

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

CARACTÉRISATION DE LA VOIE D'INFLAMMATION CGAS-STING DANS LE  
PLACENTA

MÉMOIRE PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA  
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR  
FÉLIX-ANTOINE AUBÉ

AOÛT 2024

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

*Success consists of going  
from failure to failure without  
loss of enthusiasm.*

Winston Churchill

## REMERCIEMENTS

La première personne que je tiens à remercier est ma directrice de recherche, Geneviève Pépin. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'entreprendre ce projet, de ton support et de la confiance que tu m'octroies. Je suis choyé d'avoir la chance de travailler sous ta supervision.

Je dois ensuite remercier Firas El Mortada et Karima Landelouci de m'avoir montré le fonctionnement du laboratoire à mon arrivée en 2021. Merci à tout le personnel de l'animalerie pour leur support, spécialement Nadia Desnoyers pour tous les conseils de suivi de gestation des souris. Merci à Guillaume Laliberté d'avoir pris le temps de procéder aux injections dans la veine de la queue des souris de manière aussi efficace. Merci à Mélodie B. Plourde pour l'aide avec l'ultracentrifugeuse. Merci à Matthieu Valet, c'était très inspirant et motivant de te voir travailler avec autant d'acharnement et de minutie.

Merci à mes parents et ma famille et mes amis pour leur support. Je dois remercier mon oncle Yoan Lechasseur, qui a eu un impact majeur dans mon intérêt pour les sciences et la recherche. Finalement, je tiens à remercier mon épouse Sandrine Fortin-Boily. Même à travers une période plus difficile tu as été d'une grande écoute, d'un grand support et d'une aide majeure.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>II</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....</b>	<b>XI</b>
<b>CHAPITRE 1.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<i>1.1 Mise en contexte.....</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Le placenta.....</i>	<i>3</i>
<i>1.3 Inflammation.....</i>	<i>10</i>
1.3.1 Inflammation et immunité innée .....	10
1.3.2 La voie d'inflammation cGAS-STING.....	16
<i>1.4 Inflammation et placenta.....</i>	<i>19</i>
<i>1.5 Questions de recherche, hypothèse et objectifs.....</i>	<i>22</i>
1.5.1 Question de recherche .....	22
1.5.2 Hypothèse.....	23
1.5.3 Objectifs généraux .....	23
1.5.4 Objectifs spécifiques .....	23
<i>1.6 Modèle et méthode .....</i>	<i>24</i>

1.6.1	Modèle ex vivo.....	24
1.6.1.1	Investigation ex vivo de la voie d'inflammation cGAS-STING dans le placenta murin.....	26
1.6.1.2	Isolation des cellules fibroblastes placentaires et trophoblastes primaires .....	27
1.6.1.3	Stimulation ex vivo de la voie d'inflammation cGAS-STING .....	29
1.6.1.4	RT-qPCR.....	31
1.6.1.5	Microscopie confocale .....	32
1.6.2	Modèle in vivo .....	33
1.6.2.1	Investigation in vivo de la voie d'inflammation cGAS-STING.....	33
1.6.2.2	Injection intra-veineuse d'ADN.....	34
1.6.2.3	RT-qPCR.....	37
<b>CHAPITRE 2.....</b>		<b>38</b>
	INVESTIGATION EX VIVO DE LA VOIE cGAS-STING .....	38
2.1	TROPHOBLASTES PRIMAIRES MURINS .....	38
2.2	FIBROBLASTES PRIMAIRES PLACENTAIRES MURINS .....	49
<b>CHAPITRE 3.....</b>		<b>59</b>
	INVESTIGATION IN VIVO DE LA VOIE CGAS-STING DANS LE PLACENTA MURIN.....	59
<b>CHAPITRE 4.....</b>		<b>67</b>

DISCUSSION .....	67
<b>CHAPITRE 5.....</b>	<b>76</b>
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	76
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>79</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Principaux TLR exprimés chez l'humain ainsi que leurs caractéristiques générales _____	13
<b>Tableau 2</b> : Différents PRRs exprimés par les trophoblastes extravilleux au cours de la gestation _____	20
<b>Tableau 3</b> : Différents PRRs exprimés par le syncytiotrophoblaste au cours de la gestation _____	21

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Premiers stades de développement chez l'humain. _____	4
<b>Figure 2</b> : Étapes menant à l'implantation de l'embryon. _____	5
<b>Figure 3</b> : Anatomie du placenta humain _____	6
<b>Figure 4</b> : Résumé de la voie d'inflammation cGAS-STING _____	17
<b>Figure 5</b> : Résumé de la méthode d'investigation ex vivo de la voie cGAS-STING dans les cellules de trophoblastes et fibroblastes placentaires primaires de souris _____	26
<b>Figure 6</b> : Résumé de la méthode d'isolation des trophoblastes et fibroblastes placentaires murins primaires _____	29
<b>Figure 7</b> : Différents traitements de stimulation de la voie cGAS-STING ____	30
<b>Figure 8</b> : Méthode de stimulation in vivo développée pour investiguer la voie d'inflammation cGAS-STING dans les souriceaux et placentas murins. _____	34
<b>Figure 9</b> : Test de confirmation d'isolation trophoblastique par imagerie confocale. _____	39
<b>Figure 10</b> : Imagerie confocale de p-STING dans des trophoblastes de souris WT traités au DMXAA ainsi que leurs contrôles non traités _____	41
<b>Figure 11</b> : Imagerie confocale de p-STING dans des trophoblastes de souris WT transfectés à l'ADN ainsi que leurs contrôles traités à la Lipofectamine 2000. _____	42
<b>Figure 12</b> : Imagerie confocale de p-STING dans des trophoblastes de souris cGAS <i>KO</i> traités au DMXAA ainsi que leurs contrôles non traité _____	44

<b>Figure 13</b> : Imagerie confocale de p-STING dans des trophoblastes de souris cGAS KO transfectés à l'ADN ainsi que leurs contrôles traités à la Lipofectamine 2000	45
<b>Figure 14</b> : Pourcentage de cellules de trophoblastes observées au microscope confocal ayant émis un signal pour la protéine p-STING selon les différents traitements d'activation de la voie cGAS-STING	46
<b>Figure 15</b> : Expression relative de gènes reliés à la voie cGAS-STING chez des trophoblastes primaires issus de souris <i>WT</i> suivant un traitement au DMXAA	47
<b>Figure 16</b> : Expression relative de gènes reliés à la voie cGAS-STING chez des trophoblastes primaires issus de souris <i>WT</i> suivant une transfection à l'ADN	48
<b>Figure 17</b> : Imagerie confocale de p-STING dans des fibroblastes primaires placentaires de souris cGAS <i>WT</i> traités au DMXAA ainsi que leurs contrôles non traités	50
<b>Figure 18</b> : Imagerie confocale de p-STING dans des fibroblastes primaires placentaires de souris <i>WT</i> transfectés à l'ADN ainsi que leurs contrôles traités à la Lipofectamine 2000	51
<b>Figure 19</b> : Imagerie confocale de p-STING dans des fibroblastes primaires placentaires de souris cGAS <i>KO</i> traités au DMXAA ainsi que leurs contrôles non traités	53
<b>Figure 20</b> : Imagerie confocale de p-STING dans des fibroblastes primaires placentaires de souris cGAS <i>KO</i> transfectés à l'ADN ainsi que leurs contrôles traités à la Lipofectamine 2000	54

<b>Figure 21</b> : Pourcentage des cellules de fibroblastes placentaires observées au microscope ayant émis un signal pour la protéine p-STING selon les différents traitements d'activation de la voie cGAS-STING	55
<b>Figure 22</b> : Expression relative de gènes associés à la voie cGAS-STING dans des fibroblastes placentaires primaires de souris <i>WT</i> suivant une stimulation ex vivo	56
<b>Figure 23</b> : Expression relative de gènes associés à la voie cGAS-STING dans des fibroblastes placentaires primaires de souris cGAS <i>KO</i> suivant une stimulation ex vivo	57
<b>Figure 24</b> : Résultats des tests d'innocuité de l'injection à l'ADN dans la veine de la queue de souris cGAS <i>KO</i>	63
<b>Figure 25</b> : Expression relative de gènes de l'IFN-I et IFN-III dans échantillons de souriceaux au jour de développement E8.5, après prélèvement des tissus 24h post-injection d'ADN dans la veine de la queue de la mère	64
<b>Figure 26</b> : Expression relative de gènes de l'IFN-I et IFN-III dans échantillons de fœtus au jour de développement E11.5, après prélèvement des tissus 24h post-injection d'ADN dans la veine de la queue de la mère	64
<b>Figure 27</b> : Expression relative de gènes de l'IFN-I et IFN-III dans échantillons de placentas de souriceaux au jour de développement E11,5, après prélèvement des tissus 24h post-injection d'ADN dans la veine de la queue de la mère	65
<b>Figure 28</b> : Expression relative des gènes d'IFN-I ( <i>Ifnβ</i> ) et IFN-III ( <i>Ifnλ</i> ) dans des placentas d'embryons de souris au jour E12 de développement dont les mères ont reçu une injection d'ADN dans la veine de la queue	65

**Figure 29** : Expression relative d'ISGs reliés à la voie cGAS-STING dans des placentas d'embryons de souris au jour E12 de développement dont les mères ont reçu une injection d'ADN dans la veine de la queue \_\_\_\_\_ 66

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AIM2	Absent in melanoma 2
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
BSA	Bovine Serum Albumin
CGAS	Synthase de GMP-AMP cyclique
CT	Cycle threshold
CTL	Contrôle
CTB	Cytotrophoblastes
CCL5	Chemokine (c-c motif) ligand 5
CCL8	Chemokine (c-c motif) ligand 8
CDLS	Syndrome Cornelia de Lange
Cytok7	Cytokératine-7
CXCL10	Chimiokine à ligand C-X-C 10
CGAMP :	2'3'-cyclic GMP-AMP
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DAMPs	Danger associated molecular patterns
$\Delta\Delta Ct$	Double delta cycle threshold
DMXAA	Acide 5,6-diméthylxanthenone-4-acétique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EVT	Trophoblaste extravilleux
IFN	Interférons
ISGs	Interferon stimulated genes
IFN $\alpha$	Interféron alpha (type 1)
IFN $\beta$	Interféron bêta (type 1)
IFN $\gamma$	Interféron gamma (type 2)
IFN $\lambda$	Interféron lambda (type 3)
IFNAR1	Récepteur d'interféron alpha/beta 1

IFNAR2	Récepteur d'interféron alpha/beta 2
IFNGR1	Récepteur d'interféron gamma 1
IFNGR2	Récepteur d'interféron gamma 2
IFNLR1	Récepteur d'interféron lambda 1
IL10R2	Récepteur de l'interleukine 10 #2
IFITM	Interferon inducible transmembrane protein
IRF3	Interferon regulatory factor 3
IKK	IkappaB kinase
IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
ISD	Immunostimulatory DNA
IFIT1	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1
ISG15	Interferon stimulated gene 15
JAK/STAT	Voie de signalisation des protéines Janus kinases et STAT
KO	Knock-out
LPS	Lipopolysaccharide
MDA5	Melanoma differentiation-associated protein 5
MMP2	Métalloprotéase 2
MMP3	Métalloprotéase 3
MMP9	Métalloprotéase 9
NLR	Récepteurs de type NOD-like
NF-KB	Nuclear factor Kappa B
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
NOD1	Protéine réceptrice de type NOD 1
NOD2	Protéine réceptrice de type NOD 2
NRLP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMPs	Pathogen associated molecular pattern
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase chain reaction
PRRs	Pathogen recognition receptors

PFA	Paraformaldehyde
PBS	Pampon phosphate salin
P-STING	Phospho-STING
Poly I:C	Acide polyinosinique-polycytidylique
qPCR	PCR quantitative
RCIU	Retard de croissance intra-utérine
RIG-1	Retinoic acid-inducible gene 1 like receptor
RLRs	RIG-1 like receptors
RT	Reverse transcription
RT-qPCR	Reverse-transcription qpcr
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein2
STB	Syncytiotrophoblaste
STING	Stimulator of interferon genes
TLRs	Toll-like receptors
TBK1	Tank binding kinase 1
TBP	TATA binding protein
TIR1	Toll/Interleukin-1 Receptor
WT	Wild-type

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1 Mise en contexte

Le placenta est un organe central lors du développement des mammifères<sup>1</sup>. Un placenta sain donne généralement des conditions favorables au bon développement du fœtus, en lui permettant de venir au monde dans une bonne santé globale. En effet, les nutriments et l'oxygène fournis par la mère au fœtus transitent par le placenta, tout comme les déchets organiques qui se doivent d'être évacués par la circulation sanguine de la mère, puisque le fœtus est dans l'incapacité de le faire par lui-même avant la 20<sup>e</sup> semaine de grossesse<sup>2</sup>. Le placenta est aussi une source de production d'hormones (telle que gonadotrophine et la progestérone) qui sont nécessaires à l'établissement de conditions optimales dans l'environnement utérin afin que le développement du fœtus s'effectue en bonne et due forme<sup>3</sup>. Également, le placenta exerce un rôle dans la défense immunitaire de première ligne contre des pathogènes potentiels dans le sang de la mère. Ces aspects seront expliqués plus en profondeur au cours des prochaines pages.

Le placenta est donc un organe complexe et encore aujourd'hui, plusieurs facettes de celui-ci demeurent à être mieux expliquées, voire découvertes<sup>4,5</sup>.

Pendant longtemps il a été cru que les fardeaux de la bonne santé et du bon développement de l'enfant reposaient quasiment entièrement sur l'état de santé de la mère. Certes, la santé globale de la mère qui est enceinte est très importante lors de la grossesse et son impact sur l'enfant est non négligeable. Toutefois, des travaux des dernières années en lien avec les réponses immunitaires innées ont fait en sorte de changer certains des paradigmes sur la santé du fœtus, et de constater que le placenta et le fœtus lui-même ont des capacités de défense qui sont cruciales au bon développement<sup>6,7</sup>. L'interface mère-enfant est un milieu très complexe et les mécanismes opérant sur la régulation de celui-ci sont parmi les éléments qui demeurent à être mieux compris<sup>8</sup>. Ces mécanismes sont régulés par une signalisation cellulaire et moléculaire complexe qui gagne encore à être mieux caractérisée afin de pouvoir la comprendre davantage. Une dérégulation de ces mécanismes peut, entre autres, mener à une inflammation pathologique du milieu fœto-maternel<sup>9,10</sup>.

Plusieurs pathologies affectant l'embryon sont associées à la dérégulation de l'inflammation au niveau du placenta, celles-ci pouvant également affecter la mère de manière physique et aussi psychologiques. Voici une liste de certaines pathologies associées :

- Restriction de grossesse intra-utérine<sup>11</sup>
- Prééclampsie<sup>12,13</sup>
- Mortinaissance<sup>14,15</sup>
- Retards et problèmes de développement<sup>16</sup>

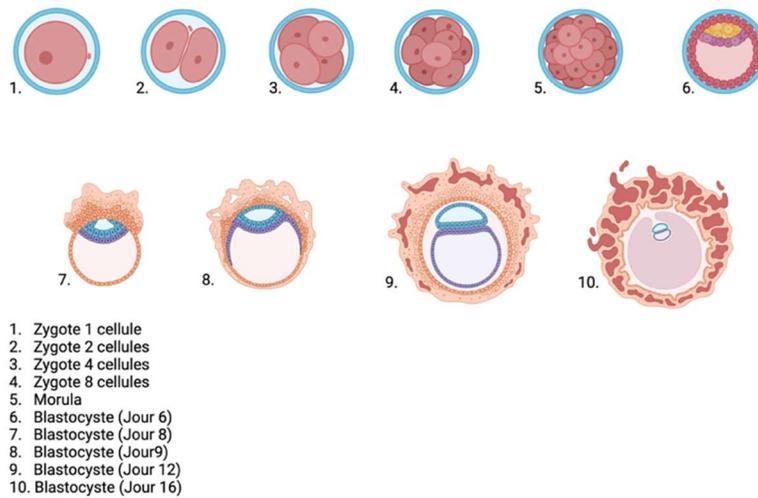
- Syndrome Cornelia de Lange<sup>17</sup>

Plusieurs de ces pathologies peuvent être causées par des infections bactériennes ou virales qui vont causer une forte réponse inflammatoire néfaste au niveau du placenta. Par exemple, une infection par le virus ZIKA peut faire en sorte d'induire une réponse antivirale excessive atteignant l'enfant<sup>18</sup>. De plus, des mères enceintes qui possèdent une comorbidité ont présenté des problèmes d'inflammation placentaire plus marqués, notamment dans des cas de mères diabétiques ou obèses<sup>19,20</sup>. On parle dans ce cas-ci d'une inflammation dite stérile, étant donné qu'aucun agent pathogène n'entre en jeu et que l'inflammation est causée par des facteurs endogènes. Les mécanismes d'inflammation placentaire causée par un pathogène sont relativement bien décrits<sup>6,18</sup>, mais les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inflammation stérile du placenta restent peu expliqués à ce jour. Dans plusieurs contextes d'inflammation stérile, l'inflammation est initiée par des fragments d'ADN double brin qui engendrent une activation de la voie cGAS-STING<sup>21</sup>. Celle-ci n'ayant pas encore été décrite dans le placenta jusqu'à maintenant, nous avons décidé d'explorer cette avenue.

## **1.2 Le placenta**

Lorsqu'il y a fécondation fonctionnelle entre l'ovule et le spermatozoïde, le zygote passe par une série de divisions cellulaires pour devenir le blastocyste. C'est au stade du blastocyste que la phase d'implantation dans l'utérus commencera par le biais d'une population cellulaire bien importante : les

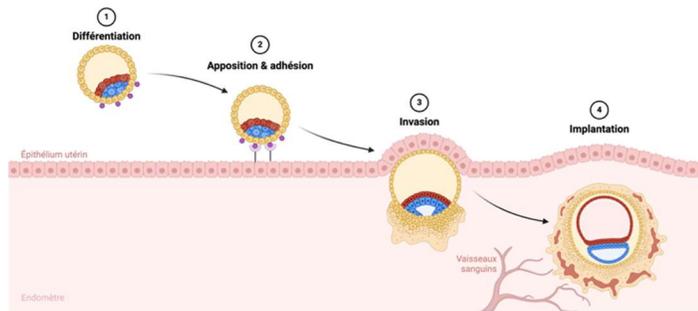
trophoblastes<sup>22,23</sup> (Figure 1). Ceux-ci sont issus du trophoctoderme, et ils



**Figure 1 : Premiers stades de développement chez l'humain.**

*Figure créée sur biorender.com*

constituent la couche cellulaire externe du blastocyste. Ils représentent la première population cellulaire à se différencier au cours du développement de ce qui deviendra le placenta. Le contact de la couche externe trophoblastique du blastocyste à l'endomètre induit le développement d'un syncytiotrophoblaste (STB), une fine couche de cellules multinucléées qui constituera la barrière avec la circulation sanguine maternelle (Figure 2).

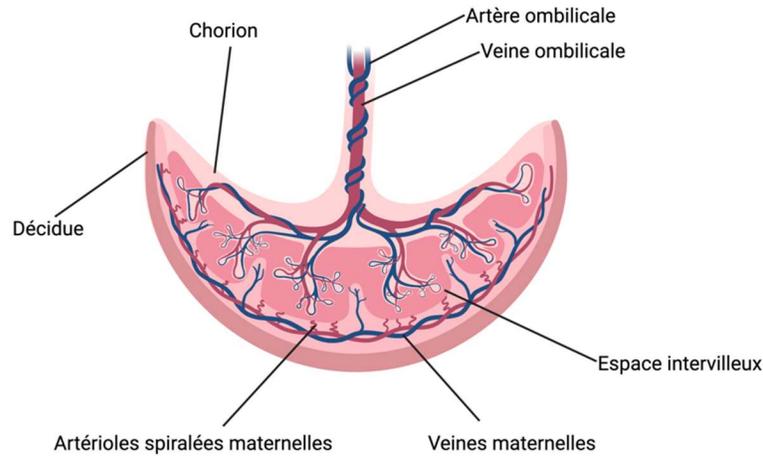


**Figure 2 : Étapes menant à l'implantation de l'embryon.**

*Figure créée sur biorender.com*

Également à ce stade, les cytotrophoblastes (CTB) (type non différencié qui agit comme réserve au syncytium du STB) produisent des enzymes protéolytiques de la matrice extracellulaire dont les métalloprotéases MMP2, MMP3 ainsi que MMP9, qui permettront au STB de progresser dans l'endomètre<sup>24,25</sup>. Cette invasion trophoblastique dans la paroi de l'endomètre se fait sous forme de villosités, qui vont en quelque sorte gruger l'endomètre avec l'affaiblissement de la matrice extracellulaire. Cela permet à l'embryon de s'implanter dans la cavité utérine, lui conférant un espace sécuritaire à sa croissance. Étant donné que celui-ci dépend de la mère pour son apport nutritionnel et en oxygène, la circulation sanguine de la mère doit être en mesure de l'approvisionner. Il y a donc un remodelage graduel des vaisseaux sanguins maternels qui se déverseront dans les espaces intervilleux, lieux où les échanges gazeux entre la mère et l'enfant seront effectués<sup>3,5</sup>. À ce moment, les vaisseaux sanguins maternels remplissent les besoins énergétiques de la mère, mais également ceux de l'embryon qui se développera à un rythme grandissant.<sup>26</sup>

Le placenta est le point pivot de la communication entre la mère et l'enfant<sup>1,3,27</sup>. Sa structure externe est en forme de disque, la partie convexe vers les tissus maternels et la face concave vers l'enfant (Figure 3).



**Figure 3 : Anatomie du placenta humain**

*Figure créée sur biorender.com*

La structure interne peut être divisée en deux parties qui consistent en une portion maternelle ainsi qu'une portion fœtale. La partie maternelle s'appelle la décidue. Elle est apposée contre la paroi de l'utérus et s'étend jusqu'à l'espace intervilloux. C'est dans cette section du placenta que se situent les vaisseaux sanguins maternels qui vont permettre les échanges gazeux entre la mère et son enfant. La partie fœtale du placenta est nommée le chorion. Elle origine des CTB, du STB ainsi que du mésoderme. Cette région est divisée en septums où se situent les vaisseaux sanguins fœtaux qui échangent avec ceux de la mère pour fournir les nutriments requis et transmettre les déchets nutritionnels à la circulation maternelle. On y trouve également l'espace intervilloux, lieu où la circulation fœtale et la circulation maternelle échangent, sans toutefois qu'elles ne se

mélangent. Entre l'espace intervilloux et les vaisseaux sanguins fœtaux se retrouvent également des cellules de soutien comme les fibroblastes, dont le facteur de croissance contribuerait à l'angiogenèse du placenta<sup>28</sup>. Chez l'humain et la souris, les vaisseaux sanguins fœtaux baignent dans le sang de la mère pour y puiser leurs ressources. Ce type de placenta est appelé placenta hémochorial<sup>29,30</sup>. Les vaisseaux sanguins de la mère s'y déversent donc, les nutriments et l'oxygène nécessaires au fœtus y traversent le syncytiotrophoblaste soit par diffusion passive, soit facilitée pour atteindre la circulation fœtale. Pour subvenir aux besoins en glucose, celui-ci entre par diffusion facilitée. Les acides aminés profitent d'un transport actif, impliquant souvent le sodium. Les acides gras passent par diffusion passive et facilitée tandis que l'eau passe par diffusion simple<sup>31,32</sup>. Inversement, les déchets métaboliques du fœtus sont diffusés et évacués vers la circulation de la mère qui traitera ces déchets. Le placenta assure également le rôle de produire plusieurs hormones (dont la gonadotrophine chorionique humaine et la progestérone<sup>33</sup>) qui auront différents rôles dans la grossesse, notamment en préparant les adaptations corporelles et physiologiques nécessaires à la mère afin qu'elle puisse être en mesure d'offrir le meilleur environnement qui soit<sup>33</sup>. Parmi le large éventail d'hormones produites par le placenta, on retrouve des hormones stéroïdiennes, des hormones de croissance, des neurotransmetteurs et autres<sup>33</sup>.

Différentes régions du placenta. À la base nous retrouvons la décidue qui est la partie apposée du côté maternel. La circulation sanguine de la mère est

déviée afin de se jeter dans l'espace intervilloux, lieux où les échanges mère-enfants sont effectués. Les artérioles spiralées fœtales vont transmettre les nutriments au fœtus par l'artère ombilical. Les déchets métaboliques feront le chemin inverse en partant de la circulation fœtale vers la circulation maternelle.

Le placenta possède une structure complexe, qui doit se développer rapidement et adéquatement en même temps que l'embryon en début de grossesse, afin de lui permettre de mettre en place les conditions favorables au développement<sup>4</sup>. Chez l'humain, le placenta a complété le développement de toutes ses structures entre les semaines 18 et 20; il va toutefois continuer de grossir jusqu'à l'accouchement<sup>34</sup>. En même temps, le système immunitaire de la mère doit s'adapter afin de ne pas rejeter l'embryon, qui constitue une greffe semi-allogénique<sup>35</sup>. Des dysfonctions du placenta peuvent non seulement affecter le développement embryonnaire, mais elles peuvent aussi affecter la santé de la mère. Voici une liste de pathologies associées à un mauvais fonctionnement du placenta ainsi que leur description. Ces pathologies peuvent être due à un mauvais fonctionnement placentaire, mais également elles-mêmes causer des problèmes de fonctionnement.

**La mortinaissance** est définie par la mort soudaine d'un bébé après la 28<sup>e</sup> semaine de grossesse<sup>36</sup>. La mort peut survenir subitement et sans raison apparente. Cela peut se dérouler lors du travail ou avant celui-ci. Un vieillissement prématuré du placenta et une dysfonction de celui-ci y sont souvent associés<sup>14,15</sup>. Selon l'OMS, il y aurait eu 48 millions de mortinaissances

rapportées dans le monde depuis 2002, ce qui représente une naissance sur 72. Celles-ci arrivent durant le travail dans 40% des cas. Bien que ce problème soit réparti partout dans le monde, l'Afrique et l'Amérique du Sud sont les deux zones plus concernées.

**La prééclampsie**<sup>37,38</sup> est une pathologie qui touche aux alentours de 20% des grossesses. Il n'y aurait toutefois que de 3 à 5% des cas qui seraient sévères. Les principaux symptômes sont une hypertension artérielle, la présence de protéines dans l'urine, des maux de têtes, des nausées très intenses ainsi que de graves crampes abdominales. Ceux-ci se présentent après la 20<sup>e</sup> semaine de grossesse, les cas sévères se manifestent généralement entre la 20<sup>e</sup> et la 34<sup>e</sup> semaine. Bien que les causes exactes de la prééclampsie ne soient pas tout à fait claires, celle-ci est principalement reliée à des complications lors de la formation de placenta ou à son mauvais fonctionnement. Parmi les causes possibles, on mentionne une hypoxie du placenta qui augmenterait drastiquement la pression sanguine.

**Le retard de croissance intra-utérin (RCIU)** peut être causé par une dérégulation du fonctionnement du placenta. Le RCIU est diagnostiqué lorsqu'un bébé possède un poids inférieur au 5<sup>e</sup> centile. Celui-ci peut mener à d'autres complications pour l'enfant, notamment des difficultés à affronter des infections, une difficulté à maintenir une température corporelle adéquate et une augmentation du risque de développer un diabète de type 2 et une hypertension.

Il peut être dû à plusieurs causes telles qu'une mauvaise perfusion du placenta, une hypoxie fœtale et peut aussi être associé à d'autres co-pathologies<sup>11,39,40</sup>.

**Le syndrome de Cornelia de Lange (CDLS)**, est un problème de développement de l'enfant pouvant toucher plusieurs systèmes. La source de ces problèmes de développement est une mutation des protéines du complexe de la cohésine<sup>41</sup>, affectant la capacité de division des cellules. La sévérité des symptômes peut varier mais en général, les enfants étant touchés ont des retards de croissance, une déformation faciale, des retards intellectuels et des membres défectueux. Le CDLS peut être transmis génétiquement de façon autosomale dominante. Le CDLS est souvent associé à un placenta plus petit causant des retards de croissances.<sup>17,42</sup>

## **1.3 Inflammation**

### ***1.3.1 Inflammation et immunité innée***

L'inflammation est un processus nécessaire à l'entretien du corps humain et est un processus tout à fait normal. Au niveau moléculaire, elle est causée par l'envoi de cellules immunitaires et la production de cytokines et autres molécules biologique dans le milieu à réparer<sup>43</sup>. Que ce soit pour la récupération tissulaire, la défense contre des pathogènes et même dans le développement de l'embryon, l'inflammation sporadique est saine<sup>44</sup> sauf dans certains cas infectieux où celle-ci peut altérer le développement du placenta<sup>45</sup>. Toutefois, une inflammation chronique est souvent associée à des conditions pathologiques telle

que des maladies auto-immunes, et peuvent endommager gravement les systèmes touchés<sup>46</sup>. Ces réactions d'inflammations sont effectuées lorsque le système immunitaire est activé de manière continue.

L'immunité innée constitue la première barrière de défense contre les organismes pathogènes, le cancer et les autres dommages de l'organisme. Elle peut se diviser en deux volets, un qui est externe composé des mucus, sécrétions et autres barrières empêchant l'entrée de pathogènes. L'autre volet est le système interne de la cellule. Ce volet fournit des réponses à large spectre de manière rapide, pour assurer une défense directe. Celle-ci tente de limiter le plus que possible les dommages, le temps que l'immunité spécialisée puisse prendre la relève lorsque nécessaire<sup>47</sup>.

Pour qu'une réponse immunitaire innée soit activée, il faut préalablement qu'il y ait un signal détecté en cause. Ces signaux peuvent être regroupés en deux types : les PAMPs (*Pathogen associated molecular pattern*) et les DAMPs (*Danger associated molecular patterns*)<sup>48</sup>. Ceux-ci sont détectés par des récepteurs spécifiques nommés PRRs (*Pathogen recognition receptors*). Ces récepteurs spécialisés ont comme rôle de détecter tous signaux potentiellement dangereux pour le système et d'engendrer une réponse face à ceux-ci. Il y a plusieurs types et sous-types de PRRs qui seront brièvement expliqués ci-dessous.

Les PAMPs sont les signaux associés aux pathogènes provenant de divers microorganismes. Les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries, les différents acides nucléiques (ARN ou ADN) simple brin ou double brin des virus, les fungi ( $\beta$ -glucane, mannane et la chitine) et les parasites font partie des signaux détectés qui engendreront une réponse.<sup>49-51</sup>

Les DAMPs proviennent quant à eux de signaux internes provenant de l'hôte. Parmi ceux-ci on peut compter l'ADN mitochondrial, l'actine-F, des protéines d'histones ou encore de l'ADN cytoplasmique. Que ce soit en raison de dommages cellulaires dus à divers stress, de lésions tissulaires, de cancer ou d'instabilité génomique, ces signaux dérivés de l'hôte vont activer une réponse inflammatoire dite stérile<sup>48,52,53</sup>. Les PRRs sont activés par un ou plusieurs DAMPS/PAMPS. Différentes classes et sous-classes de ceux-ci sont brièvement expliqués ci-dessous.

Les TLRs (*Toll-like receptors*) sont des récepteurs qui détectent une vaste gamme de signaux de danger et de pathogènes<sup>54</sup>. Ils ont une forme de crochet avec un domaine récepteur qui pourra se lier aux différents ligands, un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine TIR1 (*Toll/Interleukin-1 Receptor*) qui s'occupera de l'activation de signalisation cellulaire. Les différents TLRs peuvent être exprimés dans la membrane cellulaire, afin de détecter les pathogènes avoisinants. Les TLRs peuvent aussi être situés de manière intracellulaire, que ce soit dans la membrane du réticulum endoplasmique ou

dans les endosomes, de sorte à pouvoir détecter les dangers internes. Le tableau 1 résume les caractéristiques des principaux TLR exprimés chez l'humain.

**Tableau 1 : Principaux TLR exprimés chez l'humain ainsi que leurs caractéristiques générales** <sup>54-57</sup>

Types de TLR	Localisation(s)	Signaux détectés
TLR1	Membrane cellulaire	Lipopeptides bactériens
TLR2	Membrane cellulaire	Lipopeptides bactériens (protéoglycanes)
TLR3	Réticulum endoplasmique Membrane lysosomiale	ARN double brin
TLR4	Membrane cellulaire Réticulum endoplasmique Membrane lysosomiale	Lipopolysaccharides
TLR5	Membrane cellulaire	Protéines de flagelles bactériennes (flagelline)
TLR6	Membrane cellulaire	Lipopeptides bactériens
TLR7-8	Endosomes	ARN simple brin
TLR9	Membrane cellulaire Réticulum endoplasmique Membrane lysosomiale	Courtes séquences d'ADN hypométhylée

Les récepteurs de type *NOD-like* (NLR) sont des protéines intracellulaires qui vont principalement aider à la détection de sucres complexes pour prévenir les infections aux bactéries à Gram positif (comme les staphylocoques, les

streptocoques, etc.). Celles-ci sont situées dans le cytoplasme et vont servir d'échafaudage afin d'initier l'activation des caspases via NF-KB (*Nuclear factor Kappa-B*) et l'inflammasome. Dans les principaux NLR, on retrouve NOD1 et NOD2 ainsi que NRLP3<sup>58,59</sup>.

Les détecteurs d'acides nucléiques cytosoliques sont divisés en deux familles : les senseurs d'ARN et les senseurs d'ADN. Les senseurs d'ARN de la famille de RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1 like receptor*), les RLRs, sont situés dans le cytosol et induisent la production d'interférons, des cytokines antivirales, lorsqu'ils détectent de l'ARN. Les principaux détecteurs sont RIG-1 et MDA5 (*Melanoma differentiation-associated protein 5*)<sup>60</sup>. Le premier est sensible à la présence de courte chaîne d'ARN double brin tandis que le second est plutôt orienté vers la détection de longues chaînes d'ARN double brin. Les détecteurs d'acides nucléiques au niveau du cytoplasme jouent un rôle clé dans la défense antivirale<sup>61</sup>. Le récepteur AIM2 (*absent in melanoma 2*) est un senseur d'ADN double brin au niveau du cytosol de la cellule. Lorsque celui-ci détecte l'ADN, il procède à l'assemblage d'un complexe nommé inflammasome. La formation de ce complexe permet l'activation de la caspase-1<sup>62</sup>. Un autre senseur à l'ADN au niveau du cytosol, qui est un point clé de ce projet, est le senseur d'ADN cytosolique synthétase de GMP-AMP cyclique cGAS. L'expression des différents PRRs dans le placenta au cours de la gestation seront décrits ultérieurement dans la section 1.4 (Inflammation et Placenta).

Les interférons (IFNs) sont des protéines antivirales faisant partie de la famille des cytokines. Celles-ci sont importantes dans la réponse immunitaire car elles permettent la mise en place d'une défense en activant la production de facteurs régulateurs et de protéines inhibitrices de pathogènes. Les gènes activés en aval par l'IFN sont nommés les ISGs (*Interferons stimulated genes*)<sup>63</sup>. Les IFNs ont non seulement une activité autocrine qui permet l'activation d'une réponse de la cellule productrice elle-même mais aussi une activité paracrine qui permet la protection chez les cellules avoisinantes également<sup>64</sup>.

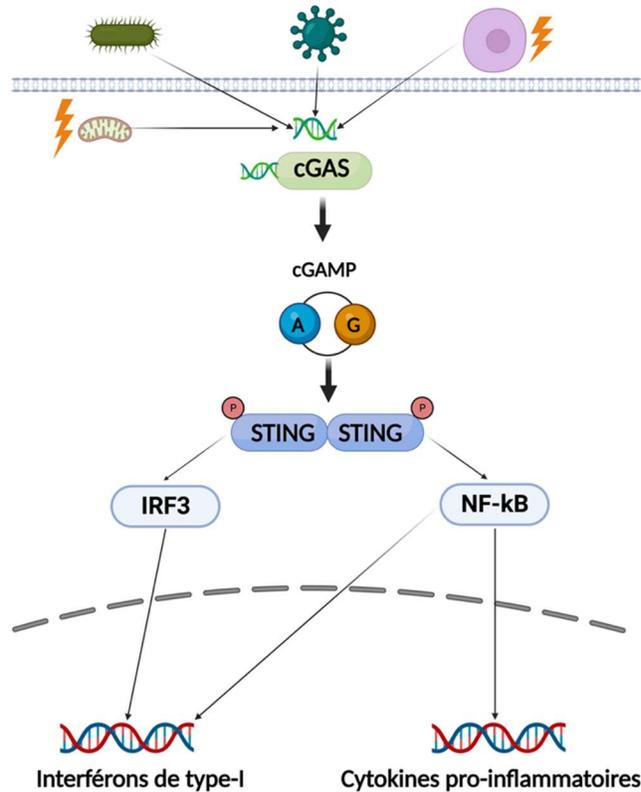
Il y a trois principaux types d'interféron qui existent. Les interférons de type 1 (notamment IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ ), les interférons de type 2 (IFN $\gamma$ ) ainsi que les interférons de type 3 (IFN $\lambda$ ). Les IFNs de type 1 se lient au complexe récepteur composé des protéines IFNAR1 (Récepteur d'interféron alpha/beta 1) et IFNAR2 (Récepteur d'interféron alpha/beta 2). Les IFNs de type 2 se lient au complexe récepteur formé de IFNGR1 (Récepteur d'interféron gamma 1) et IFNGR2 (Récepteur d'interféron gamma 2). Les IFNs de type 3 se lient quant à eux au complexe IFNLR1-IL10R2 (Récepteur d'interféron lambda 1 et Récepteur de l'interleukine 10 #2). Les récepteurs des IFNs de type 1 et 2 sont exprimés par la majorité des cellules tandis que ceux de type 3 sont généralement restreints aux cellules des muqueuses<sup>64-66</sup>. Les signalisations des IFNs de type 1 et 3 se ressemblent beaucoup, mais ceux de type 3 tendent à causer une activation des ISGs plus longue quoique moins puissante.<sup>65,67-69</sup>

La production d'IFN $\lambda$  par les cellules de trophoblastes du placenta a été documentée pour son effet protecteur et préventif d'infections contre certains virus (notamment le cytomégalovirus et le virus ZIKV). L'interféron de type 3 jouerait donc un rôle bénéfique pour le milieu fœto-maternel<sup>7,70</sup>. Toutefois, une forte réponse d'IFN de type 1 (notamment l'IFN $\beta$ ) est généralement associée à des dommages irréversibles pour le fœtus et le placenta<sup>45,71</sup>. Parmi ceux-ci les retards de croissance, des accouchements prématurés ou encore la résorption fœtale, causés par divers mécanismes comme l'inhibition de la fusion cellulaire empêchant la formation du syncytiotrophoblaste par les protéines IFITM (*Interferon inducible transmembrane protein*)<sup>72,73</sup>. Par ailleurs, une des voie d'inflammation connue pour mener à la production d'IFN de type 1 est la voie d'inflammation cGAS-STING<sup>74</sup>.

### ***1.3.2 La voie d'inflammation cGAS-STING***

La synthèse de GMP-AMP cyclique, dite cGAS, est une protéine qui a comme rôle de détecter l'ADN double brin au niveau du cytosol de la cellule<sup>75</sup>. Cet ADN peut provenir de sources exogènes au système comme une bactérie, un virus, un protozoaire ou autre pathogène. L'ADN détecté peut provenir du soi également. Que ce soit une cellule ayant subi des dommages, des tissus étant lésés, un relâchement d'ADN nucléaire ou mitochondrial à la suite d'un stress ou encore en raison d'un cancer, cGAS joue aussi un rôle dans la détection de l'ADN du Soi<sup>76-78</sup>. L'activation de la protéine cGAS en raison d'une détection de son substrat est suivi par la production d'un second messenger cyclique nommé

cGAMP (2'3'-cyclic GMP-AMP)<sup>79</sup>. La production de cGAMP permet alors une activation de la protéine adaptatrice STING (*Stimulator of interferon genes*) au réticulum endoplasmique (Figure 4).



**Figure 4 : Résumé de la voie d'inflammation cGAS-STING**  
*Figure créée sur biorender.com*

La protéine STING se dimérise et migrera vers l'appareil de Golgi par translocation et sera phosphorylée par la protéine kinase TBK1 (*Tank binding kinase*). La phosphorylation de STING permettra le recrutement du facteur de transcription IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) par une phosphorylation de celui-ci. Phospho-IRF3 fera son entrée dans le noyau de la cellule par translocation, puis activera la production d'IFN de type I<sup>74</sup>. La phosphorylation

de STING peut aussi permettre le recrutement du facteur de transcription NF-KB via une interaction avec la protéine IKK (*IkappaB kinase*)<sup>80</sup>. Une activation de NF-KB est associée avec la production d'une panoplie de cytokines pro-inflammatoires et le recrutement de cellules immunitaires<sup>81</sup>.

La production d'IFN de type 1 par la cellule qui survient après l'activation de cGAS cause une activation autocrine et paracrine de productions des ISGs<sup>63</sup>. En effet, l'IFN- relâché par la cellule activée va se lier au récepteur IFNAR sur la cellule productrice ainsi qu'aux récepteurs des cellules avoisinantes. Par la voie d'activation JAK/STAT kinase, il y aura activation des gènes reliés à l'IFN, qui sont des cytokines/chimiokines et protéines qui interfère avec la prolifération virale et bactérienne et qui aide au recrutement de cellules immunitaires<sup>69</sup>.

La voie d'inflammation cGAS-STING joue bien sûr un rôle dans la détection et la protection contre les pathogènes viraux et bactériens, mais son activation peut aussi être impliquée dans des cas de conditions et pathologies reliées à l'inflammation stérile<sup>21,46</sup>. Que ce soit en condition de maladies auto-immunes comme le lupus, ou alors en cas de fibrose des poumons ou encore de diabète, la présence d'ADN dans le cytosol est associée à une réponse inflammatoire de la voie cGAS-STING<sup>82-84</sup>. Dans le cadre des travaux de Wang et al. portant sur l'observation de marqueurs cellulaires reliés à l'IFN de type 1 dans le placenta chez des femmes enceintes ayant contracté la COVID-19, la protéine STING a été observée à l'interface fœto-maternel<sup>85</sup>. Des coupes immunohistochimiques de ces placentas suggèrent la présence de STING

principalement dans les tissus de soutien du placenta. Cependant, pour l'instant, il n'est pas connu si, quand et comment cGAS et STING sont activés dans le placenta au fil des différentes phases de la gestation et encore moins quelle est la fonction de cette voie dans ce contexte.

## **1.4 Inflammation et placenta**

Au cours de la grossesse, trois différentes phases inflammatoires existent. En début de grossesse il y a une phase pro-inflammatoire, suivi d'une phase anti-inflammatoire jusqu'à la fin de la grossesse où un milieu pro-inflammatoire règne à nouveau<sup>86,87</sup>.

La première phase est marquée notamment par l'implantation de l'embryon ainsi que la formation du placenta. L'invasion de l'utérus de la mère par les trophoblastes extravillieux, la formation du syncytiotrophoblaste ainsi que le remodelage des tissus maternels impliquent la sécrétion de métalloprotéases et de cytokines qui vont favoriser un milieu inflammatoire où énormément de changements se feront dans un court laps de temps. C'est dans ce contexte pro-inflammatoire caractérisé par une sécrétion de cytokine, notamment IL-6 et IL-8<sup>87</sup>, que la mère doit protéger l'embryon de l'invasion de pathogène potentiel tout en ayant une tolérance à la nouvelle présence dans la cavité utérine, qui constitue une greffe semi-allogénique. La deuxième phase est plutôt anti-inflammatoire, celle-ci est marquée par une croissance constante et rapide de l'enfant. Lors de cette phase, un contrôle orienté vers une minimisation de l'inflammation permet

un environnement propice au développement du fœtus<sup>88</sup>. La troisième phase précède la naissance de l'enfant, celle-ci est caractérisé par un milieu pro-inflammatoire qui favorisera l'expulsion de l'enfant par le travail<sup>57</sup>.

L'expression de différents PRRs dans le placenta varie selon les trimestres. Un nombre supérieur de différents récepteurs exprimés par les trophoblastes est observé lors des deux phases pro-inflammatoires. Il y a également une différence au niveau des types de récepteurs exprimés selon le type de trophoblaste. Ainsi, le syncytiotrophoblaste (qui constitue la barrière fœto-maternelle) et les trophoblastes extravilloux (en contact constant avec la décidue maternelle) ont quelques différences au niveau des récepteurs exprimés. Les différents PRRs recensés dans les tissus placentaires à travers la littérature sont présentés dans le tableau 2 (au niveau des trophoblastes extravilloux) et le tableau 3 (au niveau du syncytiotrophoblaste).

**Tableau 2 : Différents PRRs exprimés par les trophoblastes extravilloux au cours de la gestation<sup>57,85,89,90</sup>**

1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>e</sup> trimestre	3 <sup>e</sup> trimestre
TLR1/2	TLR4	TLR4
TLR4		TLR10
TLR5		
TLR9		
TLR10		
NOD1		
NOD2		

**Tableau 3 : Différents PRRs exprimés par le syncytiotrophoblaste au cours de la gestation<sup>57,85,89,90</sup>**

1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>e</sup> trimestre	3 <sup>e</sup> trimestre
TLR1/2	TLR10	TLR1/2
TLR3		TLR3
TLR4		TLR4
TLR10		TLR6
NOD1		TLR7/8
NOD2		TLR9
		TLR10
		NOD1
		NOD2
		RIG-I
		MDA

Il est à constater que les PRRs dans les tables ci-dessus sont quasiment exclusivement détecteurs de molécules de danger qui ne proviennent du soi. Le premier trimestre et le troisième trimestre étant pro-inflammatoire, on y retrouve une expression de plus de récepteurs dans les différents tissus placentaires que lors de la phase de croissance du deuxième trimestre.

Les conséquences de l'inflammation suivant une activation d'un ou plusieurs de ces PRRs en réponses à des pathogènes tels que le virus du ZIKA, du cytomégalovirus, de la listéria ou de la chlamydia peuvent être graves. Parmi les conséquences possibles il y a des problèmes et retards développementaux, des problèmes neuronaux voire la mortinaissance<sup>18,90,91</sup>. Comme la grossesse est

également composée d'une multitude d'évènements pouvant avoir des impacts sur le soi (stress, fusion cellulaire, remodelage tissulaires)<sup>15,17,92,93</sup> et que les mécanismes moléculaires de déséquilibre d'inflammation stérile dans le placenta sont peu expliqués pour le moment, nous avons décidé d'investiguer la fonctionnalité de la voie d'inflammation cGAS-STING.

## **1.5 Questions de recherche, hypothèse et objectifs**

### ***1.5.1 Question de recherche***

Tel que mentionné dans la section précédente, la voie d'inflammation cGAS-STING a été caractérisée dans plusieurs contextes inflammatoires différents. Dans le cadre des travaux de Wang et al. portant sur l'observation de marqueurs cellulaires reliés à l'IFN de type 1 dans le placenta chez des femmes enceintes ayant contracté la COVID-19, la protéine STING a été observée à l'interface fœto-maternel<sup>85</sup>. Des coupes immunohistochimiques de ces placentas suggèrent la présence de STING principalement dans les tissus de soutien du placenta. Cependant, pour l'instant, il n'est pas connu si, quand et comment cGAS et STING sont activés dans le placenta au fil des différentes phases de la gestation et encore moins quelle est la fonction de cette voie dans ce contexte. L'activation de cGAS peut être initiée par une infection ou encore une situation de dommages à l'ADN. Les mécanismes régulant l'inflammation au niveau du placenta gagnent à être mieux compris et des conditions connues pour activer la voie cGAS-STING sont potentiellement réunies lors de la grossesse. Ainsi, cela nous a mené

à nous demander si la voie d'inflammation cGAS-STING pouvait être activée dans le placenta murin.

### **1.5.2 Hypothèse**

L'hypothèse de mon projet est que les protéines cGAS et STING sont exprimées dans le placenta et que cette voie peut contribuer à la production d'IFN de type 1 dans le placenta murin.

### **1.5.3 Objectifs généraux**

Les objectifs généraux de nos travaux de recherche sont de déterminer si la voie d'inflammation cGAS-STING est présente et fonctionnelle dans le placenta murin.

### **1.5.4 Objectifs spécifiques**

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons établi les objectifs spécifiques suivants :

- 1) Vérifier l'expression des protéines cGAS et STING dans les cellules de trophoblastes primaires issues de placenta.
- 2) Vérifier la fonctionnalité de la voie cGAS-STING *ex vivo* dans les cellules de trophoblastes primaires issues de placenta.
- 3) Vérifier la présence des protéines cGAS et STING dans les cellules de fibroblastes primaires issues de placenta.
- 4) Vérifier la fonctionnalité de la voie cGAS-STING *ex vivo* dans les cellules de fibroblastes primaires issues de placenta.

- 5) Développer un modèle d'activation de la voie cGAS-STING *in vivo*.

## 1.6 Modèle et méthode

### 1.6.1 *Modèle ex vivo*

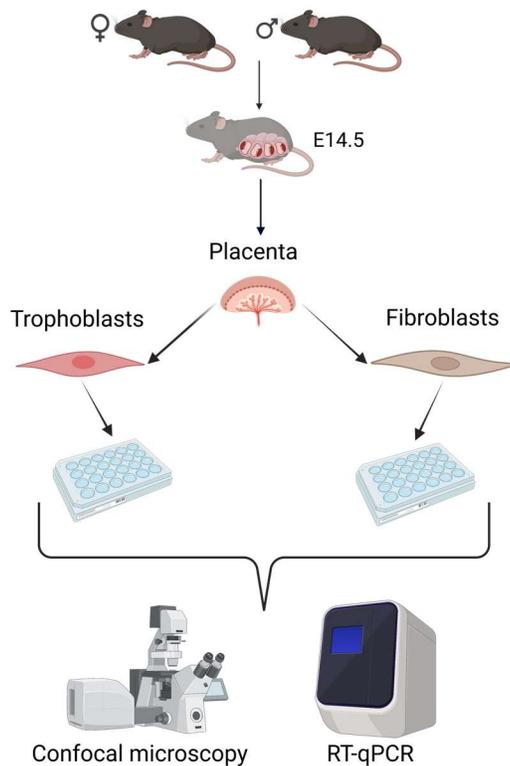
Pour déterminer si les cellules du placenta expriment les protéines de la voie de cGAS-STING, nous avons choisi de travailler avec les trophoblastes et fibroblastes primaires isolés à partir de placentas murins. Les cellules immortalisées ou les cellules tumorales ne sont pas appropriées pour déterminer l'expression de protéines de signalisation car elles sont plus susceptibles de gagner des mutations qui les éloignent des comportements et caractéristiques des cellules primaires. Nous avons donc fait usage de souris ayant deux génotypes différents complémentaires pour la protéine cGAS :

- 1) Souris sauvage *wild type* (WT) ayant un génotype cGAS<sup>+/+</sup>. Ces souris expriment cGAS dans la majorité de leurs populations cellulaires
- 2) Souris *cGAS knock-out* (cGAS KO) ayant un génotype cGAS<sup>-/-</sup>. Celles-ci n'expriment pas cGAS<sup>94</sup>, elles sont dans l'incapacité d'engendrer une réponse de la voie cGAS-STING lorsqu'en présence d'ADN.

Afin d'isoler des cellules du placenta, il fallait préalablement procéder à l'accouplement de souris. Les femelles que nous avons utilisées pour l'accouplement étaient âgées de 8 à 12 semaines. Elles ont été mises en accouplement seule à seule dans une cage avec un mâle. Le lendemain matin de

chaque journée d'accouplement, nous sommes allés vérifier la présence de bouchon muqueux au niveau du vagin de la femelle. La présence du bouchon muqueux indique qu'il y a eu fécondation, nous considérons donc ce jour comme étant le jour E0 pour faire le suivi de la grossesse. Comme celui-ci peut tomber du vagin de la femelle, il est recommandé d'aller procéder à la vérification tôt le matin pour augmenter les chances de l'observer<sup>95</sup>. Également, parce que le simple fait d'observer un bouchon muqueux ne garantit pas la gestation, nous effectuons un suivi du poids pris par la femelle au cours des jours suivant le jour E0. Une prise de poids marquée entre les jours E5 À E8 est un fort indicateur que la souris est réellement gestante et faire ce suivi permet un taux de réussite de détection d'environ 85%<sup>96</sup>.

Des souris gestantes nous pouvons prélever directement les placentas et fœtus, qui peuvent être analysés tels quels. Nous pouvons également obtenir des cellules primaires en isolant les différents types de cellules qui composent le placenta, notamment les trophoblastes et les fibroblastes. Le placenta de souris comprend aussi des cellules sanguines de la mère et du souriceau ainsi que des cellules déciduales<sup>97</sup>. Lorsque mises en culture, ces cellules primaires ont un fonctionnement qui ressemble davantage à ce qui se passe dans le système physiologique de la souris que le fonctionnement qu'auraient des cellules issues d'une lignée cellulaire.



**Figure 5 : Résumé de la méthode d’investigation ex vivo de la voie cGAS-STING dans les cellules de trophoblastes et fibroblastes placentaires primaires de souris**

*Figure créée sur biorender.com*

#### *1.6.1.1 Investigation ex vivo de la voie d’inflammation cGAS-STING dans le placenta murin*

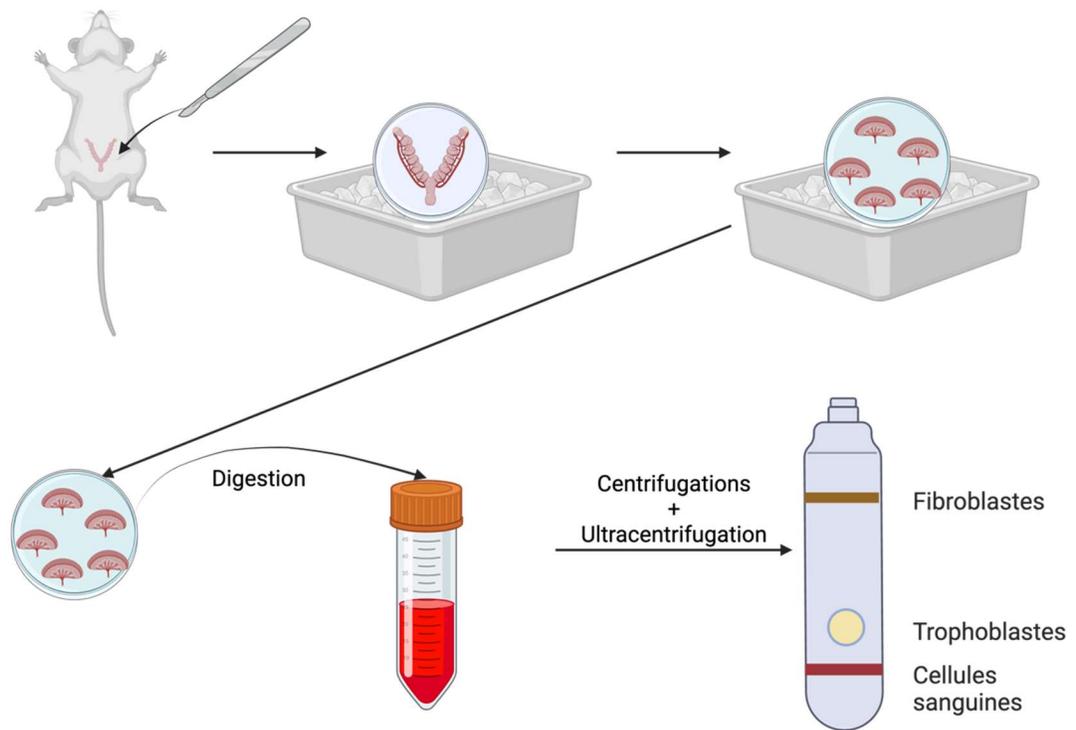
Nous avons donc des souris reproductrices de deux génotypes différents : cGAS WT ainsi que cGAS KO. Par suite de leur accouplement et du suivi de leur gestation, nous isolons les deux types cellulaires désirés à partir des placentas que nous prélevons tel que schématisé à la figure 6.

### *1.6.1.2 Isolation des cellules fibroblastes placentaires et trophoblastes primaires*

Au jour E14,5, nous avons euthanasié les mères gestantes et prélevé les placentas de leurs souriceaux. Les mères sont euthanasiées par surdose d'isoflurane suivie d'une dislocation cervicale. Une incision dans le bas de l'abdomen nous donne accès aux fœtus qui sont rattachés à la corne utérine de la mère. Nos prélevons les fœtus et ceux-ci sont immédiatement mis sur glace. Le placenta de chacun des souriceaux est ensuite prélevé et immédiatement transféré dans un pétri sur glace.

Les placentas sont alors regroupés, déchiquetés et incubés à 37 degrés dans une solution de digestion contenant les enzymes DNase I 0,02% et collagénase 0,1%. Cette étape permet la dégradation des tissus qui permet de séparer les différentes cellules le composant. L'incubation a une durée de 45 à 60 minutes au cours de laquelle la solution est agitée à toutes les 10 minutes pour homogénéiser la réaction. À la fin de l'étape de digestion, les tubes sont déposés sur glace pour inhiber l'activité des enzymes de dégradation contenues dans la solution. Ensuite, celle-ci est filtrée à travers un filtre dont la taille des pores est de 100µm puis est centrifugée pour 5 minutes à 500 x g. Le surnageant contenant les enzymes de dégradation est alors retiré et les cellules sont re-suspendues dans une solution de lavage avant d'être centrifugées une seconde fois (5 minutes à 500 x g). Le surnageant est retiré encore une fois, les cellules transférées dans une solution de *Percoll* afin de procéder à une ultracentrifugation (30 minutes à

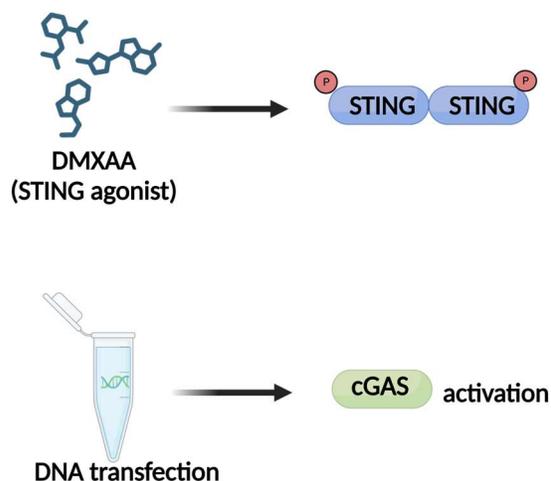
30 000 x g) qui permettra de séparer les différents types cellulaires du placenta selon leur densité. Deux bandes de cellules sont gardées de cette étape, les trophoblastes formant un amas blanchâtre dans le bas du tube, ainsi que les fibroblastes formant une mince ligne au niveau supérieur du tube. Ces cellules sont alors rincées, comptées et mises sur des plaques de 24 puits. Les trophoblastes obtenus sont placés dans le milieu de culture M-199 pour une durée maximale de 5 jours. Les fibroblastes obtenus sont placés dans le milieu de culture DMEM pour une durée maximale de 5 jours. Chaque placenta permet l'isolation d'environ 25 000 cellules de trophoblastes<sup>98,99</sup> ainsi qu'au moins 75 000 fibroblastes selon notre expérience.



**Figure 6 : Résumé de la méthode d'isolation des trophoblastes et fibroblastes placentaires murins primaires**  
*Figure créée sur biorender.com*

### 1.6.1.3 Stimulation *ex vivo* de la voie d'inflammation *cGAS-STING*

Afin d'investiguer l'activation de la voie d'inflammation *cGAS-STING* dans les fibroblastes placentaires et les trophoblastes isolés, nous avons recours à deux traitements différents : un traitement avec l'agoniste murin de *STING*, le *DMXAA* ainsi que la transfection d'ADN double brin synthétique de 90bp nommé *ISD* (*Immunostimulatory DNA*) (figure 7).



**Figure 7 : Différents traitements de stimulation de la voie cGAS-STING**

*Figure créée sur biorender.com*

Le DMXAA est un agoniste de STING spécifique à la souris. Il induit une forte réponse inflammatoire et une production de cytokines associées à la voie d'inflammation cGAS-STING. Dissout dans le DMSO, nous l'utilisons à une concentration de 10 µg/mL dans les puits de trophoblastes et de fibroblastes. Les cellules sont ensuite récoltées à différents temps selon la technique désirée. Pour la visualisation des protéines d'intérêt par immunofluorescence, les cellules sont récoltées 45 minutes post-traitement. Pour la mesure de l'activité des gènes associés à la voie d'inflammation cGAS-STING par la RT-qPCR, les cellules sont récoltées 2 heures post-traitement<sup>100-103</sup>.

L'ISD-90 est constitué d'une séquence de dinucléotide de 90 paires de bases. Il est reçu sous forme lyophilisée. Nous recevons une séquence dans le sens 3'-5' ainsi que son complément inverse. Nous devons les suspendre dans du PBS stérile à une concentration de 10 µg/µL chacune pour ensuite hybrider les

séquences ensemble. Le tout nous donne une solution contenant la séquence de dinucléotide de 90 paires de bases à une concentration de 1 µg/µL. Afin de procéder à la transfection, nous utilisons un milieu de transfection OPTIMEM (10% du volume total), avec l'agent de transfection Lipofectamine-2000. Les cellules sont ensuite récoltées à différents temps selon la technique désirée. Pour la visualisation des protéines d'intérêt par immunofluorescence, les cellules sont récoltées 90 minutes post-traitement. Pour la mesure de l'activité des gènes associés à la voie d'inflammation cGAS-STING par la RT-qPCR, les cellules sont récoltées 6 à 8 heures post-traitement<sup>100-103</sup>.

#### 1.6.1.4 RT-qPCR

La RT-qPCR permet de mesurer l'activité des gènes associés à la voie d'inflammation cGAS-STING à partir de l'ARN extrait de nos différents échantillons. Nous procédons à l'extraction d'ARN avec le GENEzol™ TriRNA Pure Kit (*Geneaid*) et à la transcription inverse avec le *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*.

Pour les cellules du placenta, celles-ci sont préalablement traitées et mises sur plaque, avant d'être lysée avec le tampon de lyse. De l'éthanol 70% (ratio 1 :1 avec tampon de lyse) est ensuite ajouté à chaque échantillon de lysat avant que ce dernier soit transféré sur une colonne de silice, qui possède une affinité avec les acides nucléiques faisant en sorte que ceux-ci y adhèrent. Après des étapes de rinçage de la colonne, on procède ensuite à une dégradation de l'ADN possiblement contaminant sur les colonnes avec un traitement à base de DNase.

Il vient ensuite d'autres étapes de rinçage avant de procéder à l'éluion des colonnes. La concentration d'ARN de chaque échantillon ainsi que sa pureté sont mesurées. Les échantillons d'ARN obtenus sont alors convertis en ADNc par une réaction de RT. À partir de ces échantillons d'ADNc, nous mesurons l'activité des gènes d'intérêt par qPCR.

La trousse que nous utilisons pour procéder à la qPCR est la suivante : le SensiFAST™ SYBR No-ROX (*meridian bioscience*). Chaque échantillon est mesuré en duplicata, et le gène de référence que nous avons utilisé est le gène TBP. Afin d'analyser l'expression relative à chacun des gènes, nous utilisons la technique du  $\Delta\Delta Ct$ <sup>104</sup>.

#### 1.6.1.5 Microscopie confocale

Les cellules sont préalablement mises en culture sur des plaques de 24 puits contenant une lamelle au fond de chacun des puits. Les trophoblastes et fibroblastes sont ensuite traités avec le DMXAA ou l'ADN. Après le délai d'attente post-traitement, les cellules sont lavées avec du PBS (200 uL/puit) puis incubées pour 15 minutes dans du PFA (*Paraformaldehyde*) 4% afin de subir une fixation. Les cellules sont ensuite rincées délicatement au PBS. Par la suite, celles-ci subissent une étape de perméabilisation de leur membrane cellulaire en incubant 5 minutes dans une solution (0,2% TRITON PBS), une étape de blocage avec une solution de PBS (0.1% TRITON 1% BSA). Nous procédons ensuite à l'immunomarquage des différentes protéines d'intérêt : cytokératine-7 afin de

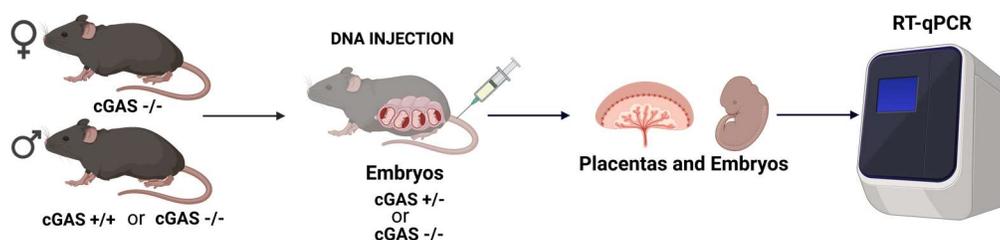
vérifier la pureté des trophoblastes, cGAS, p-STING, l'actine ainsi que DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole).

## **1.6.2 *Modèle in vivo***

### *1.6.2.1 Investigation in vivo de la voie d'inflammation cGAS-STING*

Comme il n'y avait pas encore de modèle de recherche pour étudier les effets de la voie d'inflammation cGAS-STING dans le placenta, nous avons fouillé dans la littérature afin d'en générer un par nous-même. La prémisse de base du modèle que nous avons élaboré est qu'une souris cGAS *knock-out* est théoriquement dans l'incapacité d'engendrer une réponse de la voie inflammatoire cGAS-STING lors d'une exposition à l'ADN. Ainsi, une mère gestante cGAS *KO* qui se verrait exposée à une stimulation à l'ADN ne devrait pas avoir de réaction inflammatoire à celle-ci. La deuxième prémisse du modèle est qu'en accouplant une femelle cGAS *KO* avec un mâle cGAS *WT*, les souriceaux obtenus auraient un génotype cGAS hétérozygote, permettant ainsi une réponse inflammatoire en réaction à l'ADN. La troisième prémisse du modèle est qu'en exposant des souriceaux cGAS +/- portés par une mère cGAS *KO* à de l'ADN, une réponse inflammatoire de la voie d'inflammation cGAS-STING proviendrait nécessairement des souriceaux, dû au fait que la mère serait dans l'incapacité d'engendrer cette réponse.

Ainsi, nous avons accouplé des femelles cGAS KO avec des mâles WT ou KO, pour obtenir des souriceaux cGAS KO ou cGAS +/- que nous avons ensuite stimulé avec de l'ADN par une injection dans la veine de la queue de la mère (figure 8).



**Figure 8 : Méthode de stimulation in vivo développée pour investiguer la voie d'inflammation cGAS-STING dans les souriceaux et placentas murins.**  
Figure créée sur biorender.com

#### 1.6.2.2 Injection intra-veineuse d'ADN

Quelques études sur le transfert de certains gènes aux embryons ont été effectuées en procédant à une injection d'ADN plasmidique au niveau de la veine de la queue de la mère gestante<sup>105,106</sup>. L'utilisation de l'agent de transfection FUGENE6 (*Promega*) pour l'injection a permis le succès de transfert génétique transplacentaire. Également, certaines études portant sur les effets de l'activation d'une réponse interféron pendant le développement embryonnaire de la souris ont procédé à l'injection intra-veineuse au niveau de la veine de la queue de la mère gestante pour stimuler une réponse inflammatoire. Cette technique a été effectuée notamment avec l'injection de poly I:C (Acide polyinosinique-polycytidylique), simulant une infection bactérienne qui a permis d'observer une augmentation du taux de résorption des embryons<sup>72</sup>. En ce moment, il n'y a pas

de littérature connue d'injection d'ADN dans la veine de la queue dans le but de vérifier la réponse inflammatoire ou encore la fonctionnalité de la voie cGAS-STING.

Cela dit, nous nous sommes basés sur ces travaux précédents afin d'établir un protocole d'injection d'un complexe d'ADN/FUGENE6 dans une solution de PBS dans la veine de la queue de nos souris gestantes. Le volume total injecté dans la veine de la queue est de 200  $\mu$ L. Nous avons non seulement procédé à des tests d'innocuité sur des souris du même génotype que nos futures mères gestantes afin de nous assurer que celles-ci ne répondent pas à une stimulation à l'ADN (via le ISD90) mais également nous avons vérifié quelle dose la plus grande d'ADN il serait possible d'injecter. L'importance de la vérification de la dose maximale d'ADN pouvant être injectée relève principalement du fait que la proportion d'ADN qui se rendra au placenta ne sera fort probablement pas de 100% étant donné qu'elle transite par la circulation sanguine. Il est également à noter que des doses de 50  $\mu$ g d'ADN ont été répertoriées pour causer des problèmes de santé majeurs chez les femmes WT<sup>106</sup>. Voici donc les différentes injections testées lors de ces tests d'innocuité sur les femelles cGAS KO:

- 1) 50  $\mu$ L FUGENE 6 + PBS
- 2) 50  $\mu$ L FUGENE 6 + 50  $\mu$ g ADN
- 3) 50  $\mu$ L FUGENE 6 +150  $\mu$ g ADN
- 4) 50  $\mu$ L FUGENE 6 +300  $\mu$ g ADN

Les souris cGAS KO injectées ne démontrant pas de signe de réponse inflammatoire, la dose de 300 µg d'ADN a été déterminée comme dose d'injection pour les expériences subséquentes. La solution contrôle utilisée est composée de l'agent de transfection FUGENE 6 dans le PBS.

La solution d'injection est préparée de manière stérile, le jour même de l'injection. Elle est ensuite transférée dans une seringue 1mL avec aiguille 25G. Avant de débiter le processus d'injection, les souris sont pesées sur une balance. Elles sont ensuite chauffées avant d'être déposée dans un tube de contention, qui fait en sorte de les immobiliser pour diminuer les risques de blessures au moment de l'injection. Dans les heures qui suivent le traitement, l'état des souris est évalué sur une base régulière afin de s'assurer que celles-ci ne démontrent pas de signe de détresse, lequel mènerait à une euthanasie immédiate. Les échantillons de placentas et d'embryons sont prélevés selon le délai de prélèvement post-injection (soit 24 h ou 10 h). Au moment de la récolte des échantillons, nous prélevons le sang de la mère gestante, puis nous procédons à la dislocation cervicale afin de s'assurer de son décès. Nous ouvrons ensuite l'abdomen et prélevons les fœtus, en notant leur nombre ainsi que leur position par rapport aux cornes utérines. Ceux-ci sont ensuite immédiatement déposés dans un pétri sur glace pour être ramenés au laboratoire. Une fois au laboratoire, les placentas et les embryons sont divisés selon les trois options suivantes :

- 1) Les échantillons servant à la RT-qPCR sont placés dans des tubes 1,7ml contenant de la solution de stabilisation d'ARN *RNAlater (ThermoFisher)* puis placés à -20 degrés Celsius.
- 2) Des échantillons sont fixés dans la PFA 4% afin de pouvoir procéder à de l'immunohistochimie dans une étape ultérieure du projet.
- 3) Les autres échantillons sont directement placés à -80 degrés Celsius afin de les conserver le mieux que possible dans le but d'analyses ultérieures.

### 1.6.2.3 RT-qPCR

Les échantillons sont décongelés et la solution de stabilisation d'ARN est retirée des tubes. Ils sont ensuite transférés dans un autre microtube contenant 700µL de tampon de lyse GENEZOL (*Geneaid*), broyés à la main à l'aide d'un micropilon stérile puis passés à travers une aiguille 22G une dizaine de fois afin d'homogénéiser la solution. Nous procédons ensuite à l'extraction d'ARN avec la trousse *Geneaid*. Les concentrations d'ARN ainsi que la pureté de chaque échantillon est mesurée à l'aide de l'appareil Nanodrop et les échantillons d'ARN sont ensuite convertis en ADNc avec la trousse *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*. Les échantillons d'ADNc sont ensuite ajoutés aux mélanges contenant le SensiFAST™ SYBR No-ROX (*Meridian Bioscience*) ainsi que les amorces des gènes que nous désirons mesurer par qPCR. Les réactions sont effectuées sur des plaques de 96 puits où chaque échantillon est dupliqué, puis la lecture se fait dans la machine CFX100 (*BIO-RAD*). L'expression relative des gènes associés à la voie d'inflammation cGAS-

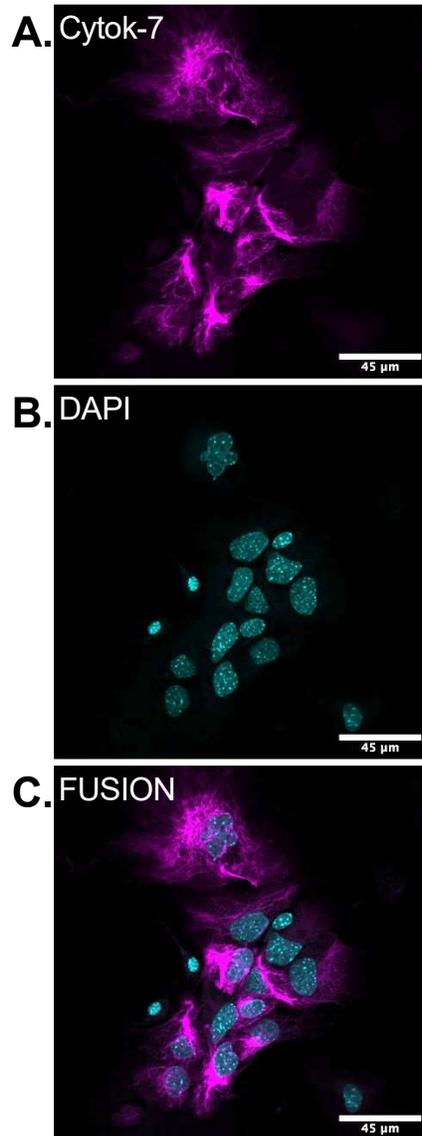
STING est mesurée par la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , et le test statistique appliqué pour leur comparaison est le test t de Welch avec le logiciel Prism10.1(*Graphpad*)

## **CHAPITRE 2**

### **INVESTIGATION EX VIVO DE LA VOIE cGAS-STING**

#### **2.1 Trophoblastes primaires murins**

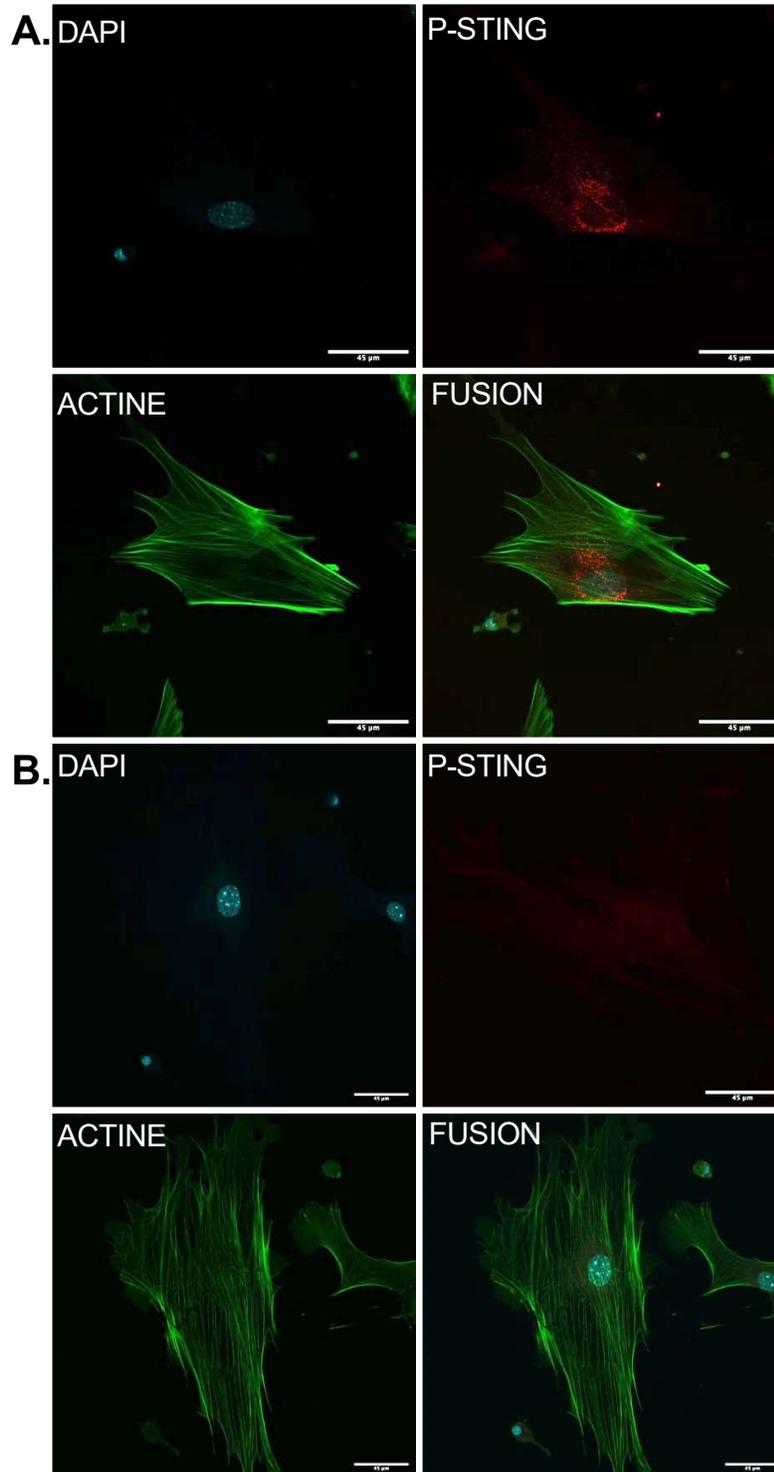
En commençant ce projet sur l'investigation de la voie d'inflammation cGAS-STING dans le placenta, c'était la première fois que notre laboratoire explorait ce qui est relié à la reproduction. Le modèle à l'étude ainsi que le protocole d'isolation des cellules issues du placenta étaient à établir et perfectionner, sujet auquel je reviendrai lors de la discussion. À chaque isolation de trophoblastes faite, nous avons procédé à une coloration à la cytokératine-7 ainsi qu'au DAPI par immunofluorescence. Ces images nous ont non seulement servi à confirmer l'isolation du bon type cellulaire, mais également à nous assurer de ne pas avoir de populations cellulaires contaminantes avec les cellules isolées. Les images de la prochaine figure (figure 9) constituent des images représentatives de populations trophoblastiques obtenues lors de nos isolations de trophoblastes.



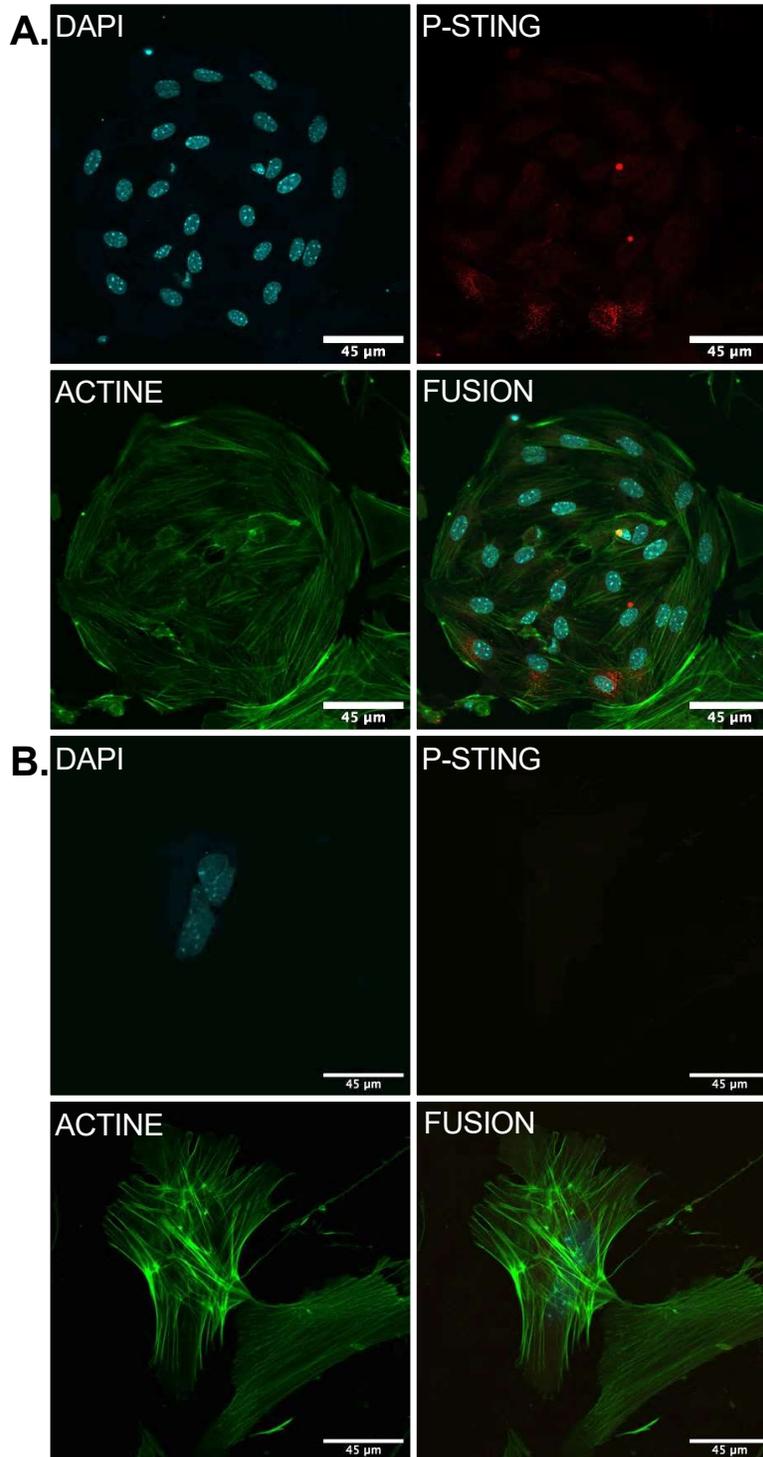
**Figure 9 : Test de confirmation d'isolation trophoblastique par imagerie confocale.** A. Filaments de Cytokératine 7 (cytok-7); B. Noyaux colorés avec DAPI; C. Superposition des deux images.

Les noyaux des cellules sont marqués en bleu avec DAPI, les filaments intermédiaires de cytokératine-7 sont en rose. La colocalisation des deux signaux ensemble nous indiquent que ces cellules sont des trophoblastes, certaines cellules semblant avoir plus d'un noyau. Cela peut être attribué au fait que parmi les trophoblastes que nous avons isolés, certains ont formé des syncytiums.

Notre premier objectif était de déterminer si les protéines cGAS et STING étaient exprimées chez les trophoblastes. Afin d'optimiser les étapes des objectifs, nous avons procédé à l'imagerie confocale de la forme active de STING, p-STING. Non seulement la détection de signal dans les cellules permettrait de montrer la présence même de cette protéine adaptatrice, mais elle permettrait également de vérifier la fonctionnalité de la protéine dans ces cellules. Ainsi, nous avons procédé à l'imagerie de trophoblastes de souris *WT* traités au DMXAA ainsi que son contrôle non traité (figure 10) puis des trophoblastes ayant été transfectés à l'ADN ainsi que leur contrôle qui est la LIPOFECTAMINE 2000 (figure 11).

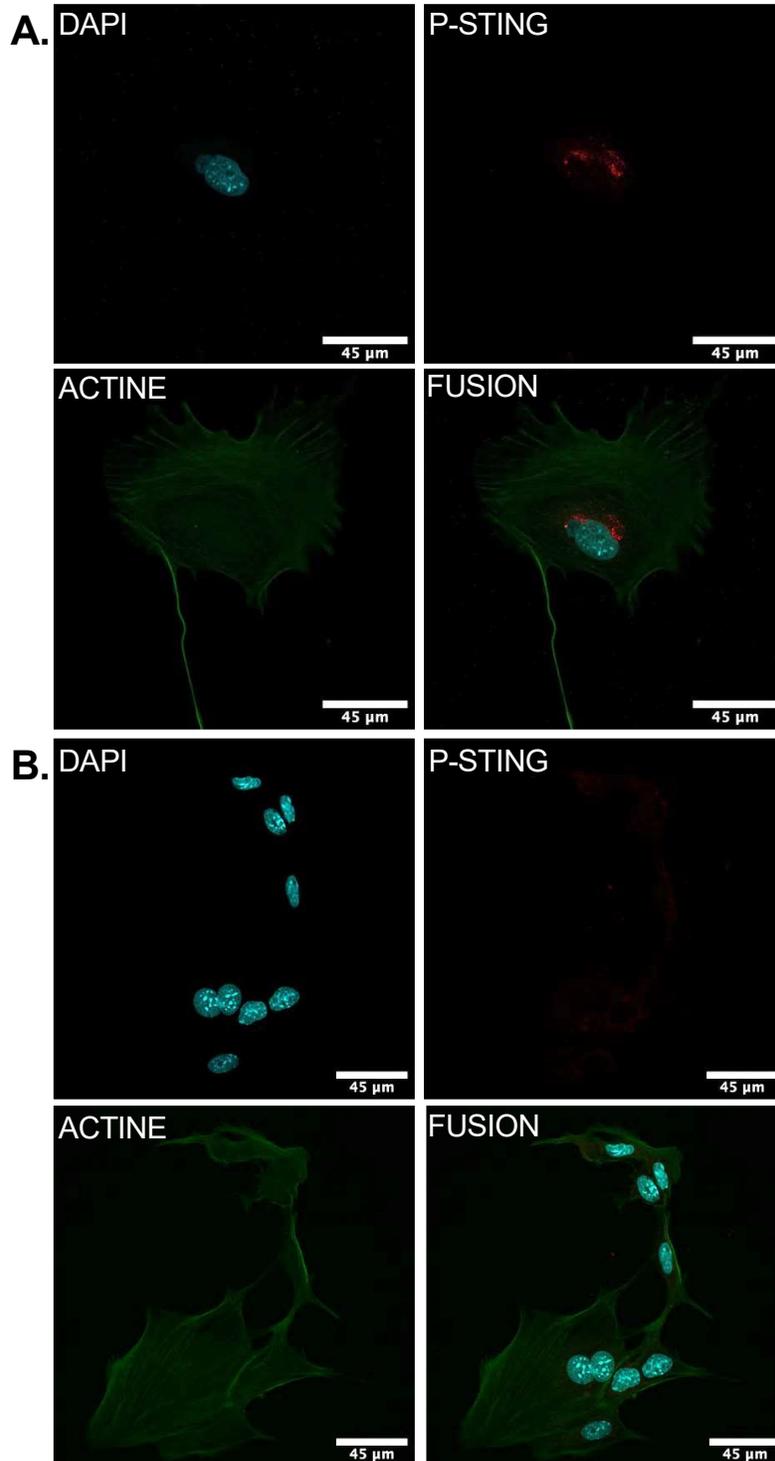


**Figure 10 : Imagerie confocale de p-STING dans des trophoblastes de souris *WT* traités au DMXAA ainsi que leurs contrôles non traités A. Traitement au DMXAA. Noyaux marqués avec DAPI, p-STING marqué avec Alexa-555 et corps d'actine marqué à la Phalloïdine 488; B. Contrôles non traités. L'immunomarquage est le même qu'en a). n=3**



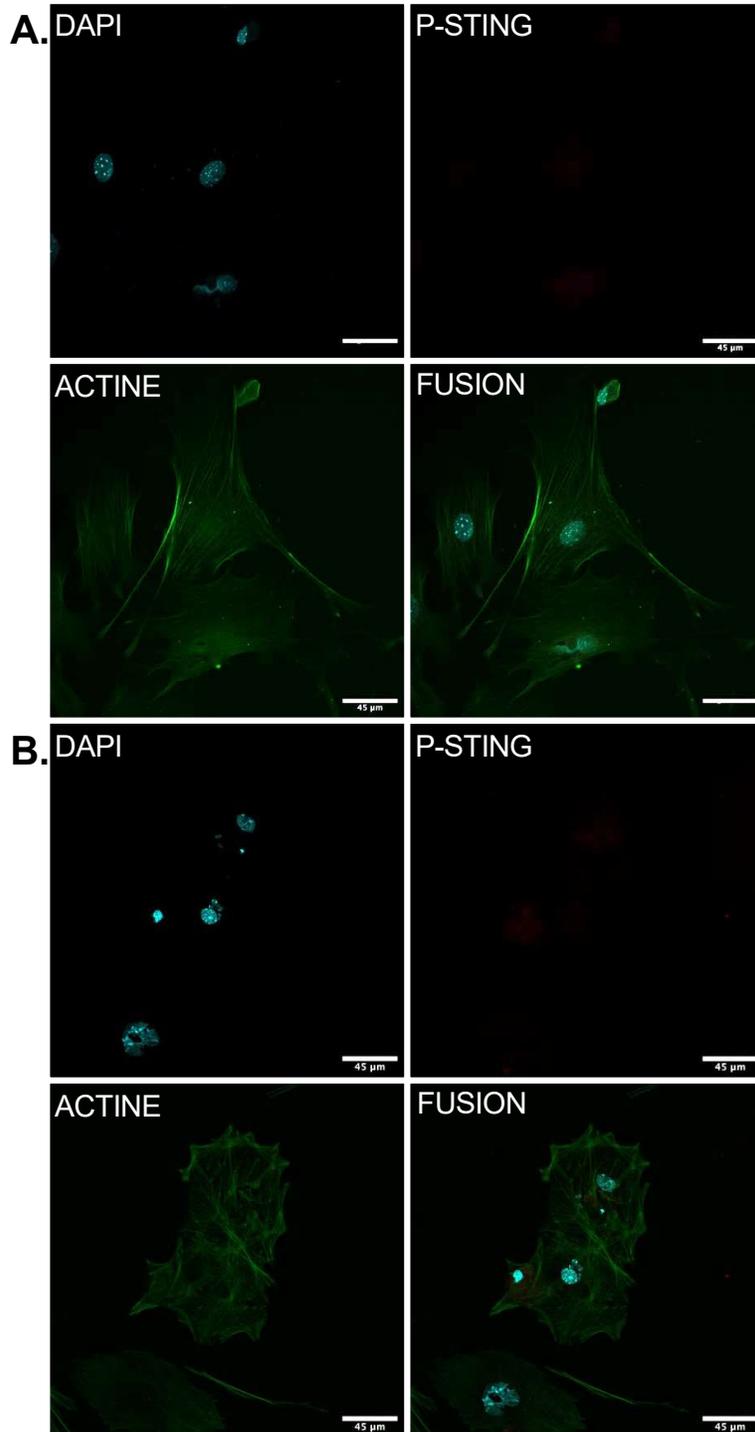
**Figure 11 : Imagerie confocale de p-STING dans des trophoblastes de souris *WT* transfectés à l'ADN ainsi que leurs contrôles traités à la Lipofectamine 2000. A. Traitement à l'ADN. Noyaux marqués avec DAPI, p-STING marqué avec Alexa-555 et corps d'actine marqué à la Phalloïdine 488; B. Contrôles traités avec Lipofectamine 2000. L'immunomarquage est le même qu'en a). n=3**

Les figures ci-dessous sont représentatives de ce que nous avons observé au microscope. La détection de foyers de signal rouge en périphérie du noyau dans les cellules de trophoblastes traitées au DMXAA et à l'ADN nous indique la présence de p-STING. Lorsque STING est activé, il transite vers l'appareil de Golgi. L'absence de signal dans les contrôles de nos traitements vient également contribuer à renforcer nos conclusions que non seulement la protéine STING est présente dans les trophoblastes primaires et mais qu'elle peut aussi être activée donc fonctionnelle. Parallèlement, nous avons effectué les mêmes traitements et procédé aux mêmes marquages, cette fois-ci avec des cellules de trophoblastes primaires provenant de souris *cGAS knock-out*. Cette fois-ci, nous avons pu observer des foyers de signal de la protéine p-STING que chez les trophoblastes traités avec l'agoniste de STING (DMXAA) tel qu'il est possible de constater à la figure 12. Ainsi, nous n'avons pas observé de détection de p-STING pour la transfection à l'ADN figure 13.



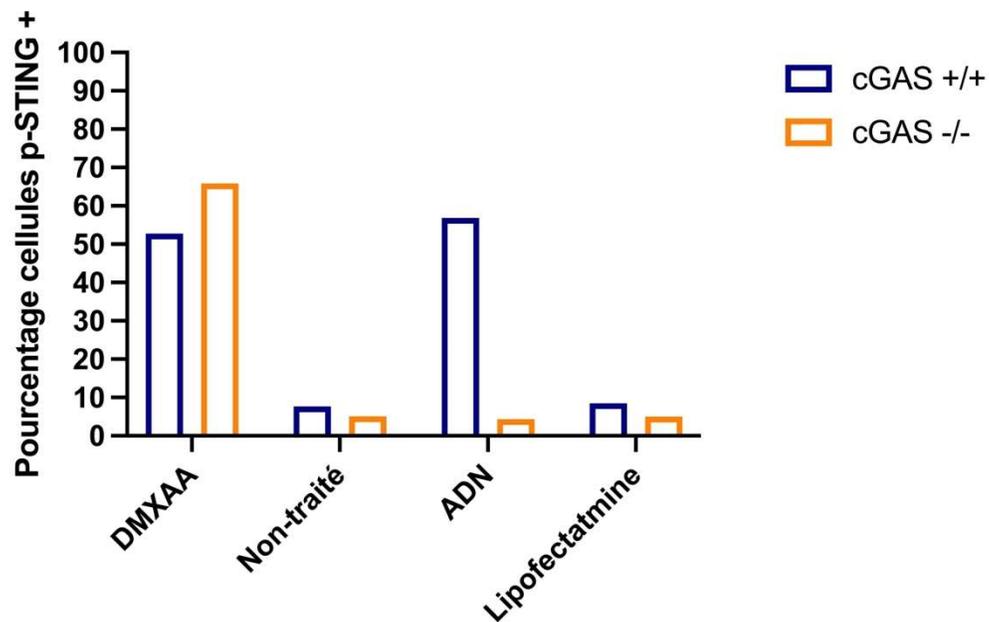
**Figure 12 : Imagerie confocale de p-STING dans des trophoblastes de souris cGAS KO traités au DMXAA ainsi que leurs contrôles non traités.**

A. Traitement au DMXAA. Noyaux marqués avec DAPI, p-STING marqué avec Alexa-555 et corps d'actine marqué à la Phalloïdine 488; B. Contrôles non traités. L'immunomarquage est le même qu'en A. n=3



**Figure 13 : Imagerie confocale de p-STING dans des trophoblastes de souris cGAS KO transfectés à l'ADN ainsi que leurs contrôles traités à la Lipofectamine 2000. A. Traitement à l'ADN. Noyaux marqués avec DAPI, p-STING marqué avec Alexa-555 et corps d'actine marqué à la Phalloïdine 488; B. Contrôles traités avec Lipofectamine 2000. L'immunomarquage est le même qu'en a). n=3**

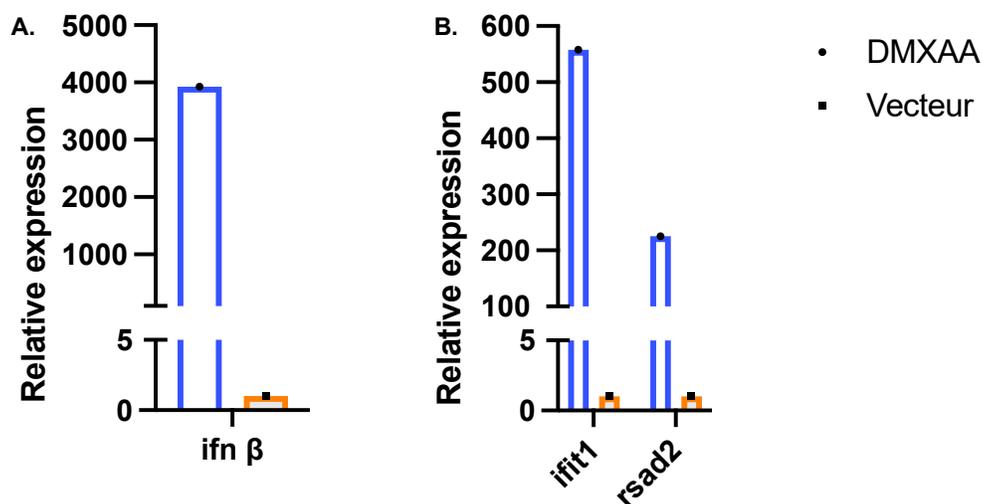
Ces résultats, lorsque combinés avec ceux précédents, nous suggèrent que malgré la dysfonction du détecteur d'ADN cGAS dans les trophoblastes cGAS<sup>-/-</sup>, la protéine STING demeure fonctionnelle. Cela semble nous indiquer également que la réponse observée chez les trophoblastes *WT* par suite d'une transfection à l'ADN transiterait nécessairement par une activation de cGAS. Cela concorde avec les résultats de la figure 14, où l'on peut voir les pourcentages de cellules ayant émis un signal de p-STING lorsqu'observées au microscope confocal.



**Figure 14 : Pourcentage de cellules de trophoblastes observées au microscope confocal ayant émis un signal pour la protéine p-STING selon les différents traitements d'activation de la voie cGAS-STING.** En bleu se retrouvent les valeurs de cellules WT tandis que les valeurs de cellules cGAS KO se retrouvent en orange. (Pour les cellules WT analysées au microscope DMXAA n=36 non traitées n=39 ADN n=51 et Lipofectamine n=35. Pour les cellules cGAS KO analysées au microscope DMXAA n=44 non traitées n=39 ADN n=68 et Lipofectamine 2000 n=60.)

En effet, les trophoblastes traités au DMXAA présentent des valeurs plus élevées autant chez les souris *WT* que les *cGAS KO* tandis que la transfection à l'ADN ne présente pas d'augmentation pour les cellules *cGAS KO*.

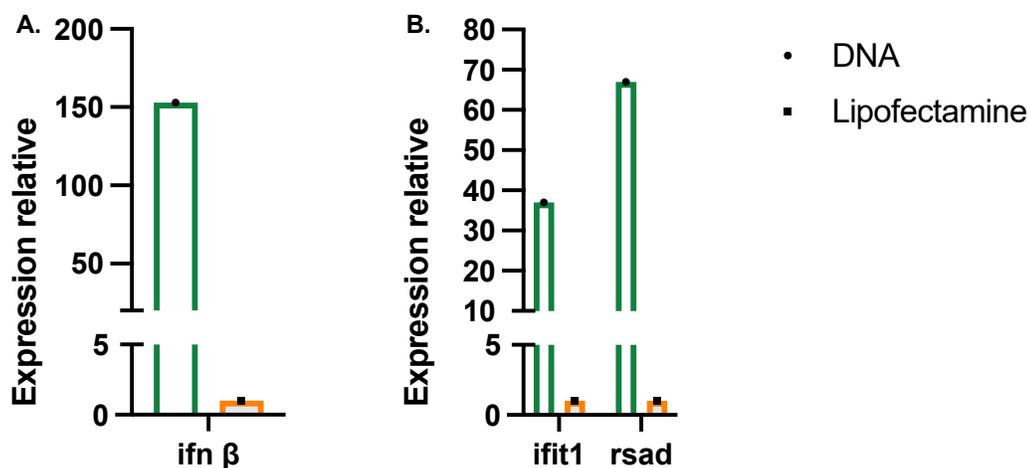
Pour conclure l'objectif 2 qui est de vérifier la fonctionnalité de la voie *cGAS-STING* dans les trophoblastes placentaires murins, nous sommes ensuite allés mesurer l'activités de gènes reliés à la voie d'inflammation suivant les traitements au DMXAA et la transfection d'ADN. Nous avons mesuré l'activité du gène *ifn $\beta$* , un interféron de type 1 ainsi que d'*ifit1* et *rsad2*, qui sont deux ISGs. Tel que possible d'observer à la figure 15, le traitement au DMXAA a induit des augmentations pour les trois gènes mesurés par rapport à son contrôle.



**Figure 15 : Expression relative de gènes reliés à la voie *cGAS-STING* chez des trophoblastes primaires issus de souris *WT* suivant un traitement au DMXAA. A. *ifn $\beta$*  ; B. *Ifit1* et *rsad2* (ISGs). Expression relative calculée avec la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , rapportée sur le gène TBP. n=1**

Pour *Ifn $\beta$*  (15A) on parle d'une augmentation relative aux alentours de 4000 fois, 600 fois pour *ifit1* et près de 200 fois pour *rsad2* (15B). Pour ce qui a trait de la

transfection d'ADN, un patron d'activation similaire a été observé (figure 16). En effet, on parle d'une augmentation relative d'aux alentours de 150 fois pour le gène *Ifn $\beta$*  (16A) par rapport à son contrôle alors qu'il s'agit d'augmentation d'aux alentours de 500 fois pour *Ifit1* et 200 pour *rsad2* (16B).

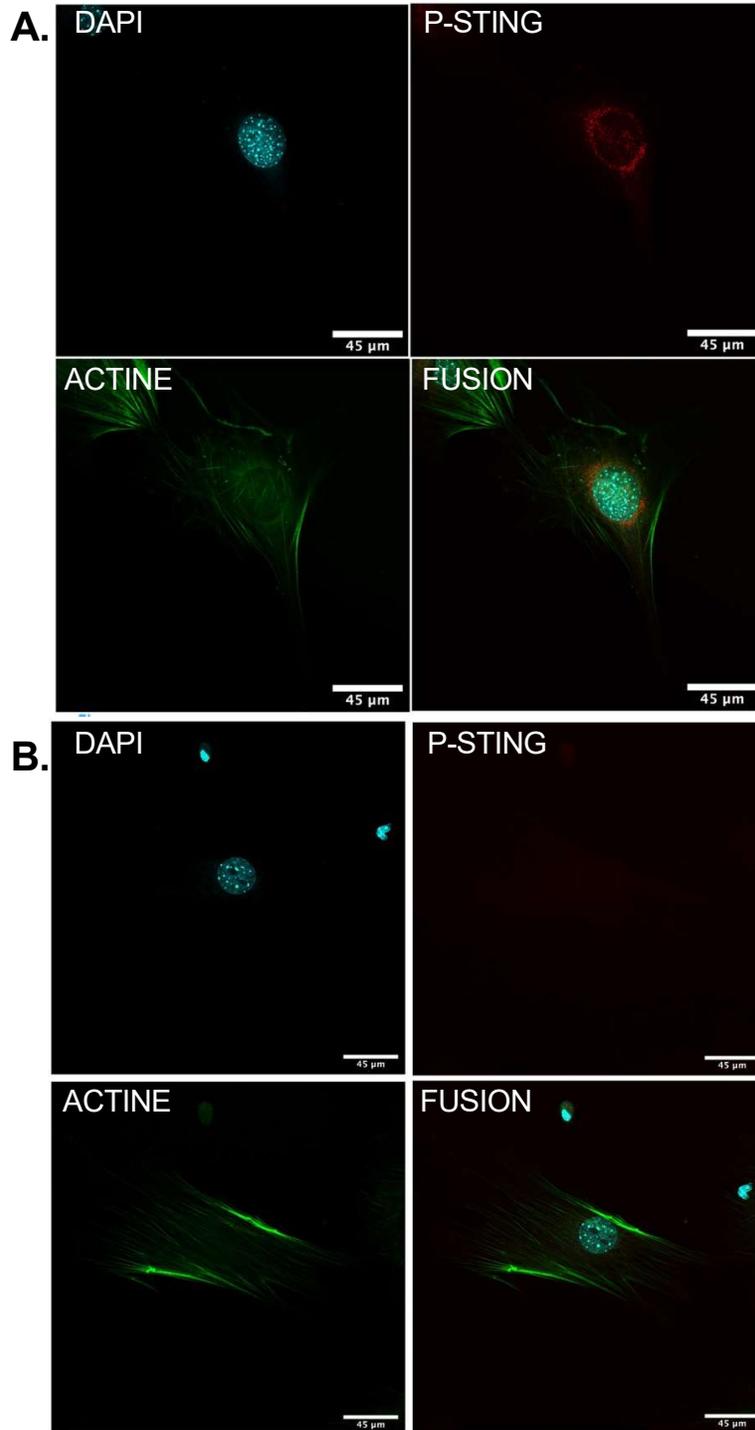


**Figure 16 : Expression relative de gènes reliés à la voie cGAS-STING chez des trophoblastes primaires issus de souris *WT* suivant une transfection à l'ADN. A. *ifn $\beta$*  ; B. *ifit1* et *rsad2* (ISGs) Expression relative calculée avec la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , rapportée sur le gène TBP. n=1**

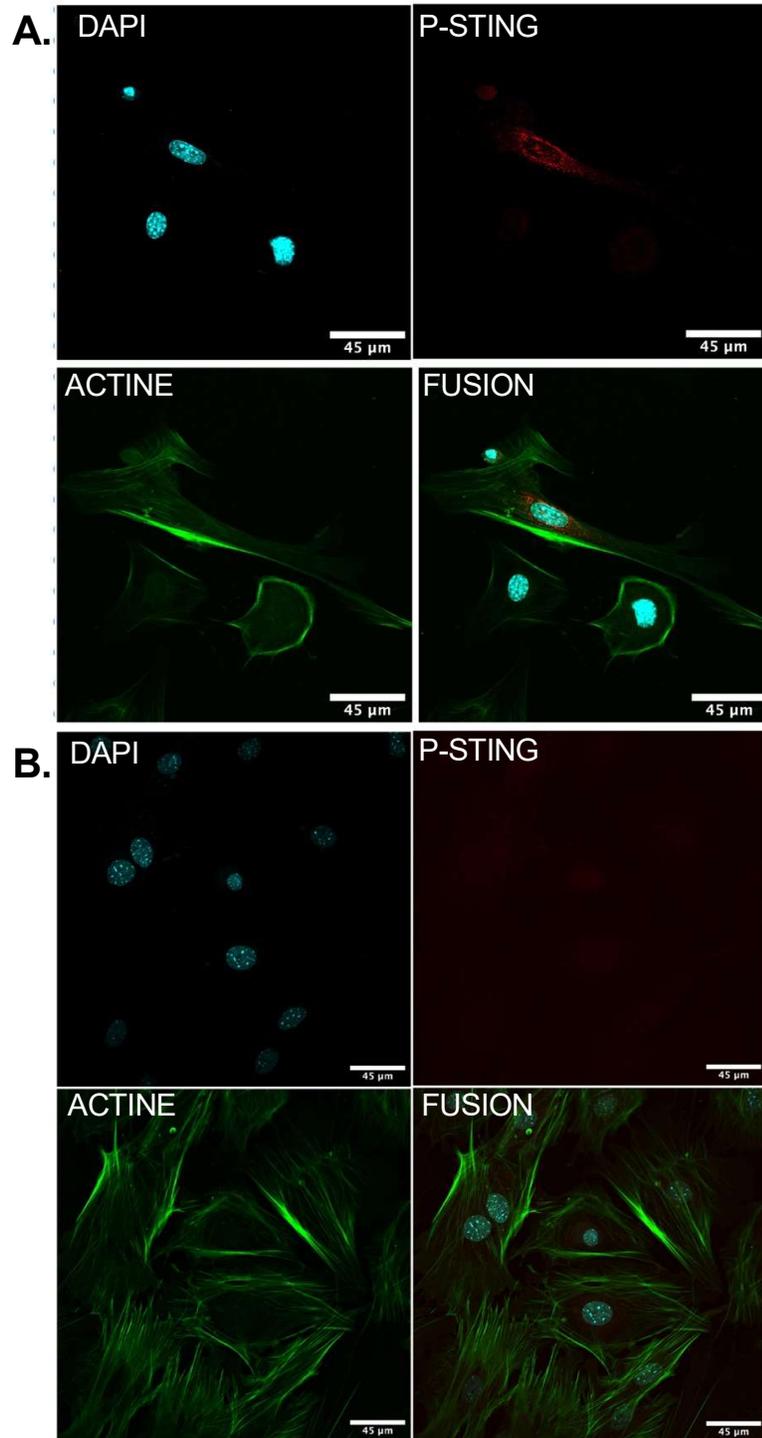
Bien que ces expériences n'aient été effectuées qu'une seule fois pour le moment (pour des raisons auxquelles je reviendrai dans la discussion), nous observons une tendance à une augmentation relative de l'activité des gènes reliés à la voie cGAS-STING lors de stimulation chez les trophoblastes. Ces expériences seront répétées lors de ma première année de doctorat mais celles-ci semblent tout de même nous indiquer que la voie d'inflammation cGAS-STING est activable dans les trophoblastes primaires.

## 2.2 Fibroblastes primaires placentaires murins

La seconde population cellulaire provenant de placentas que nous avons isolée est celle des fibroblastes. Pour répondre aux objectifs 3 et 4, qui étaient de vérifier que les protéines cGAS ainsi que STING étaient présentes au niveau de fibroblastes placentaires primaires et que la voie cGAS-STING était fonctionnelle, nous avons sensiblement effectué les mêmes expériences qu'avec les trophoblastes. Pour remplir l'objectif de déterminer si la protéine STING était exprimée chez les fibroblastes placentaires. Nous avons également procédé à l'imagerie confocale de la forme active de STING, p-STING. Non seulement la détection de signal dans les cellules permettrait de montrer la présence même de cette protéine adaptatrice, mais elle permettrait également de vérifier la fonctionnalité de la protéine dans ces cellules. Ainsi, nous avons procédé à l'imagerie de fibroblastes placentaires de souris *WT* traités au DMXAA ainsi que son contrôle non traité (figure 17) puis des fibroblastes ayant été transfectés à l'ADN) ainsi que leur contrôle qui est la LIPOFECTAMINE 2000 (figure 18).

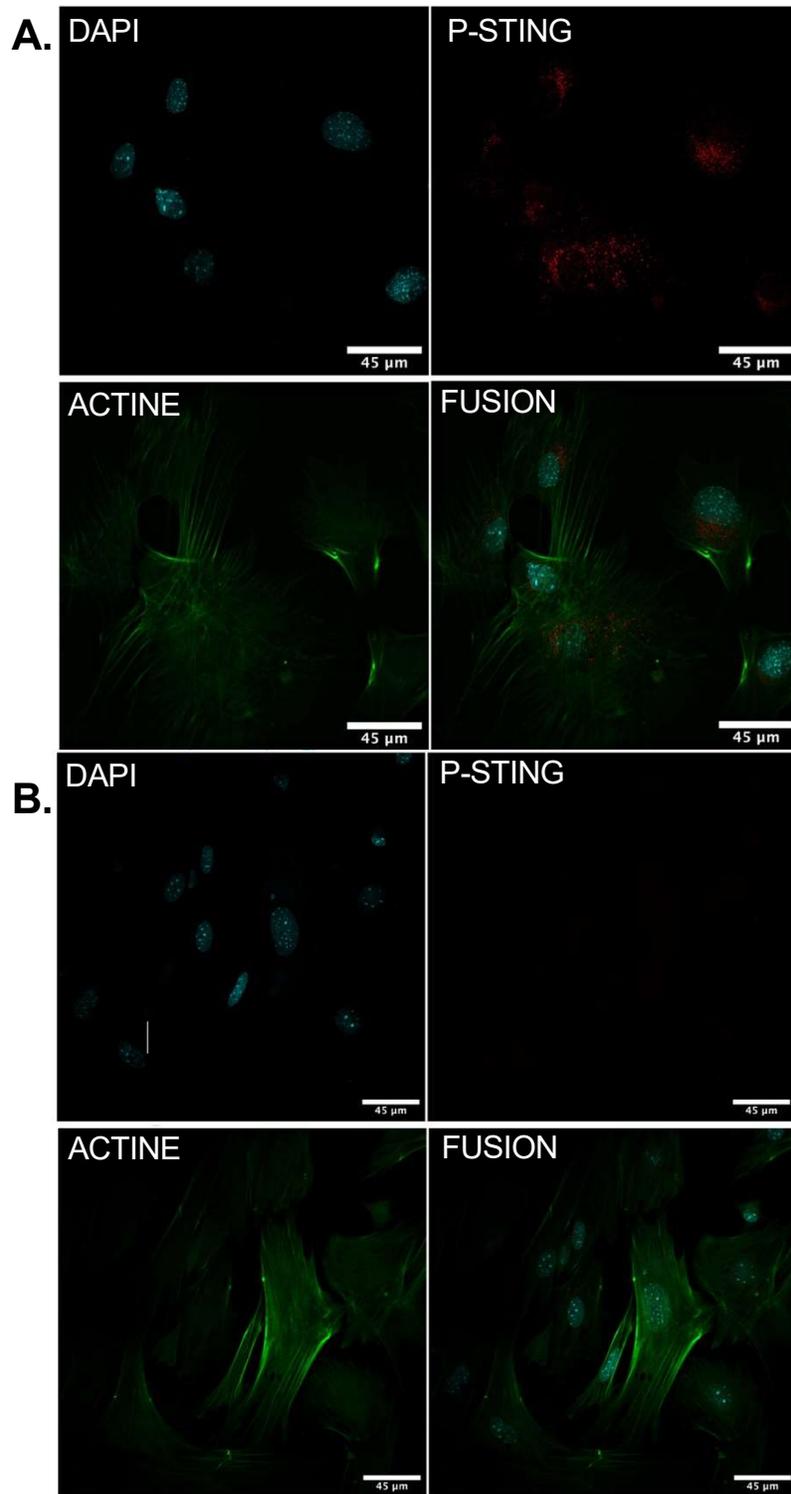


**Figure 17 : Imagerie confocale de p-STING dans des fibroblastes primaires placentaires de souris cGAS *WT* traités au DMXAA ainsi que leurs contrôles non traités. A. Traitement au DMXAA. Noyaux marqués avec DAPI, p-STING marqué avec Alexa-555 et corps d'actine marqué à la Phalloïdine 488; B. Contrôles non traités. L'immunomarquage est le même qu'en A. n=3**

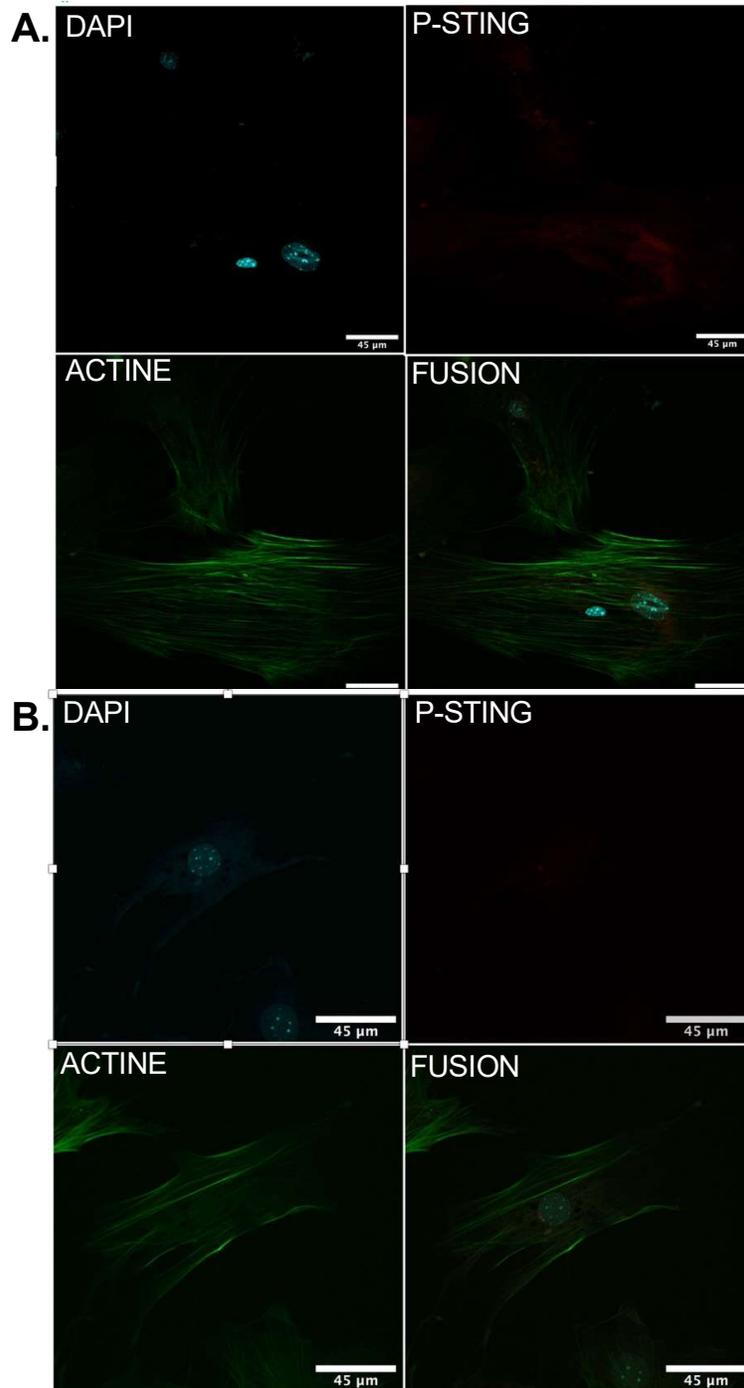


**Figure 18 : Imagerie confocale de p-STING dans des fibroblastes primaires placentaires de souris WT transfectés à l'ADN ainsi que leurs contrôles traités à la Lipofectamine 2000. A. Traitement à l'ADN. Noyaux marqués avec DAPI, p-STING marqué avec Alexa-555 et corps d'actine marqué à la Phalloïdine 488; B. Contrôles traités avec Lipofectamine 2000. L'immunomarquage est le même qu'en A. n=3**

Les figures ci-dessous sont représentatives de ce que nous avons observé au microscope. La détection de foyers de signal rouge en périphérie du noyau dans les cellules de fibroblastes placentaires traitées au DMXAA et à l'ADN nous indique la présence de p-STING. L'absence de signal dans les contrôles de nos traitements vient également contribuer à renforcer nos conclusions que non seulement la protéine STING est présente dans les fibroblastes placentaires primaires et mais qu'elle peut aussi être activée donc fonctionnelle. Parallèlement, nous avons effectué les mêmes traitements et procédé aux mêmes marquages, cette fois-ci avec des cellules de placenta provenant de souris *cGAS knock-out*. Cette fois-ci, nous avons pu observer des foyers de signal de la protéine p-STING que chez les trophoblastes traités avec l'agoniste de STING (DMXAA) tel qu'il est possible de constater à la figure 19. Ainsi, nous n'avons pas observé de détection de p-STING pour la transfection à l'ADN (figure 20).

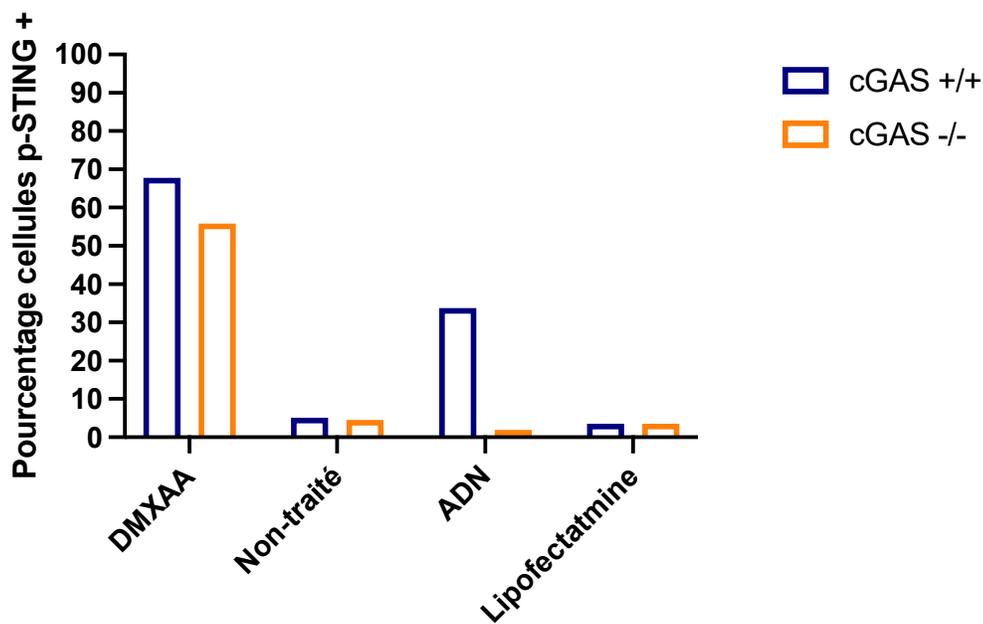


**Figure 19 : Imagerie confocale de p-STING dans des fibroblastes primaires placentaires de souris *cGAS KO* traités au DMXAA ainsi que leurs contrôles non traités. A. Traitement au DMXAA. Noyaux marqués avec DAPI, p-STING marqué avec Alexa-555 et corps d'actine marqué à la Phalloïdine 488; B. Contrôles non traités. L'immunomarquage est le même qu'en A. n=3**



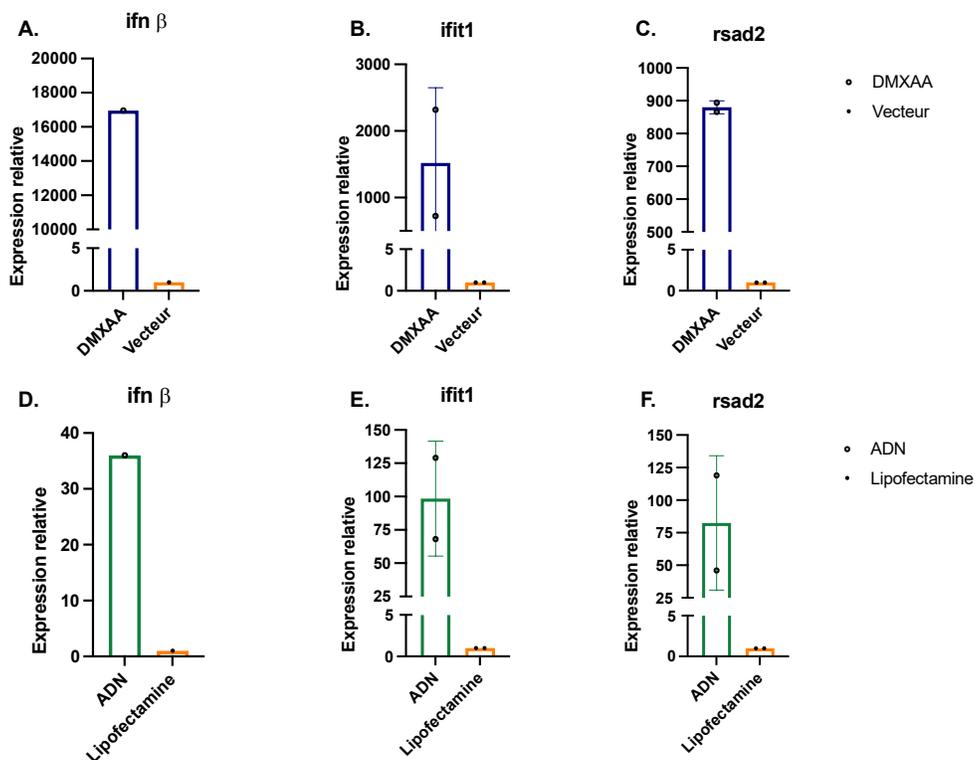
**Figure 20 : Imagerie confocale de p-STING dans des fibroblastes primaires placentaires de souris *cGAS KO* transfectés à l'ADN ainsi que leurs contrôles traités à la Lipofectamine 2000. A. Traitement à l'ADN. Noyaux marqués avec DAPI, p-STING marqué avec Alexa-555 et corps d'actine marqué à la Phalloïdine 488; B. Contrôles traités avec Lipofectamine 2000. L'immunomarquage est le même qu'en A. n=3**

Ces résultats, lorsque combinés avec les précédents, nous indiquent que la protéine STING demeure fonctionnelle dans les fibroblastes cGAS<sup>-/-</sup>. Cela nous indique également que la réponse observée chez les fibroblastes de placentas *WT* par suite d'une transfection à l'ADN transite nécessairement par une activation de cGAS. Cela corrobore également avec les pourcentages de cellules exprimant p-STING (figure 21) où encore une fois le DMXAA a engendré une réponse dans les deux types de fibroblastes, contrairement à la transfection d'ADN qui n'a pas activé de réponse dans les fibroblastes cGAS *knock-out*.

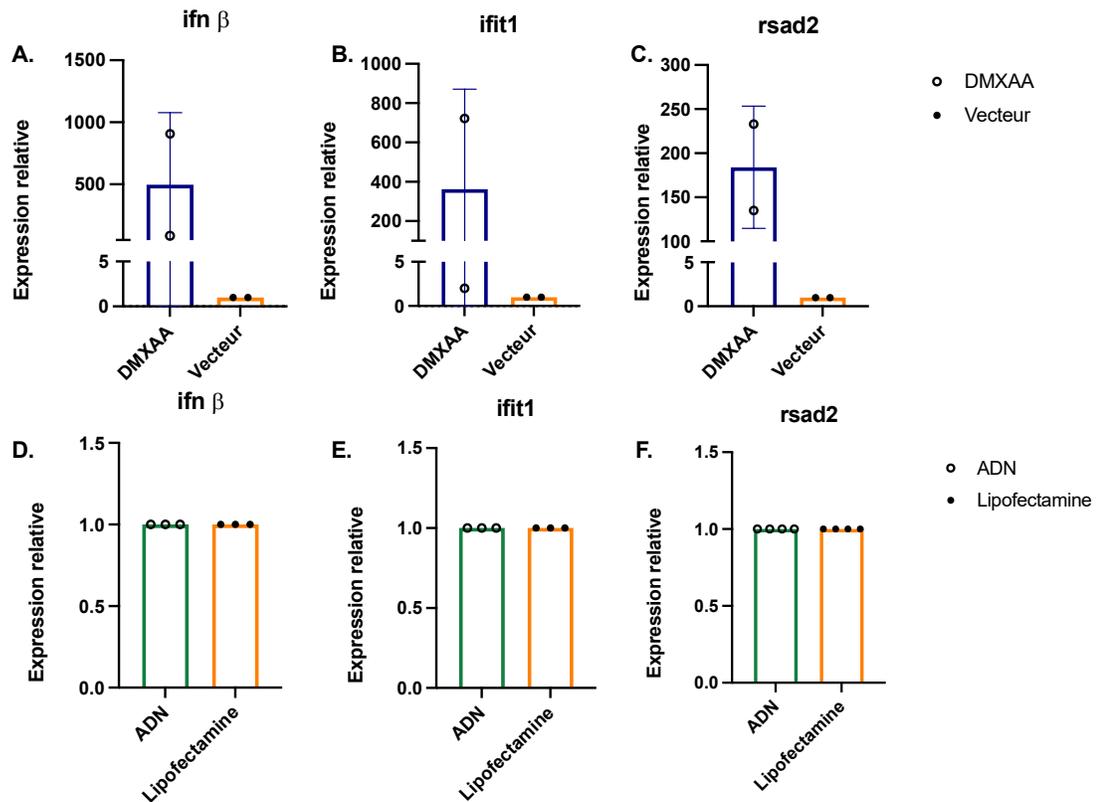


**Figure 21 : Pourcentage des cellules de fibroblastes placentaires observées au microscope ayant émis un signal pour la protéine p-STING selon les différents traitements d'activation de la voie cGAS-STING.** En bleu se retrouvent les valeurs de cellules cGAS WT tandis que les valeurs de cellules cGAS KO se retrouvent en orange. (Pour les cellules WT analysées au microscope DMXAA n=90 non traitées n=98 ADN n=68 et lipofectamine n=57. Pour les cellules cGAS KO analysées au microscope DMXAA n=34 non traitées n=44 ADN n=52 et Lipofectamine 2000 n=56).

Afin de vérifier que l'activation de STING que nous avons observé en microscopie se traduisant en réponse inflammatoire, nous avons effectué des traitements de stimulations de la voie cGAS-STING à des fibroblastes mis en culture. Nous avons encore une fois traité avec l'agoniste de STING, le DMXAA ainsi qu'avec une transfection d'ADN. Suivant ces traitements, nous avons procédé à l'extraction d'ARN avant de faire une RT-qPCR. Pour les fibroblastes placentaires de souris *WT*, nous avons observé une tendance d'augmentation relative des gènes *ifn $\beta$* , *ifit1* et *rsad2* après traitement au DMXAA et après la transfection à l'ADN (Figures 22 et 23).



**Figure 22 : Expression relative de gènes associés à la voie cGAS-STING dans des fibroblastes placentaires primaires de souris *WT* suivant une stimulation ex vivo.** A. Gènes *ifn $\beta$*  (n=1); B. *ifit1* (n=2); C. *rsad2* (n=2) après avoir un traitement à l'agoniste de STING DMXAA (2 h post-traitement); D.. Gènes *ifn $\beta$*  (n=1); E. *ifit1* (n=2); F. *rsad2* (n=2) suivant une transfection à l'ADN (6 h post-transfection). Expression relative calculée avec la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , rapportée sur le gène TBP.



**Figure 23 : Expression relative de gènes associés à la voie cGAS-STING dans des fibroblastes placentaires primaires de souris cGAS *KO* suivant une stimulation ex vivo.** A. Gènes ifnβ (n=2); B. ifit1 (n=2); C. rsad2 (n=2) après avoir un traitement à l'agoniste de STING DMXAA (2 h post-traitement); D.. Gènes ifnβ (n=3); E. ifit1 (n=3); F. rsad2 (n=3) suivant une transfection à l'ADN (6 h post-transfection). Expression relative calculée avec la méthode du  $\Delta\Delta Ct$ , rapportée sur le gène TBP.

Au niveau des fibroblastes placentaires de souris cGAS *knock-out*, une tendance d'augmentation des gènes ifnβ, ifit1 et rsad2 est observée pour donner suite au traitement par le DMXAA, toutefois, la transfection à l'ADN n'a pas engendré de réponse. Ces résultats nous semblent suggérer que la protéine STING demeure alors fonctionnelle malgré une dysfonction de cGAS. Sachant que la protéine STING demeure fonctionnelle dans les fibroblastes placentaires de souris cGAS

*KO* et que la transfection d'ADN ne semble pas induire de réponse inflammatoire, ces résultats tendent à nous montrer que la réponse observée chez les fibroblastes placentaires de type *WT* est conditionnelle à une activation de cGAS par l'ADN. Ces expériences seront également à conclure au début de mon doctorat également mais nous sommes confiants de pouvoir les reproduire.

Avec l'ensemble des résultats obtenus dans notre investigation de la voie cGAS-STING chez les fibroblastes placentaires primaires, nous tendons à conclure que non seulement que les protéines cGAS et STING sont exprimées mais que la voie d'inflammation cGAS-STING est fonctionnelle. Ce qui tend à répondre aux objectifs 3 et 4 émis plus tôt.

## CHAPITRE 3

### INVESTIGATION IN VIVO DE LA VOIE cGAS-STING DANS LE PLACENTA MURIN

Comme il n'existait pas de modèle d'investigation in vivo de la voie cGAS-STING dans un contexte de développement, nous avons dû en développer un. Tel que mentionné plus tôt, nous avons développé un modèle où une mère gestante cGAS *knock-out* est mise en reproduction avec un mâle cGAS *WT* ou *knock-out*. Ainsi, nous pouvons étudier les réponses différentes de souriceaux cGAS<sup>+/-</sup> et cGAS<sup>-/-</sup>. La prémisse de ce modèle était que les mères gestantes cGAS *knock-out* n'auraient pas de réponse inflammatoire cGAS-STING suivant une injection d'ADN dans la veine de la queue. Nous avons donc procédé à des tests d'innocuité pour vérifier la validité de cette prémisse. Nous avons procédé à l'injection de souris femelles non gestantes avec différentes doses d'ADN (50 µg, 150 µg et 300 µg) ainsi que notre agent de transfection, puis nous avons suivi leur état physique pendant 72 heures. Nous nous sommes assurés qu'elles ne démontrent aucun signe de détresse, de réaction inhabituelle ou de détérioration. Leurs réflexes, leur taux d'hydratation, leurs comportements et leur poids ont été observés. Comme il est mentionné dans la figure 24A, il n'y a pas eu de variation de poids inhabituelle remarquée ni signe de détresse au cours de ces 72 heures. Au bout de ces trois jours post-injection, nous avons prélevé le sang et isolé les leucocytes desquelles nous avons extrait l'ARN. Nous avons ensuite conduit des

RT-qPCR de gènes reliés à la voie cGAS-STING et nous n'avons pas observé de marqueur de réponse inflammatoire (figure 25). Ces résultats nous ont permis de passer à l'étape suivante qui était de procéder à l'injection chez des mères gestantes.

La première série d'injection d'ADN dans les mères gestantes s'est effectuée avec des mères au jour de développement E8,5. Nous avons récolté les échantillons 24 heures plus tard. À ce stade de développement, il est très difficile de séparer de manière efficace les placentas des souriceaux, voici pourquoi les échantillons analysés à la figure 25 sont un mélange de fœtus et de placentas. Les souriceaux cGAS<sup>+/-</sup> semblent avoir une légère augmentation d'expression du gène *Ifnβ* ainsi que *Ifnλ* comparativement à leur contrôle ainsi que par rapport aux souriceaux cGAS<sup>-/-</sup>.

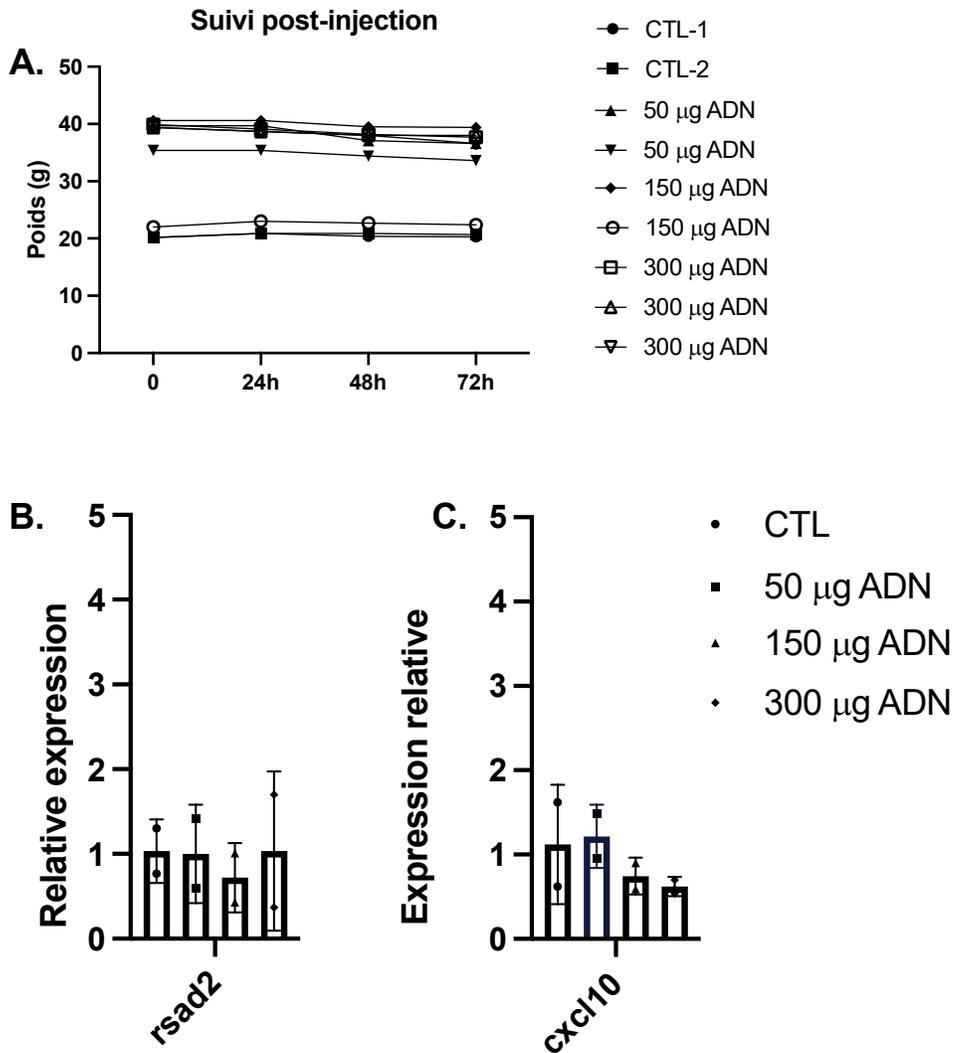
La deuxième série d'injection a été effectuée alors que les mères gestantes en étaient au jour 11,5 de grossesse. Nous avons encore récolté les échantillons 24 heures plus tard. Cette fois-ci, il a été possible de séparer les fœtus des placentas et ainsi mesurer leurs réponses séparément. Les résultats montrés à la figure 26 représentent l'expression relative des gènes *Ifnβ* et *Ifnλ* dans les souriceaux injectés à l'ADN de génotype cGAS<sup>+/-</sup> et cGAS<sup>-/-</sup>. Il semble y avoir une légère tendance à une augmentation de l'expression des gènes IFN chez les souriceaux +/- . À la figure suivante (figure 28) on y retrouve l'expression relative de *Rsad2* d'*Ifnλ* où il semble y avoir une possible réponse inflammatoire dans les placentas de souriceaux cGAS<sup>+/-</sup>. Les résultats de ces expériences nous ont

mené à changer nos délais de prélèvements, car nous pensions que le point culminant de la réponse devait se passer plus tôt que 24 heures post-injection.

Comme nous étions encore en train d'établir notre modèle, nous nous sommes questionnés à savoir si nous étions trop tard dans les délais de prélèvements afin de bien observer une réponse inflammatoire. Nous avons alors pris la décision de faire nos prélèvements d'échantillons entre 10 heures post-injection au lieu de 24 heures. Parmi les facteurs qui ont justifié cette décision est l'augmentation d'expression de *Rsad2* observée dans les placentas (figure 28). Comme une activation des ISGs est nécessairement après l'activation de l'interféron et considérant que *Rsad2* est un ISG, nous avons émis l'hypothèse que la réponse IFN à l'injection de l'ADN devait se faire plus tôt que le moment auquel nous vérifiions. Après une injection d'ADN dans la veine de la queue au jour 12 et une récolte des échantillons 10 h plus tard, nous avons été en mesure d'observer une augmentation de l'*Ifnβ* dans les placentas *cGAS*<sup>+/-</sup> par rapport à l'injection de vecteur FUGENE 6 (figure 29). Les résultats observés tendent aussi à montrer une augmentation de l'expression d'*Ifnλ* dans les placentas. Nous avons également mesuré l'activité de ISGs reliés à la voie *cGAS*-*STING* dans les mêmes échantillons (Figure 30). Il semble y avoir une tendance d'augmentation d'expression des gènes *Ccl5*, *Ccl8* et *Cxcl10* dans les placentas de souriceaux dont les mères ont été injectées à l'ADN. Il est à mentionner que les individus ayant une activité plus élevée des IFNs ne sont pas les mêmes que ceux dont l'activité des ISGs est plus élevée. Bien que plusieurs placentas ne semblent pas montrer d'activation, nous pensons qu'avec l'ajout d'un nombre égal de souris

ayant reçus l'injection contrôle permettraient potentiellement de confirmer plus qu'une tendance d'augmentation des ISGs dans les placentas de souris cGAS+/-

L'ensemble des résultats de ce volet d'expériences sur l'investigation de la voie cGAS-STING tend à nous montrer que le modèle que nous avons développé en injectant de l'ADN dans la veine de la queue de mères cGAS *knock-out* gestantes est opérationnel. Également, la réponse Ifn $\beta$  observée dans les placentas cGAS+/- 10 h post-injection nous suggère que le récepteur à l'ADN cGAS serait fonctionnel au niveau du placenta.



**Figure 24 : Résultats des tests d'innocuité de l'injection à l'ADN dans la veine de la queue de souris cGAS KO.** A. Suivi du poids (g) des souris injectées à l'ADN sur 72 heures. Les souris ont été pesées avant l'injection, ensuite à 24 h, 48 h et 72 h post-injection; BC. Expression relative des gènes liés à la voie cGAS-STING *rsad2* et *cxcl10* 72 h après injection d'ADN dans la veine de la queue. Expression relative calculée avec la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , rapportée sur le gène TBP.

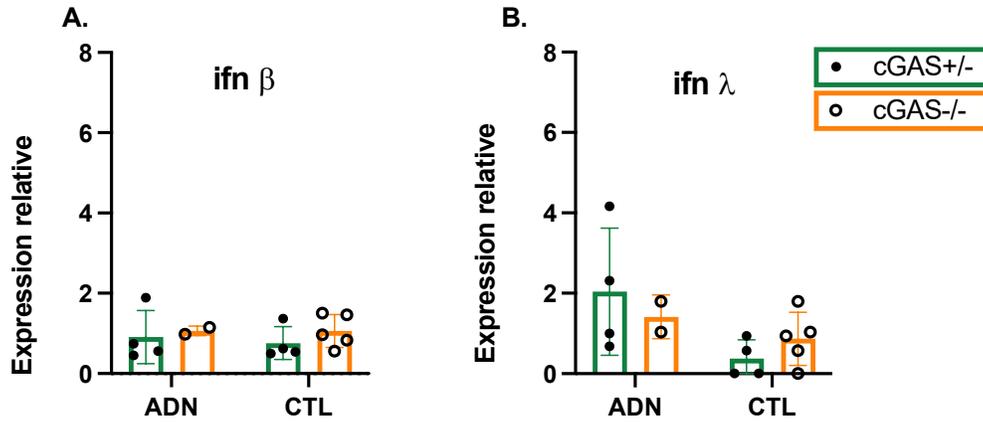


Figure 25 : Expression relative de gènes de l'IFN-I et IFN-III dans échantillons de souriceaux au jour de développement E8.5, après prélèvement des tissus 24h post-injection d'ADN dans la veine de la queue de la mère. A. *ifnβ*; B. *ifnλ*; Expression relative calculée avec la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , rapportée sur le gène TBP.

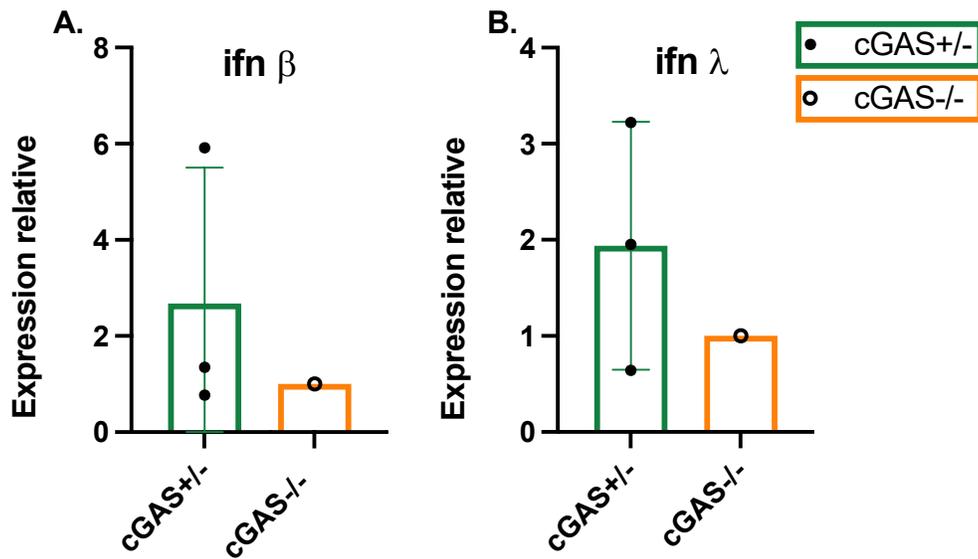


Figure 26 : Expression relative de gènes de l'IFN-I et IFN-III dans échantillons de fœtus au jour de développement E11.5, après prélèvement des tissus 24h post-injection d'ADN dans la veine de la queue de la mère. A. *ifnβ* ; B. *ifnλ*.; Expression relative calculée avec la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , rapportée sur le gène TBP.

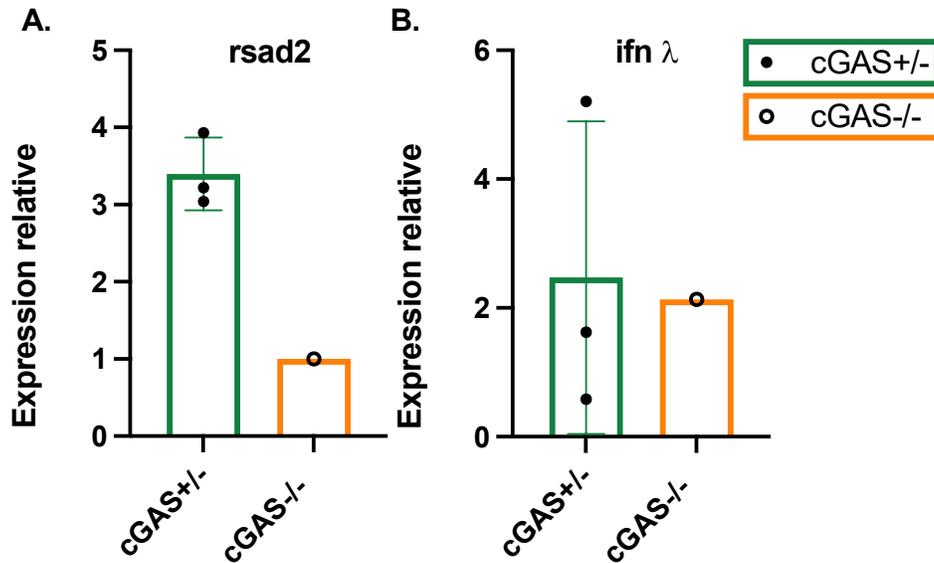


Figure 27 : Expression relative de gènes de l'IFN-I et IFN-III dans échantillons de placentas de souriceaux au jour de développement E11,5, après prélèvement des tissus 24h post-injection d'ADN dans la veine de la queue de la mère. a) *Rsad2*; b) *Ifnλ*. Expression relative calculée avec la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , rapportée sur le gène TBP.

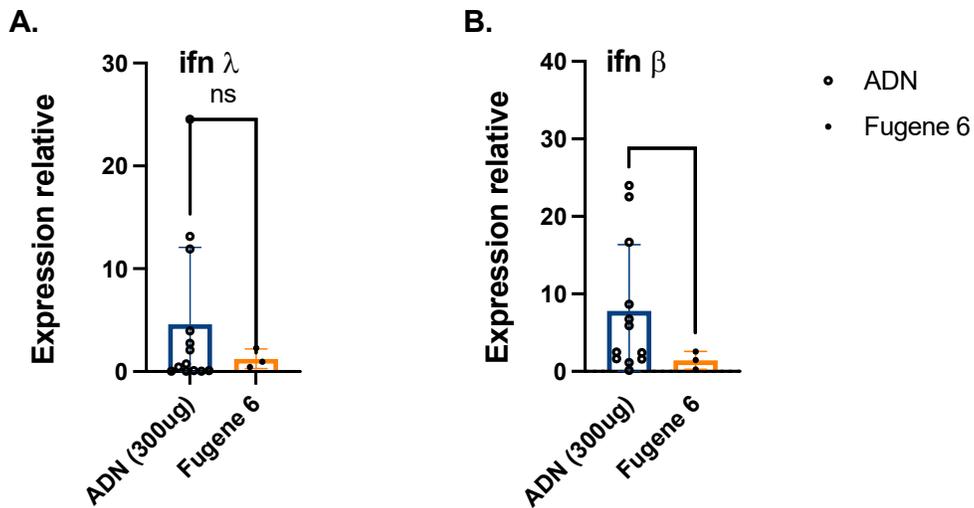
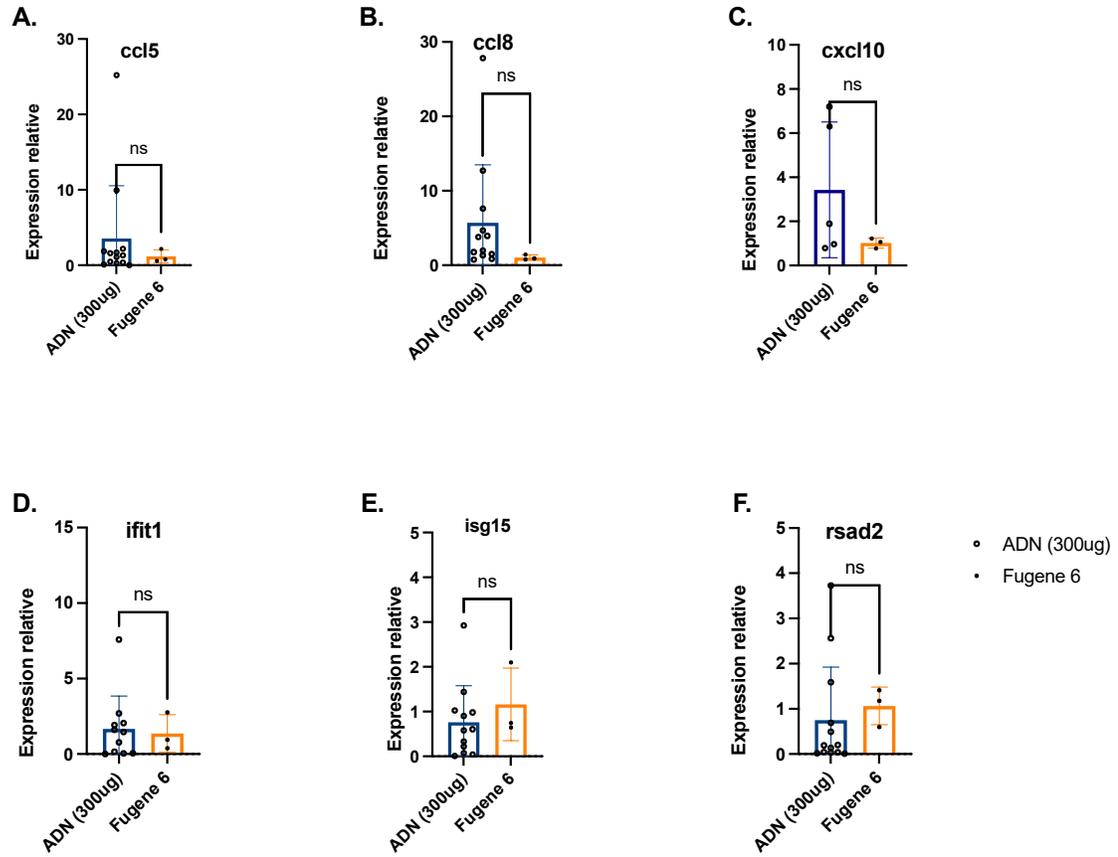


Figure 28 : Expression relative des gènes d'IFN-I (*Ifnβ*) et IFN-III (*Ifnλ*) dans des placentas d'embryons de souris au jour E12 de développement dont les mères ont reçu une injection d'ADN dans la veine de la queue. A. *ifnλ*, 10 h post-injection; B. *ifnβ*, 10 h post-injection. Expression relative calculée avec la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , rapportée sur le gène TBP. ( $p^* < 0,05$ ) (placentas de mères gestantes injectées à l'ADN  $n=12$ , injection contrôles  $n=3$ ).



**Figure 29 : Expression relative d'ISGs reliés à la voie cGAS-STING dans des placentas d'embryons de souris au jour E12 de développement dont les mères ont reçu une injection d'ADN dans la veine de la queue. A. ccl5, 10 h post-injection ; B. ccl8, 10 h post-injection ; C. cxcl10, 10 h post-injection ; D. ifit1, 10 h post-injection ; E. isg15, 10 h post-injection ; F. rsad2, 10 h post-injection. Expression relative calculée avec la méthode du  $\Delta\Delta C_t$ , rapportée sur le gène TBP. (Placentas de mères gestantes injectées à l'ADN n=12, injection contrôles n=3).**

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

L'objectif global de la première portion du projet était d'investiguer la présence de la voie cGAS-STING dans le placenta. Notre laboratoire travaillait déjà sur la voie cGAS-STING, ce qui nous donnait déjà accès aux souris cGAS *KO* et leur contrôle *WT* pour notre modèle. Voilà pourquoi nous avons choisi d'établir un protocole d'isolation des trophoblastes et fibroblastes à partir de placentas de souris.

Le développement et le perfectionnement d'un nouveau protocole est un bon défi en soi. Plusieurs éléments sous-jacents à ce volet de projet étaient nouveaux pour moi. Dans un laps de temps relativement court, j'ai appris à faire le suivi des souris gestantes, à faire la dissection du placenta et à isoler les cellules voulues. Plusieurs défis étaient en place et il y a eu beaucoup de recherche de solutions qui ont été effectuées. Tout d'abord, nous avons dû nous ajuster en termes de nombre de souris gestantes par isolation cellulaire. Pour être en mesure d'identifier le culot et trophoblastes après l'ultracentrifugation à 30 000 x g, il faut un minimum de 10 placentas. Cependant, en travaillant avec le vivant, nous n'avons pas le contrôle sur la grosseur des portées obtenues. Nous nous sommes alors ajustés en ayant un minimum de deux souris gestantes par isolation, nous permettant ainsi d'être en mesure de bien identifier les trophoblastes isolés.

Également, la quantité de matériel cellulaire contenu dans chaque isolation était limitée, ce qui a fait en sorte que nous nous sommes contenus à un nombre de gènes relativement bas à mesurer par RT-qPCR. Voilà aussi une des raisons pour lesquelles nous avons opté pour la technique d'immunofluorescence pour commencer. En effet, cette technique nous a permis de procéder à notre investigation le temps d'optimiser le protocole, car même avec peu de cellules, il était quasiment toujours possible de pouvoir faire les expériences de microscopie. Ces défis ont été grandement formateurs et ont contribué à développer mon sens de l'organisation et de l'autonomie, étant le seul membre du laboratoire à travailler avec les placentas de souris.

Les deux premiers objectifs étaient de vérifier que les cellules de trophoblastes expriment les protéines cGAS et STING ainsi que de vérifier que la voie d'inflammation peut être activée dans celles-ci. Les images obtenues par microscopie confocale nous ont permis d'observer cGAS dans les trophoblastes. Le signal observé est plus au niveau du noyau que du cytoplasme, mais en vérifiant dans la littérature, il n'est pas anormal que le signal y soit plus fort. En effet, lorsque les cellules sont en division, il y a une migration de la protéine cGAS afin de protéger l'ADN<sup>107</sup>. Cela peut faire en sorte d'observer cGAS au niveau du noyau, cela nous suggère alors que nos observations ne représentent pas un cas isolé. Ensuite, le fait que nous soyons limités en quantité de matériel a fait en sorte que nous avons optimisé l'investigation de STING en utilisant une stimulation et en procédant au marquage de p-STING, sa forme activée. Le traitement au DMXAA et la transfection d'ADN nous ont permis d'observer la

forme active de STING dans les trophoblastes de souris *WT*. Dans les trophoblastes de souris cGAS *knock-out*, seul le traitement au DMXAA a permis l'observation de p-STING. De ces résultats peuvent être tirées deux tendances, la première étant que la protéine STING est présente et fonctionnelle dans les trophoblastes. La deuxième tendance qu'on peut déduire est que l'activation observée chez les trophoblastes *WT* avec la transfection d'ADN semble être conditionnelle à la détection d'ADN par cGAS, comme tend à le confirmer l'absence de p-STING dans les trophoblastes cGAS *knock-out* transfectés. Nous avons procédé à l'extraction d'ARN suivi d'une RT-qPCR afin de tenter de confirmer de manière quantifiable nos observations d'activation de la voie cGAS-STING dans les trophoblastes. Ainsi, nous avons traité des trophoblastes *WT* avec le DMXAA et effectué une transfection d'ADN. Les résultats que nous avons jusqu'à maintenant corroborés ce qui a été vu en microscopie, dans le sens où il y a une augmentation relative de l'expression des gènes *Ifn $\beta$* , *Rsad2* et *Ifit1*. De l'ensemble des résultats acquis avec les trophoblastes primaires, nous déduisons que les protéines cGAS et STING sont présentes et que la voie cGAS-STING semble être fonctionnelle dans ces cellules issues de placentas. Cela tend à répondre aux deux premiers objectifs que nous avons déterminés.

Parallèlement à l'investigation dans les trophoblastes, nous avons procédé aux mêmes expériences *in vitro* avec les fibroblastes placentaires primaires dans le but de répondre aux objectifs 3 et 4. Les images obtenues par microscopie confocale à la suite du marquage par immunofluorescence de la protéine cGAS nous ont permis de déduire que celle-ci était exprimée dans les fibroblastes du

placenta. Ensuite, nous avons procédé au traitement des cellules avec le DMXAA et à des transfections d'ADN préalablement au marquage de la forme active de STING, p-STING. Nous avons donc été en mesure d'observer des foyers de signal dans les fibroblastes placentaires *WT* stimulés au DMXAA et à l'ADN. Le traitement au DMXAA a également permis l'observation d'une activation de STING dans les fibroblastes placentaires cGAS *knock-out*, ce qui n'a pas été le cas pour la transfection d'ADN. De ces résultats peuvent être tirées deux tendances, la première étant que la protéine STING est présente et fonctionnelle dans les fibroblastes placentaires. La deuxième tendance qu'on peut déduire est que l'activation observée chez les fibroblastes placentaires *WT* avec la transfection d'ADN semble être conditionnelle à la détection d'ADN par cGAS, comme tend à le confirmer l'absence de p-STING dans les cellules cGAS *knock-out* transfectés.

Afin de vérifier que ces tendances se traduisent également au niveau d'expression des gènes, nous avons mesuré l'activité des gènes *Ifn $\beta$*  ainsi que des ISGs *Ifit1* et *Rsad2* dans les fibroblastes placentaires de souris *WT* et cGAS *knock-out*. Nous avons été en mesure d'observer une augmentation de l'expression des gènes *Ifn $\beta$* , *Ifit1* et *Rsad2* dans les deux types de fibroblastes lorsque ceux-ci ont été traités au DMXAA. Cela nous indique que malgré la dysfonction de cGAS dans les fibroblastes placentaires de souris cGAS *knock-out*, la protéine STING elle, demeure fonctionnelle. Cependant, seule la transfection d'ADN chez les cellules issues de placentas *WT* a engendré une augmentation des gènes reliés à la voie cGAS-STING. Sachant que la protéine

STING semble demeurer fonctionnelle dans les fibroblastes placentaires cGAS *knock-out*, l'absence de réponse inflammatoire par suite de la transfection tend à nous indiquer que la réponse observée dans les cellules *WT* serait conditionnelle à l'activation préalable de cGAS. Les résultats de notre investigation dans les fibroblastes placentaires primaires tendent à nous permettre d'affirmer que non seulement ceux-ci semblent exprimer les protéines cGAS et STING, mais que la voie d'inflammation cGAS-STING semble y être fonctionnelle. Ce qui tend à nous permettre de répondre à nos objectifs 3 et 4.

Avec les résultats obtenus indiquant que le voie cGAS-STING semble être présente dans les cellules isolées à partir de placentas de souris lors de stimulation *in vitro*, nous voulions aller investiguer la voie de façon *in vivo*. Nous avons d'abord développé notre modèle. Des études avaient déjà montré que l'injection d'ADN plasmidique via la veine de la queue pouvait permettre le transfert génétique aux embryons de souris<sup>105,106</sup>. Également, d'autres travaux avaient utilisé l'injection de poly I :C pour induire une réponse IFN (via TLR3)<sup>108</sup> mais l'injection d'ADN pour étudier la voie cGAS-STING dans le placenta n'avait pas été faite. Nous voulions aussi nous assurer qu'une réponse observée serait due à une réponse fœtale et non maternelle. Voilà comment nous en sommes arrivés au modèle de femelles cGAS *knock-out* accouplées avec un mâle du même génotype ou *wild type*. Ainsi, comme la mère ne répond pas à une stimulation de cGAS par l'ADN, une réponse observée dans le placenta et les souriceaux vient donc forcément de ceux-ci. L'établissement d'un nouveau modèle comporte son lot de défis, le principal défi dans notre cas étant le suivi et

la confirmation de gestation. En effet, dans les premiers blocs d'expériences, il nous est arrivé à quelques reprises que les souris sur lesquelles nous avons observé des bouchons muqueux n'étaient pas gestantes. En collaboration avec le personnel de l'animalerie, nous avons trouvé une manière pour raffiner notre suivi de gestation, qui consiste à faire le suivi du poids des souris à partir du moment où il y a détection d'un bouchon muqueux. Depuis que nous avons apporté cette modification, nous avons grandement diminué le nombre de souris faussement gestante. Même que le suivi de poids nous a permis d'identifier des souris sur lesquelles nous n'avions pas observé de bouchon muqueux mais qui étaient gestantes elles-aussi.

Nous avons ainsi procédé aux injections de 300ug d'ADN dans l'agent de transfection FUGENE6 et du PBS à l'intérieur de la veine de la queue de mères gestantes. Nos premiers résultats semblaient monter une légère tendance d'augmentation d'expression des gènes de l'interféron de type 1 ( $IFN\beta$ ) et de type III ( $IFN\lambda$ ) ainsi que du gène *Rsad2* chez les souriceaux *cGAS*<sup>+/-</sup>. À ce moment, nous prélevons les souriceaux 24 h post-injection et comme il semblait avoir de légères augmentations des IFN et du ISG *Rsad2*, nous avons ajusté les délais de prélèvement afin de vérifier si la réponse était plus rapide qu'anticipé. Tel que mentionné dans le chapitre sur l'immunité innée, lorsqu'il y a une réponse de type IFN, il y a d'abord une augmentation d'expression des gènes d'IFN pour produire l'IFN lui-même, et cette production d'IFN amène à l'augmentation de l'expression des ISGs par la suite. Ainsi, l'augmentation d'expression des deux types de gène ne commence pas de manière simultanée. À partir de ce moment,

nous avons donc fait nos prélèvements de souriceaux 10 h post-injection. Avec ce délai de prélèvement, nous avons été en mesure d'observer une augmentation significative de l'expression d'Ifn $\beta$  dans les souriceaux cGAS $\pm$  ayant reçu de l'ADN par rapport à ceux qui n'avaient reçu que l'agent de transfection. Nous semblons également observer une tendance d'augmentation d'expression d'Ifn $\lambda$  ainsi que de certains ISGs (Ccl15, Ccl18 et Cxcl10). Une caractérisation des délais de réponse pourrait être intéressante à effectuer, afin de mieux comprendre comment la réponse interféron est organisée dans le temps. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant nous indiquent donc que l'injection d'ADN dans la veine de la queue de la mère gestante induit une réponse IFN dans les souriceaux, suggérant alors que le récepteur d'ADN cytosolique cGAS est fonctionnel dans le placenta.

Tel que mentionné plus tôt, une forte réponse IFN de type 1 au niveau du placenta est associée à des problèmes de santé et de développement du fœtus. Une forte réponse IFN peut même mener à l'induction d'un accouchement précoce<sup>73</sup>. Sachant que l'on peut induire une réponse Ifn $\beta$  dans les placentas dont la mère fut injectée à l'ADN, nous pourrions vérifier si l'injection en fin de grossesse pourrait induire le travail précoce de nos mère gestantes. Nous allons vérifier si l'injection d'ADN peut causer la résorption des fœtus cGAS $\pm$  ou encore induire des retards de croissance et développement tel qu'observé par Buchrieser et al lors d'injection au poly I:C<sup>72</sup>. La réponse de tendance d'augmentation de l'activité d'Ifn $\lambda$  que nous avons observé qui est moins grande que l'Ifn $\beta$  pourrait s'expliquer par le fait que les IFNs de type III tendent à avoir

une réponse moins intense mais qui s'échelonne sur plus de temps. Il serait possible qu'en faisant la cinétique de réaction  $\text{Ifn}\lambda$  nous observions le sommet de l'augmentation d'expression qui s'échelonne sur plus de temps que celui de l' $\text{Ifn}\beta$ .

L'activation de cGAS en contexte pathologique implique nécessairement de l'ADN en circulation comme celui-ci est un senseur d'ADN. Dans le cadre de nos expériences, celui-ci a été activé via la stimulation avec le ISD90 mais dans un contexte *in vivo*, celui-ci pourrait être activé par de l'ADN viral, bactérien ou à de l'ADN du soi en raison de dommages tissulaires et cellulaires de la mère ou du fœtus. L'activation de la voie cGAS-STING dans les placentas de mères souffrant d'un diabète gestationnel a été observé par Zhou et al. en raison de stress mitochondrial causé par le diabète<sup>109</sup>. Un contexte de prééclampsie pourrait potentiellement fournir des conditions favorables de stress mitochondrial et cellulaire qui permettraient une activation de la voie cGAS-STING via la détection d'ADN. Également, des conditions comme l'anémie de Fanconi, maladie où il y a des défauts de réparation de l'ADN, pourraient aussi potentiellement mener à une activation de cGAS en raison d'une instabilité génomique.

Également, il est à noter que ce ne sont pas tous les placentas de souriceaux de mères injectés à l'ADN qui ont répondu. Un des facteurs pouvant expliquer cela est que nos injections dans la veine de la queue doivent parcourir toute la circulation maternelle avant de parvenir au placenta, en passant

notamment par la veine caudale, le cœur et les poumons<sup>110</sup>. Nous ne connaissons pas encore la proportion d'ADN injectée qui se rend aux fœtus, ni si cet ADN est réparti de manière uniforme dans chaque placenta. Afin de répondre à ces deux questions, nous pourrions procéder à l'injection d'ADN avec un marqueur fluorescent comme la GFP pour observer la répartition de la fluorescence dans les placentas. Comme l'équipe de Nakamura et al. l'ont fait avec leur plasmide afin de vérifier le transfert de matériel génétique par injection dans la veine de la queue<sup>105</sup>.

## CHAPITRE 5

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Lorsque j'ai débuté ma maîtrise à l'automne 2021, le projet en était encore au stade de zygote. Nous savions que nous voulions caractériser la voie cGAS-STING dans les cellules du placenta mais nous ne savions pas encore si ces protéines y étaient exprimées. Nous ne savions pas non plus si la voie allait pouvoir être activée de façon *in vitro*, et l'avenue *in vivo* semblait encore bien loin. Donc nos résultats tendent à suggérer que :

- 1) Les trophoblastes primaires de souris semblent exprimer la protéine STING;
- 2) La voie cGAS-STING semble pouvoir être activée de manière *ex vivo* dans les trophoblastes;
- 3) Les fibroblastes placentaires primaires murins semblent exprimer la STING;
- 4) La voie cGAS-STING semble être fonctionnelle *ex vivo* dans les fibroblastes placentaires;
- 5) Nous avons établi un modèle d'investigation de la voie cGAS-STING *in vivo* et il semble que le récepteur cGAS est fonctionnel dans les placentas de souriceaux cGAS<sup>+/-</sup>.

Je terminerai alors ma maîtrise avec un projet qui a passé le stade d'implantation, et qui pourra croître durant le temps où j'effectuerai mes études doctorales, toujours sous la supervision de la professeure Geneviève Pépin. Quelques expériences seront à répéter par rapport à la stimulation *in vitro*, notamment des RT-qPCR des trophoblastes et fibroblastes, afin de valider les tendances que nous observons déjà. En complément de cela, nous irons également procéder à de l'immunohistochimie avec des coupes de placentas de souris *wild type* et *cGAS knock-out*. Nous avons également l'opportunité d'une collaboration avec une chercheuse qui possède des organoïdes de trophoblastes, avec qui nous pourrions faire affaire. Ce volet de projet apporte donc des connaissances supplémentaires, et nécessaires, sur le fonctionnement inflammatoire de populations cellulaires qui sont présentes dans le placenta. Nous pourrions investiguer plus en profondeur sur les stimuli et mécanismes naturels qui pourraient potentiellement activer la voie cGAS-STING dans les trophoblastes et fibroblastes placentaires. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires dans le placenta pourrait potentiellement aider au développement de stratégies pour aider à diminuer les problèmes de développement.

Le modèle que nous avons développé pour la stimulation et l'investigation *in vivo* de la voie cGAS-STING ouvre une panoplie d'avenues à explorer. Nous pourrions bien entendu caractériser la dynamique de la réponse cGAS-STING dans le temps pour donner suite à une injection d'ADN dans la veine de la queue de la mère. Également, nous allons également pouvoir investiguer si l'activation

de la voie cGAS-STING à différents moments de la grossesse a des répercussions sur la morphologie du placenta et/ou le développement du souriceau. Il est déjà connu qu'une forte induction d'expression d'Ifn $\beta$ <sup>108</sup> lors de la grossesse peut mener à une augmentation du taux de résorption : nous allons investiguer celle-ci par rapport à une stimulation de la voie cGAS-STING. Également, nous allons investiguer le potentiel rôle de la voie d'inflammation dans des contextes comme celui de la maladie de l'anémie de Fanconi. Cette maladie comporte entre autres une instabilité génétique due à des défauts dans la voie de réparation à l'ADN FancA<sup>111,112</sup>. Notre laboratoire travaille déjà sur cette maladie qui constitue un bon modèle d'étude de la voie cGAS-STING étant donné son instabilité génomique. Nous pourrions aussi vérifier si la voie cGAS-STING peut être activée de manière endogène dans le placenta au cours du développement et de quelle manière. Cela permettrait de savoir si la voie est impliquée dans la régulation naturelle du placenta ou si celle-ci est plutôt activée de manière extraordinaire. Ces informations fourniront une meilleure compréhension globale des mécanismes de régulation de l'inflammation placentaire. Une meilleure compréhension des mécanismes pouvant mener à l'activation de la voie cGAS-STING de manière endogène pourrait donc potentiellement répondre à certaines questions portant sur des problèmes de grossesses et de développements tels que la restriction de grossesse intra-utérine, la prééclampsie et potentiellement même les fausses couches.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Roberts, R. M., Green, J. A. & Schulz, L. C. The evolution of the placenta. *Reproduction* **152**, R179-189 (2016). <https://doi.org/10.1530/rep-16-0325>
- 2 de Kroon, R. R., de Baat, T., Senger, S. & van Weissenbruch, M. M. Amniotic Fluid: A Perspective on Promising Advances in the Prevention and Treatment of Necrotizing Enterocolitis. *Front Pediatr* **10**, 859805 (2022). <https://doi.org/10.3389/fped.2022.859805>
- 3 Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B. & King, R. G. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* **114**, 397-407 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.06.038>
- 4 Cindrova-Davies, T. & Sferruzzi-Perri, A. N. Human placental development and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **131**, 66-77 (2022). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.03.039>
- 5 Rossant, J. & Tam, P. P. L. Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation. *Dev Cell* **57**, 152-165 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.12.022>
- 6 Racicot, K. *et al.* Cutting Edge: Fetal/Placental Type I IFN Can Affect Maternal Survival and Fetal Viral Load during Viral Infection. *J Immunol* **198**, 3029-3032 (2017). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601824>
- 7 Yang, L. *et al.* Innate immune signaling in trophoblast and decidua organoids defines differential antiviral defenses at the maternal-fetal interface. *eLife* **11**, e79794 (2022). <https://doi.org/10.7554/eLife.79794>
- 8 Zhang, Y., Liu, Z. & Sun, H. Fetal-maternal interactions during pregnancy: a 'three-in-one' perspective. *Front Immunol* **14**, 1198430 (2023). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1198430>
- 9 Zhang, C. X. W., Candia, A. A. & Sferruzzi-Perri, A. N. Placental inflammation, oxidative stress, and fetal outcomes in maternal obesity. *Trends Endocrinol Metab* **35**, 638-647 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2024.02.002>
- 10 Cornish, E. F., McDonnell, T. & Williams, D. J. Chronic Inflammatory Placental Disorders Associated With Recurrent Adverse Pregnancy Outcome. *Front Immunol* **13**, 825075 (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.825075>
- 11 Zur, R. L., Kingdom, J. C., Parks, W. T. & Hobson, S. R. The Placental Basis of Fetal Growth Restriction. *Obstet Gynecol Clin North Am* **47**, 81-98 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2019.10.008>
- 12 Aplin, J. D., Myers, J. E., Timms, K. & Westwood, M. Tracking placental development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **16**, 479-494 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0372-6>

- 13 Challis, J. R. *et al.* Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* **16**, 206-215 (2009). <https://doi.org:10.1177/1933719108329095>
- 14 Cox, L. S. & Redman, C. The role of cellular senescence in ageing of the placenta. *Placenta* **52**, 139-145 (2017). <https://doi.org:10.1016/j.placenta.2017.01.116>
- 15 Kohlrausch, F. B. & Keefe, D. L. Telomere erosion as a placental clock: From placental pathologies to adverse pregnancy outcomes. *Placenta* **97**, 101-107 (2020). <https://doi.org:10.1016/j.placenta.2020.06.022>
- 16 Ward, E. J. *et al.* Placental Inflammation Leads to Abnormal Embryonic Heart Development. *Circulation* **147**, 956-972 (2023). <https://doi.org:10.1161/circulationaha.122.061934>
- 17 Singh, V. P., McKinney, S. & Gerton, J. L. Persistent DNA Damage and Senescence in the Placenta Impacts Developmental Outcomes of Embryos. *Dev Cell* **54**, 333-347.e337 (2020). <https://doi.org:10.1016/j.devcel.2020.05.025>
- 18 Yockey, L. J. *et al.* Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci Immunol* **3** (2018). <https://doi.org:10.1126/sciimmunol.aao1680>
- 19 Leddy, M. A., Power, M. L. & Schulkin, J. The impact of maternal obesity on maternal and fetal health. *Rev Obstet Gynecol* **1**, 170-178 (2008).
- 20 Walewska, E. *et al.* Fetal growth restriction and placental defects in obese mice are associated with impaired decidualisation: the role of increased leptin signalling modulators SOCS3 and PTPN2. *Cell Mol Life Sci* **81**, 329 (2024). <https://doi.org:10.1007/s00018-024-05336-7>
- 21 Couillin, I. & Riteau, N. STING Signaling and Sterile Inflammation. *Front Immunol* **12**, 753789 (2021). <https://doi.org:10.3389/fimmu.2021.753789>
- 22 Maître, J. L. Mechanics of blastocyst morphogenesis. *Biol Cell* **109**, 323-338 (2017). <https://doi.org:10.1111/boc.201700029>
- 23 Wamaitha, S. E. & Niakan, K. K. Human Pre-gastrulation Development. *Curr Top Dev Biol* **128**, 295-338 (2018). <https://doi.org:10.1016/bs.ctdb.2017.11.004>
- 24 Halasz, M. & Szekeres-Bartho, J. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *Journal of Reproductive Immunology* **97**, 43-50 (2013). <https://doi.org:https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.011>
- 25 Staun-Ram, E. & Shalev, E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology* **3**, 1-12 (2005).
- 26 Elaine N. Marieb, K. H. *Anatomie et Physiologie humaines*. 5 edn, 1264 (ERPI, 2015).
- 27 Ottawa-Hospital. *Le Placenta pour les professionnels de la santé*, <<https://www.ottawahospital.on.ca/fr/documents/2017/01/the-placenta-for-health-professionals-webfr.pdf>> (2017).
- 28 Wang Y, Z. S. *Vascular Biology of the Placenta*. Chapter 4: Cell Types of the Placenta (2010).

- 29 Soares, M. J., Varberg, K. M. & Iqbal, K. Hemochorial placentation: development, function, and adaptations. *Biol Reprod* **99**, 196-211 (2018). <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy049>
- 30 Rai, A. & Cross, J. C. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Developmental Biology* **387**, 131-141 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.015>
- 31 Griffiths, S. K. & Campbell, J. P. Placental structure, function and drug transfer. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* **15**, 84-89 (2014). <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mku013>
- 32 Desforges, M. & Sibley, C. P. Placental nutrient supply and fetal growth. *Int J Dev Biol* **54**, 377-390 (2010). <https://doi.org/10.1387/ijdb.082765md>
- 33 Napso, T., Yong, H. E. J., Lopez-Tello, J. & Sferruzzi-Perri, A. N. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Front Physiol* **9**, 1091 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01091>
- 34 Herrick EJ, B. B. *Embryology, Placenta*. (StatPearls, Updated 2023 May 1).
- 35 Chavan, A. R., Griffith, O. W. & Wagner, G. P. The inflammation paradox in the evolution of mammalian pregnancy: turning a foe into a friend. *Curr Opin Genet Dev* **47**, 24-32 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.08.004>
- 36 UNICEF. *Ce qu'il faut savoir sur les mortinaissances*, <<https://www.unicef.org/fr/recits/ce-quil-faut-savoir-sur-les-mortinaissances>> (2022).
- 37 Melchiorre, K., Giorgione, V. & Thilaganathan, B. The placenta and preeclampsia: villain or victim? *Am J Obstet Gynecol* **226**, S954-s962 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.10.024>
- 38 Ottawa-Hospital. *Qu'est-ce que la prééclampsie?*, <<https://www.ottawahospital.on.ca/fr/services-cliniques/deptpgrmcs/cliniques-et-services/clinique-de-sante-du-placenta/preeclampsie/>> (2016).
- 39 Ottawa-Hospital. *Qu'est-ce qu'un retard de croissance intra-utérin?*, <<https://www.ottawahospital.on.ca/fr/services-cliniques/deptpgrmcs/cliniques-et-services/clinique-de-sante-du-placenta/retard-de-croissance-intra-uterin/>> (2016).
- 40 Davy, P., Nagata, M., Bullard, P., Fogelson, N. S. & Allsopp, R. Fetal growth restriction is associated with accelerated telomere shortening and increased expression of cell senescence markers in the placenta. *Placenta* **30**, 539-542 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.03.005>
- 41 Liu, J. & Krantz, I. D. Cornelia de Lange syndrome, cohesin, and beyond. *Clin Genet* **76**, 303-314 (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01271.x>
- 42 Health, N. I. o. *Cornelia de Lange syndrom*, <<https://rarediseases.info.nih.gov/diseases/10109/cornelia-de-lange-syndrome>> (

- 43 Clininc, C. *Inflammation*,  
<<https://my.clevelandclinic.org/health/symptoms/21660-inflammation>>  
(2021).
- 44 Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*  
**454**, 428-435 (2008). <https://doi.org:10.1038/nature07201>
- 45 Yockey, L. J., Lucas, C. & Iwasaki, A. Contributions of maternal and  
fetal antiviral immunity in congenital disease. *Science* **368**, 608-612  
(2020). <https://doi.org:doi:10.1126/science.aaz1960>
- 46 Hong, Z., Mei, J., Guo, H., Zhu, J. & Wang, C. Intervention of cGAS–  
STING signaling in sterile inflammatory diseases. *J Mol Cell Biol* **14**  
(2022). <https://doi.org:10.1093/jmcb/mjac005>
- 47 Care, G. I. f. Q. a. E. i. H. *The innate and adaptive immune systems.*, <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279396/>  
> (2006).
- 48 Roh, J. S. & Sohn, D. H. Damage-Associated Molecular Patterns in  
Inflammatory Diseases. *Immune Netw* **18**, e27 (2018).  
<https://doi.org:10.4110/in.2018.18.e27>
- 49 Mahla, R. S., Reddy, M. C., Prasad, D. V. & Kumar, H. Sweeten PAMPs:  
Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine  
Biology. *Front Immunol* **4**, 248 (2013).  
<https://doi.org:10.3389/fimmu.2013.00248>
- 50 Mogensen, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in  
innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev* **22**, 240-273, Table of  
Contents (2009). <https://doi.org:10.1128/cmr.00046-08>
- 51 Pradhan, A. *et al.* Non-canonical signalling mediates changes in fungal  
cell wall PAMPs that drive immune evasion. *Nat Commun* **10**, 5315  
(2019). <https://doi.org:10.1038/s41467-019-13298-9>
- 52 Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to  
damage. *Nature Reviews Immunology* **10**, 826-837 (2010).  
<https://doi.org:10.1038/nri2873>
- 53 Gong, T., Liu, L., Jiang, W. & Zhou, R. DAMP-sensing receptors in  
sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* **20**, 95-  
112 (2020). <https://doi.org:10.1038/s41577-019-0215-7>
- 54 Sameer, A. S. & Nissar, S. Toll-Like Receptors (TLRs): Structure,  
Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal  
Cancer Susceptibility. *Biomed Res Int* **2021**, 1157023 (2021).  
<https://doi.org:10.1155/2021/1157023>
- 55 Kou, M. & Wang, L. Surface toll-like receptor 9 on immune cells and its  
immunomodulatory effect. *Front Immunol* **14**, 1259989 (2023).  
<https://doi.org:10.3389/fimmu.2023.1259989>
- 56 Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity.  
*International Immunology* **17**, 1-14 (2005).  
<https://doi.org:10.1093/intimm/dxh186>
- 57 Koga, K. & Mor, G. Expression and function of toll-like receptors at the  
maternal-fetal interface. *Reprod Sci* **15**, 231-242 (2008).  
<https://doi.org:10.1177/1933719108316391>

- 58 Franchi, L., Warner, N., Viani, K. & Nuñez, G. Function of Nod-like  
receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* **227**,  
106-128 (2009). [https://doi.org:10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x)
- 59 Zhou, Y., Yu, S. & Zhang, W. NOD-like Receptor Signaling Pathway in  
Gastrointestinal Inflammatory Diseases and Cancers. *Int J Mol Sci* **24**  
(2023). [https://doi.org:10.3390/ijms241914511](https://doi.org/10.3390/ijms241914511)
- 60 Nombel, A., Fabien, N. & Coutant, F. Dermatomyositis With Anti-  
MDA5 Antibodies: Bioclinical Features, Pathogenesis and Emerging  
Therapies. *Front Immunol* **12**, 773352 (2021).  
[https://doi.org:10.3389/fimmu.2021.773352](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.773352)
- 61 Rehwinkel, J. & Gack, M. U. RIG-I-like receptors: their regulation and  
roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol* **20**, 537-551 (2020).  
[https://doi.org:10.1038/s41577-020-0288-3](https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3)
- 62 Kumari, P., Russo, A. J., Shivcharan, S. & Rathinam, V. A. AIM2 in  
health and disease: Inflammasome and beyond. *Immunol Rev* **297**, 83-95  
(2020). [https://doi.org:10.1111/imr.12903](https://doi.org/10.1111/imr.12903)
- 63 Schoggins, J. W. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do?  
*Annu Rev Virol* **6**, 567-584 (2019). [https://doi.org:10.1146/annurev-virology-092818-015756](https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756)
- 64 Walter, M. R. The Role of Structure in the Biology of Interferon  
Signaling. *Front Immunol* **11**, 606489 (2020).  
[https://doi.org:10.3389/fimmu.2020.606489](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.606489)
- 65 Wells, A. I. & Coyne, C. B. Type III Interferons in Antiviral Defenses at  
Barrier Surfaces. *Trends Immunol* **39**, 848-858 (2018).  
[https://doi.org:10.1016/j.it.2018.08.008](https://doi.org/10.1016/j.it.2018.08.008)
- 66 Lee, A. J. & Ashkar, A. A. The Dual Nature of Type I and Type II  
Interferons. *Front Immunol* **9**, 2061 (2018).  
[https://doi.org:10.3389/fimmu.2018.02061](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02061)
- 67 Goel, R. R., Kolenko, S. V. & Kaplan, M. J. Interferon lambda in  
inflammation and autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*  
**17**, 349-362 (2021). [https://doi.org:10.1038/s41584-021-00606-1](https://doi.org/10.1038/s41584-021-00606-1)
- 68 Pervolaraki, K. *et al.* Differential induction of interferon stimulated genes  
between type I and type III interferons is independent of interferon  
receptor abundance. *PLoS Pathog* **14**, e1007420 (2018).  
[https://doi.org:10.1371/journal.ppat.1007420](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007420)
- 69 Mesev, E. V., LeDesma, R. A. & Ploss, A. Decoding type I and III  
interferon signalling during viral infection. *Nat Microbiol* **4**, 914-924  
(2019). [https://doi.org:10.1038/s41564-019-0421-x](https://doi.org/10.1038/s41564-019-0421-x)
- 70 Bayer, A. *et al.* Type III Interferons Produced by Human Placental  
Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host  
Microbe* **19**, 705-712 (2016). [https://doi.org:10.1016/j.chom.2016.03.008](https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008)
- 71 Wu, H. *et al.* Zika virus targets human trophoblast stem cells and prevents  
syncytialization in placental trophoblast organoids. *Nat Commun* **14**,  
5541 (2023). [https://doi.org:10.1038/s41467-023-41158-0](https://doi.org/10.1038/s41467-023-41158-0)
- 72 Buchrieser, J. *et al.* IFITM proteins inhibit placental syncytiotrophoblast  
formation and promote fetal demise. *Science* **365**, 176-180 (2019).  
[https://doi.org:10.1126/science.aaw7733](https://doi.org/10.1126/science.aaw7733)

- 73 Cappelletti, M. *et al.* Type I interferons regulate susceptibility to inflammation-induced preterm birth. *JCI Insight* **2**, e91288 (2017). <https://doi.org:10.1172/jci.insight.91288>
- 74 Sun, Z. & Hornung, V. cGAS-STING signaling. *Curr Biol* **32**, R730-r734 (2022). <https://doi.org:10.1016/j.cub.2022.05.027>
- 75 Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. & Chen, Z. J. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* **339**, 786-791 (2013). <https://doi.org:10.1126/science.1232458>
- 76 Ablasser, A. & Chen, Z. J. cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. *Science* **363** (2019). <https://doi.org:10.1126/science.aat8657>
- 77 Ablasser, A. *et al.* cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* **498**, 380-384 (2013). <https://doi.org:10.1038/nature12306>
- 78 Cai, X., Chiu, Y. H. & Chen, Z. J. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol Cell* **54**, 289-296 (2014). <https://doi.org:10.1016/j.molcel.2014.03.040>
- 79 Li, X. D. *et al.* Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* **341**, 1390-1394 (2013). <https://doi.org:10.1126/science.1244040>
- 80 Liu, S. *et al.* Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science* **347**, aaa2630 (2015). <https://doi.org:10.1126/science.aaa2630>
- 81 Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2**, 17023 (2017). <https://doi.org:10.1038/sigtrans.2017.23>
- 82 Skopelja-Gardner, S., An, J. & Elkon, K. B. Role of the cGAS-STING pathway in systemic and organ-specific diseases. *Nat Rev Nephrol* **18**, 558-572 (2022). <https://doi.org:10.1038/s41581-022-00589-6>
- 83 Xu, D., Tian, Y., Xia, Q. & Ke, B. The cGAS-STING Pathway: Novel Perspectives in Liver Diseases. *Front Immunol* **12**, 682736 (2021). <https://doi.org:10.3389/fimmu.2021.682736>
- 84 Ma, R., Ortiz Serrano, T. P., Davis, J., Prigge, A. D. & Ridge, K. M. The cGAS-STING pathway: The role of self-DNA sensing in inflammatory lung disease. *Faseb j* **34**, 13156-13170 (2020). <https://doi.org:10.1096/fj.202001607R>
- 85 Wang, Y. *et al.* Cell-type specific distribution and activation of type I IFN pathway molecules at the placental maternal-fetal interface in response to COVID-19 infection. *Front Endocrinol (Lausanne)* **13**, 951388 (2022). <https://doi.org:10.3389/fendo.2022.951388>
- 86 Kalagiri, R. R. *et al.* Inflammation in Complicated Pregnancy and Its Outcome. *Am J Perinatol* **33**, 1337-1356 (2016). <https://doi.org:10.1055/s-0036-1582397>
- 87 Dekel, N., Gnainsky, Y., Granot, I. & Mor, G. Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol* **63**, 17-21 (2010). <https://doi.org:10.1111/j.1600-0897.2009.00792.x>

- 88 Denizli, M., Capitano, M. L. & Kua, K. L. Maternal obesity and the impact of associated early-life inflammation on long-term health of offspring. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, 940937 (2022). <https://doi.org:10.3389/fcimb.2022.940937>
- 89 Motomura, K., Hara, M., Ito, I., Morita, H. & Matsumoto, K. Roles of human trophoblasts' pattern recognition receptors in host defense and pregnancy complications. *J Reprod Immunol* **156**, 103811 (2023). <https://doi.org:10.1016/j.jri.2023.103811>
- 90 Bouças, A. P., de Souza, B. M., Bauer, A. C. & Crispim, D. Role of Innate Immunity in Preeclampsia: A Systematic Review. *Reprod Sci* **24**, 1362-1370 (2017). <https://doi.org:10.1177/1933719117691144>
- 91 Tomlinson, M. S. *et al.* Microorganisms in the Placenta: Links to Early-Life Inflammation and Neurodevelopment in Children. *Clin Microbiol Rev* **32** (2019). <https://doi.org:10.1128/cmr.00103-18>
- 92 Saroyo, Y. B. *et al.* Oxidative Stress Induced Damage and Early Senescence in Preterm Placenta. *J Pregnancy* **2021**, 9923761 (2021). <https://doi.org:10.1155/2021/9923761>
- 93 Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 75-95 (2021). <https://doi.org:10.1038/s41580-020-00314-w>
- 94 Schoggins, J. W. *et al.* Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* **505**, 691-695 (2014). <https://doi.org:10.1038/nature12862>
- 95 Yeadon, J. *6 steps for setting up timed pregnant mice*, <<https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2014/september/six-steps-for-setting-up-timed-pregnant-mice#:~:text=Females%20that%20have%20mated%20during,8%2D24%20hours%20after%20mating.>> (2014).
- 96 Heyne, G. W. *et al.* A Simple and Reliable Method for Early Pregnancy Detection in Inbred Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* **54**, 368-371 (2015).
- 97 Hemberger, M., Hanna, C. W. & Dean, W. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. *Nat Rev Genet* **21**, 27-43 (2020). <https://doi.org:10.1038/s41576-019-0169-4>
- 98 Li, L. & Schust, D. J. Isolation, purification and in vitro differentiation of cytotrophoblast cells from human term placenta. *Reprod Biol Endocrinol* **13**, 71 (2015). <https://doi.org:10.1186/s12958-015-0070-8>
- 99 Au - Pennington, K. A., Au - Schlitt, J. M. & Au - Schulz, L. C. Isolation of Primary Mouse Trophoblast Cells and Trophoblast Invasion Assay. *JoVE*, e3202 (2012). <https://doi.org:doi:10.3791/3202>
- 100 Pépin, G. *et al.* Cre-dependent DNA recombination activates a STING-dependent innate immune response. *Nucleic Acids Res* **44**, 5356-5364 (2016). <https://doi.org:10.1093/nar/gkw405>
- 101 Pépin, G. *et al.* Activation of cGAS-dependent antiviral responses by DNA intercalating agents. *Nucleic Acids Res* **45**, 198-205 (2017). <https://doi.org:10.1093/nar/gkw878>

- 102 Pépin, G., Ferrand, J. & Gantier, M. P. Assessing the Off-Target Effects of miRNA Inhibitors on Innate Immune Toll-Like Receptors. *Methods Mol Biol* **1517**, 127-135 (2017). [https://doi.org:10.1007/978-1-4939-6563-2\\_9](https://doi.org:10.1007/978-1-4939-6563-2_9)
- 103 Ullah, T. R. *et al.* Genistein Targets STING-Driven Antiviral Responses. *mBio* **13**, e0206422 (2022). <https://doi.org:10.1128/mbio.02064-22>
- 104 Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001). <https://doi.org:10.1006/meth.2001.1262>
- 105 Kikuchi, N., Nakamura, S., Ohtsuka, M., Kimura, M. & Sato, M. Possible mechanism of gene transfer into early to mid-gestational mouse fetuses by tail vein injection. *Gene Ther* **9**, 1529-1541 (2002). <https://doi.org:10.1038/sj.gt.3301818>
- 106 Nakamura, S. *et al.* Transplacental delivery of genome editing components causes mutations in embryonic cardiomyocytes of mid-gestational murine fetuses. *IUBMB Life* **71**, 835-844 (2019). <https://doi.org:10.1002/iub.2004>
- 107 Wischniewski, M. & Ablasser, A. Interplay of cGAS with chromatin. *Trends Biochem Sci* **46**, 822-831 (2021). <https://doi.org:10.1016/j.tibs.2021.05.011>
- 108 Monteiro, V. R. S. *et al.* Mid-pregnancy poly(I:C) viral mimic disrupts placental ABC transporter expression and leads to long-term offspring motor and cognitive dysfunction. *Scientific Reports* **12**, 10262 (2022). <https://doi.org:10.1038/s41598-022-14248-0>
- 109 Zhou, X. *et al.* The role of chemerin in the regulation of cGAS-STING pathway in gestational diabetes mellitus placenta. *Faseb j* **37**, e22806 (2023). <https://doi.org:10.1096/fj.202201611R>
- 110 Ciszek, B., Skubiszewska, D. & Ratajska, A. The anatomy of the cardiac veins in mice. *J Anat* **211**, 53-63 (2007). <https://doi.org:10.1111/j.1469-7580.2007.00753.x>
- 111 Nepal, M., Che, R., Zhang, J., Ma, C. & Fei, P. Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends Cancer* **3**, 840-856 (2017). <https://doi.org:10.1016/j.trecan.2017.10.005>
- 112 Peake, J. D. & Noguchi, E. Fanconi anemia: current insights regarding epidemiology, cancer, and DNA repair. *Hum Genet* **141**, 1811-1836 (2022). <https://doi.org:10.1007/s00439-022-02462-9>