Puisqu'une sur-activation des voies pro-inflammatoires chez le macrophage induit une production excédentaire détectable chez des femmes présentant des avortements spontanés précoces [45] d'IFN γ , TNF α , NO et autres molécules néfastes sur le site de

l'implantation [104], il est impératif que leur production locale soit finement balancée et contrôlée. L'interface fœto-maternelle est connue pour exprimer beaucoup de facteurs et de cytokines régulatrices qui limiteraient l'agressivité immunologique envers l'embryon.

1.4.1 L'IL-10, une cytokine compatible avec la grossesse

L'IL-10 semble être la molécule anti-inflammatoire et immunosuppressive la plus puissante sur le site de l'implantation [122]. Elle émerge comme la plus importante cytokine de type Th2 impliquée dans le maintien d'une grossesse normale [123]. Elle détient cette importance du fait qu'elle est directement impliquée dans l'atténuation de l'activité de type Th1 via l'inhibition de la production de l'IFN γ . Dans le contexte de la grossesse, le rôle d'IL-10 réside dans son pouvoir modulateur de l'immunité maternelle pour permettre la tolérance de l'allogreffe fœtale. Elle est sécrétée abondamment par plusieurs cellules locales incluant les macrophages, les cellules NK, les lymphocytes et les trophoblastes [124]. Comparativement au syncytiotrophoblaste, le trophoblaste extra-villeux est intrinsèquement pauvre en IL-10, ce qui améliore sa compétence invasive [125, 126]. Il a été prouvé que son expression aide à orchestrer les processus normaux d'une grossesse. Les trophoblastes humain et murin l'expriment d'une manière dépendante du stade gestationnel [44]. Chez la femme, son niveau augmente remarquablement en grossesse précoce et demeure élevé jusqu'au début du travail ce qui témoigne de l'importance de son rôle. Il a été démontré aussi que les cellules T régulatrices (cellules Trég) produisent de l'IL-10 pour moduler les réponses inflammatoires [127]. Sachant que ces cellules sont connues pour favoriser le succès de la grossesse, cela suggère que les cellules Trég utérines exerceraient leurs fonctions via l'IL-10.

Dans le cadre de la grossesse, certains cas d'avortement spontané inexplicé ont été associés à de très faibles niveaux d'expression d'IL-10 [102], ce qui appuie la possibilité de son implication dans le contrôle de l'inflammation excessive et la promotion d'une grossesse saine [5]. Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de cette cytokine à l'aide de modèles murins. Les souches CBA/J x DBA/2, prédisposées

à la résorption fœtale, présentent un déficit local de production d'IL-10 et d'IL-4 par le trophoblaste. L'administration systémique d'IL-10 à ces souris prévient la perte de l'embryon [128], tandis que l'administration d'anticorps anti IL-10 augmente leur taux de résorption embryonnaire [129]. Bien que les souris déficientes en IL-10 (souris IL-10 KO) soient fertiles lorsqu'elles sont accouplées dans des conditions exemptes d'agents pathogènes, leur gestation s'avère très sensible aux dommages inflammatoires. L'endotoxine LPS est un inducteur puissant de l'avortement précoce et de naissances prématurées dans le modèle murin. Il a été démontré que le traitement des souris IL-10 KO gestantes avec du LPS, à des doses n'ayant pas d'influence sur la gestation chez des souris sauvages, causerait le rejet presque total des embryons [130].

À l'aide de données cliniques et de modèles *in vitro* humains, plusieurs études ont rattaché la déficience en IL-10 à plusieurs complications de grossesse telles que l'avortement spontané précoce, le retard de croissance intra-utérine ou la naissance prématurée [124]. Notamment, l'étude d'explants placentaires obtenus de femmes présentant des fausses couches spontanées idiopathiques montre des taux de production d'IL-10 et d'IL-4 très amoindris et une forte production de prostaglandines comparativement à des explants dérivés de grossesses normales [131]. Par ailleurs, la production réduite d'IL-10 chez ces femmes les rend spécialement sensibles aux effets inflammatoires d'infections du système génito-urinaire, ce qui provoque un désordre de la grossesse [132], tandis que les femmes présentant une production adéquate d'IL-10 sont capables de limiter les conséquences néfastes de l'inflammation, permettant ainsi le maintien de la grossesse.

L'IL-10 présente un large éventail d'activités immunosuppressives, parmi celles-ci, la répression de l'expression de gènes pro-inflammatoires (Figure 1.6) dont des cytokines telles que TNF α , IL-6 et IL-1 chez les macrophages activés ainsi que l'IFN γ chez les cellules Th1 [133], l'inhibition de la fonction des cellules T cytotoxiques, l'induction de l'activation des cellules T régulatrice et la désactivation des monocytes/macrophages [134] et des cellules NK [135]. Également, elle diminue la présentation antigénique du CMH-II [136] et inhibe la prolifération des macrophages via le contrôle de la voie de signalisation JAK1/STAT3 [137].

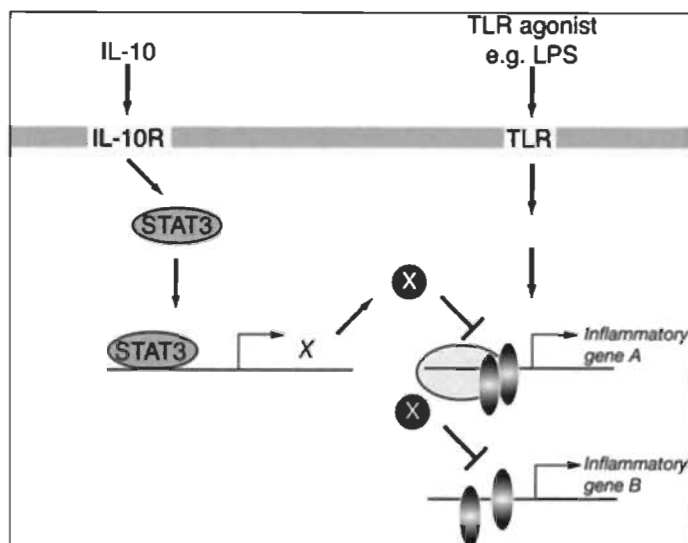


Figure 1.6 STAT3 est le médiateur de l'action anti-inflammatoire de l'IL-10. L'IL-10 via STAT3 agit par un mécanisme hautement sélectif qui inhibe l'expression de gènes pro-inflammatoires en ciblant spécifiquement les gènes induits par de puissants stimuli pro-inflammatoires tel le LPS reconnu par les TLRs. Ainsi, l'activation de STAT3 par l'IL-10 induit l'expression de gènes qui sont par la suite requis pour bloquer sélectivement d'autres gènes pro-inflammatoires. *Tirée de [138].*

L'IL-10 est produite principalement par les monocytes, macrophages, lymphocytes B ou les cellules Th2 activées [139]. Au niveau de la structure, elle constitue un dimère composé de deux chaînes polypeptidiques unies par deux ponts disulfures. Au niveau moléculaire, sa liaison au domaine extracellulaire de son récepteur l'IL-10R1 (Figure 1.7) active la phosphorylation des kinases associées au récepteur [140]. Ces kinases phosphorylent alors les résidus tyrosines spécifiques (Y446 et Y496) sur le domaine intracellulaire de la chaîne de l'IL-10R1. Une fois phosphorylés, ces résidus de tyrosine vont servir de sites d'accueil pour le facteur de transcription STAT3. STAT3 se lie à ces sites par l'intermédiaire de son domaine SH2 (*homologie Src-2*) et est, à son tour, tyrosine-phosphorylé par les kinases JAK1 et TYK2. Ensuite, il s'homodimérise et se déplace vers le noyau où il se lie à l'ADN au niveau des SBE (*stat-binding elements*) des promoteurs de plusieurs gènes [141]. Il est important de noter que la déficience en STAT3 chez les macrophages est associée à une production exagérée de cytokines pro-inflammatoires probablement à cause de défauts de réponse à l'IL-10 [142].

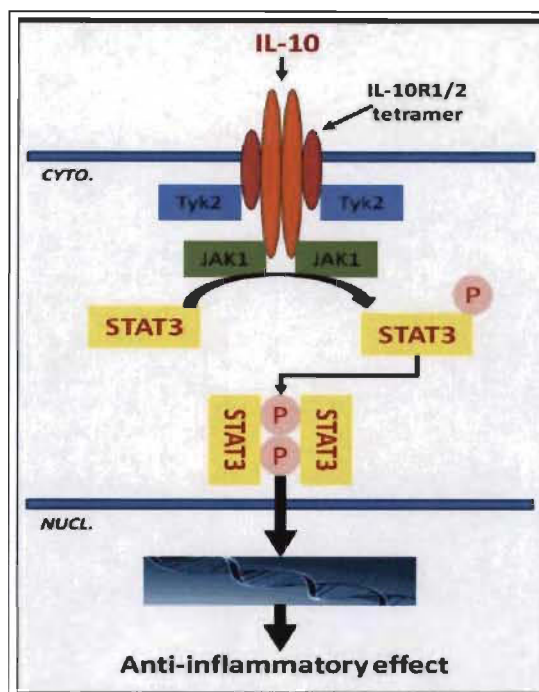


Figure 1.7 Représentation schématique du mécanisme d'interaction de l'IL-10 avec son récepteur spécifique.

La liaison de l'IL-10 à son récepteur spécifique déclenche une voie de signalisation intracellulaire impliquant STAT-3 comme facteur nucléaire de translocation clé qui induit l'activation de gènes spécifiques codant pour des facteurs anti-inflammatoires. *Adaptée de [143].*

1.4.2 Le facteur inhibiteur de leucémie (LIF) essentiel au succès de la gestation

Le facteur inhibiteur de leucémie (LIF) est un facteur de croissance pléiotropique de la famille de l'IL-6. Il possède une étendue remarquable de fonctions biologiques et représente un facteur clé dans l'implantation embryonnaire [144]. Il est détectable au niveau de la granulosa, de l'endomètre humain, de la décidue et du cytotrophoblaste, mais pas au niveau du syncytiotrophoblaste qui exprime plutôt l'IL-6. Le récepteur du LIF (LIFR) est un complexe membranaire qui comprend une chaîne β (LIFR β) et la glycoprotéine gp130 nécessaire à la transduction du signal [145]. Durant la grossesse, la protéine et l'ARNm de LIF sont exprimés au cours du premier trimestre [144] et l'endomètre humain l'exprime d'une manière dépendante du cycle menstruel. Son niveau augmente de façon spectaculaire dans la phase mi- sécrétoire du cycle menstruel (jours 19-25), à la fois dans l'épithélium luminal et glandulaire de l'utérus,

ce qui coïncide avec le moment supposé de la fenêtre implantatoire où l'utérus est prêt pour recevoir un blastocyste en voie d'implantation [144]. C'est pourquoi LIF est connu également comme marqueur potentiel de la réceptivité de l'endomètre. Le blastocyste humain exprime le LIFR au jour de l'implantation, le moment où la concentration endométriale de LIF est à son maximum [146]. Ainsi, le fait que le LIF endométrial soit produit de façon maximale au moment de l'implantation et que l'embryon soit capable de répondre à son signal provenant de l'endomètre suggère l'importance de cette cytokine dans l'implantation de l'embryon humain. Cette importance est également mise en évidence en clinique, un déficit de production du LIF étant observé chez les femmes infertiles. Une étude basée sur la comparaison des taux de LIF obtenus du liquide de lavage de la cavité utérine de patientes fertiles versus de patientes présentant une infertilité d'étiologie inconnue a démontré des taux réduits chez ces dernières [144]. Certaines stérilités inexplicables et avortements précoces à répétition peuvent être dus à un déficit quantitatif ou qualitatif de LIF par l'endomètre humain. Même une mutation dans le gène de LIF a été associée avec des stérilités inexplicables chez la femme [147].

LIF est connu pour promouvoir le développement du blastocyste humain *in vitro* [148]. En plus, des études ont démontré qu'il régule les propriétés d'adhésion des cellules épithéliales de l'endomètre humain [149], ce qui supporte un rôle de LIF dans l'attachement du blastocyste humain dans l'endomètre. Une diminution de sa sécrétion est souvent associée à des pertes embryonnaires récurrentes [150, 151].

Les souris déficientes en LIF (LIF KO) ont fourni des informations éloquentes sur l'action décisive de LIF dans le succès de l'implantation embryonnaire. Ces souris, bien que viables, montrent des conséquences catastrophiques sur l'implantation. En effet, les ovocytes des souris LIF KO sont fécondables, mais l'implantation ne se produit pas par défaut d'attachement du blastocyste à l'endomètre [152]. L'administration de LIF recombinant à ces mêmes souris ou le transfert de l'embryon à une femelle sauvage pseudo-gestante, restaure l'implantation ce qui exclut tout rôle du LIF embryonnaire. Dans la même optique, l'injection d'un antagoniste de LIF (LIF conjugué au polyéthylène glycol) bloque l'action de LIF dans l'épithélium luminal durant la période péri-implantatoire chez la souris, ce qui provoque l'échec de l'implantation [153].

Étonnamment, si l'implantation embryonnaire se produit, la sécrétion du LIF par l'épithélium glandulaire, alors principal siège de son expression, est réduite à un niveau très faible alors que son expression est fortement augmentée au niveau stromal dont il était jusqu'alors absent [154]. Ce décalage du siège de l'expression du LIF vers les tissus sous-jacents à l'épithélium endométrial de même qu'au niveau des villosités choriales lors du premier trimestre [155] soutient le rôle du LIF dans les capacités invasives du CTEV [156, 157]. En effet, diverses populations de CT expriment fortement le transcrite et la protéine du LIF-R, dont les CTs et les STs, mais pas l'ARNm du LIF [158] ni la protéine. Nécessairement, les CTs voient potentiellement leur comportement modulé par la cytokine dont l'expression se fait strictement au sein des tissus qu'ils traversent et remodelent. De plus, le transcrite du LIF-R est exprimé par les villosités choriales durant le premier trimestre et son expression est maintenue dans le placenta au second trimestre et à terme [155], suggérant non seulement une fonction du LIF lors de l'invasion, mais aussi à des fins de soutien de la structure placentaire et forcément de la régénération du syncytium.

Les kinases JAK1, JAK2 et TYK2, mais pas JAK3, sont susceptibles d'être activées en réponse à LIF [159]. Ces kinases sont connues pour activer chez les trophoblastes humains principalement STAT3, mais aussi STAT1 et la voie MAP kinase MAPK 3/1 [146]. Comme l'indique la figure 1.9, ces facteurs de transcription induisent l'expression d'un large spectre de gènes, dont celui correspondant à la protéine SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), soit l'un des principaux régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT [160]. De cette manière, LIF procède lui-même à la régulation de son mécanisme d'action au moyen d'une cible limitant directement l'activation de sa propre réponse.

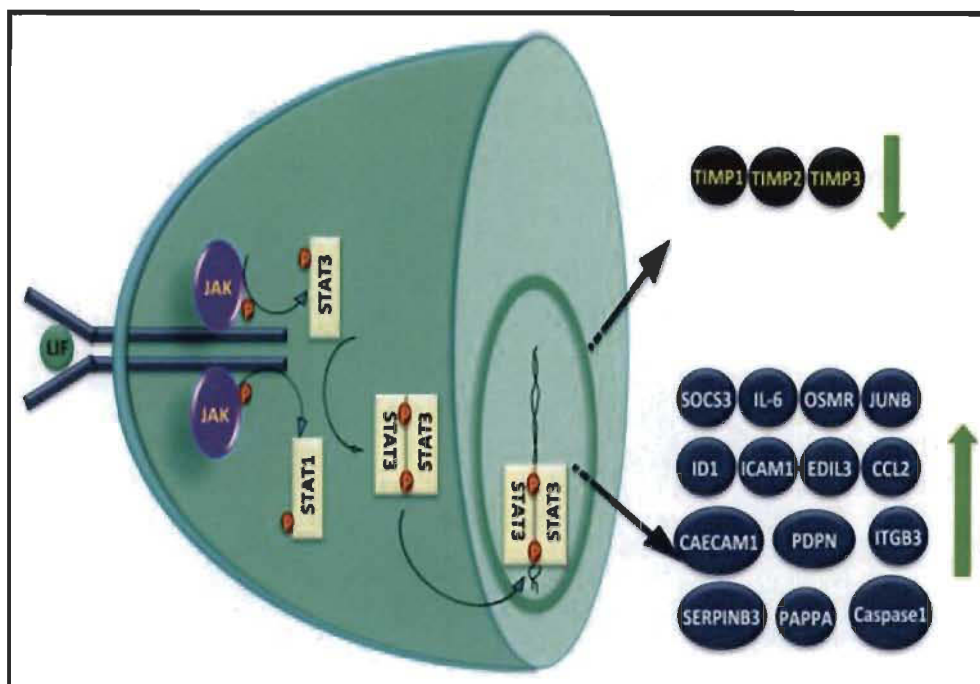


Figure 1.8 La signalisation intracellulaire et les gènes induits par LIF chez les trophoblastes.

Lors de sa liaison au complexe gp130-LIF-R présent sur la membrane plasmique des cellules trophoblastiques, LIF active les JAKs qui phosphorylent STAT3 et/ou STAT1 dans le cytoplasme. Une fois activés, ces STATs forment des homo- ou hétéro -dimères et se déplacent vers le noyau pour influencer l'expression de différents gènes qui réguleront différentes fonctions comme la signalisation et la production de cytokines (IL-6, OSMR, SOCS3, et Jun B), l'adhésion (CECAM1, PDPN et ITGB3), l'invasion (PAPP, Caspase1, SERPINB3, TIMP1, TIMP2 et TIMP3) et l'angiogenèse (ID1, ICAM1, EDIL3 et CCL2). Les gènes dont l'expression est régulée à la baisse après la stimulation par LIF sont montrés avec flèche vers le bas, tandis que ceux montrant une régulation positive sont représentés avec une flèche vers le haut. *Tirée de [146].*

Afin de confirmer l'idée que le LIF agit comme régulateur des fonctions endocrines inhérentes à la formation du syncytiotrophoblaste, nous avons précédemment utilisé le modèle de cytotrophoblaste BeWo dont la fusion cellulaire et la sécrétion de hCG ont été induites par un traitement avec la forskoline. Nos résultats ont démontré que dans les cellules BeWos différenciées avec la forskoline, le LIF amplifie leur capacité à fusionner, mais réduit leur production de hCG tout en activant la kinase MAPK3/1 et les facteurs de transcription STAT1 et STAT3 [161]. Nos résultats suggèrent ainsi que le LIF agit de manière opposée sur les deux axes de la différenciation et que cette

divergence d'action dépend de l'activation de la voie JAK/STAT alors que la fusion cellulaire est dépendante de l'activation concomitante des voies JAK/STAT et MAPK3/1 [161].

Sous une autre optique, plusieurs études ont mis la lumière sur un rôle protecteur crucial de LIF dans les pathologies induites par les endotoxines, comme le LPS. Nous avons déjà souligné que les dommages tissulaires causés par le LPS sont en grande partie dus à la liaison de cette endotoxine au récepteur TLR4 à la surface des M ϕ s [99]. Par ailleurs, la sécrétion de TNF α , d'IL-1 β et de NO par les M ϕ s activés a été associée avec la perte précoce d'embryon dans les modèles d'avortements induits par le LPS. Au fait, il a été démontré que les souris LIF déficientes sont plus sensibles aux chocs endotoxiniques et présentent une production réduite d'IL-10 et un taux élevé et prolongé de TNF α et IL-6 [162]. De plus, de hauts niveaux de LIF ont été détectés dans le sérum des sujets démontrant une septicémie élevée [163], ainsi que chez les souris gestantes et non-gestantes lorsqu'exposées au LPS. Ainsi, LIF a été proposé comme régulateur central de la réponse inflammatoire, conférant une tolérance au choc endotoxinique en augmentant l'expression de protéines de la phase aigüe de l'inflammation ainsi que de la cytokine IL-10, laquelle agit comme un régulateur négatif sur la synthèse et la relâche de TNF α et IL-6 [162]. LIF semble également très important par son action immuno-modulatrice en début de grossesse. Une étude récente a démontré l'implication de LIF dans l'effet protecteur de la progestérone contre la résorption embryonnaire [164]. Les auteurs ont observé que la progestérone sérique décline à de très faibles niveaux après 12 heures et 24 heures d'exposition au LPS, alors que l'expression du récepteur de la progestérone diminue de façon significative après 6 heures de traitement. Un prétraitement avec la progestérone empêche la résorption embryonnaire et bloque l'augmentation de la production de NO induite *in vivo* par le LPS. De plus, une incubation des explants utérins en présence de progestérone induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de LIF par rapport au témoin et le LPS. Ils ont également observé que le LIF exogène et endogène participe aux effets de la progestérone en empêchant une augmentation de la production de NO.

1.4.3 Les trophoblastes sont au centre de la communication entre l'embryon et les macrophages

Les cellules trophoblastiques représentent une autre composante cellulaire majeure du site de l'implantation. Le trophoblaste assure plusieurs fonctions sur le site de l'implantation dont la plus pertinente est de constituer le moteur de l'implantation embryonnaire. Dans la décidue, il règne un environnement cytokinique particulier, supporteur de la grossesse tout en étant en veille pour défendre la mère et l'embryon en cas d'infection [5]. Dans ce contexte, le trophoblaste contribuerait lui-même à se protéger grâce à l'expression des récepteurs TLR [165]. Le trophoblaste a donc le pouvoir de déceler la présence d'un agent pathogène possiblement infectieux sur le site de l'implantation en reconnaissant sa signature moléculaire unique, les PAMPs [165]. De plus, le trophoblaste est capable de répondre à ces signaux via la biosynthèse de cytokines et chimiokines appropriées [166]. Cela suppose que le trophoblaste et les effecteurs cellulaires du système immunitaire maternel doivent établir un dialogue moléculaire étroitement régulé pour coordonner la défense de l'hôte et la survie de l'embryon.

Étant donné que ces cellules embryonnaires se trouvent à proximité des populations leucocytaires utérines effectrices de l'immunité, elles interagissent alors directement avec les macrophages utérins. Les M ϕ s utérins sont associés, dans certaines conditions de l'environnement local, à un mauvais pronostic en jouant un rôle majeur dans le déclenchement des désordres de grossesse, dont les pertes spontanées et précoces d'embryons [89]. Ainsi, de minutieux mécanismes régulateurs des processus inflammatoires véhiculés par les M ϕ s doivent absolument exister afin de prévenir l'arrêt de la grossesse.

En fait, malgré leur prévalence dans la décidue et leur proximité du trophoblaste dans les villosités chorionales, très peu d'attention a été consacrée au rôle du trophoblaste dans la régulation de la différenciation et de l'activation des M ϕ s. Récemment, des études innovatrices en immunologie de la reproduction ont proposé que ce processus soit orchestré entre autres par l'unité fœtale elle-même, en particulier le CTEV [50].

Ce trophoblaste met en place l'environnement déciduel adéquat en attirant les acteurs du système immunitaire. Les messages qu'il renvoie évoluent alors pour adapter le milieu au déroulement normal de la grossesse. Il inflige alors une influence différente sur l'éducation des macrophages en fonction de l'étape de la grossesse : éducation inflammatoire au premier et dernier trimestre et anti-inflammatoire au cours du second trimestre. Il a déjà été récemment démontré que les CT structurent leur environnement inflammatoire par un apport à leur juste besoin de facteurs pro-inflammatoires en régulant la différenciation et activation des monocytes, phénomène appelé « éducation des monocytes » [50]. Cette hypothèse proposée par Gil Mor et ses collaborateurs propose que la différenciation et l'activation des fonctions des Mφs dépendent intimement des signaux originaires du blastocyste, en particulier le trophoblaste (Figure 1.9). Ces signaux induisent l'acquisition d'un phénotype coopératif par les Mφs. Plusieurs études réalisées *in vitro* démontrent que cette « éducation » se fait en trois étapes. Premièrement, le recrutement : les cellules trophoblastiques accentuent la sécrétion de substances connues pour attirer et augmenter le taux de migration des monocytes vers le site de l'implantation telles les cytokines chimotactiques GRO α (*growth-related oncogen- α*), MCP1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) et IL-8 [167]. Deuxièmement, l'éducation : au cours de cette étape, les cellules trophoblastiques produisent des cytokines régulatrices capables de moduler le processus de différenciation des Mφs [166]. Troisièmement, la réponse : les Mφs éduqués par le trophoblaste répondent à l'embryon par un mode de soutien et de protection, favorable à son développement [168]. Le trophoblaste serait donc à priori le chef d'orchestre des interactions fonctionnelles entre les Mφs utérins et le blastocyste. Cependant, la nature des signaux moléculaires de modulation du phénotype fonctionnel et du niveau d'activation des Mφs utérins fait encore l'objet d'études.

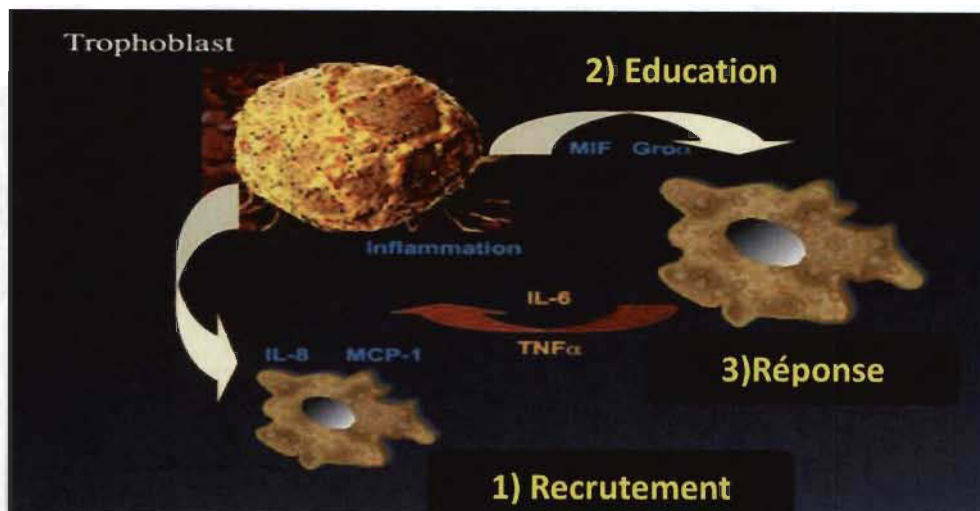


Figure 1.9 Étapes de la théorie d'éducation du macrophage par le trophoblaste. Ce processus inclut trois étapes essentielles d'interaction :

- 1) Recrutement** : Le trophoblaste diffuse des signaux chimiques tels IL-8 et MCP1 pour recruter le monocyte vers le site d'implantation.
- 2) Éducation** : la différenciation monocytaire est modulée par des facteurs originaires du trophoblaste comme MIF et Gro α .
- 3) Réponse** : le macrophage programmé par le trophoblaste exhibe un comportement coopératif avec la formation et les fonctions du placenta. *Adaptée de [50].*

En accord avec cette théorie, une étude a démontré que les exosomes dérivés du trophoblaste extra-villeux du premier trimestre de grossesse sont capables d'induire la migration des monocytes et les « éduquer » à produire un profil cytokinique pro-inflammatoire, en particulier l'IL-1 β [169]. En fait, ces particules exosomales trophoblastiques induisent chez les M ϕ s l'augmentation de la libération de l'IL-1 β . L'IL-1 β est connu pour promouvoir de multiples événements de la grossesse précoce notamment l'attraction et l'activation des cellules immunitaires et la stimulation de l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales [35]. Une autre étude *in vitro* a démontré que la réponse au LPS de M ϕ s pré-exposés en co-culture avec les cellules trophoblastiques est manifestement moins forte que les M ϕ s non pré-exposés et donc non éduqués [170], car il transforme leur profil de production cytokinique pour sécréter à la place un niveau inférieur de médiateurs pro-inflammatoires. Cela démontre que les facteurs sécrétés par le trophoblaste ont la capacité d'induire la différenciation des monocytes sanguins périphérique en M ϕ s dotés d'un phénotype très similaire à

celui des M ϕ s prélevés d'utérus gestants en plus d'atténuer l'amplitude inflammatoire des M ϕ s activés par le LPS [171]. Toutes ces observations supportent la notion de la participation active du trophoblaste dans la transformation des M ϕ s utérins activés en cellules ayant un phénotype immunosuppresseur, supporteur et protecteur de l'embryon en cours d'implantation. Toutefois, les mécanismes moléculaires par lesquels les M ϕ s utérins acquièrent ce phénotype restent mal connus. Ainsi, les questions suivantes restent encore sans réponse : comment le trophoblaste arrive-t-il à imposer un tel équilibre des fonctions inflammatoires immédiates? Quels sont les facteurs intrinsèques du trophoblaste? Et par quels mécanismes moléculaires orchestrent-ils cette communication avec les M ϕ s utérins?

1.5 Hypothèse de travail et objectifs

L'hypothèse générale de travail de nos études est que, pour assurer la protection de l'utérus et de l'embryon en développement, LIF agirait comme médiateur essentiel afin de diriger de façon spatio-temporelle l'activation des M ϕ s utérins. Plus particulièrement, nous proposons que LIF puisse réguler les activités pro-inflammatoires des M ϕ s de façon directe ou indirecte, via l'activation des cellules déciduales et les cellules épithéliales d'origine utérine (endomètre) et embryonnaire (trophoblastes). Plus particulièrement, nous avons performé cette étude afin de comprendre comment et par quels mécanismes moléculaires le fœtus et spécialement le placenta lutte contre un système immunitaire maternel actif et agressif, en particulier contre des macrophages utérins ayant un phénotype pro-inflammatoire et hautement cytotoxique. Le but principal des études *in vitro* proposées dans ce mémoire-article était de décrire le rôle régulateur que l'axe LIF/trophoblast/IL-10 pourrait jouer dans le processus d'activation des M ϕ s en réponse à des cytokines pro-inflammatoires, en particulier, l'IFN γ .

En utilisant des primocultures de trophoblaste provenant de placenta à terme et le modèle cellulaire BeWo, les objectifs spécifiques de notre étude étaient les suivants :

- 1) Déterminer l'effet de l'IFN γ sur la motilité, l'activation de STAT1, l'expression des gènes pro-inflammatoires et les fonctions cytotoxiques des macrophages.
- 2) Préparer des milieux conditionnés à partir de cytotrophoblastes vilieux et de cellules BeWo différenciées en présence de LIF (cellules vCT+LIF et cellules BW/ST+LIF) et étudier leurs effets sur les macrophages activés en réponse à l'IFN γ .
- 3) Déterminer l'implication de STAT1 et de STAT3 dans la régulation des effets de l'IFN γ sur la fonction des macrophages, à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques.
- 4) Étudier l'implication de l'IL-10 dans la réponse des facteurs trophoblastiques à l'aide des anticorps neutralisants anti-IL-10 et d'IL-10 recombinant exogène.

1.6 Les cellules BeWos comme modèle cellulaire

Les méthodes couramment utilisées pour l'étude de la différenciation du trophoblaste humain ou des fonctions associées telles la production de facteurs gestationnels dérivent surtout d'approches *in vitro*, par exemple la culture d'explants placentaires, de chorion lisse ou la purification de CT à partir de placenta humain. Cependant, en raison de leur hétérogénéité, des alternatives plus homogènes ont été mises au point [172]. Alors, les lignées cellulaires dérivées de choriocarcinomes, principalement les BeWos sont très vite devenues très pertinentes pour mimer la différenciation trophoblastique. Cette lignée a été développée à partir d'une tumeur placentaire (choriocarcinome) humaine maintenue à l'origine chez le hamster. À raison de leur capacité de fusion cellulaire, elles sont largement employées comme modèle de syncytialisation [173]. Toutefois, ces cellules sont incapables de se différencier spontanément contrairement aux cytotrophoblastes primaires [174]. Conséquemment, leur différenciation est induite par l'ajout de la forskoline au milieu, un activateur de l'adénylate cyclase dont l'activité permet d'augmenter le taux intra-cellulaire d'AMPc [175].

CHAPITRE II

THE ACTIVATING EFFECT OF IFN γ ON MONOCYTES/MACROPHAGES IS REGULATED BY THE LIF-TROPHOBLAST-IL10 AXIS THROUGH STAT1 INHIBITION AND STAT3 ACTIVATION

Ce chapitre est présenté sous forme d'article, en anglais, et a été publié dans le journal *Cellular & Molecular Immunology*.

Angham Dallagi^{1,2}, Julie Girouard^{1,2}, Jovane Hamelin-Morrisette^{1,2}, Rachel Dadzie^{1,2}, Laetitia Laurent^{2,3}, Cathy Vaillancourt^{2,3}, Julie Lafond^{2,4} and Carlos Reyes-Moreno^{1,2}

¹ Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, département de biologie médicale, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada

² Centre de recherche BioMed UQAM-UQTR-INRS, Montréal, QC, H3C 3P8, Canada

³ INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, QC, H7V 1B7, Canada

⁴ Université du Québec à Montréal, département des sciences biologiques, Montréal, QC, H3C 3P8, Canada

Correspondence : Dr Carlos Reyes-Moreno, Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 boulevard des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada. Tel: (819) 376-5011 Ext.: 3308. E-mail: carlos.reyes-moreno@uqtr.ca

ABSTRACT

Interferon gamma (IFN γ) and leukemia inhibitory factor (LIF) are key gestational factors that may differentially affect leukocyte function during gestation. Because IFN γ induces a pro-inflammatory phenotype in macrophages and that trophoblast cells are main targets for the action of LIF in the placenta, we investigate whether and how soluble factors from trophoblast cells regulate the effects of IFN γ on macrophage activation. IFN γ reduces macrophage motility but enhances Stat1 activation, pro-inflammatory gene expression, and cytotoxic functions. Soluble factors from villous cytotrophoblasts (pVC+LIF cells) and BeWo cells (BW/ST+LIF cells) differentiated in the presence of LIF inhibit macrophage Stat1 activation but inversely sustain Stat3 activation in response to IFN γ . pVC+LIF cells produce soluble factors that induce Stat3 activation, an effect being partially abrogated in the presence of neutralizing anti-interleukin 10 (IL10) antibodies. Moreover, soluble factors from BW/ST+LIF cells decrease cell proliferation but enhance the migratory responses of monocytes while it reverses the inhibitory effect of IFN γ on monocyte/macrophage motility. BW/ST+LIF cells also generate IFN γ -activated macrophages with enhanced IL10 expression but reduced TNF α , CD14, and CD40 expression as well as impaired cytotoxic function. Additional assays performed in the presence of neutralizing anti-IL10 antibodies and exogenous IL10 show that reduced macrophage cytotoxicity and proliferation while increased cell motility result from the ability of trophoblast IL10 to sustain Stat3 activation and to suppress IFN γ -induced Stat1 activation. These in vitro studies are the first to describe the regulatory role the LIF-trophoblast-IL10 axis might play in the process of macrophage activation in response to pro-inflammatory cytokines.

Key words: cell migration/motility; embryonic cell; gestational factors; inflammatory cell; macrophage deactivation

INTRODUCTION

Tissue macrophages (M ϕ s) are no longer of exclusive interest to the field of immunology as part of the innate immune system but perform various homeostatic functions in tissue organization during organogenesis and in mature tissues. [1, 2] During the inflammatory response, tissue M ϕ s are expected to sequentially develop into three different subpopulations: type-1 (M ϕ -1), type-2 (M ϕ -2), and regulatory (Reg-M ϕ s). [3-6] At the initiation phase of inflammation, the pro-inflammatory M ϕ -1 subtype is generated in response to two signals, IFN γ and TNF α , or a ligand for a TLR such as lipopolysaccharide (LPS). At the resolution phase of inflammation, the presence of type-2 cytokines IL4 and IL13 leads to the generation of anti-inflammatory M ϕ -2, which are associated with the coordination of tissue repair. The third subtype, Reg-M ϕ s, is fundamentally different from M ϕ -1 and M ϕ -2 and requires two signals to be generated. [3-6] The first signals include IL10, prostaglandins, immune complexes, adenine nucleotides, glucocorticoids, or apoptotic cells, and the second one is TLR activation. Reg-M ϕ s overproduce IL10 but not IL12 showing potent immunosuppressive activity to modulate the acute inflammatory response, and thereby limiting tissue damage. [3-6]

Tissue M ϕ s constitute one of the most abundant populations of inflammatory cells into the uterus, and their numbers remain relatively constant into the decidua throughout gestation. [7, 8] In normal pregnancies, the phenotype of uterine M ϕ s is locally modified to acquire a type-2 phenotype, [9-11] which may contribute to promote trophoblast differentiation, support embryo implantation, and supply growth factors to the placenta. [7, 8] However, although M ϕ s play important roles at the maternal–fetal interface, aberrant activation of inflammatory pathways in M ϕ s can affect trophoblast survival and function, [12] potentially leading to pregnancy complications such as recurrent spontaneous abortion, pre-eclampsia, fetal growth restriction and intrauterine infection-associated preterm labor in humans. [7, 8]

Whereas gestation has long been recognized as an anti-inflammatory Th2 condition, recent studies have shown that the process of blastocyst implantation requires a

pro-inflammatory Th1 environment. [13, 14] The transitory maintenance of this Th1 environment appears to be essential for the growth and survival of trophoblast cells, which in turn, produce a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines linked to the control of leukocyte recruitment, to the regulation of inflammatory activity, and to the promotion of Th2 immune responses. [14] Among the numerous cytokines produced at the implantation site, interferon gamma (IFN γ) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) are potent inducers of pro-inflammatory type-1 phenotype on tissue M ϕ s, [15] while presenting, in regard of the developing embryo, both beneficial and harmful attributes. [16] IFN γ , 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 cell death-inducing cytokine TNF α and the cell surface receptors cluster of differentiation 14 and 40 (CD14 and CD40). [15] During early pregnancy, uterine natural killer (uNK) cells secrete IFN γ , which plays critical roles in the initiation of endometrial vasculature remodeling, in the process of angiogenesis at implantation sites, and in the maintenance of decidual and placental tissues. [16] On the other hand, inflammatory stress in pregnant mice induces higher levels of IFN γ and TNF α synthesis by uNK cells and M ϕ s, respectively, which in turn target uterine endothelial cells to provoke vascular damage and placental ischemia. [17, 18] For instance, gestational complications have been linked to elevated IFN γ and/or TNF α expressions in the immune-mediated, early abortion mouse model CBA/J \times DBA/2J [17, 18] and the preterm labor and delivery model of LPS-treated IL10 knockout (KO) mice. [19, 20] Moreover, as observed in recurrent spontaneous abortion and intrauterine infection-associated preterm labor in humans, [7, 8] aberrant inflammatory behaviour in M ϕ s has been associated with spontaneous and endotoxin-mediated abortion in rodents. [21]

Thus, even if a pro-inflammatory Th1 environment seems to be required for successful blastocyst implantation, [13, 14] the regulation of pro-inflammatory M ϕ activation within the pregnant uterus may be vital to avoid detrimental M ϕ functions, leading ultimately to placental and fetal demise. Embryonic trophoblast cells have been proposed to participate intensively in this process by producing factors that modulate

leukocyte function. [22] Recently, Mor *et al.* (2011) have proposed the theory that trophoblast/immune cells interaction involves three stages. [14] During the attraction step, trophoblast cells secrete chemokines that can recruit immune cells to the implantation site; during the education step, trophoblast cells produce regulatory cytokines that modulate the differentiation process of immune cells; and finally, in the response step, immune cells acquire a trophoblast-supporting phenotype in response to signals from the local microenvironment. [14] However, the molecular mechanism by which uterine M ϕ s are programmed to adopt a Th2 phenotype in response to trophoblast-derived factors remains elusive.

Many potential M ϕ programming factors have been described in the human pregnant uterus. [23, 24] One factor of interest is the pleiotropic cytokine leukemia inhibitory factor (LIF). LIF plays an important role in the establishment of pregnancy by supporting decidual and placental differentiation, but also through its influence on reproductive tract cells such as leukocytes and luminal/glandular epithelial cells. [25] The best evidence that LIF might play a role in the regulation of M ϕ s comes from data obtained from LIF KO mice, which present a more than half reduced percentage of uterine M ϕ s by days 3-5 of pregnancy. [25] The LIF KO mouse model has also revealed the central regulatory role LIF plays in endotoxic shock and host defense. Essentially, LIF expression following endotoxic shock enhances the expressions of hepatic acute-phase proteins and interleukin 10 (IL10), which down regulates TNF α synthesis and release in the liver and thereby confers protection to endotoxemia. [26] In the uterus of pregnant mice, LIF is most likely playing a similar but local role in the protective effect of progesterone against endotoxin-induced fetal demise by decreasing nitric oxide (NO) levels *in utero*. [27]

Another important gestational factor is IL10, a type-2 cytokine expected to play a key role in pregnancy immunotolerance through the establishment of a Th2 immune response at the maternal-fetal interface. [28, 29] Using IL10 KO mice to study LPS-induced preterm parturition, Murphy *et al.* (2005 and 2009) demonstrate that, in the absence of IL10, uNK cells may exert cytotoxic functions through TNF α production and

invasiveness into the placental zone, leading to fetal demise or intrauterine fetal growth restriction. [19, 20] IL10 inhibits the production of several pro-inflammatory cytokines including TNF α in M ϕ s and IFN γ in NK cells, thereby preventing the development of type-1 immune reactions deleterious for both the establishment and maintenance of pregnancy. [30-32] Moreover, IL10 is noted for its ability to inhibit M ϕ proliferation by activating Stat3, [33] and to suppress IFN γ -mediated function of M ϕ s by blocking Stat1 activation. [34]

In the human pregnant uterus, IL10 is highly produced by both the syncytiotrophoblast and the decidual M ϕ s, [9, 10, 28, 29] while LIF is highly expressed by decidual M ϕ s and uNK cells. [35] On the other hand, the IL10 receptor is constitutively expressed on placental trophoblasts, [28, 29] and decidual M ϕ s are known to be highly responsiveness to IL10. [9, 10] The expression level of LIF receptors in contrast is significantly higher in both villous and extravillous trophoblast than in decidua, [35] suggesting that all cells of the trophoblast lineage are major targets for the action of LIF in the placenta. However, the possible interplay between LIF, trophoblast cells, and IL10 in the modulation of M ϕ functional phenotype has never been investigated. By using *in vitro* M ϕ and trophoblast differentiation models previously established in our lab, [36-41] we investigate whether and how, in response to LIF stimulation, syncytiotrophoblast-derived factors and, IL10 in particular, regulate the effects of IFN γ on the behavior of M ϕ s and to describe their mechanism of action at the molecular level.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and chemicals

All cell culture media, serum and reagents were purchased from Wisent. Boyden chambers, cell culture plates and flasks were from Corning. The cytokines LIF, IL10 and IFN γ were purchased from Peprotech. Neutralizing polyclonal anti-human IL10 antibody (#IC2172F) was from R&D Systems. The chemicals methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), DMSO, forskolin, propidium iodide (PI) dye and all

electrophoresis grade chemicals were from Sigma Chemical Company. Trizol reagent and PCR primers were from Invitrogen. Taq DNA polymerase and M-MLV reverse transcriptase were from New England Biolabs. Cocktails of proteases and phosphatases inhibitors were from Roche Applied Science. The specific inhibitors of Stat1, JAK inhibitor I, and Stat3, Stat3 inhibitor V, were from Calbiochem. The rabbit polyclonal antibodies (Abs) against phospho (p) Stat1 (pY701), Stat1, pStat3 (pY705), and Stat3 were purchased from Cell Signaling Technologies whereas monoclonal peroxidase-conjugated mouse anti- β -actin antibody was from Sigma Chemical Company and the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG came from Bio-Rad Laboratories.

Isolation and purification of term villous cytotrophoblasts

This study was approved by the ethical committee of CHUM-St-Luc Hospital (Montreal, QC, Canada). Human term placentas (37-41 weeks) were obtained immediately after spontaneous vaginal deliveries from uncomplicated pregnancies. Immediately after delivery, placentas were immersed in DMEM-HG containing antibiotics (5 μ g/ml amphotericin, 50 μ g/ml gentamycin and 0.12 mg/ml penicillin), kept at 4 °C and processed within 1 h. Villous cytotrophoblasts (VCT) were isolated and purified as previously described by our group, using the trypsin-DNase/Percoll method. [39-41] Mononuclear vCT were purified by immunomagnetic labelling using autoMACS™ (Myltenyi Biotec) and anti-HLA-ABC antibody as described previously. [39] The purity of immunopurified vCT was determined by flow cytometry using FITC-conjugated monoclonal antibody against cytokeratin-7. All vCT preparations used in this study were at least 98% pure after cell sorting. vCT were centrifuged, suspended in 37 °C culture medium, consisting of DMEM-High Glucose supplemented with 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES, 5% FBS and 1X penicillin-streptomycin-neomycin antibiotic mixture, seeded at a density of 4.5×10^6 cells/well in CellBIND 6-wells microplates. After seeding, cells were cultured for 12 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, the medium was gently removed and cells were washed twice with pre-warmed

medium. Twenty four hours after, cells were treated with pre-warmed medium containing the human LIF (50 ng/ml) then cultured for a maximum of 48 h. [39-41]

Villous cytotrophoblast-like BeWo cell differentiation

Human placental choriocarcinoma cell line BeWo cell (ATCC number CCL-98) was cultured in RPMI-1640 cell culture media supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES and 50 µg/ml gentamicin (referred as 10% FBS-RPMI media). Human BeWo cell line is the most extensively used cellular *in vitro* model to study villous cytotrophoblast fusion and function. [42] Undifferentiated BeWo cells are morphologically similar to primary cultures of mononuclear cytotrophoblast cells [43] with a low spontaneous fusion rate, which can be boosted upon treatment with forskolin (FK). [44] As we previously described, FK-stimulated BeWo cells also express markers of typical syncytiotrophoblast cells such as human chorionic gonadotrophin and markedly decreased E-cadherin expression. [38] The similarities with trophoblast cells support the use of BeWo cells as a valid and suitable model to study different aspects of villous cytotrophoblast differentiation and function. In this study, to induce cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast (ST), 10 µM FK was added in BeWo cell cultures (BW/ST), as previously described. [38]

Trophoblast conditioned media collection

To obtain control media (CTLm), fresh 10% FBS-RPMI media was placed in the cell incubator for 48 h. Conditioned media (CM) was prepared from primary cultures of villous cytotrophoblasts (vCT) and BW/ST cells which were cultured during 48 h in 5% FBS-RPMI media in the absence (CM vCT-LIF and CM BW/ST-LIF) or the presence of 50 ng/ml LIF (CM vCT+LIF and CM BW/ST+LIF). CTLm and CM (5 ml) were centrifuged once at 250g×5 min to eliminate cells and cell debris and then in a centrifugal device (molecular weight cut-off 3K Dalton; Pall Life Science) at 3 200g×45 min to separate proteins from low molecular weight molecules, including residual FK and LIF. Concentrated proteins were diluted with an equal volume of

10% FBS-RPMI media. Sterile cell-free CTLm and CM were snap-frozen, stored at -80 °C, and thawed on ice when required.

Monocyte and macrophage differentiation

Human subjects underwent written informed consent for blood donation at the haematologic service of the Centre Hospitalier Régional de Trois-Rivières (CHRTR, Trois-Rivières, PQ, Canada), as approved by the Institutional Review Board of CHRTR. Over a period of one year, 35 voluntary blood donors were enrolled in this study. The mean age was 41.5 ± 7.8 years and the number of male donors (69%) was much higher than the female donors (31%). Most of the blood donors in the current study (91%) were both non-smokers and non-alcoholic. Exclusion criteria included history of chronic immunosuppression, anti-inflammatory use, and history of hepatitis B infection. Blood monocytes were isolated as previously described. [36] Adherent mononuclear cells were recovered using Lymphocyte Separation Medium (Ficoll) and cultured for 5 days to induce M ϕ differentiation with 10 ng/ml GM-CSF. At day one, the purity of monocyte-derived M ϕ s (MDM ϕ) was approximately 98% as assessed by the detection of CD14 by flow cytometry. [36] Human monocytic leukemia cell line THP1 cell (ATCC number TIB-202) was cultured in 10% FBS-RPMI media. THP1 cell is one of the most widely used cell lines to investigate the function and differentiation of monocytes and M ϕ s in response to various inflammatory mediators, such as IFN γ and bacterial lipopolysaccharide (LPS). [45-47] Undifferentiated THP1 cells resemble primary monocytes/M ϕ s isolated from healthy donors or donors with inflammatory diseases, such as diabetes mellitus and atherosclerosis. [47] After treatment with phorbol esters, THP1 cells differentiate into macrophage-like cells which mimic native monocyte-derived M ϕ s in several respects. [46, 48] Because of these characteristics, the THP-1 cell line was broadly proposed as a valuable model to study the regulation of M ϕ -specific genes [48] as well as the mechanisms involved in M ϕ differentiation, [45] and the molecular mechanisms in monocytes and M ϕ s in relation to the physiology and the pathophysiology of inflammatory responses. [47] In this study, green fluorescent protein-expressing (GFP)-THP1 cells were cultured for 18 h in 50 nM phorbol

12-myristate 13-acetate (PMA) to induce monocyte-to-M ϕ differentiation. In order to investigate whether trophoblast-derived factors regulate the effects of IFN γ on the behavior of M ϕ s, MDM ϕ and GFP-THP1-derived M ϕ s (TDM ϕ) were cultured in the absence of cytokines to obtain control cells (M ϕ) or with 50 U/ml IFN γ to induce pro-inflammatory type-1 phenotype (M ϕ +IFN γ).

Migratory/chemotactic assay

Undifferentiated GFP-THP1 cells were used to investigate whether trophoblast cells are able to regulate the chemotactic responsiveness of monocytes (Mo) to trophoblast-derived factors. The transwell migratory assay was conducted in a modified Boyden chamber with membrane inserts (8 μ m pore size) as described previously. [36, 37] Briefly, GFP-THP1 cells were cultured for 24 h without or with 50 U/ml IFN γ , and then washed, counted, and seeded into the upper well of the chamber (50×10^3 cells/100 μ l), while BW/ST cells previously stimulated with phosphate-buffered saline (PBS) solution (BW/ST-LIF) or LIF (BW/ST+LIF) were seeded in the lower well (50×10^3 cells). GFP-THP1 cells that migrated down to the lower well in response to trophoblast-derived chemotactic factors were visualized by fluorescence microscopy and counted from images captured at t=0 h and t=48 h. All observations were performed at 5 \times magnification on cell monolayers. Five fields were taken randomly for each different treatment.

Motility assay

The *in vitro* scratch wound healing assay was performed to study the effects of trophoblast-derived factors in M ϕ cell migration. [49] Briefly, MDM ϕ (300×10^3 cells/ml) and TDM ϕ (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 would line to create a cross in each well. The debris

were removed and the edge of the scratch were smoothed by washing the cells once with 1 ml of Hank's buffer and then cultured in CTLm, CM BW/ST-LIF, or CM BW/ST+LIF, without or with 50 U/ml IFN γ , for the *in vitro* scratch assay. To assess the effects of exogenous IL10, TDM ϕ were pretreated for 3 h with 25 ng/ml IL10, and then washed and activated with 50 U/ml IFN γ . 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 a ratio of motile cells at t=48 h/t=0 h within the initial wound. To study the impact of inhibiting IFN γ -induced signaling pathways activation during the healing of the wound, M ϕ were plated as described above. After the scratch cross line was created, the cell monolayers were treated for 60 min with either vehicle (0.1% DMSO) or optimal dose of the chemical inhibitors JAK inhibitor I (JAK Inh I; 10 μ M) and Stat3 inhibitor V (Stat3 Inh V; 5 μ M) before incubation with CTLm, CM DMSO, CM FK, or CM FK+LIF, without or with 50 U/ml IFN γ . To determine the influence of JAK Inh I and Stat3 Inh V on IFN γ -induced signaling pathway activation, pretreated M ϕ were stimulated for 15 min and 30 min and cell lysates were prepared and analyzed by immunoblotting as described. [36-38]

Cell viability/proliferation assays

To assess the effects of trophoblast-derived factors in cell viability of monocytes and M ϕ s, undifferentiated GFP-THP1 cells and TDM ϕ were cultured in CTLm, CM BW/ST-LIF, or CM BW/ST+LIF, without or with 50 U/ml IFN γ . Cell viability was assessed at t=0 h and 48 h by MTT assays, as previously described. [36-38] To evaluate the number of dead cells, cells were washed and stained for 15 min with 2 μ g/ml PI solution before analysis by flow cytometry. To estimate the influence of BW/ST cell-derived factors on the cytotoxic activities of M ϕ s, TDM ϕ were cultured for 24 h with CTLm, CM BW/ST-LIF, or CM BW/ST+LIF, without or with 50 U/ml IFN γ , and then washed and cultured for 24 h in serum-free RPMI-1640 culture media. Undifferentiated BeWo

cells were incubated for conditioned media from these cell cultures. MTT assays and PI staining were performed at $t=0$ h, 24 h, and 48 h to evaluate the number of alive and dead cells, respectively. Each assay was performed in quadruplicates and represents three independent experiments.

Protein immunodetection

TDM ϕ (750×10^3 cells/ml) were pretreated for 24 h with CTLm, CM BW/ST-LIF, or CM BW/ST+LIF, or pretreated for 3 h with exogenous IL10 (5 and 25 ng/ml), and then washed and activated with 50 U/ml IFN γ at $t=0$ min, 15 min, and 30 min. Cell lysates were prepared and analyzed by immunoblotting as described. [36-38] 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 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).

RNA isolation and RT-PCR analyses

Total RNA extraction, preparation of first strand cDNA by reverse transcriptase (RT) and polymerase chain reaction (PCR) were performed as we previously described. [36, 37] 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; 5' -CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG-3' (S) and 5' -CCTTGGTCTGGTAGGAGACG-3'

(AS) for TNF α ; and 5'-TGAGAACCAAGACCCAGACA-3' (S) and 5'-TCATGGCTTTGTAGATGCCT-3' (AS) for IL10.

Surface antigen expression analysis

To study membrane receptor expression, M ϕ s were pretreated for 24 h with CM from BW/ST cell cultures, and then collected after a 48-hours stimulation period without or with 50 U/ml IFN γ . The expression level of CD14 and CD40 was evaluated by flow cytometry as described. [36, 37]

IL10 neutralization assays

To determine the potential involvement of trophoblast-derived IL10 as deactivating mediator on M ϕ behavior, we used a polyclonal antibody directed against IL10 (R&D System; #IC2172F) to neutralize IL10 in trophoblast CM. MTT assays and *in vitro* scratch wound healing assays were performed as described above. Neutralizing anti-IL10 or isotype control antibodies (both at 2 μ g/ml) were added daily to M ϕ monolayers. A representative result from three independent experiments is shown.

Statistical analyses

For all experiments, values 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.

RESULTS

Villous cytotrophoblast-derived factors repress Stat1 activation but inversely sustain Stat3 activation in IFN γ -activated M ϕ s

This set of experiments were planned to investigate whether primary cultures of vCT are responsiveness to LIF and if LIF-differentiated vCT have the ability to regulate the effects of IFN γ on the behavior of MDM ϕ s. As shown in figure 1A, activation of the Stat3 signaling pathway was efficiently induced in vCT, and this effect was maintained at similar levels during 15 min and 30 min of LIF stimulation. Figure 1B shows representative activation status of Stat1 and Stat3 following stimulation with IFN γ in MDM ϕ s preconditioned for 24 h with CTLm, CM vCT-LIF, CM vCT+LIF, and recombinant human LIF (rLIF). MDM ϕ s express low basal levels of pStat1 and pStat3 (t=0 min) when preconditioned in CTLm, in CM vCT-LIF, in CM vCT+LIF, and in the presence of rLIF (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 by 4.3 folds with CTLm at t=15 min, and 7.6 folds at t=30 min (Fig. 1B). These increased effects in pStat1 were efficiently reduced when MDM ϕ s were preconditioned with both CM vCT+LIF (1.9 folds at t=15 min, and 2.8 folds at t=30 min) and rLIF (no change at t=15 min, and 2.1 folds at t=30 min), but not with CM vCT-LIF (Fig. 1B). In contrast to pStat1, the induction of pStat3 was significantly enhanced by IFN γ but only at t=15 min when MDM ϕ s were preconditioned with CM vCT-LIF (4 folds), CM vCT+LIF (4.5 folds), and rLIF (2.8 folds).

Villous cytotrophoblast-derived IL10 sustain Stat3 activation in M ϕ s

In this set of experiments, we investigate the direct effects of vCT-derived factors in the induction of pStat3 in MDM ϕ s and the potential involvement of IL10 in this process. As shown in figure 2A, Stat3 is significantly induced in MDM ϕ s by soluble factors present in CM vCT-LIF and even more by soluble factors present in CM vCT+LIF and exogenous IL10. Cell signaling studies performed in the presence of neutralizing anti-IL10 antibodies show that IL10 is required for vCT+LIF cells to trigger enhanced

Stat3 activation in MDM ϕ s (Fig. 2A). For the rest of our studies, we opted for the use of BeWo cell model because of its relevance and especially because of its availability and reproducibility when used at early passages. [38] IL10 mRNA expression was thus studied by RT-PCR to validate the use of BeWo cells as a pertinent model to study villous cytotrophoblast differentiation and function. Undifferentiated BeWo cells express basal levels of IL10 mRNA but we found that the IL10/GAPDH ratio substantially increased from 0.2 ± 0.1 up to 0.7 ± 0.2 in BW/ST-LIF cells and up to 1.2 ± 0.2 in BW/ST+LIF cells (Fig. 2B). Furthermore, cell signaling studies demonstrated that soluble factors from BW/ST+LIF cells inhibit M ϕ Stat1 activation but inversely sustain Stat3 activation in response to IFN γ (Supplemental Figure 1).

Syncytiotrophoblast-derived factors affect cell proliferation but enhance the migratory response of IFN γ -activated monocytes/M ϕ s

In order to determine the influence of trophoblast-derived factors in cell proliferation, monocytes and M ϕ s were incubated for 48 h in CTLm, CM BW/ST-LIF, or CM BW/ST+LIF in the presence of 50 U/ml IFN γ , and then, MTT viability/proliferation assays were performed. As can be seen in figure 3A, the rates of proliferation are considerable higher in IFN γ -activated monocytes (close square; relative cell viability= $0.0982t+0.05$; $R^2=1$) compared with MDM ϕ s (close square; relative cell viability= $0.064t+0.0383$; $R^2=1$). However, striking rates of decrease in cellular proliferation was observed when IFN γ -activated monocytes were cultured in the presence of CM BW/ST-LIF (close triangle; relative cell viability= $0.0476t+0.0924$; $R^2=1$) and even more in the presence of CM BW/ST+LIF (close circle; relative cell viability= $0.0159t+0.1276$; $R^2=1$). Similar results were observed when IFN γ -activated MDM ϕ were cultured in the presence of CM BW/ST-LIF (close triangle; relative cell viability= $0.0341t+0.061$; $R^2=1$) and CM BW/ST+LIF (close circle; relative cell viability= $0.0103t+0.0863$; $R^2=1$). To explore the possibility that the decrease in the number of viable cells was due to cell death, monocytes and M ϕ were recovered at the end of treatments and stained with PI DNA dye and the number of dead cells was evaluated by flow cytometry. The results indicated that the effect was probably

cytostatic and no cytotoxic since very low and similar levels of dead cells were found in monocytes and M ϕ s cultured with CTLm, CM BW/ST-LIF, or CM BW/ST+LIF, without or with 50 U/ml IFN γ (data not shown).

In this set of migratory/chemotactic assays, undifferentiated GFP-THP1 cells were used in order to investigate if, in response to LIF, BW/ST cells are effective in regulating the chemotactic responsiveness of monocytes. To this purpose, monocytes were previously cultured for 48 h in the absence and the presence of IFN γ , and then placed in the upper well of transwell migratory chambers. As shown in figure 3B, the number of migratory monocytes passing to the lower well, at t=48 h, in the absence of trophoblast cells was determined at 35 ± 5 , but was substantially increased when cultured in the presence of BW/ST-LIF cells (109 ± 11) and even more with BW/ST+LIF cells (127 ± 13). In the absence of BW/ST cells, the number of migratory monocytes decreases from 35 ± 5 to 9 ± 3 (decrease to 24% of control) when activated with IFN γ (Fig. 3B). In the presence of BW/ST cells in the lower well, IFN γ is less effective to inhibit monocyte migration (Fig. 3B). The proportion of migratory cells activated with IFN γ gradually increases up to 66% when co-cultured with BW/ST-LIF cells (71 ± 13), and up to 86% with BW/ST+LIF cells (109 ± 13).

A set of wound healing assays was designed to investigate whether BW/ST factors also changes the relative number of motile cells in M ϕ cultures pretreated with CTLm, CM BW/ST-LIF, or CM BW/ST+LIF, activated without or with 50 U/ml IFN γ . It is well known that IFN γ stimulation is associated with a lower chemotactic responsiveness and motility in human monocytes/M ϕ s via a selective inhibition expression of CCR2, the receptor for the chemoattractant CCL2 (formerly known as macrophage chemoattractant protein 1 or MCP1). [50] As expected, MDM ϕ are motile in the absence of IFN γ . After a 48-hours cell culture period, however, the cell motility of MDM ϕ being gradually increased in response to CM BW/ST-LIF and CM BW/ST+LIF (Fig. 3C). The relative number of motile cells, expressed as a ratio of motile cells at t=48 h/t=0 h within the initial wound, was determined at 12 ± 1 with CTLm, at 25 ± 2 with CM BW/ST-LIF,

and at 32 ± 2 with CM BW/ST+LIF (Fig. 3C). MDM ϕ are poorly motile in the presence of IFN γ (decrease to 18% of control). However, the percent of motile cells within the wound gradually increases up to 62%, and 81% when cultured respectively in the presence of factors from BW/ST-LIF and BW/ST+LIF cells (Fig. 3C). Similar results were obtained with TDM ϕ cultures, the factors from BW/ST+LIF cells being the most efficient to reverse the effects of IFN γ on M ϕ motility (Supplemental Figure 2).

IFN γ -induced Stat1 activation mediated M ϕ motility inhibition

To determine whether Stat1 and Stat3 mediate the inhibitory effects of IFN γ on M ϕ motility, TDM ϕ s were separately preconditioned for 24 h with CTLm and CM BW/ST+LIF, and then pretreated for 30 min with either 0.1% DMSO, 10 μ M JAK Inh I, or 5 μ M Stat3 Inh V before activation with 50 U/ml IFN γ . As shown in figure 4A, the relative number of motile cells at t=48 h in CTLm was determined at 1.1 ± 0.3 when pretreated with DMSO, at 4.9 ± 0.8 with JakInh I, and at 1.1 ± 0.4 with Stat3 Inh V (Fig. 4A). The results using CM BW/ST+LIF demonstrated that, as expected, factors from BW/ST+LIF cells promote the motility of M ϕ s immobilized by IFN γ , the relative number of motile cells at t=48 h being determined at 7.6 ± 0.9 when pretreated with JakInh I. Of note, this promoting effect was significantly increased in M ϕ s pretreated with JAK Inh I but not with Stat3 Inh V, the respective ratio of motile cells being established at 10.7 ± 0.5 and 2.9 ± 0.6 (Fig. 4A).

Cell signaling studies indicated that IFN γ -mediated arrest of cell motility is mediated by Stat1 activation, as the induction of pStat1, but not that of pStat3, was efficiently impeded by JAK Inh I in response to IFN γ (Fig. 4B). Moreover, as shown in figure 4C, Stat3 activation is required to sustain cell motility on IFN γ -immobilized M ϕ s by BW/ST+LIF factors as M ϕ s are poorly motile when pretreated with Stat3 Inh V (Fig. 4A).

Syncytiotrophoblast-derived factors modulate M ϕ pro-inflammatory markers expression

This set of experiments was designed to investigate M ϕ TNF α and IL10 gene expression by RT-PCR and the expression of CD14 and CD40 by flow cytometry. Consistently with the pro-inflammatory role of IFN γ , the transcription level of TNF α was gradually up-regulated in M ϕ s stimulated with IFN γ , the levels being increased from 0.59 ± 0.06 to 1.39 ± 0.08 after 24 h of stimulation (Fig. 5A, left panel). Levels of TNF α mRNA were down-regulated when M ϕ s were pretreated with CM BW/ST+LIF, and stimulated with IFN γ (0.56 ± 0.06 versus 0.39 ± 0.04 ; Fig. 5A, left panel). In contrast to TNF α , the levels of IL10 mRNA were up-regulated when M ϕ s were pretreated with CM BW/ST+LIF, the IL10/GAPDH ratio being increased from 0.21 ± 0.06 to 1.17 ± 0.12 (Fig. 5A, right panel). Notably, this rise in IL10 mRNA expression was maintained even after M ϕ activation with IFN γ , the IL10/GAPDH ratio being increased from 0.22 ± 0.08 to 1.00 ± 0.10 (Fig. 5A, right panel).

In response to IFN γ , M ϕ CD14 and CD40 expressions were enhanced by 2 folds and 3.5 folds, respectively (Fig. 5B). However, this rise in CD14 and CD40 expression in IFN γ -activated M ϕ s was blocked when they were preconditioned with soluble factors from BW/ST+LIF cells (Fig. 5B). Thus, in response to LIF, BW/ST-derived factors have the ability to generate IFN γ -activated M ϕ s with enhanced expression of anti-inflammatory IL10 but reduced expression of pro-inflammatory TNF α , CD14, and CD40.

Syncytiotrophoblast-derived IL10 regulates pro-inflammatory M ϕ function

This set of experiments was designed to investigate the involvement of ST-derived IL10 in the regulation of M ϕ proliferation, cytotoxicity and motility. Results from MTT assays showed that anti-proliferative activity of BW/ST+LIF cells on M ϕ s was reduced when they were preconditioned with neutralizing anti-IL10 Abs. The number of IFN γ -activated M ϕ s was reduced by 38% in the presence of isotype Abs, and by 15% in

the presence of anti-IL10 Abs (Fig. 6A). To further confirm that LIF act on ST/BW cells to produce IL10 and counteract the activating effects of IFN γ , M ϕ -mediated cytotoxicity against undifferentiated BeWo cells were performed in the presence of neutralizing anti-IL10 Abs. As shown in figure 6B, soluble factors from IFN γ -activated M ϕ s preconditioned with CTLm completely blocked cell proliferation in BeWo cells. However, the cytotoxic activity of IFN γ -activated M ϕ s against BeWo cells was efficiently neutralized when M ϕ s were preconditioned with CM BW/ST+LIF, while M ϕ -mediated cytotoxicity was restored in the presence of neutralizing anti-IL10 Abs (Fig. 6B). Moreover, we found that IL10 is required for BW/ST+LIF cells to trigger sustained motility in IFN γ -activated M ϕ s (Fig. 6C).

Exogenous IL10 regulates cell motility in IFN γ -activated M ϕ s

Scratch assays were performed to further demonstrate the deactivating effects of IL10 on IFN γ -activated M ϕ s. We found that pretreatment for 3 h with exogenous IL10 significantly enhanced M ϕ motility, the ratio of motile cells being increased up to 38% compared with PBS pretreatment (Fig. 7A). However, as observed with BW/ST+LIF factors (Fig. 1B), the inhibitory effect of IFN γ on M ϕ motility was significantly blocked when M ϕ s were pretreated with IL10; the ratio of motile cells being increased up to 78% compared with PBS pretreatment (Fig. 7A). The differential influence of IL10 on M ϕ proliferation and motility may result from the ability of IL10 to suppress IFN γ -induced Stat1 activation while Stat3 activation is maintained (Fig. 7B).

DISCUSSION

Although IFN γ has been defined as an important gestational factor and a potent inducer of pro-inflammatory type-1 phenotype in M ϕ s, [15] it present in regard of the developing embryo both beneficial and harmful attributes. [51] The present study demonstrates that multinucleated trophoblast cells are efficient in the deactivating process of pro-inflammatory M ϕ -1. For instance, M ϕ proliferation, inflammatory

gene/protein expression, and cytotoxicity were significantly reduced when IFN γ -activated M ϕ s were preconditioned with soluble factors from syncytiotrophoblast cells. In line with our results suggesting the involvement of IL10 in this process, our previous studies have shown that IL10 and IL10-producing M ϕ -2 cells inhibits M ϕ -1 cytotoxic activity, [36] probably by blocking the endogenous production of TNF α , the most important microbicidal and tumoricidal mediator produced by IFN γ -activated M ϕ s. [52] Several lines of evidence suggest that IL10 is an important suppressor of active maternal immunity that would be involved in the process of acceptance of the fetal allograft. [29] IL10 levels increase markedly in women during early pregnancy and remain elevated up to the third trimester immediately prior to onset of labor. Of note, compared to syncytiotrophoblast, extravillous cytotrophoblast are intrinsically poor in IL10 production, [28, 29] indicating that the syncytium might indeed contribute locally to counteract the deleterious effects of pro-inflammatory cytokines during early pregnancy.

Uterine CD14⁺ M ϕ s are the most important leukocyte population in the pregnant uterus of humans and mice. They have potential inflammatory and antigen-presenting cells functions that could be detrimental to the fetus if they are over activated in response to infection. [7, 8, 13, 14, 17, 22] CD14 is part of a cognate receptor complex, comprising Toll-like receptor 4 (TLR4) and myeloid differentiation factor 2 (MDF-2), involved in M ϕ detection of gram-negative bacteria via binding of the outer-wall component LPS. [56] It is well established that IFN γ -primed M ϕ s produced higher levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines on stimulation with LPS via up-regulation of CD14, TLR4, and MDF-2 expressions. [57] The physiological importance in down regulating expression of the LPS receptor CD14 by syncytiotrophoblast cells could be placed in the context of recent studies demonstrating that LPS may provide the danger signal through which IFN γ -mediated stress triggers maternal immune activation. This would subsequently results in fetal rejection in the abortion-prone CBA/J \times DBA/2J mouse model. This interpretation is in agreement with the results showing that blocking receptors for LPS or neutralization of LPS abrogate loss of embryos in these pregnant mice. [58]

CD40 is a costimulatory immune receptor member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily. [59,60] CD40 expression and activation on antigen-presenting cells (including M ϕ and DC) is crucial for Th1-cell mediated immune responses. [61] IFN γ is the most potent inducer of CD40 expression in M ϕ s, [62] and as we have previously established, this induction is associated with enhanced cytotoxic function that triggers robust M ϕ -mediated destruction of tumor cells. [37] Thus, as we suggested for TNF α and CD14, repression of M ϕ CD40 expression by syncytiotrophoblast cells could be viewed as a mechanism leading to reduced cytotoxic and costimulatory functions of IFN γ -activated M ϕ s.

Indeed, recent studies suggest that human decidual M ϕ s could represent a regulatory or suppressive type of tissue M ϕ s and there by contribute to the development of appropriate maternal immune responses to the fetus in early pregnancy. Decidual M ϕ s produced spontaneously high levels of IL10. [9-10-11] IL10-producing decidual M ϕ s expressed CD14 and HLA-DR, but lower levels of costimulatory molecules CD40 and CD86 than peripheral blood monocytes from pregnant and non-pregnant women. [11] Furthermore, decidual M ϕ s do not differentiated into dendritic cells under the influence of IL4 and GM-CSF. [11] Sayama *et al.* (2013) [63] recently demonstrated that decidual M ϕ s are able to suppress T cell IFN γ production. This occurs via B7-H1, a costimulatory ligand in the B7 family, which negatively modulates T cell activity by binding to its corresponding receptor, PD-1. The Fisher's group proposed that decidual M ϕ s can also protect the fetal cells (trophoblast cells) against death-inducing activity of IFN γ -producing uterine NK cells through a transforming growth factor beta 1 (TGF β 1)-dependent mechanism. [64]

IFN γ -mediated activation of gene transcription occurs primarily through the transcription factor Stat1. [15] Once Stat1 is phosphorylated by Jak1 and Jak2, it homodimerizes, translocates to the nucleus, and activates the transcription of multiple genes containing an IFN γ -activating sequence in their promoters. [65] As reported here, IFN γ signaling in M ϕ s involves Stat1 activation, and syncytiotrophoblast-derived

factors, such as IL10, have the ability to sustain Stat3 activation but inversely repress Stat1 activation in response to IFN γ stimulation. Our results strongly suggest that this inverse action on Stat1 and Stat3 is the molecular mechanism that could antagonize the inhibitory effects of IFN γ on M ϕ motility by syncytiotrophoblast-derived factors and IL10. In accordance with our premise, previous studies have shown that Stat1, and Stat1-induced gene products, mediate the inhibitory effects of IFN γ on M ϕ migration, and that this inhibitory effect is completely abrogated in Stat1-deficient M ϕ s. [66] Moreover, these studies have demonstrated that Stat3 is required to sustain M ϕ motility. However, Stat3 does not oppose to the effects of IFN γ since it can still suppress THP1 cell migration, even if THP1 cells express high levels of activated Stat3. [66] IL10 can directly inhibit Stat-dependent gene expression induced by IFN γ in M ϕ s by suppressing the tyrosine phosphorylation of Stat1. [34] Furthermore, similar to IL10, other immunosuppressive cytokines and growth factors, such as TGF β 1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) ligands, are also known to promote M ϕ deactivation via suppression of IFN γ -induced Stat1 phosphorylation and activation. [67, 68]

In addition to its effect on M ϕ motility, we also demonstrated that IL10 mediates the inhibitory action of syncytiotrophoblast cells on M ϕ proliferation. This data is in line with a previous study showing that IL10 inhibits M ϕ proliferation and that this anti-proliferative signal was not associated with enhanced apoptosis. [33] Of note, based on the fact that Stat3 is the primary mediator of IL10 effects, the authors also demonstrated that suppression of M ϕ proliferation is a Stat3-dependent event while M ϕ deactivation could be mediated via a Stat3-independent pathway. [33]

The finding that monocytes and M ϕ s are poorly motile in the presence of IFN γ is in accordance with previous studies showing that IFN γ stimulation is associated with a lower chemotactic responsiveness and motility in human monocytes/M ϕ s via a selective and rapid inhibition of CCR2 expression. [53] For instance, CCR2 is the receptor for CCL2, a chemotactic chemokine essential for the trafficking and recruitment of

monocytes/M ϕ s to the decidua. [8, 69] The inhibition of CCR2 expression by pro-inflammatory agents such as IFN γ has been proposed to serve as a way of retaining M ϕ s at sites of inflammation and may also act as a negative feedback loop for monocyte recruitment from the blood. [70]. However, because the number of uterine M ϕ s remains relatively constant throughout gestation, circulating blood monocytes are expected to be continuously recruited to the decidua by both stromal and trophoblast cells in response to diverse chemotactic factors. [8, 69] Moreover, M ϕ s are expected to be motile within both the decidua and the fetal membranes as they express higher levels of genes that promote activation of migration. [71] One of these genes is the one coding for the nuclear repressor protein glucocorticoid receptor DNA binding factor-1 (GRLF1) that antagonizes the inhibitory effect of TGF β 1 on monocyte migration. [72] In this context, our results suggest that trophoblast cells could favour movement of monocyte and M ϕ s by a similar mechanism antagonizing the potential blocking effects of IFN γ on monocyte/M ϕ motility.

In summary, we demonstrate that trophoblast-derived factors, such as IL10, can induce the differentiation of M ϕ s into a trophoblast-supporting phenotype by controlling M ϕ migration/motility and the magnitude of M ϕ -mediated immune responses induced by pro-inflammatory cytokines, particularly IFN γ and TNF α . Overall, our study support the general concept proposing that immune modulating molecules expressed by trophoblast cells are key players in the regulation of M ϕ inflammatory activity and in the promotion of regulatory/suppressive phenotype in M ϕ s. [14]

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.R.-M. A.D, RD, and JH-M. were supported by the RQR-CREATE scholarships program. JG holds a postdoctoral fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec

(FRSQ). The authors wish to acknowledge Nahla Mrad and Rodrigo Flores Soto for technical assistance in cell signaling and cell motility studies, and Dr Monique Cadrin and Dr Céline Van Themsche for critical reading of this manuscript.

REFERENCES

1. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 209-12.
2. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 23-35.
3. Cohen HB, Mosser DM. Extrinsic and intrinsic control of macrophage inflammatory responses. *J Leuk Biol* 2013.
4. Mosser DM, Zhang X. Activation of murine macrophages. *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan ... [et al.] 2008; Chapter 14: Unit 14 2.
5. Yang Z, Kong B, Mosser DM, Zhang X. TLRs, macrophages, and NK cells: our understandings of their functions in uterus and ovary. *International immunopharmacology* 2011; 11: 1442-50.
6. Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J Pathol* 2008; 214: 161-78.
7. Nagamatsu T, Schust DJ. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *American journal of reproductive immunology* 2010; 63: 460-71.
8. Renaud SJ, Graham CH. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunological investigations* 2008; 37: 535-64.
9. Gustafsson C, Mjosberg J, Matussek A, Geffers R, Matthiesen L, Berg G *et al.* Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype. *PLoS One* 2008; 3: e2078.
10. Svensson J, Jenmalm MC, Matussek A, Geffers R, Berg G, Ernerudh J. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J Immunol* 2011; 187: 3671-82.

11. Heikkinen J, Mottonen M, Komi J, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *ClinExpImmunol* 2003; 131: 498-505.
12. Wu ZM, Yang H, Li M, Yeh CC, Schatz F, Lockwood CJ *et al*. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts. *Placenta* 2012; 33: 188-94.
13. Granot I, Gnainsky Y, Dekel N. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. *Reproduction* 2012; 144: 661-8.
14. Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011; 1221: 80-7.
15. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 749-95.
16. Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biology of reproduction* 2009; 80: 848-59.
17. Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittrucker HW, Levy GA. Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]. *Journal of immunology* 1998; 160: 545-9.
18. Gendron RL, Nestel FP, Lapp WS, Baines MG. Lipopolysaccharide-induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumour necrosis factor-alpha. *Journal of reproduction and fertility* 1990; 90: 395-402.
19. Murphy SP, Fast LD, Hanna NN, Sharma S. Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. *Journal of immunology* 2005; 175: 4084-90.
20. Murphy SP, Hanna NN, Fast LD, Shaw SK, Berg G, Padbury JF *et al*. Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery. *American journal of obstetrics and gynecology* 2009; 200: 308 e1-9.
21. Haddad EK, Duclos AJ, Lapp WS, Baines MG. Early embryo loss is associated with the prior expression of macrophage activation markers in the decidua. *Journal of immunology* 1997; 158: 4886-92.

22. Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, Visintin I, Alvero A, Chen R *et al.* Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *American journal of reproductive immunology* 2007; 57: 55-66.
23. Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 2005.
24. Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, Nayak N *et al.* Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. *Biol Reprod* 2007; 76: 102-17.
25. Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction* 2005; 130: 131-45.
26. Weber MA, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Quesniaux V, Poli V, Stewart CL *et al.* Endogenous leukemia-inhibitory factor attenuates endotoxin response. *Lab Invest* 2005; 85: 276-84.
27. Aisemberg J, Vercelli CA, Bariani MV, Billi SC, Wolfson ML, Franchi AM. 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: e56161.
28. Szony BJ, Bata-Csorgo Z, Bartfai G, Kemeny L, Dobozy A, Kovacs L. Interleukin-10 receptors are expressed by basement membrane anchored, alpha(6) integrin(+) cytotrophoblast cells in early human placenta. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 1059-65.
29. Thaxton JE, Sharma S. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *American journal of reproductive immunology* 2010; 63: 482-91.
30. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1041-8.
31. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1994; 153: 811-6.
32. Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N. The Th2 cytokine environment of the placenta. *International archives of allergy and immunology* 2000; 123: 107-19.

33. O'Farrell AM, Liu Y, Moore KW, Mui AL. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *The EMBO journal* 1998; 17: 1006-18.
34. Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP *et al.* Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* 1999; 93: 1456-63.
35. Sharkey AM, King A, Clark DE, Burrows TD, Jokhi PP, Charnock-Jones DS *et al.* Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod* 1999; 60: 355-64.
36. Dufresne M, Dumas G, Asselin E, Carrier C, Pouliot M, Reyes-Moreno C. Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells. *Mol Immunol* 2011; 48: 1556-67.
37. Dumas G, Dufresne M, Asselin E, Girouard J, Carrier C, Reyes-Moreno C. CD40 pathway activation reveals dual function for macrophages in human endometrial cancer cell survival and invasion. *Cancer immunology, immunotherapy* 2012; 62: 273-283.
38. Leduc K, Bourassa V, Asselin E, Leclerc P, Lafond J, Reyes-Moreno C. Leukemia inhibitory factor regulates differentiation of trophoblast like BeWo cells through the activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP kinase-signaling pathways. *Biology of reproduction* 2012; 86: 54.
39. Lanoix D, Beghdadi H, Lafond J, Vaillancourt C. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *Journal of pineal research* 2008; 45: 50-60.
40. Lanoix D, Vaillancourt C. Cell culture media formulation and supplementation affect villous trophoblast HCG release. *Placenta* 2010; 31: 558-9.
41. Le Bellego F, Vaillancourt C, Lafond J. Isolation and culture of term human cytotrophoblast cells and *in vitro* methods for studying human cytotrophoblast cells' calcium uptake. *Methods in molecular biology* 2009; 550: 73-87.
42. Orendi K, Gauster M, Moser G, Meiri H, Huppertz B. The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction* 2010; 140: 759-66.

43. Liu F, Soares MJ, Audus KL. Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo. *The American journal of physiology* 1997; 273: C1596-604.
44. Wice B, Menton D, Geuze H, Schwartz AL. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Exp Cell Res* 1990; 186: 306-16.
45. Bennett WA, Lagoo-Deenadayalan S, Brackin MN, Hale E, Cowan BD. Cytokine expression by models of human trophoblast as assessed by a semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction technique. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36: 285-294.
46. Bennett WA, Lagoo-Deenadayalan S, Whitworth NS, Brackin MN, Hale E, Cowan BD. Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance. *Early Pregnancy* 1997; 3: 190-198.
47. Zhao M, Zhang R, Xu X, Liu Y, Zhang H, Zhai X *et al.* IL-10 reduces levels of apoptosis in *Toxoplasma gondii*-infected trophoblasts. *PloS ONE* 2013; 8: e56455.
48. Ansa-Addo EA, Lange S, Stratton D, Antwi-Baffour S, Cestari I, Ramirez MI *et al.* Human Plasma Membrane-Derived Vesicles Halt Proliferation and Induce Differentiation of THP-1 Acute Monocytic Leukemia Cells. *The Journal of Immunology* 2010; 185: 5236-5246.
49. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991; 47: 22-31.
50. Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 2012; 221: 2-11.
51. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 2010; 5: 0008668.
52. Menon MB, Ronkina N, Schwermann J, Kotlyarov A, Gaestel M. Fluorescence-based quantitative scratch wound healing assay demonstrating the role of MAPKAPK-2/3 in fibroblast migration. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009; 66: 1041-7.
53. Penton-Rol G, Polentarutti N, Luini W, Borsatti A, Mancinelli R, Sica A *et al.* Selective Inhibition of Expression of the Chemokine Receptor CCR2 in Human Monocytes by IFN- γ . *The Journal of Immunology* 1998; 160: 3869-3873.

54. Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. 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: 259-70.
55. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 2002; 44: 143-61.
56. Bode JG, Ehltling C, Haussinger D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal* 2012; 24: 1185-94.
57. Tamai R, Sugawara S, Takeuchi O, Akira S, Takada H. Synergistic effects of lipopolysaccharide and interferon-gamma in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression. *J Endotoxin Res* 2003; 9: 145-53.
58. Friebe A, Douglas AJ, Solano E, Blois SM, Hagen E, Klapp BF *et al.* Neutralization of LPS or blockage of TLR4 signaling prevents stress-triggered fetal loss in murine pregnancy. *J Mol Med (Berl)* 2011; 89: 689-99.
59. Reyes-Moreno C, Girouard J, Lapointe R, Darveau A, Mourad W. CD40/CD40 Homodimers Are Required for CD40-induced Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Expression of B7.2 by Human B Lymphocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 7799-806.
60. Reyes-Moreno C, Sharif-Askari E, Girouard J, Leveille C, Jundi M, Akoum A *et al.* Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *J Biol Chem* 2007; 282: 19473-80.
61. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-52.
62. Lee SJ, Qin H, Benveniste EN. Simvastatin inhibits IFN-gamma-induced CD40 gene expression by suppressing STAT-1alpha. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 436-47.
63. Sayama S, Nagamatsu T, Schust DJ, Itaoka N, Ichikawa M, Kawana K *et al.* Human decidual macrophages suppress IFN-gamma production by T cells through costimulatory B7-H1:PD-1 signaling in early pregnancy. *J Reprod Immunol* 2013, 100: 109-117.

64. Co EC, Gormley M, Kapidzic M, Rosen DB, Scott MA, Stolp HA *et al.* Maternal decidual macrophages inhibit NK cell killing of invasive cytotrophoblasts during human pregnancy. *Biol Reprod* 2013; 88: 155.
65. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-64.
66. Hu Y, Hu X, Boumsell L, Ivashkiv LB. IFN- γ and STAT1 Arrest Monocyte Migration and Modulate RAC/CDC42 Pathways. *The Journal of Immunology* 2008; 180: 8057-8065.
67. Chen CW, Chang YH, Tsi CJ, Lin WW. Inhibition of IFN-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase induction by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2, involves inhibition of the upstream Janus kinase/STAT1 signaling pathway. *Journal of immunology* 2003; 171: 979-88.
68. Takaki H, Minoda Y, Koga K, Takaesu G, Yoshimura A, Kobayashi T. TGF-beta1 suppresses IFN-gamma-induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation. *Genes Cells* 2006; 11: 871-82.
69. Renaud SJ, Sullivan R, Graham CH. Tumour necrosis factor alpha stimulates the production of monocyte chemoattractants by extravillous trophoblast cells via differential activation of MAPK pathways. *Placenta* 2009; 30: 313-9.
70. Hu X, Park-Min KH, Ho HH, Ivashkiv LB. IFN-gamma-primed macrophages exhibit increased CCR2-dependent migration and altered IFN-gamma responses mediated by Stat1. *Journal of immunology* 2005; 175: 3637-47.
71. Oliveira LJ, McClellan S, Hansen PJ. Differentiation of the endometrial macrophage during pregnancy in the cow. *PLoS One* 2010; 5: e13213.
72. Kim JS, Kim JG, Moon MY, Jeon CY, Won HY, Kim HJ *et al.* Transforming growth factor-beta1 regulates macrophage migration via RhoA. *Blood* 2006; 108: 1821-9.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1, Dallagi et al., 2014

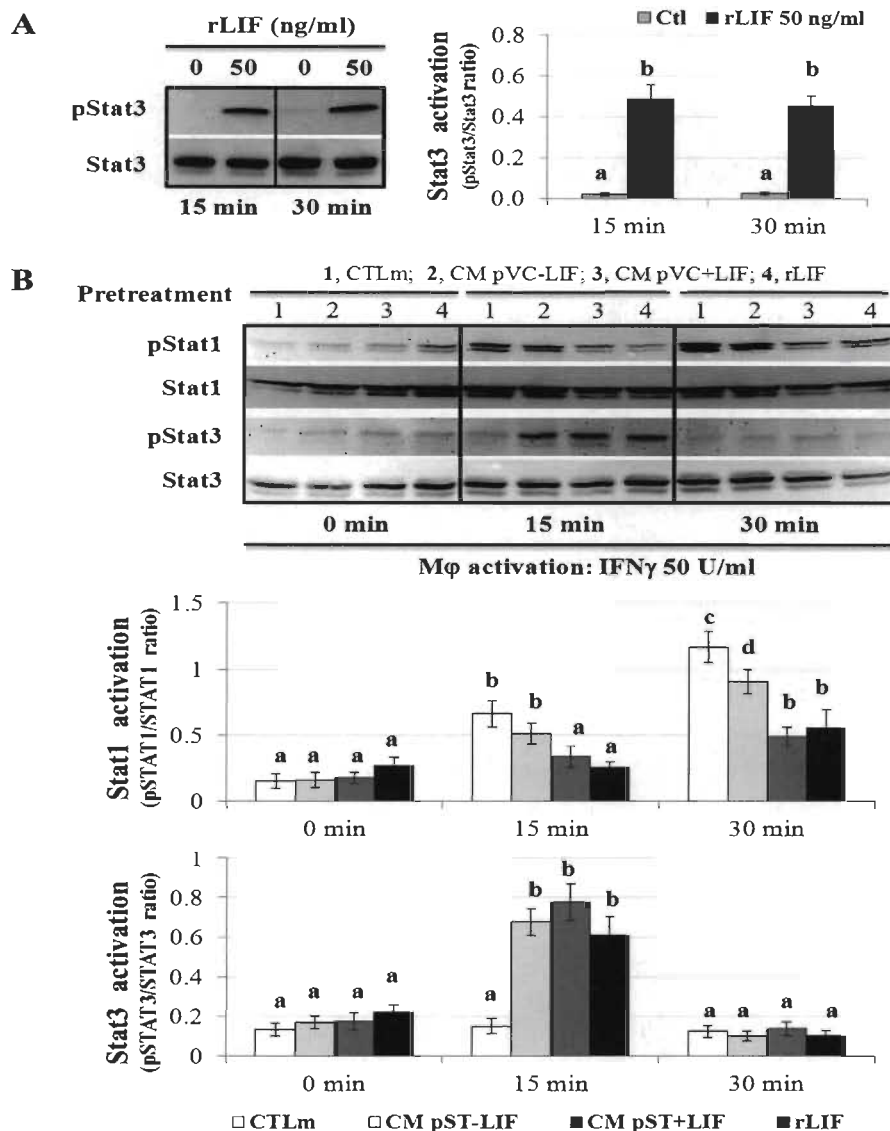


Figure 1. (A) Representative images and graphical analysis showing the immunodetection of phosphorylated Stat3 in primary cultures of villous cytotrophoblast (vCT) stimulated with 50 recombinant human LIF (rLIF) for 15 min and 30 min. (B) Representative images and graphical analysis showing the immunodetection of phosphorylated Stat1 and Stat3 in M ϕ s pretreated for 24 h with either CTLm, CM vCT-LIF, CM vCT+LIF, or rLIF, and then activated with 50 U/ml IFN γ for 0 min, 15 min, and 30 min. (A and B) The ratio of phosphorylated/no phosphorylated proteins was calculated from densitometric analysis of each sample to evaluate the relative activation of pStat1 or pSTAT3. Different superscripts denote significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Figure 2, Dallagi et al., 2014

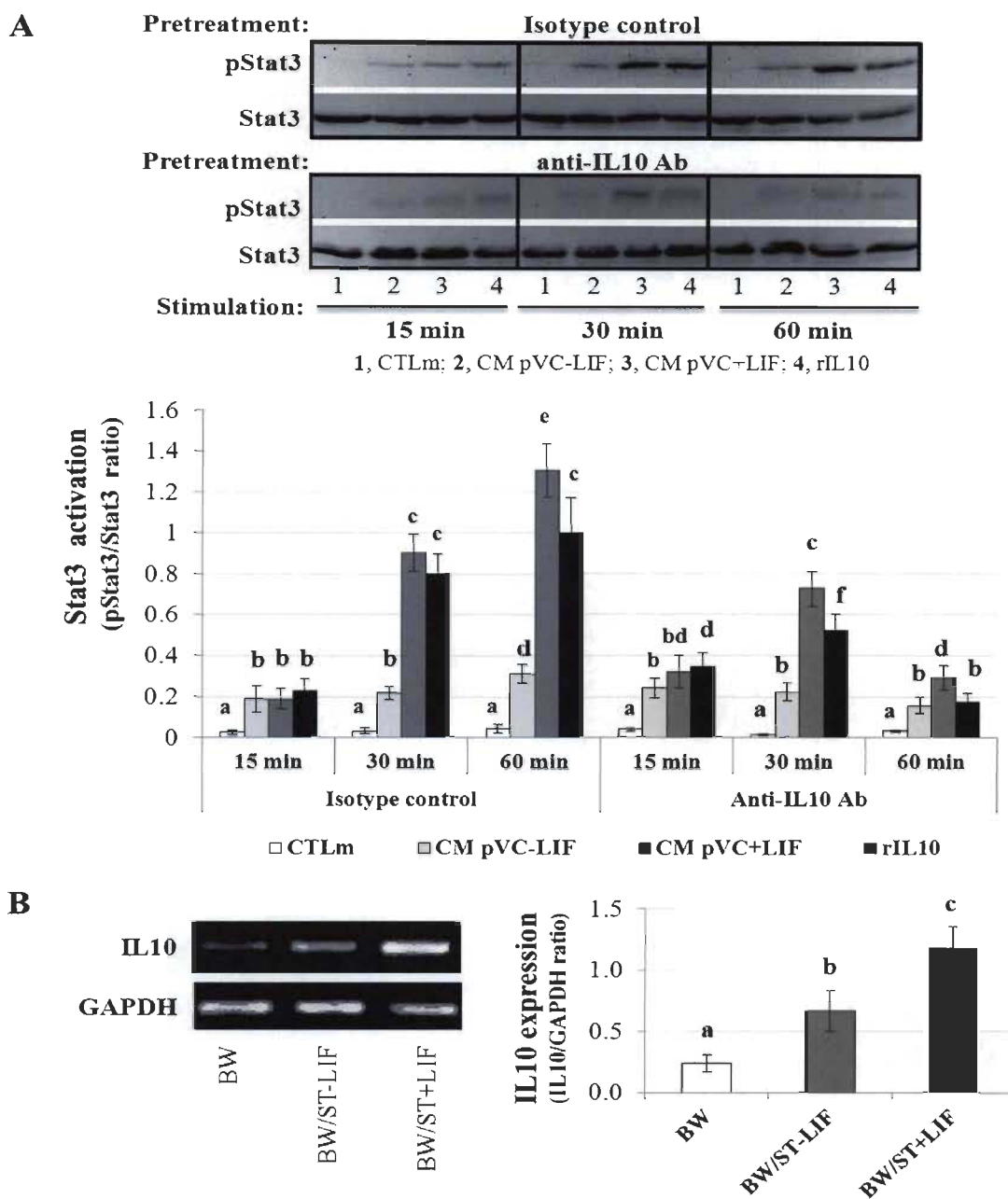


Figure 2. (A) Representative images and graphical analysis showing the immunodetection of phosphorylated Stat3 in Mφs pretreated for 15 min, 30 min, and 60 min with either CTLm, CM vCT-LIF, CM vCT+LIF, or recombinant human IL10 (rIL10) in the presence of isotype control and anti-IL10 antibodies (Ab). The ratio of phosphorylated/no phosphorylated proteins was calculated from densitometric analysis of each sample to evaluate the relative activation of pStat1 or pStat3. (B) Representative images and graphical analysis showing the transcription level of IL10 mRNA in resting (BW) and differentiated BW/ST cells (\pm LIF) as assessed by RT-PCR. Different superscripts denote significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Figure 3, Dallagi et al., 2014

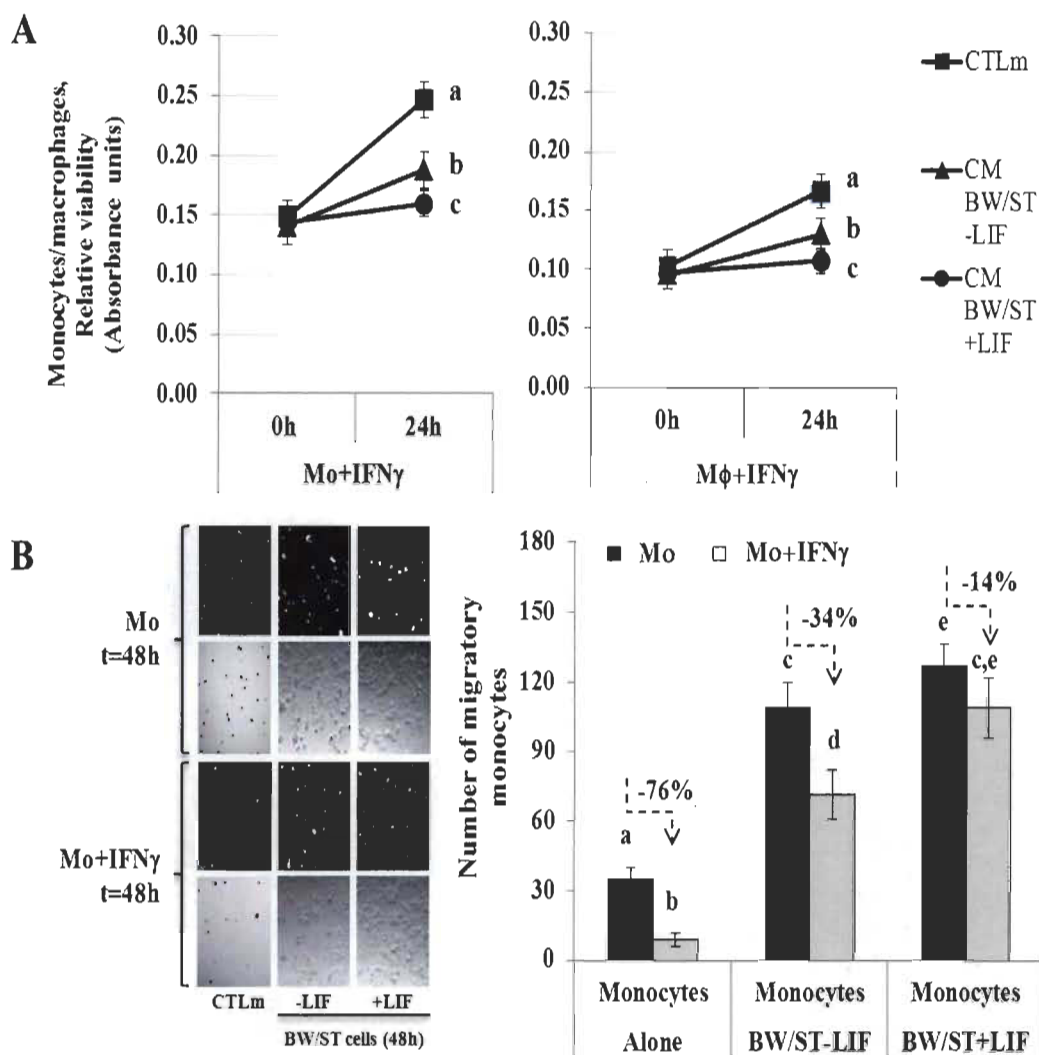


Figure 3. (A) Transwell migratory assays were performed in a modified Boyden chamber with membrane inserts. Monocytes stimulated without (Mo) or with 50 U/ml IFN γ (Mo+IFN γ) were seeded into the upper well of the chamber, while previously differentiated BW/ST cells (\pm LIF) were seeded into the lower well. Monocytes that migrated down to the lower well in response to trophoblast-derived chemotactic factors were visualized by fluorescence microscopy at t=0 h and t=48 h. GFP-expressing monocytes in the lower well were counted from images captured. (B) Representative images and graphical analysis showing scratch wound healing assays performed in MDM ϕ monolayers cultured in CTLm and in CM from BW/ST cells (\pm LIF). 50 U/ml IFN γ was added to induce pro-inflammatory type-1 phenotype (M ϕ +IFN γ). The images of the scratch were acquired at t=0 h and t=48 h by fluorescence microscopy. (A and B) Five fields were taken randomly for each different treatment. All observations were performed at 5 \times magnification. Relative number of motile monocytes and M ϕ s was determined and expressed as ratio of motile cells at t=48 h/t=0 h.

Figure 3, Dallagi et al., 2014

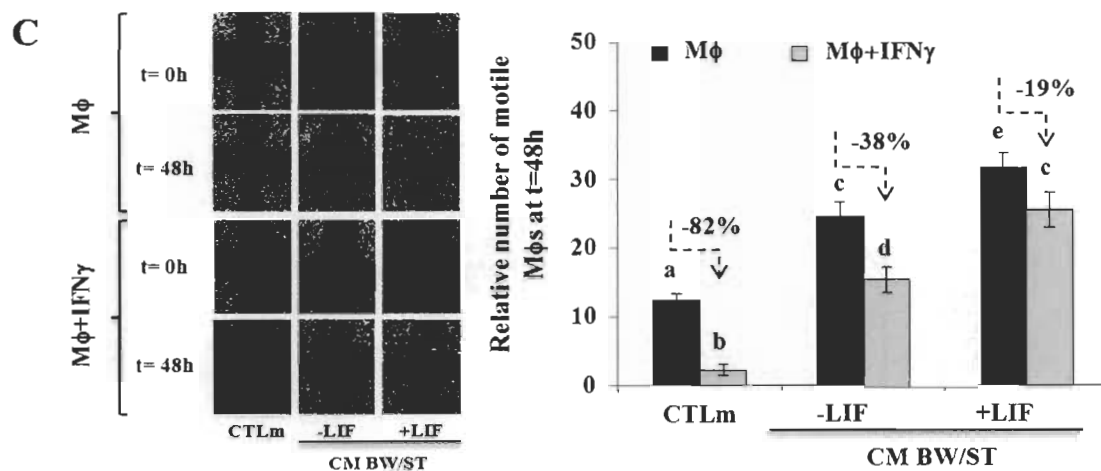


Figure 3. (C) The effect of soluble factors from BW/ST cells in cell proliferation of activated monocyte/Mφs was assessed by MTT assays. IFN γ -activated monocytes (M ϕ +IFN γ) and Mφs (Mφ+IFN γ) were cultured for 48 h with either CTLm, CM BW/ST-LIF, or CM BW/ST+LIF. Different superscripts denote significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Figure 4, Dallagi et al., 2014

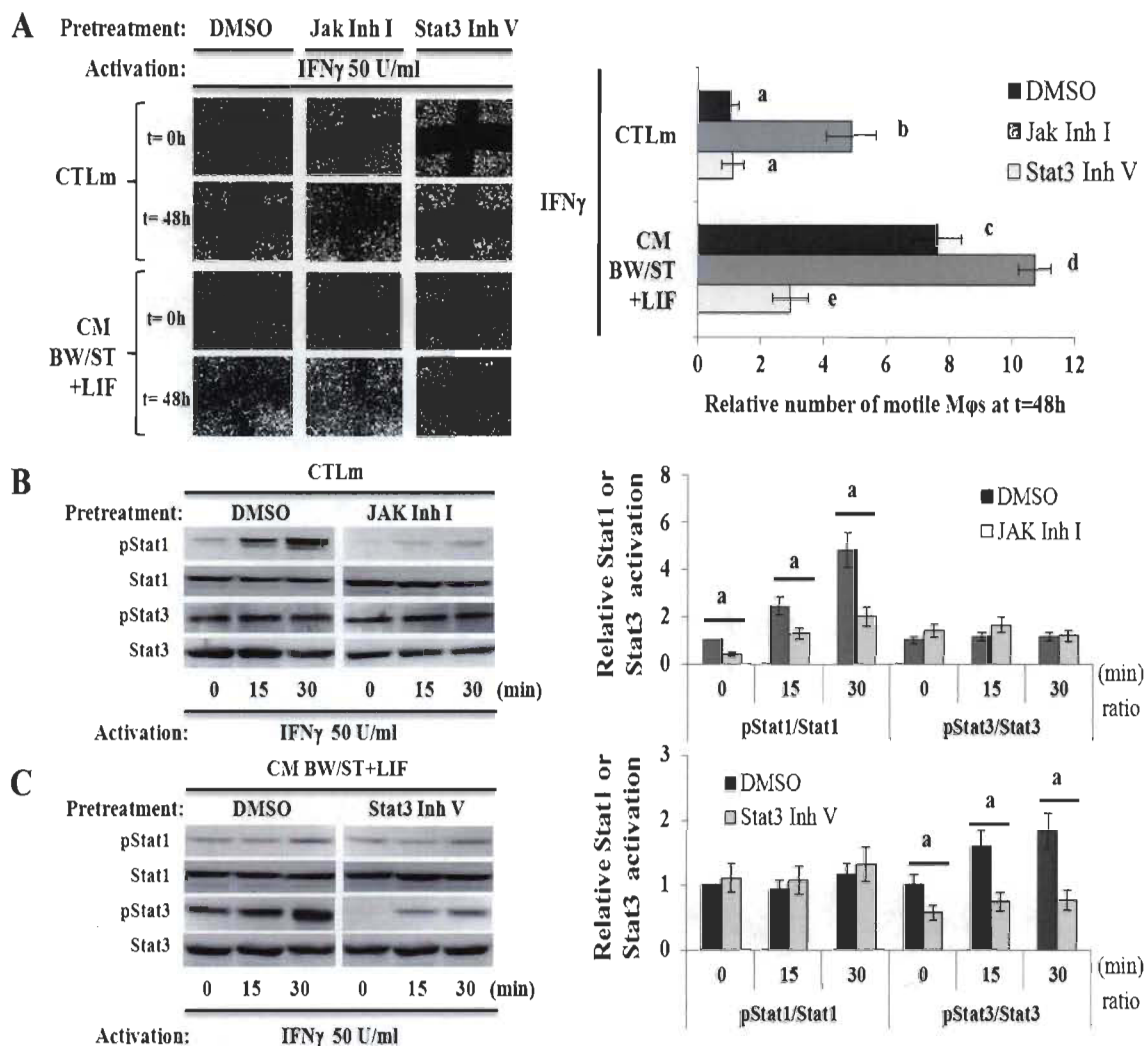


Figure 4. (A) M ϕ s were separately preconditioned for 24 h with CTLm and CM BW/ST+LIF, and then pretreated for 30 min with either 0.1% DMSO, 10 μ M JAK Inh I, or 5 μ M Stat3 Inh V before activation with 50 U/ml IFN γ . Motility of M ϕ s were evaluated by *in vitro* scratch assay and visualized by fluorescence microscope at t=0 h and t=48 h. Five fields were taken randomly for each different treatment. All observations were performed at 5 \times magnification. Results are presented as mean \pm SD from three independent experiments. Different superscripts denote significant differences between treatments ($p < 0.05$). (B) and (C) M ϕ s were preconditioned for 24 h with CTLm or CM BW/ST+LIF, and then pretreated with 0.1% DMSO, 10 μ M JakInh I, or 5 μ M Stat3 Inh V, and then incubated with 0 and 50 U/ml IFN γ for the indicated times. The activated status of Stat1 and Stat3 was assessed by immunoblotting studies. The superscript (a) denotes significant differences between DMSO and inhibitor treatments ($p < 0.05$).

Figure 5, Dallagi et al., 2014

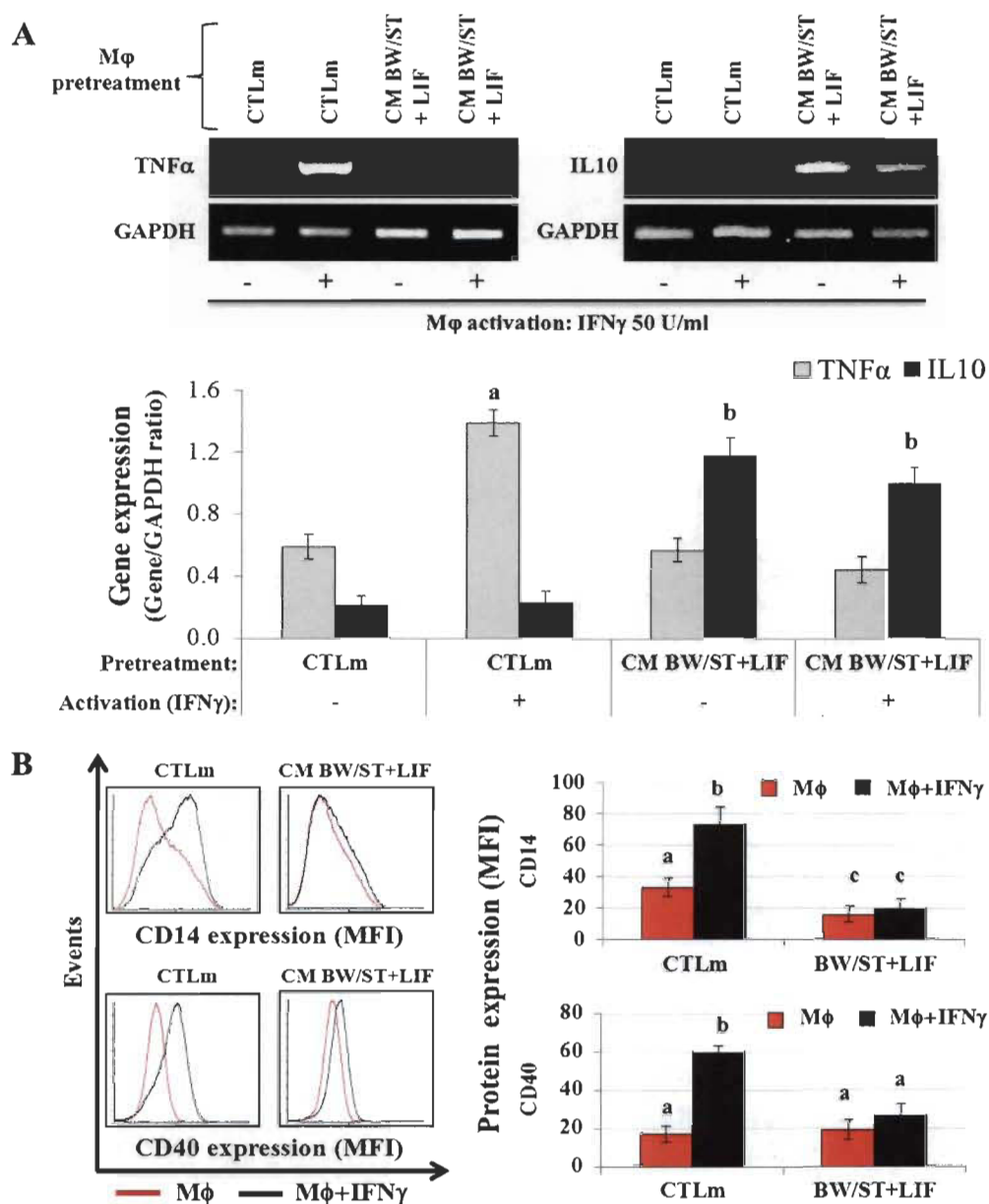


Figure 5. Representative images and graphical analysis showing the expression level of TNF α and IL10 (A) and CD14 and CD40 (B) in resting and IFN γ -activated M ϕ s pretreated with CTLm and CM BW/ST+LIF. M ϕ s were pre-incubated with CTLm and CM for 24 h and then activated for 16 h with 50 U/ml IFN γ in order to evaluate mRNA and protein expression by RT-PCR and flow cytometry, respectively. (A) The superscript "a" denotes significant difference for TNF α mRNA expression between CTLm-IFN γ and CTLm+IFN γ ($p < 0.05$). The superscript "b" denotes significant difference for IL10 mRNA expression between CM BW/ST+LIF and CTLm ($p < 0.05$). (B) Different superscripts denote significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Figure 6, Dallagi et al., 2014

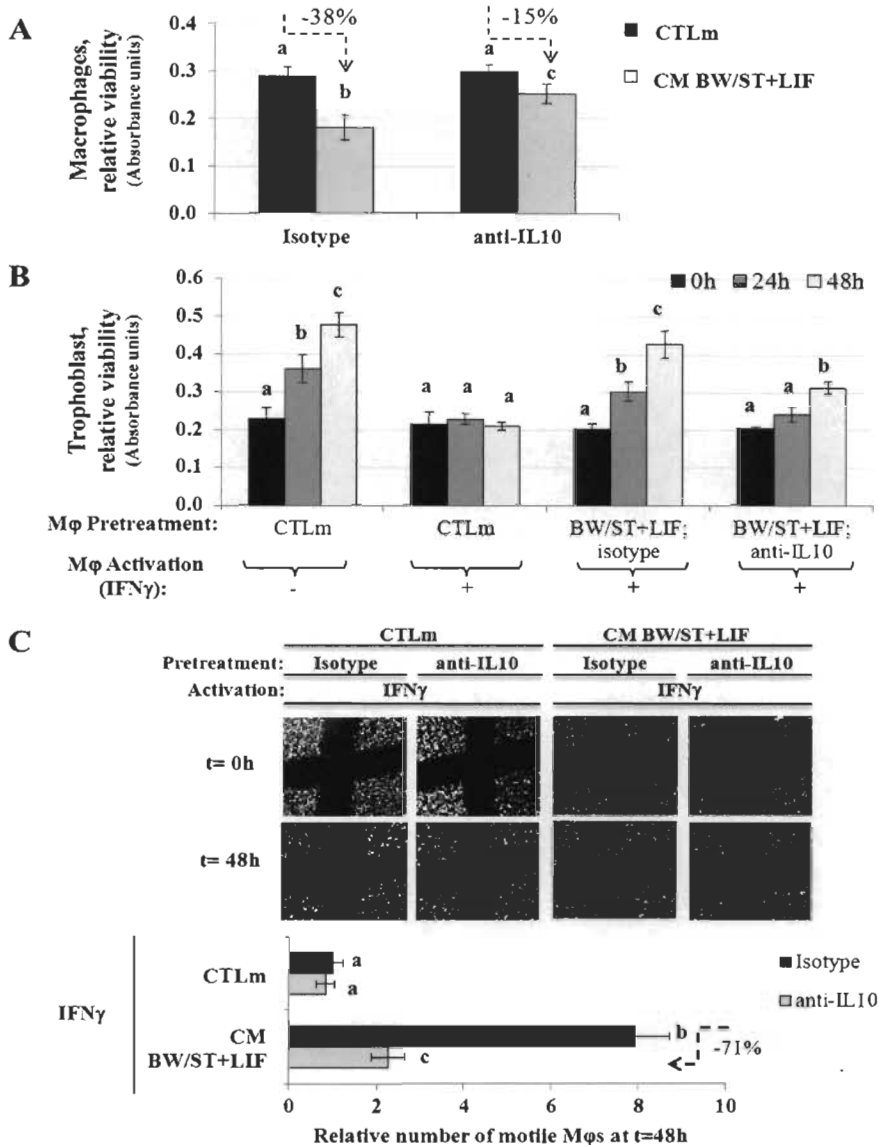


Figure 6. Representative images and graphical analysis showing the involvement of LIF-differentiated BW/ST cells and trophoblast-derived IL10 in the regulation of M ϕ proliferation (A), cytotoxicity (B), and motility (C). (A) MTT assays were performed to determine the cell survival/proliferation of IFN γ -activated M ϕ s incubated for 48 h with CTLm and CM BW/ST+LIF in the presence of isotype control and anti-IL10 antibodies. (B) MTT assays were performed to assess the cell survival/proliferation of undifferentiated BeWo cells incubated with CM from IFN γ -activated M ϕ s pretreated for 24 h with CTLm and CM BW/ST+LIF in the presence of isotype control and anti-IL10 antibodies. (C) Scratch wound healing assays were performed to evaluate the cell motility of IFN γ -activated M ϕ s incubated for 24 h with CTLm and CM BW/ST+LIF in the presence of isotype control and anti-IL10 antibodies. Cell motility was visualized by fluorescence microscope at t=0 h and t=48 h. Different superscripts denote significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Figure 7, Dallagi et al., 2014

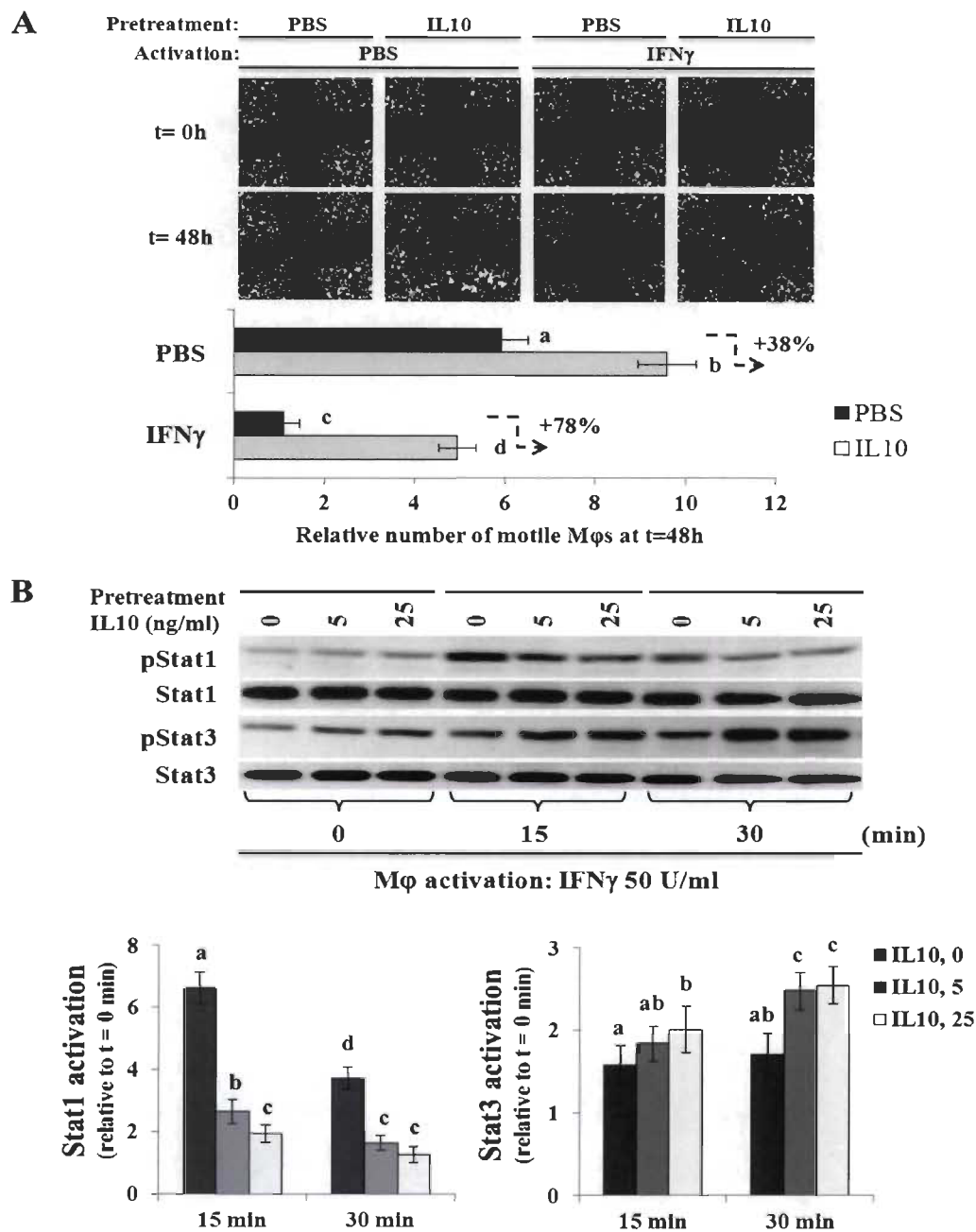
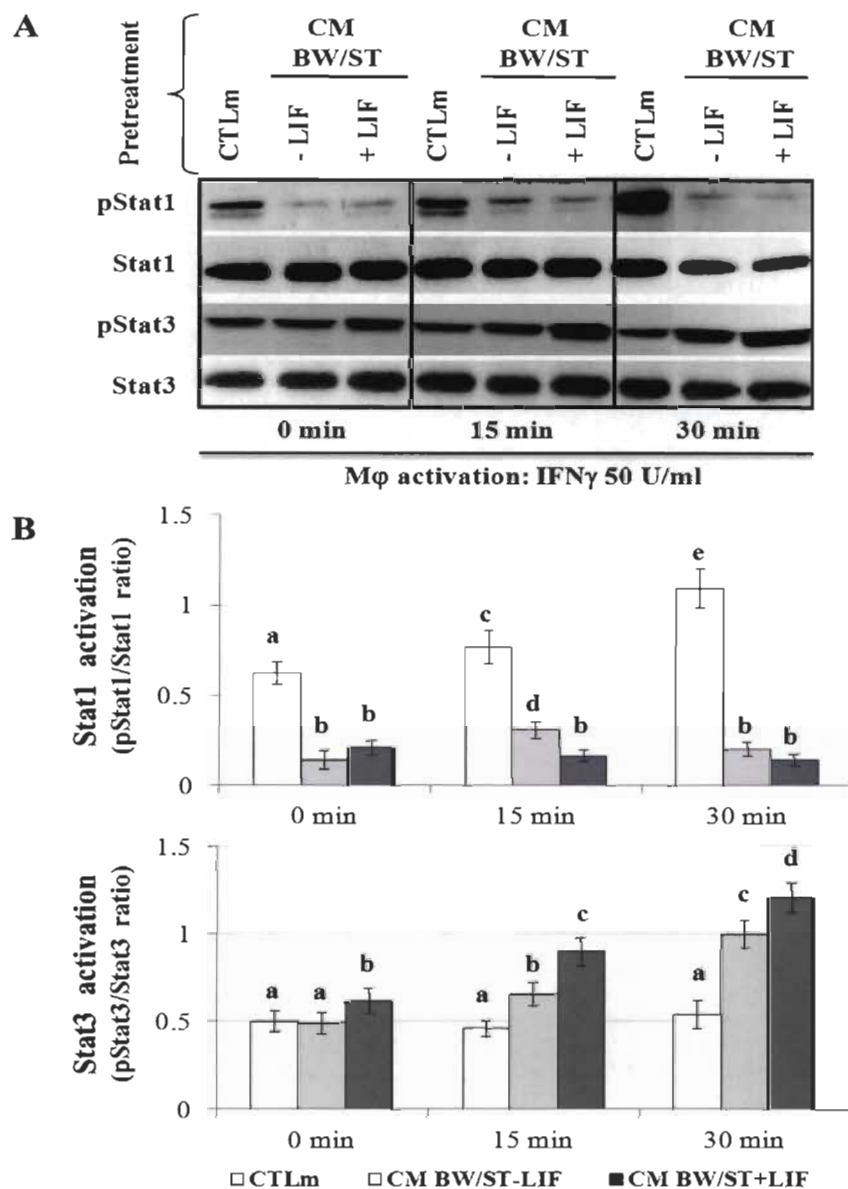


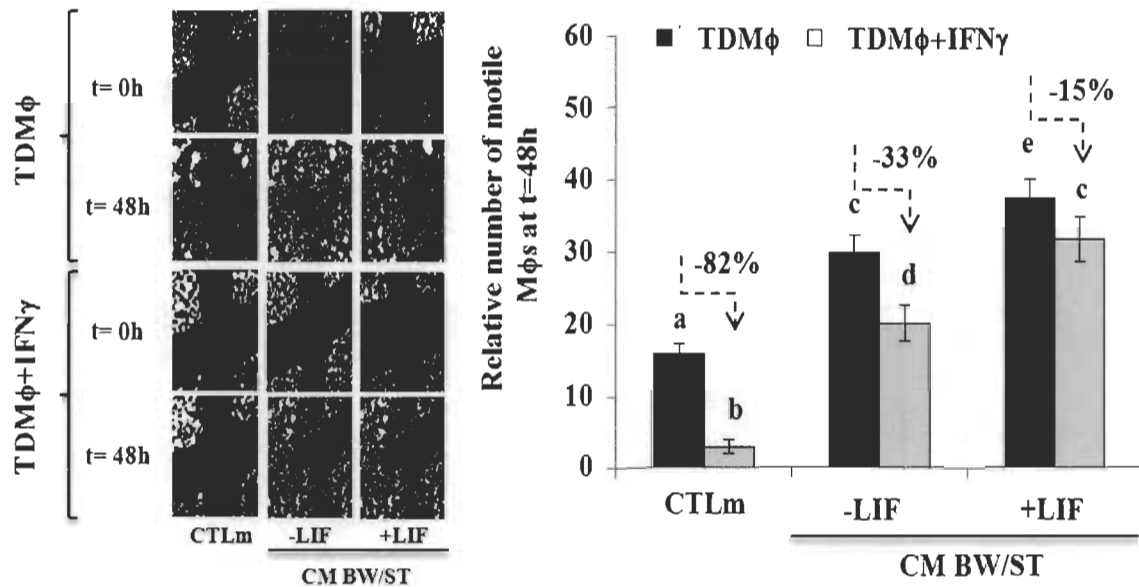
Figure 7. (A) Representative images and graphical analysis of scratch wound healing assays showing involvement of IL10 in the regulation of cell motility in resting and IFN γ -activated M ϕ s. The images of the scratch were acquired at t=0 h and t=48 h by fluorescence microscopy. (B) Representative images showing the activated status of Stat1 and Stat3. M ϕ s were pretreated for 3 h with 5 ng/ml and 25 ng/ml IL10, and then activated with 50 U/ml IFN γ for 0 min, 15 min, or 30 min. Different superscripts denote significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Supplemental figure 1, Dallagi et al., 2014



Supplemental Figure 1. (A) Representative images showing the immune detection of phosphorylated Stat1 and Stat3 in M ϕ s pretreated for 24 h with CTLm and CM BW/ST \pm LIF, and then activated with 50 U/ml IFN γ for 0 min, 15 min, or 30 min. (B) Graphical analysis showing the ratio of phosphorylated/no phosphorylated proteins, calculated from densitometric analysis of each sample, to evaluate the relative activation of pStat1 or pStat3. Different superscripts denote significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Supplemental figure 2, Dallagi et al., 2014



Supplemental Figure 2. Representative images and graphical analysis showing scratch wound healing assays performed in GFP-expressing TDM ϕ monolayers cultured in CTLm and in CM from BW/ST cells. 50 U/ml IFN γ was added to induce pro-inflammatory type-1 phenotype (M ϕ +IFN γ). 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. Relative number of motile monocytes and M ϕ s was determined and expressed as ratio of motile cells at t=48 h/t=0 h. Different superscripts denote significant differences between treatments ($p < 0.05$).

CHAPITRE III

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nous avons depuis longtemps constaté que chez l'espèce humaine, un nombre notable de femmes présentent en premier trimestre de grossesse des avortements spontanés inexplicables appelés communément « fausse couche » [223]. Ces pertes embryonnaires précoces étant sans cause infectieuse, mécanique ou hormonale évidente, plusieurs études cliniques ont signalé une forte association entre cette complication gynécologique et une irrégularité au niveau de la réponse immunitaire innée locale, notamment un déséquilibre déciduel de polarisation M1/M2 chez les Mφs utérins [87, 224].

Il est certain qu'un environnement inflammatoire créé par un afflux approprié de cellules immunitaires innées dans l'endomètre est reconnu comme une condition essentielle préalable à une implantation réussie et donc le succès de la grossesse [225]. Cependant, plusieurs études confirment que l'infiltration leucocytaire trop élevée et si elle est en plus accompagnée d'une activation inappropriée peut constituer une cause inhérente de complications de début de grossesse, notamment la perte précoce d'embryon [226, 227].

Dans le cas normal, les Mφs utérins se trouvent intimement proches des cellules trophoblastiques [24, 59] et sont d'une importance vitale puisqu'ils sont impliqués dans plusieurs processus gestationnels de début de grossesse tels l'implantation et le développement placentaire [170] : leur déplétion entraîne inévitablement l'arrêt de la gestation [10]. Les monocytes sanguins en circulation sont caractérisés par l'expression de CD14, cependant, une fois qu'ils migrent vers un tissu et se différencient en macrophages, ils perdent généralement son expression. Mais ce n'est toutefois pas le cas des Mφs utérins qui maintiennent son expression [179]. Ces Mφs CD14⁺ utérins forment

la population leucocytaire la plus importante au sein de l'utérus gestant humain et murin. Donc, comme les trophoblastes du premier trimestre sont à proximité des Mφs CD14⁺, une interaction paracrine adéquate assurera le développement normal du placenta ainsi que la protection du fœtus contre les infections. Cependant, les fonctions inflammatoires et l'activité de cellules présentatrices d'antigènes que les Mφs CD40⁺ possèdent [228] sont susceptibles de nuire à l'embryon en développement s'ils sont suractivés, notamment en réponse aux cytokines pro-inflammatoires. Alors, si non contrôlés, les Mφs CD14⁺ CD40⁺ entraînent des effets délétères à l'égard de l'embryon et dans les cas les plus sévères, comme mentionné ci-haut, ils contribuent à l'étiologie des pertes non expliquées du produit de conception en premier trimestre de grossesse qui découleraient d'une répartition et une activation aberrante de ces mêmes cellules dans l'utérus gestant [226, 229]. Chez le modèle murin, plusieurs études ont démontré que sur le site d'implantation une transition brusque vers la polarisation pro-inflammatoire M1 induite par l'ancrage du LPS au complexe CD14-TLR4 augmente significativement le taux d'avortements chez le modèle de souris CBA/J × DBA/2 [230].

Les données récentes sur les mécanismes d'immunotolérance du fœtus soulignent la position centrale du trophoblaste et démontrent clairement qu'il participerait activement à installer un microenvironnement immunitaire actif tout à la fois protecteur, mais tolérant, garantissant la croissance et la survie embryonnaire [50, 166]. Particulièrement, le trophoblaste protège l'embryon en cas d'attaque immunitaire maternelle (cas des infections intra-utérines) en émettant des signaux moléculaires qui modulent la manière dont les macrophages vont se comporter en présence de signaux potentiellement dangereux [9]. L'équipe de Gill Mor a déjà démontré que les cellules du trophoblaste secrètent constitutivement une panoplie de facteurs de croissance, chimiokines et cytokines comme IL-8, IL-6, GRO α et TGF β [167]. De cette façon, elles réguleraient la migration, la différenciation et les fonctions des cellules immunitaires utérines au cours de la gestation. Récemment cette équipe a émis la théorie que le trophoblaste utilise une stratégie de reprogrammation fonctionnelle en trois phases pour conférer aux Mφs utérins le phénotype unique exigé pour le succès de la grossesse [50]. Le recrutement constitue la première étape et le

trophoblaste émet alors des signaux pour recruter les cellules immunitaires vers le site d'implantation. Sur ce point nos résultats viennent confirmer ce fait en plus de démontrer que les cellules du syncytiotrophoblaste secrètent des facteurs solubles capables de restaurer le potentiel chimiotactique et la motilité des M ϕ s préalablement immobilisés par l'IFN γ . Selon la deuxième étape, soit l'éducation, le trophoblaste influence alors la différenciation des cellules immunitaires. Suivant le même fil conducteur, nos résultats sont en accord avec ce concept et ajoutent que le syncytium est aussi capable de limiter l'amplitude de la réaction pro-inflammatoire des M ϕ s en réponse à l'IFN γ . Finalement l'étape trois, soit la réponse, les cellules immunes éduquées par le trophoblaste exhibent un phénotype unique coopératif avec la formation et les fonctions placentaires. Dans ce contexte, après exposition des M ϕ s activés par l'IFN γ aux facteurs dérivés des cellules du syncytiotrophoblaste (différenciées sans ou avec LIF), nos résultats démontrent bel et bien que les M ϕ s prétraités par les milieux conditionnés ont une amplitude de réponse pro-inflammatoire significativement atténuée par rapport aux M ϕ s non prétraités; et cette réponse était plus évidente avec les facteurs des cellules du syncytiotrophoblaste différenciées avec LIF. Ce changement au niveau de leur profil cytokinique se manifeste par une diminution significative de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires CD14, CD40 et TNF α , et une augmentation de l'expression d'IL-10. Alors cet effet amplificateur de LIF sur l'action des syncytiotrophoblastes vient consolider son influence positive déjà décrite sur les cellules embryonnaires [148, 155] et donc attribuer potentiellement un rôle au récepteur de LIF au niveau des syncytiotrophoblastes encore méconnu.

Comme la différenciation des M ϕ s est fondamentalement très influencée par les signaux moléculaires diffusés de leur microenvironnement local [231], il n'est pas exclu que ces M ϕ s soient sous le contrôle des cellules trophoblastiques environnantes. Cependant, le manque de connaissances relatives aux détails du dialogue entre trophoblastes et M ϕ s rend difficile la prévention des complications de grossesse précoce qui résulterait d'un défaut de communication paracrine.

Le projet proposé dans ce mémoire visait ainsi à mieux comprendre l'effet biologique des cellules du syncytiotrophoblaste différenciées avec et sans LIF face à une hyper-activation du M ϕ activé *in vitro* par la cytokine pro-inflammatoire IFN γ , l'objectif sous-jacent étant aussi de décrire le mécanisme moléculaire par lequel les trophoblastes modulent la différenciation macrophagique. La portée fondamentale d'une telle étude était d'approfondir les connaissances sur les interactions fonctionnelles entre les cellules embryonnaires et les M ϕ s utérins maternels en période péri-implantatoire. Ultimement, une meilleure description de l'action du trophoblaste sur le comportement du M ϕ pro-inflammatoire en début de grossesse pourrait permettre de proposer des avenues thérapeutiques potentielles. Dans ce contexte, nos résultats confirment que les cellules trophoblastiques multinucléées sont très compétentes dans le processus de désactivation du M ϕ pro-inflammatoire de type-1. Nous avons démontré clairement que les facteurs solubles des cellules du syncytiotrophoblaste induisaient une réduction significative de la prolifération, de l'expression de médiateurs inflammatoires ainsi que la cytotoxicité des M ϕ s activés par l'IFN γ . Les facteurs solubles des cellules du syncytiotrophoblaste génèrent donc une population unique de M ϕ s activés par l'IFN γ , mais avec un phénotype distinct beaucoup moins agressif pour l'embryon.

Étant donné que les M ϕ s sont hautement cytotoxiques quand ils sont activés dans des tissus autres que l'utérus, cela veut dire que les facteurs produits sur le site de l'implantation sont critiques pour maintenir un phénotype supporteur de la grossesse. Un de ces facteurs impliqués dans la promotion de la grossesse est l'IL-10 [124]. Cette cytokine est connue comme un important suppresseur de l'immunité maternelle active [102], participant ainsi au mécanisme par lequel le fœtus évite le rejet maternel. Les niveaux d'expression d'IL-10 augmentent remarquablement chez la femme en début de grossesse et restent élevés jusqu'au début du travail [44]. En plus, dans certains cas d'avortements spontanés inexplicables, il a été constaté qu'il y avait des concentrations très faibles de cette cytokine [102] supposant qu'elle contrôle le début du travail possiblement en maintenant une balance entre une inflammation excessive et la promotion d'un début de grossesse normale. Il est connu que les M ϕ s présents dans la décidue bénéficient des instructions envoyées par le trophoblaste, qui les attire, les

éduque, les active et parfois les neutralise et les reprogramme pour contribuer au développement harmonieux du placenta et de l'embryon [50]. Il est bien établi que le trophoblaste extra-villeux est intrinsèquement pauvre en IL-10 comparativement au syncytiotrophoblaste [124], ce qui indique que le syncytium pourrait effectivement contribuer localement pour contrer les effets délétères des cytokines pro-inflammatoires durant la grossesse précoce. Dans ce contexte, notre étude a clairement démontré que l'IL-10 dérivée des cellules du syncytiotrophoblaste est impliquée dans le processus de désactivation des M ϕ s pro-inflammatoires. Conformément à nos résultats, nos études précédentes ont démontré que l'IL-10 exogène et l'IL-10 produite par les M ϕ s régulateurs de type-2 inhibent l'activité cytotoxique des M ϕ s-1 [192], probablement en bloquant la production endogène de TNF α , le médiateur tumoricide et microbicide le plus important produit par les M ϕ s activés par l'IFN γ [192].

Par ailleurs, même si l'IFN γ a été décrit comme un important facteur gestationnel ayant entre autres un rôle essentiel dans le remodelage des artères spiralées [232], cette cytokine pro-inflammatoire montre, en plus des effets bénéfiques, des effets délétères sur le site de l'implantation. Ces effets seraient associés entre autres à l'induction de l'expression des molécules impliquées dans la présentation des antigènes paternels, telles que les CMH classe I et classe II, par les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages) amplifiant ainsi les fonctions effectrices de celles-ci vis-à-vis des allo-antigènes fœtaux. D'autre part, en cas d'infection ou d'activation inopinée du récepteur de reconnaissance du LPS bactérien (TLR4), l'IFN γ agit en synergie avec ce complexe LPS-TLR4 pour activer optimalement les M ϕ s et donc les rendre cytotoxiques vis-à-vis du trophoblaste.

Au niveau moléculaire, l'IFN γ active la transcription des gènes portant la séquence d'activation correspondante dans leurs promoteurs principalement à travers le facteur de transcription Stat1 [119]. Une fois Stat1 phosphorylé par Jak1 et Jak2, il est homodimerisé et subit une translocation vers le noyau où il active la transcription de plusieurs gènes pro-inflammatoires [81]. Comme notre étude l'indique, la signalisation de l'IFN γ chez les M ϕ s requiert l'activation de Stat1, et nous avons démontré que les

facteurs dérivés des cellules du syncytiotrophoblaste, tels que l'IL-10, possèdent la capacité de soutenir l'activation de Stat3 mais inversement répriment celle de Stat1 en réponse à une stimulation par l'IFN γ . Nos résultats suggèrent alors fortement que cette action inverse sur Stat1 et Stat3 est le mécanisme moléculaire par lequel l'IL-10 pourrait antagoniser les effets de l'IFN γ sur les diverses fonctions des M ϕ s pro-inflammatoires, notamment leur motilité, leur toxicité et leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes. Conformément à notre hypothèse, des études antérieures ont démontré que la voie JAK-Stat1 et les produits de gènes qu'elle induit sont à l'origine des effets inhibiteurs de IFN γ sur la migration des M ϕ s, et que cet effet d'inhibition est complètement abrogé chez les M ϕ s Stat1 déficients [233]. Chez les M ϕ s, il est connu que l'IL-10 est capable d'inhiber directement l'expression de gènes induits par l'IFN γ en supprimant la phosphorylation de Stat1 [191]. De façon similaire à l'IL-10, d'autres cytokines immunosuppressives et facteurs de croissance tels TGF β 1 et les ligands PPAR γ sont également connus pour promouvoir la désactivation des M ϕ s via la suppression de la phosphorylation et donc de l'activation de Stat1 induite par l'IFN γ [234, 235].

Chez la souris en début de gestation, une infection bactérienne peut induire une stimulation non contrôlée des récepteurs TLRs et provoquer de graves conséquences telles un avortement précoce par excès de production des cytokines inflammatoires d'origine macrophagique comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α . Bien que le TNF α soit impliqué dans la croissance du blastocyste et son implantation [236], ainsi que dans la croissance et la fonction placentaire [237], un excès de sa production s'avère néfaste à la survie du trophoblaste et de l'embryon [238, 239]. Toder *et al.* ont démontré que le TNF α est impliqué dans les pathologies embryonnaires en activant l'apoptose [240] et une autre étude révèle que TNF α augmente les taux d'avortements spontanés chez la souris [241]. En d'autres mots, dans certaines conditions il pourrait augmenter les signaux de mort pour éliminer l'embryon si les dommages qu'il présente sont trop importants. Nos résultats démontrent alors clairement que les facteurs solubles des cellules du syncytiotrophoblaste réussissent à réduire significativement les niveaux d'expression de TNF α chez les M ϕ s activés par l'IFN γ , suggérant ainsi que ce tissu

péri-embryonnaire est très efficace dans la réduction des mécanismes cytotoxiques des Mφs pro-inflammatoires induits par l'IFN γ .

Le récepteur CD40 est une protéine transmembranaire de type 1 membre de la superfamille du récepteur au TNF[242]. Exprimé de façon constitutive chez les Mφs, il entraîne une réponse à prédominance pro-inflammatoire, une augmentation de la capacité de présentation des antigènes [243, 244] et une sécrétion accrue de TNF α en présence d'IFN γ [244]. En fait, l'IFN γ est le plus puissant inducteur de l'expression de CD40 chez les Mφs [213] et comme nous l'avons établi précédemment, cette induction est associée à un renforcement de la fonction cytotoxique qui déclenche une destruction efficace des cellules tumorales via les Mφs[94]. Ainsi, comme nous l'avons suggéré pour TNF α , la répression de l'expression de CD40 chez les Mφs par les cellules du syncytiotrophoblaste pourrait être considérée comme un mécanisme conduisant à la réduction des fonctions cytotoxiques et co-stimulatrices chez le macrophage activé par l'IFN γ .

Le CD14 présent à la surface des Mφs fait partie d'un complexe de récepteur apparenté incluant le TLR4 et le MDF-2 [99]. Les Mφs détectent les bactéries gram-négatives à la suite d'une liaison de leur endotoxine structurale membranaire, le LPS, au complexe CD14-TLR4 [93]. En réponse à cet initiateur microbien d'inflammation, il est connu que les Mφs activés par l'IFN γ augmentent nettement leur production de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires [245]. Sachant que des études récentes ont démontré que le LPS pourrait fournir le « signal de danger » via lequel le stress induit par l'IFN γ déclenche l'activation du système immunitaire de la mère et donc possiblement provoquer la perte embryonnaire [246], l'avantage physiologique de la baisse d'expression de CD14 par les cellules du syncytiotrophoblaste serait de limiter la réactivité des Mφs aux stimulants inflammatoires néfastes pour la grossesse [91].

Un bon nombre d'études récentes suggèrent qu'en grossesse précoce, les Mφs utérins humains pourraient exhiber une activité régulatrice ou immuno-suppressive et

contribuer ainsi au développement d'une réponse immunitaire maternelle appropriée vis-à-vis du fœtus. Par exemple, les Mφs utérins produisent spontanément de hauts niveaux d'IL-10 [68, 179]. Cette population de Mφ exprime le CD14 et le HLA-DR, mais des niveaux moins élevés des molécules co-stimulatrices CD40 et CD86 par rapport aux monocytes sanguins périphériques prélevés à partir de femmes enceintes et non enceintes [180]. En outre, les Mφs utérins sont non différenciables en cellules dendritiques sous l'influence d'IL-4 et de GM-CSF [180]. Sayama *et al.* (2013) ont récemment démontré que les Mφs utérins sont capables de supprimer la production de TNFα chez les lymphocytes T. Cela se produit par l'intermédiaire de B7-H1, un ligand de costimulation de la famille B7, qui module négativement l'activité des cellules T, une fois lié à son récepteur correspondant PD-1 [247]. Similairement, Fisher *et al.* (2013) ont proposé que les Mφs utérins puissent également protéger les cellules fœtales (cellules trophoblastiques) contre les activités apoptotiques des cellules NKs utérines productrices d'IFNγ, via un mécanisme TGFβ1-dépendant [215].

En plus de son effet sur la motilité des Mφs, nous avons également démontré que l'IL-10 est le médiateur potentiel de l'action inhibitrice des cellules du syncytiotrophoblaste sur la prolifération des Mφs. Ces données concordent avec une étude précédente montrant que l'IL-10 inhibe la prolifération des Mφs et que cette action anti-proliférative n'était pas associée à une augmentation de l'apoptose [248]. En se basant sur le fait que Stat3 est le principal médiateur des effets d'IL-10, les auteurs ont également montré que l'inhibition de la prolifération est un événement Stat3-dépendant tandis que la désactivation peut être médiée par une voie indépendante de STAT3 [248].

Notre constatation que les monocytes et les Mφs sont immobiles en présence d'IFNγ est en accord avec des études précédentes montrant qu'une stimulation par l'IFNγ est associée à une plus faible motilité et réponse chimiotactique chez les monocytes/Mφs humains via une inhibition sélective et rapide de l'expression du récepteur CCR2 [249]. CCR2 est le récepteur de CCL2, une cytokine chimiotactique essentielle pour le trafic et le recrutement des monocytes/Mφs [250] vers la décidue. En fait, l'inhibition de

l'expression de CCR2 par des agents pro-inflammatoires comme l'IFN γ a été proposée comme un moyen pour retenir les M ϕ s sur le site de l'inflammation, et peut également agir comme une boucle de rétrocontrôle négatif pour le recrutement des monocytes du sang [251]. Toutefois, étant donné que le nombre de M ϕ s utérins reste relativement constant tout au long de la gestation, les monocytes sanguins devraient être constamment recrutés vers la décidue par les cellules stromales et trophoblastiques en réponse à divers facteurs chimiotactiques [91, 252]. De même, les M ϕ s devraient être motiles entre la décidue et les membranes fœtales puisque ces derniers expriment des niveaux plus élevés de gènes qui favorisent l'activation de la migration [221]. L'un de ces gènes est celui codant pour le récepteur GRLF1, un antagoniste de l'effet inhibiteur de TGF β 1 sur la migration des monocytes [222]. Dans ce contexte, nos résultats suggèrent que les cellules trophoblastiques favorisent le mouvement des monocytes et M ϕ s par un mécanisme similaire qui antagonise l'effet bloquant de l'IFN γ sur la motilité des monocytes/M ϕ s.

Petty *et al.* (2006) ont démontré que le trophoblaste module les fonctions des neutrophiles et que ce fait est considéré comme un moyen de protection du trophoblaste extra-villeux contre les effets délétères du système immunitaire inné [253]. Sur le même principe, nos études suggèrent alors un nouveau mécanisme par lequel les cellules syncytiotrophoblastiques modulerait les M ϕ s pro-inflammatoires en cas d'une hyperactivation induite par l'IFN γ , puisqu'une altération dans l'interaction trophoblaste-M ϕ s peut contribuer à la pathogenèse de certaines complications de la grossesse. L'extrapolation de ces résultats au niveau de l'utérus gestant suscite l'idée que ce changement induit par le syncytium au niveau du phénotype des M ϕ s induit par l'IFN γ peut être considéré comme un mécanisme d'adaptation pour protéger l'embryon d'une imminente destruction par les M ϕ s de type M1 en présence d'une infection intra-utérine.

En résumé, la présente étude est la première à démontrer une association entre LIF, les syncytiotrophoblastes et l'IL-10 dans l'atténuation du phénotype pro-inflammatoire cytotoxique des M ϕ s. Au niveau moléculaire, cette étude démontre d'une

part que les facteurs dérivés du trophoblaste ont une action inhibitrice sur Stat1 et inversement, activatrice de Stat3. Cette action se traduit par la réduction de l'expression de $TNF\alpha$, de CD14 et de CD40 et le déblocage du potentiel chimiotactique et migratoire des monocytes/macrophages activés par l' $IFN\gamma$. D'autre part, nous avons démontré que l'IL10 dérivé de cellules du syncytiotrophoblaste est un médiateur essentiel de ces actions et constitue le mécanisme antagoniste des effets néfastes de l' $IFN\gamma$ ainsi que nous avons pu déceler un rôle du récepteur de LIF au niveau du trophoblaste encore flou, soit celui de fortifier et amplifier cette contribution locale du trophoblaste. Donc, les cellules du syncytiotrophoblaste sont capables d'influencer la différenciation des M ϕ s afin de les reprogrammer et induire un phénotype coopératif et supporteur du trophoblaste en contrôlant l'amplitude de leurs réponses immunitaires induites par des cytokines pro-inflammatoires, en particulier le $TNF\alpha$ et l' $IFN\gamma$.

Dans l'ensemble, notre étude soutient le concept général proposant que les molécules immunomodulatrices exprimées par les cellules du trophoblaste constituent des acteurs clés dans la régulation de l'activité inflammatoire des M ϕ s en induisant la différenciation des monocytes/M ϕ s en cellules dotées d'un phénotype régulateur ou suppresseur et donc coopératif avec l'embryon en développement.

Il est maintenant clair que le trophoblaste est un important modulateur immunitaire qui contrôle la magnitude de la réponse inflammatoire des M ϕ s locaux en cas d'hyperactivation. Ils ne sont donc pas supprimés, mais au contraire fonctionnels, mais finement contrôlés. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de ce dialogue entre trophoblastes et M ϕ s et surtout leur intégration dans un schéma global devrait permettre de situer les anomalies rencontrées dans certaines pathologies gravidiques de la gestation. L'avancement dans la compréhension des aspects de cette interaction est pertinent dans le but d'éviter une possible perte embryonnaire précoce et la prise de décisions liées au traitement et à la prévention des effets abortifs des infections.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Beucher, G., G. Benoist, and M. Dreyfus, [*Management of the first trimester miscarriages*]. *Gynecol Obstet Fertil*, 2009. **37**(3): p. 257-64.
2. Winikoff, D. and M. Malinek, *The predictive value of thyroid "test profile" in habitual abortion*. *Br J Obstet Gynaecol*, 1975. **82**(9): p. 760-6.
3. Hill, J.A., et al., *Evidence of embryo- and trophoblast-toxic cellular immune response(s) in women with recurrent spontaneous abortion*. *Am J Obstet Gynecol*, 1992. **166**(4): p. 1044-52.
4. Portnoi, M.F., et al., *Karyotypes of 1142 couples with recurrent abortion*. *Obstet Gynecol*, 1988. **72**(1): p. 31-4.
5. Racicot, K., et al., *Understanding the complexity of the immune system during pregnancy*. *Am J Reprod Immunol*, 2014. **72**(2): p. 107-16.
6. Straszewski-Chavez, S.L., et al., *AKT controls human first trimester trophoblast cell sensitivity to FAS-mediated apoptosis by regulating XIAP expression*. *Biol Reprod*, 2010. **82**(1): p. 146-52.
7. Renaud, S.J., et al., *Spontaneous pregnancy loss mediated by abnormal maternal inflammation in rats is linked to deficient uteroplacental perfusion*. *J Immunol*, 2011. **186**(3): p. 1799-808.
8. Ozer, E., et al., *Intrauterine fetal loss associated with Candida glabrata chorioamnionitis: report of two cases*. *Turk Patoloji Derg*, 2013. **29**(1): p. 77-9.
9. Mor, G. and I. Cardenas, *The immune system in pregnancy: a unique complexity*. *Am J Reprod Immunol*, 2010. **63**(6): p. 425-33.
10. Care, A.S., et al., *Macrophages regulate corpus luteum development during embryo implantation in mice*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(8): p. 3472-87.
11. Perrier D'hauterive, S., et al., [*The implantation window*]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 2002. **31**(5): p. 440-55.
12. Paria, B.C., H. Song, and S.K. Dey, *Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue*. *Int J Dev Biol*, 2001. **45**(3): p. 597-605.

13. Shuya, L.L., *et al.*, *Leukemia inhibitory factor enhances endometrial stromal cell decidualization in humans and mice*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25288.
14. Dunn, C.L., R.W. Kelly, and H.O. Critchley, *Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation*. Reprod Biomed Online, 2003. **7**(2): p. 151-61.
15. Evain-Brion, D., *[The 2 differentiation pathways of the human trophoblast]*. Gynecol Obstet Fertil, 2001. **29**(7-8): p. 497-502.
16. Knofler, M., *et al.*, *Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin beta gene during villous trophoblast differentiation*. Endocrinology, 2004. **145**(4): p. 1685-94.
17. Robbins, J.R., *et al.*, *Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of Listeria monocytogenes*. PLoS Pathog, 2010. **6**(1): p. e1000732
18. Malassine, A. and L. Cronier, *Hormones and human trophoblast differentiation: a review*. Endocrine, 2002. **19**(1): p. 3-11.
19. Fitzgerald, J.S., *et al.*, *Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(4): p. 335-44.
20. Le Bouteiller, P. and J. Tabiasco, *[Immunology of pregnancy: renewed interest]*. Med Sci (Paris), 2006. **22**(8-9): p. 745-50.
21. Norwitz, E.R., D.J. Schust, and S.J. Fisher, *Implantation and the survival of early pregnancy*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1400-8.
22. Hunt, J.S. and S.A. Robertson, *Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success*. J Reprod Immunol, 1996. **32**(1): p. 1-25.
23. Murphy, S.P., *et al.*, *Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 4084-90.
24. Mor, G. and V.M. Abrahams, *Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 119.
25. Lessin, D.L., *et al.*, *Antigen expression by cells near the maternal-fetal interface*. Am J Reprod Immunol Microbiol, 1988. **16**(1): p. 1-7.

26. Manaster, I. and O. Mandelboim, *The unique properties of uterine NK cells*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 434-44.
27. Moffett-King, A., *Natural killer cells and pregnancy*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 656-63.
28. Bulmer, J.N. and G.E. Lash, *Human uterine natural killer cells: a reappraisal*. Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 511-21.
29. Khong, T.Y., *Immunohistologic study of the leukocytic infiltrate in maternal uterine tissues in normal and preeclamptic pregnancies at term*. Am J Reprod Immunol Microbiol, 1987. **15**(1): p. 1-8.
30. Guerin, L.R., J.R. Prins, and S.A. Robertson, *Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment?* Hum Reprod Update, 2009. **15**(5): p. 517-35.
31. Leber, A., A. Teles, and A.C. Zenclussen, *Regulatory T cells and their role in pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 445-59.
32. Barrientos, G., *et al.*, *The impact of dendritic cells on angiogenic responses at the fetal-maternal interface*. J Reprod Immunol, 2009. **83**(1-2): p. 85-94.
33. 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.
34. Knofler, M., *Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(2-3): p. 269-80.
35. Engert, S., *et al.*, *Profiling chemokines, cytokines and growth factors in human early pregnancy decidua by protein array*. Am J Reprod Immunol, 2007. **58**(2): p. 129-37.
36. Mor, G. and K. Koga, *Macrophages and pregnancy*. Reprod Sci, 2008. **15**(5): p. 435-6.
37. Jasper, M.J., *et al.*, *Macrophage-derived LIF and IL1B regulate alpha(1,2) fucosyltransferase 2 (Fut2) expression in mouse uterine epithelial cells during early pregnancy*. Biol Reprod, 2011. **84**(1): p. 179-88.
38. Koga, K. and G. Mor, *Expression and function of toll-like receptors at the maternal-fetal interface*. Reprod Sci, 2008. **15**(3): p. 231-42.

39. Yoshinaga, K., *Review of factors essential for blastocyst implantation for their modulating effects on the maternal immune system*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(2): p. 161-9.
40. Blois, S.M., *et al.*, *Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy*. Biol Reprod, 2004. **70**(4): p. 1018-23.
41. Ruszczak, Z. and R.A. Schwartz, *Modern aspects of wound healing: An update*. Dermatol Surg, 2000. **26**(3): p. 219-29.
42. Granot, I., Y. Gnainsky, and N. Dekel, *Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome*. Reproduction, 2012. **144**(6): p. 661-8.
43. Wegmann, T.G., *et al.*, *Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?* Immunol Today, 1993. **14**(7): p. 353-6.
44. Hanna, N., *et al.*, *Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5721-8.
45. Bennett, W.A., *et al.*, *Cytokine expression by first-trimester human chorionic villi*. Am J Reprod Immunol, 1998. **40**(5): p. 309-18.
46. Dekel, N., *et al.*, *Inflammation and implantation*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(1): p. 17-21.
47. 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.
48. Burke, S.D., *et al.*, *Uterine NK cells, spiral artery modification and the regulation of blood pressure during mouse pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 472-81.
49. Cartwright, J.E., *et al.*, *Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders*. Reproduction, 2010. **140**(6): p. 803-13.
50. 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.

51. Mills, C.D., *M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease*. Crit Rev Immunol, 2012. **32**(6): p. 463-88.
52. Romagnani, S., *T-cell subsets (Th1 versus Th2)*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **85**(1): p. 9-18; quiz 18, 21.
53. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
54. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
55. Hutchinson, J.A., et al., *Human regulatory macrophages*. Methods Mol Biol, 2011. **677**: p. 181-92.
56. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
57. Hamilton, S., et al., *Macrophages infiltrate the human and rat decidua during term and preterm labor: evidence that decidual inflammation precedes labor*. Biol Reprod, 2012. **86**(2): p. 39.
58. Hunt, J.S., *Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells*. J Reprod Immunol, 1989. **16**(1): p. 1-17.
59. Abrahams, V.M., et al., *Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2004. **51**(4): p. 275-82.
60. Miller, L. and J.S. Hunt, *Sex steroid hormones and macrophage function*. Life Sci, 1996. **59**(1): p. 1-14.
61. Nagamatsu, T. and D.J. Schust, *The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 460-71.
62. Hanada, T., et al., *Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer*. Int J Urol, 2000. **7**(7): p. 263-9.
63. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7303-11.

64. Povsic, T.J., *et al.*, *Lower levels of circulating progenitor cells are associated with low physical function and performance in elderly men with impaired glucose tolerance: a pilot substudy from the VA Enhanced Fitness trial.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013. **68**(12): p. 1559-66.
65. Zhang, X. and D.M. Mosser, *Macrophage activation by endogenous danger signals.* J Pathol, 2008. **214**(2): p. 161-78.
66. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas.* J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
67. Parhar, R.S., S. Yagel, and P.K. Lala, *PGE2-mediated immunosuppression by first trimester human decidual cells blocks activation of maternal leukocytes in the decidua with potential anti-trophoblast activity.* Cell Immunol, 1989. **120**(1): p. 61-74.
68. Gustafsson, C., *et al.*, *Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype.* PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2078.
69. Savill, J. and V. Fadok, *Corpse clearance defines the meaning of cell death.* Nature, 2000. **407**(6805): p. 784-8.
70. Mor, G., *et al.*, *Macrophages, estrogen and the microenvironment of breast cancer.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. **67**(5-6): p. 403-11.
71. Nakamura, H., *et al.*, *Macrophages regulate expression of alpha1,2-fucosyltransferase genes in human endometrial epithelial cells.* Mol Hum Reprod, 2012. **18**(4): p. 204-15.
72. Belardelli, F., *Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response.* APMIS, 1995. **103**(3): p. 161-79.
73. Haider, S. and M. Knofler, *Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium.* Placenta, 2009. **30**(2): p. 111-23.
74. Jaattela, M., P. Kuusela, and E. Saksela, *Demonstration of tumor necrosis factor in human amniotic fluids and supernatants of placental and decidual tissues.* Lab Invest, 1988. **58**(1): p. 48-52.
75. Chen, H.L., *et al.*, *Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation.* Am J Pathol, 1991. **139**(2): p. 327-35.

76. Hunt, J.S., H.L. Chen, and L. Miller, *Tumor necrosis factors: pivotal components of pregnancy?* Biol Reprod, 1996. **54**(3): p. 554-62.
77. Marth, C., *et al.*, *Modulation of secretion of human chorionic gonadotropin by biologic response modifiers on term placenta and choriocarcinoma cells.* Mol Biother, 1989. **1**(3): p. 140-4.
78. Tato, C.M., *et al.*, *Cutting Edge: Innate production of IFN-gamma by NK cells is independent of epigenetic modification of the IFN-gamma promoter.* J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1514-7.
79. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity.* Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 251-76.
80. Greenwood, J.D., *et al.*, *Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells.* Placenta, 2000. **21**(7): p. 693-702.
81. Murphy, S.P., *et al.*, *Interferon gamma in successful pregnancies.* Biol Reprod, 2009. **80**(5): p. 848-59.
82. Ashkar, A.A. and B.A. Croy, *Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy.* Biol Reprod, 1999. **61**(2): p. 493-502.
83. Zhang, J.H., *et al.*, *Analysis of cytokine regulators inducing interferon production by mouse uterine natural killer cells.* Biol Reprod, 2003. **69**(2): p. 404-11.
84. 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.
85. Giannubilo, S.R., *et al.*, *The involvement of inflammatory cytokines in the pathogenesis of recurrent miscarriage.* Cytokine, 2012. **58**(1): p. 50-6.
86. Challis, J.R., *et al.*, *Inflammation and pregnancy.* Reprod Sci, 2009. **16**(2): p. 206-15.
87. Reister, F., *et al.*, *Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women.* Lab Invest, 2001. **81**(8): p. 1143-52.
88. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation.* J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.

89. Duclos, A.J., E.K. Haddad, and M.G. Baines, *Presence of activated macrophages in a murine model of early embryo loss*. Am J Reprod Immunol, 1995. **33**(5): p. 354-66.
90. Katabuchi, H., *et al.*, *Characterization of macrophages in the decidual atherotic spiral artery with special reference to the cytology of foam cells*. Med Electron Microsc, 2003. **36**(4): p. 253-62.
91. Renaud, S.J. and C.H. Graham, *The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy*. Immunol Invest, 2008. **37**(5): p. 535-64.
92. El-Gayar, S., *et al.*, *Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4561-8.
93. Dobrovolskaia, M.A. and S.N. Vogel, *Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS*. Microbes Infect, 2002. **4**(9): p. 903-14.
94. Dumas, G., *et al.*, *CD40 pathway activation reveals dual function for macrophages in human endometrial cancer cell survival and invasion*. Cancer Immunol Immunother, 2013. **62**(2): p. 273-83.
95. Laskin, D.L., *Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces*. Chem Res Toxicol, 2009. **22**(8): p. 1376-85.
96. Allavena, P., *et al.*, *Pathways connecting inflammation and cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 3-10.
97. Boehm, U., *et al.*, *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
98. Duclos, A.J., D.K. Pomerantz, and M.G. Baines, *Relationship between decidual leukocyte infiltration and spontaneous abortion in a murine model of early fetal resorption*. Cell Immunol, 1994. **159**(2): p. 184-93.
99. Bode, J.G., C. Ehltng, and D. Haussinger, *The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis*. Cell Signal, 2012. **24**(6): p. 1185-94.
100. Wu, C., *et al.*, *IFN-gamma primes macrophage activation by increasing phosphatase and tensin homolog via downregulation of miR-3473b*. J Immunol, 2014. **193**(6): p. 3036-44.

101. Buhtoiarov, I.N., *et al.*, *CD40 ligation activates murine macrophages via an IFN-gamma-dependent mechanism resulting in tumor cell destruction in vitro*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6013-22.
102. Plevyak, M., *et al.*, *Deficiency of decidual IL-10 in first trimester missed abortion: a lack of correlation with the decidual immune cell profile*. Am J Reprod Immunol, 2002. **47**(4): p. 242-50.
103. Casey, M.L., *et al.*, *Cytokines and infection-induced preterm labour*. Reprod Fertil Dev, 1990. **2**(5): p. 499-509.
104. Saini, V., *et al.*, *Cytokines in recurrent pregnancy loss*. Clin Chim Acta, 2011. **412**(9-10): p. 702-8.
105. Haimovici, F., J.A. Hill, and D.J. Anderson, *The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro*. Biol Reprod, 1991. **44**(1): p. 69-75.
106. Jenkins, C., *et al.*, *Evidence of a T(H) 1 type response associated with recurrent miscarriage*. Fertil Steril, 2000. **73**(6): p. 1206-8.
107. Mueller-Eckhardt, G., *et al.*, *Immunogenetic and serological investigations in nonpregnant and in pregnant women with a history of recurrent spontaneous abortions. German RSA/IVIG Study Group*. J Reprod Immunol, 1994. **27**(2): p. 95-109.
108. Shaarawy, M. and A.R. Nagui, *Enhanced expression of cytokines may play a fundamental role in the mechanisms of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1997. **76**(3): p. 205-11.
109. Azizieh, F.Y. and R.G. Raghupathy, *Tumor Necrosis Factor-alpha and Pregnancy Complications: A Prospective Study*. Med Princ Pract, 2015. **24**(2): p. 165-70.
110. 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.
111. Kwak-Kim, J.Y., A. Gilman-Sachs, and C.E. Kim, *T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures*. Chem Immunol Allergy, 2005. **88**: p. 64-79.

112. Garcia-Lloret, M.I., B. Winkler-Lowen, and L.J. Guilbert, *Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF-alpha. A model for hematogenous initiation of placental inflammations.* J Leukoc Biol, 2000. **68**(6): p. 903-8.
113. Raghupathy, R., *et al.*, *Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion.* Hum Reprod, 2000. **15**(3): p. 713-8.
114. Kwak-Kim, J., *et al.*, *Immunological modes of pregnancy loss.* Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 611-23.
115. Knackstedt, M., *et al.*, *Activation of the novel prothrombinase, fg12, as a basis for the pregnancy complications spontaneous abortion and pre-eclampsia.* Am J Reprod Immunol, 2001. **46**(3): p. 196-210.
116. Haddad, E.K., *et al.*, *Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss.* Cell Immunol, 1997. **181**(1): p. 68-75.
117. 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.
118. Haddad, E.K., *et al.*, *Early embryo loss is associated with the prior expression of macrophage activation markers in the decidua.* J Immunol, 1997. **158**(10): p. 4886-92.
119. Stark, G.R., *et al.*, *How cells respond to interferons.* Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.
120. Soeters, P.B. and R.F. Grimble, *The conditional role of inflammation in pregnancy and cancer.* Clin Nutr, 2013. **32**(3): p. 460-5.
121. Sahni, M., *et al.*, *STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2.* Development, 2001. **128**(11): p. 2119-29.
122. Raghupathy, R., *Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy.* Immunol Today, 1997. **18**(10): p. 478-82.
123. Chaouat, G., *et al.*, *The emerging role of IL-10 in pregnancy.* Am J Reprod Immunol, 1996. **35**(4): p. 325-9.

124. Thaxton, J.E. and S. Sharma, *Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 482-91.
125. Szony, 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.
126. Blanco, O., *et al.*, *Human decidual stromal cells express HLA-G: Effects of cytokines and decidualization*. Hum Reprod, 2008. **23**(1): p. 144-52.
127. Santner-Nanan, B., *et al.*, *Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 7023-30.
128. Chaouat, G., *et al.*, *IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4261-8.
129. Huizinga, T.W., *et al.*, *Interleukin-10 as an explanation for pregnancy-induced flare in systemic lupus erythematosus and remission in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 1999. **38**(6): p. 496-8.
130. Er, A., *Azithromycin prevents pregnancy loss: reducing the level of tumor necrosis factor-alpha and raising the level of interleukin-10 in rats*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 928137.
131. Hanna, N., *et al.*, *Evidence for interleukin-10-mediated inhibition of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production in preterm human placenta*. Am J Reprod Immunol, 2006. **55**(1): p. 19-27.
132. Roth, I., *et al.*, *Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 539-48.
133. Williams, L.M., *et al.*, *Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle*. Immunology, 2004. **113**(3): p. 281-92.
134. Bogdan, C. and C. Nathan, *Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **685**: p. 713-39.
135. 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.

136. de la Barrera, S., *et al.*, *IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients*. Clin Exp Immunol, 2004. **138**(1): p. 128-38.
137. Williams, L., *et al.*, *Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 567-76.
138. Murray, P.J., *STAT3-mediated anti-inflammatory signalling*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 6): p. 1028-31.
139. Striz, I., *et al.*, *Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy*. Clin Sci (Lond), 2014. **126**(9): p. 593-612.
140. Iyer, S.S. and G. Cheng, *Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease*. Crit Rev Immunol, 2012. **32**(1): p. 23-63.
141. Moore, K.W., *et al.*, *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
142. Alonzi, T., *et al.*, *Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1621-32.
143. Fioranelli, M. and R.M. Grazia, *Twenty-five years of studies and trials for the therapeutic application of IL-10 immunomodulating properties. From high doses administration to low dose medicine new paradigm*. 2014.
144. Paiva, P., *et al.*, *Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: critical regulators in the establishment of pregnancy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(4): p. 319-28.
145. Yang, Z.M., *et al.*, *Leukemia inhibitory factor, LIF receptor, and gp130 in the mouse uterus during early pregnancy*. Mol Reprod Dev, 1995. **42**(4): p. 407-14.
146. Suman, P., S.S. Malhotra, and S.K. Gupta, *LIF-STAT signaling and trophoblast biology*. JAKSTAT, 2013. **2**(4): p. e25155.
147. Novotny, Z., *et al.*, *Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women diagnosed with unexplained infertility and endometriosis have a negative impact on the IVF outcome. A pilot study*. Folia Biol (Praha), 2009. **55**(3): p. 92-7.

148. Dunglison, G.F., D.H. Barlow, and I.L. Sargent, *Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium*. Hum Reprod, 1996. **11**(1): p. 191-6.
149. Marwood, M., et al., *Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation*. Endocrinology, 2009. **150**(6): p. 2915-23.
150. 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.
151. Chaouat, G., et al., *Immuno-endocrine interactions in early pregnancy*. Hum Reprod, 1995. **10 Suppl 2**: p. 55-9.
152. Stewart, C.L., et al., *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 76-9.
153. Menkhorst, E., et al., *Vaginally administered PEGylated LIF antagonist blocked embryo implantation and eliminated non-target effects on bone in mice*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19665.
154. Kojima, K., et al., *Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta*. Biol Reprod, 1994. **50**(4): p. 882-7.
155. Kojima, K., et al., *Expression of leukaemia 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.
156. Poehlmann, T.G., et al., *Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3*. Placenta, 2005. **26 Suppl A**: p. S37-41.
157. Tapia, A., et al., *Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2*. Hum Reprod, 2008. **23**(8): p. 1724-32.
158. 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.
159. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334** (Pt 2): p. 297-314.

160. Fitzgerald, J.S., *et al.*, *Knocking off the suppressors of cytokine signaling (SOCS): their roles in mammalian pregnancy*. J Reprod Immunol, 2009. **83**(1-2): p. 117-23.
161. 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.
162. Weber, M.A., *et al.*, *Endogenous leukemia inhibitory factor attenuates endotoxin response*. Lab Invest, 2005. **85**(2): p. 276-84.
163. Waring, P., *et al.*, *Leukemia inhibitory factor levels are elevated in septic shock and various inflammatory body fluids*. J Clin Invest, 1992. **90**(5): p. 2031-7.
164. 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.
165. Abrahams, V.M., *et al.*, *Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs*. J Immunol, 2004. **173**(7): p. 4286-96.
166. Fest, S., *et al.*, *Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2007. **57**(1): p. 55-66.
167. Mor, G., *et al.*, *Is the trophoblast an immune regulator? The role of Toll-like receptors during pregnancy*. Crit Rev Immunol, 2005. **25**(5): p. 375-88.
168. Abrahams, V.M., *et al.*, *A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8096-104.
169. Atay, S., C. Gercel-Taylor, and D.D. Taylor, *Human trophoblast-derived exosomal fibronectin induces pro-inflammatory IL-1beta production by macrophages*. Am J Reprod Immunol, 2011. **66**(4): p. 259-69.
170. Nagamatsu, T. and D.J. Schust, *The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface*. Reprod Sci, 2010. **17**(3): p. 209-18.
171. Aldo, P.B., *et al.*, *Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14+/CD16+ macrophages*. Am J Reprod Immunol, 2014. **72**(3): p. 270-84.
172. Sullivan, M.H., *Endocrine cell lines from the placenta*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **228**(1-2): p. 103-19.

173. Vargas, A., *et al.*, *Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells*. J Mol Biol, 2009. **392**(2): p. 301-18.
174. Bode, C.J., *et al.*, *In vitro models for studying trophoblast transcellular transport*. Methods Mol Med, 2006. **122**: p. 225-39.
175. Seamon, K.B., W. Padgett, and J.W. Daly, *Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(6): p. 3363-7.
176. Cohen, H.B. and D.M. Mosser, *Extrinsic and intrinsic control of macrophage inflammatory responses*. J Leukoc Biol, 2013.
177. Mosser, D.M. and X. Zhang, *Activation of murine macrophages*. Curr Protoc Immunol, 2008. **Chapter 14**: p. Unit 14 2.
178. Yang, Z., *et al.*, *TLRs, macrophages, and NK cells: our understandings of their functions in uterus and ovary*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(10): p. 1442-50.
179. Svensson, J., *et al.*, *Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10*. J Immunol, 2011. **187**(7): p. 3671-82.
180. Heikkinen, J., *et al.*, *Phenotypic characterization of human decidual macrophages*. Clin Exp Immunol, 2003. **131**(3): p. 498-505.
181. Wu, Z.M., *et al.*, *Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts*. Placenta, 2012. **33**(3): p. 188-94.
182. 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.
183. Murphy, S.P., *et al.*, *Interferon gamma in successful pregnancies*. Biology of reproduction, 2009. **80**(5): p. 848-59.
184. Haddad, E.K., *et al.*, *Early embryo loss is associated with the prior expression of macrophage activation markers in the decidua*. Journal of immunology, 1997. **158**(10): p. 4886-92.
185. Fest, S., *et al.*, *Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy*. American journal of reproductive immunology, 2007. **57**(1): p. 55-66.

186. Kimber, S.J., *Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology*. Reproduction, 2005. **130**(2): p. 131-45.
187. D'Andrea, A., et al., *Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 1041-8.
188. Wang, P., et al., *IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells*. J Immunol, 1994. **153**(2): p. 811-6.
189. Dealtry, G.B., M.K. O'Farrell, and N. Fernandez, *The Th2 cytokine environment of the placenta*. Int Arch Allergy Immunol, 2000. **123**(2): p. 107-19.
190. O'Farrell, A.M., et al., *IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways*. The EMBO journal, 1998. **17**(4): p. 1006-18.
191. 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.
192. Dufresne, M., et al., *Pro-inflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages differentially modulate cell survival and invasion of human bladder carcinoma T24 cells*. Mol Immunol, 2011. **48**(12-13): p. 1556-67.
193. Dumas, G., et al., *CD40 pathway activation reveals dual function for macrophages in human endometrial cancer cell survival and invasion*. Cancer immunology, immunotherapy, 2012. **62**: p. 273-283.
194. 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*. Biology of reproduction, 2012. **86**(2): p. 54.
195. Lanoix, D., et al., *Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors*. J Pineal Res, 2008. **45**(1): p. 50-60.
196. Lanoix, D. and C. Vaillancourt, *Cell culture media formulation and supplementation affect villous trophoblast HCG release*. Placenta, 2010. **31**(6): p. 558-9.
197. Le Bellego, F., C. Vaillancourt, and J. Lafond, *Isolation and culture of term human cytotrophoblast cells and in vitro methods for studying human cytotrophoblast cells' calcium uptake*. Methods Mol Biol, 2009. **550**: p. 73-87.

198. Orendi, K., *et al.*, *The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins*. *Reproduction*, 2010. **140**(5): p. 759-66.
199. Liu, F., M.J. Soares, and K.L. Audus, *Permeability properties of monolayers of the human trophoblast cell line BeWo*. *The American journal of physiology*, 1997. **273**(5 Pt 1): p. C1596-604.
200. Wice, B., *et al.*, *Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro*. *Exp Cell Res*, 1990. **186**(2): p. 306-16.
201. Ansa-Addo, E.A., *et al.*, *Human Plasma Membrane-Derived Vesicles Halt Proliferation and Induce Differentiation of THP-1 Acute Monocytic Leukemia Cells*. *The Journal of Immunology*, 2010. **185**(9): p. 5236-5246.
202. Auwerx, J., *The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation*. *Experientia*, 1991. **47**(1): p. 22-31.
203. Qin, Z., *The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature*. *Atherosclerosis*, 2012. **221**(1): p. 2-11.
204. Daigneault, M., *et al.*, *The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages*. *PloS one*, 2010. **5**(1): p. 0008668.
205. Menon, M.B., *et al.*, *Fluorescence-based quantitative scratch wound healing assay demonstrating the role of MAPKAPK-2/3 in fibroblast migration*. *Cell motility and the cytoskeleton*, 2009. **66**(12): p. 1041-7.
206. Penton-Rol, G., *et al.*, *Selective Inhibition of Expression of the Chemokine Receptor CCR2 in Human Monocytes by IFN- γ* . *The Journal of Immunology*, 1998. **160**(8): p. 3869-3873.
207. Klimp, A.H., *et al.*, *A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002. **44**(2): p. 143-61.
208. Thaxton, J.E. and S. Sharma, *Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy*. *American journal of reproductive immunology*, 2010. **63**(6): p. 482-91.
209. Bode, J.G., C. Ehltling, and D. Haussinger, *The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis*. *Cellular signalling*, 2012. **24**(6): p. 1185-94.

210. Tamai, R., *et al.*, *Synergistic effects of lipopolysaccharide and interferon-gamma in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression.* Journal of endotoxin research, 2003. **9**(3): p. 145-53.
211. Friebe, A., *et al.*, *Neutralization of LPS or blockage of TLR4 signaling prevents stress-triggered fetal loss in murine pregnancy.* Journal of molecular medicine, 2011. **89**(7): p. 689-99.
212. Cella, M., *et al.*, *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.* J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 747-52.
213. Lee, S.J., H. Qin, and E.N. Benveniste, *Simvastatin inhibits IFN-gamma-induced CD40 gene expression by suppressing STAT-1alpha.* J Leukoc Biol, 2007. **82**(2): p. 436-47.
214. Sayama, S., *et al.*, *Human decidual macrophages suppress IFN-gamma production by T cells through costimulatory B7-H1:PD-1 signaling in early pregnancy.* J Reprod Immunol, 2013.
215. Co, E.C., *et al.*, *Maternal decidual macrophages inhibit NK cell killing of invasive cytotrophoblasts during human pregnancy.* Biol Reprod, 2013. **88**(6): p. 155.
216. Stark, G.R., *et al.*, *How cells respond to interferons.* Annual review of biochemistry, 1998. **67**: p. 227-64.
217. Hu, Y., *et al.*, *IFN- γ and STAT1 Arrest Monocyte Migration and Modulate RAC/CDC42 Pathways.* The Journal of Immunology, 2008. **180**(12): p. 8057-8065.
218. Chen, C.W., *et al.*, *Inhibition of IFN-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase induction by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2, involves inhibition of the upstream Janus kinase/STAT1 signaling pathway.* Journal of immunology, 2003. **171**(2): p. 979-88.
219. Takaki, H., *et al.*, *TGF-beta1 suppresses IFN-gamma-induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation.* Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms, 2006. **11**(8): p. 871-82.

220. Hu, X., *et al.*, *IFN-gamma-primed macrophages exhibit increased CCR2-dependent migration and altered IFN-gamma responses mediated by Stat1*. *Journal of immunology*, 2005. **175**(6): p. 3637-47.
221. Oliveira, L.J., S. McClellan, and P.J. Hansen, *Differentiation of the endometrial macrophage during pregnancy in the cow*. *PloS one*, 2010. **5**(10): p. e13213.
222. Kim, J.S., *et al.*, *Transforming growth factor-beta1 regulates macrophage migration via RhoA*. *Blood*, 2006. **108**(6): p. 1821-9.
223. Pellicer, A., *et al.*, *In vitro fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos*. *Fertil Steril*, 1999. **71**(6): p. 1033-9.
224. Reister, F., *et al.*, *The distribution of macrophages in spiral arteries of the placental bed in pre-eclampsia differs from that in healthy patients*. *Placenta*, 1999. **20**(2-3): p. 229-33.
225. Moffett, A. and Y.W. Loke, *The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal*. *Placenta*, 2004. **25**(1): p. 1-8.
226. Guenther, S., *et al.*, *Decidual Macrophages Are Significantly Increased in Spontaneous Miscarriages and Over-Express FasL: A Potential Role for Macrophages in Trophoblast Apoptosis*. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(7): p. 9069-80.
227. Liu, T., *et al.*, *Trophoblast apoptosis through polarization of macrophages induced by Chinese Toxoplasma gondii isolates with different virulence in pregnant mice*. *Parasitol Res*, 2013. **112**(8): p. 3019-27.
228. Dorman, P.J. and R.F. Searle, *Alloantigen presenting capacity of human decidual tissue*. *J Reprod Immunol*, 1988. **13**(2): p. 101-12.
229. Lambropoulou, M., *et al.*, *Imbalance of mononuclear cell infiltrates in the placental tissue from fetuses after spontaneous abortion versus therapeutic termination from 8th to 12th weeks of gestational age*. *Clin Exp Med*, 2006. **6**(4): p. 171-6.
230. Jaiswal, M.K., *et al.*, *Placental ATPase expression is a link between multiple causes of spontaneous abortion in mice*. *Biol Reprod*, 2011. **85**(3): p. 626-34.
231. Brown, M.B., *et al.*, *M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 606.

232. Murphy, S.P., *et al.*, *Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery.* Am J Obstet Gynecol, 2009. **200**(3): p. 308 e1-9.
233. Hu, Y., *et al.*, *IFN-gamma and STAT1 arrest monocyte migration and modulate RAC/CDC42 pathways.* J Immunol, 2008. **180**(12): p. 8057-65.
234. Chen, C.W., *et al.*, *Inhibition of IFN-gamma-mediated inducible nitric oxide synthase induction by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2, involves inhibition of the upstream Janus kinase/STAT1 signaling pathway.* J Immunol, 2003. **171**(2): p. 979-88.
235. Takaki, H., *et al.*, *TGF-beta1 suppresses IFN-gamma-induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation.* Genes Cells, 2006. **11**(8): p. 871-82.
236. Argiles, J.M., N. Carbo, and F.J. Lopez-Soriano, *TNF and pregnancy: the paradigm of a complex interaction.* Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(3): p. 181-8.
237. Bowen, J.M., *et al.*, *Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition.* Placenta, 2002. **23**(4): p. 257-73.
238. Savion, S., *et al.*, *Cytokine expression in the uterus of mice with pregnancy loss: effect of maternal immunopotential with GM-CSF.* Reproduction, 2002. **123**(3): p. 399-409.
239. Lea, R.G., *et al.*, *Tumor necrosis factor-alpha mRNA-positive cells in spontaneous resorption in rodents.* Am J Reprod Immunol, 1998. **39**(1): p. 50-7.
240. Toder, V., *et al.*, *TNF-alpha in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit?* J Assist Reprod Genet, 2003. **20**(2): p. 73-81.
241. Chaouat, G., *Regulation of T-cell activities at the feto-placental interface--by placenta?* Am J Reprod Immunol, 1999. **42**(4): p. 199-204.
242. Bereznaya, N.M. and V.F. Chekhun, *Expression of CD40 and CD40L on tumor cells: the role of their interaction and new approach to immunotherapy.* Exp Oncol, 2007. **29**(1): p. 2-12.

243. Mathur, R.K., A. Awasthi, and B. Saha, *The conundrum of CD40 function: host protection or disease promotion?* Trends Parasitol, 2006. **22**(3): p. 117-22.
244. Lum, H.D., et al., *In vivo CD40 ligation can induce T-cell-independent antitumor effects that involve macrophages.* J Leukoc Biol, 2006. **79**(6): p. 1181-92.
245. Tamai, R., et al., *Synergistic effects of lipopolysaccharide and interferon-gamma in inducing interleukin-8 production in human monocytic THP-1 cells is accompanied by up-regulation of CD14, Toll-like receptor 4, MD-2 and MyD88 expression.* J Endotoxin Res, 2003. **9**(3): p. 145-53.
246. Friebe, A., et al., *Neutralization of LPS or blockage of TLR4 signaling prevents stress-triggered fetal loss in murine pregnancy.* J Mol Med (Berl), 2011. **89**(7): p. 689-99.
247. Sayama, S., et al., *Human decidual macrophages suppress IFN-gamma production by T cells through costimulatory B7-H1:PD-1 signaling in early pregnancy.* J Reprod Immunol, 2013. **100**(2): p. 109-17.
248. O'Farrell, A.M., et al., *IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways.* EMBO J, 1998. **17**(4): p. 1006-18.
249. Penton-Rol, G., et al., *Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma.* J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3869-73.
250. Qian, B.Z., et al., *CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis.* Nature, 2011. **475**(7355): p. 222-5.
251. Hu, X., et al., *IFN-gamma-primed macrophages exhibit increased CCR2-dependent migration and altered IFN-gamma responses mediated by Stat1.* J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3637-47.
252. Renaud, S.J., R. Sullivan, and C.H. Graham, *Tumour necrosis factor alpha stimulates the production of monocyte chemoattractants by extravillous trophoblast cells via differential activation of MAPK pathways.* Placenta, 2009. **30**(4): p. 313-9.
253. Petty, H.R., et al., *Trophoblast contact deactivates human neutrophils.* J Immunol, 2006. **176**(5): p. 3205-14.