

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

**LE RÔLE IMMUNOMODULATEUR DE L'ONCOSTATINE M (OSM) DANS LES POPULATIONS
CELLULAIRES DE L'INTERFACE FOETO-MATERNELLE EN RÉPONSE À UN STRESS
INFLAMMATOIRE**

THÈSE PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

MARION RAVELOJAONA

MARS 2025

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.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (DOCTORAT)

Direction de recherche :

Carlos Reyes-Moreno, Ph. D.

Prénom et nom

Directeur de recherche

Jury d'évaluation :

Carlos Reyes-Moreno, Ph. D.

Prénom et nom

Directeur de recherche

Céline Van Themsche, Ph. D.

Prénom et nom

Codirectrice de recherche

Geneviève Pépin, Ph. D.

Prénom et nom

Présidente du jury

Benoît Barbeau, Ph. D.

Prénom et nom

Évaluateur externe

Cathy Vaillancourt, Ph. D.

Prénom et nom

Évaluatrice externe

1 Table des matières

2	CHAPITRE I	16
2.1	Introduction	17
2.1.1	Préambule.....	17
2.2	Brève introduction à l'immunologie de la reproduction.....	18
2.3	La viabilité de l'endomètre utérin : point de départ de la grossesse.....	21
2.3.1	Description macroscopique de l'endomètre utérin : cellules et glandes endométriales. 21	
2.3.2	Le cycle menstruel.	22
2.3.3	La décidualisation	24
2.4	Mise en place de l'interface fœto-maternelle.....	26
2.4.1	L'implantation embryonnaire : initiation de la mise en place de l'interface fœto- maternelle. 26	
2.4.2	La placentation	28
2.4.3	Différenciation et fonction des cellules trophoblastiques, principaux acteurs de la placentation. 29	
2.4.4	Différenciation biochimique et morphologique du CTB en STB : de la formation initiale du STB. 31	
2.4.5	Transition du STB primitif en STB définitif ou villos.	32
2.4.6	La placentation humaine : le STB en première ligne.	34
2.5	Activité immunologique à l'interface fœto-maternelle : pilier des processus clés à l'interface fœto-maternelle.....	36
2.5.1	Les phases immunologiques de la grossesse.	36

2.5.2	Portraits de l'IFN- γ , du GM-CSF, de LIF et de l'OSM, des cytokines actrices dans le processus d'implantation embryonnaire.....	38
2.6	Les macrophages utérins ont un profil spécifique pour les fonctions endométriales.....	43
2.6.1	Les macrophages : principaux acteurs de l'activité inflammatoire intra-utérine	44
3	<i>Régulation de l'inflammation: la voie de signalisation JAK/STAT, carrefour dans la régulation de la réponse inflammatoire.....</i>	48
3.1	STAT1	50
3.2	STAT3	50
3.3	STAT5	51
3.4	Inhibiteurs de la voie de signalisation JAK/STAT.....	51
3.5	Les SOCS: Suppressor of cytokine signal.....	51
4	<i>Problématique</i>	52
4.1	Présence d'une réponse inflammatoire non-contrôlée dans l'environnement utéro-placentaire.	52
4.2	Les stratégies thérapeutiques face à l'inflammation intra-utérine non-régulée sont limitées.	54
5	<i>Hypothèse.....</i>	56
6	<i>Objectifs et méthodologie</i>	58

6.1	Étude du rôle et de l'effet immunorégulateur de l'OSM dans un modèle de trophoblastes humains <i>in vitro</i> lors d'un stress inflammatoire induit par l'IFN- γ ou le GM-CSF	58
6.2	Analyse des effets immunomodulateurs et anti-inflammatoire de LIF et de l'OSM sur le microenvironnement immunitaire utérin et les macrophages dans un modèle murin d'endométrite induite par le LPS.....	59
7	Chapitre II	60
7.1	Statut de l'article 1#.....	61
7.2	Contribution des auteurs.....	61
7.3	Résumé de l'article 1#	62
7.4	Article (<i>version publiée</i>)	63
8	Chapitre III	110
8.1	Statut de l'article 2#.....	111
8.2	Contribution des auteurs.....	111
8.3	Résumé de l'article 2#	112
8.4	Article (<i>version préparation pour publication</i>).....	113
9	Chapitre IV.....	153
9.1	Discussion.....	154
9.1.1	L'OSM, immunorégulateur du stress inflammatoire dans différentes populations cellulaires de l'interface foeto-maternelle.	154

9.1.2	Effet immunomodulateur de l'OSM dans les trophoblastes humains lors d'un stress inflammatoire induit par l'IFN- γ /STAT1 et le GM-CSF/STAT5.....	156
9.1.3	Étudier les effets immunomodulateurs de l'OSM au travers de modèles de fusion trophoblastiques in vitro.	163
9.1.4	Effet immunomodulateur de l'OSM et de LIF dans les macrophages péritonéaux et dans l'environnement immunologique intra-utérin murin lors d'un stress inflammatoire induit par le LPS.	164
9.1.5	Effets complémentaires de LIF et OSM, dans la progression de l'inflammation intra-utérine.	171
9.2	Perspectives	174
9.3	Conclusion générale.....	177
9.4	Bibliographie	178

Liste des figures :

Figure 1 : Le corps de l'utérus	22
Figure 2 : Le cycle menstruel	23
Figure 3 : Description de la muqueuse utérine en phase proliférative versus pendant la décidualisation	25
Figure 4 : Étapes de l'implantation embryonnaire chez l'humain..	27
Figure 5 : Différentiation des trophoblastes.....	30
Figure 6 : Formation du syncytiotrophoblaste	33
Figure 7 : Développement du placenta humain au cours des 3 premières semaines de gestation.....	35
Figure 8 : Phases immunologiques de la grossesse	37
Figure 9 : Réponse immune nécessaire pour l'implantation embryonnaire	40
Figure 10 : Dualité (M1/M2) du fonctionnement des macrophages.....	44
Figure 11 : Activation des récepteurs PRR par des PAMP ou des DAMP : La reconnaissance des microorganismes pathogènes tels que les virus, les bactéries, ou les champignons active les PAMP	45
Figure 12 : Effets de Th1/Th2 sur la progression de l'inflammation : Les cellules T naïves deviennent des cellules Th1 ou Th2, après avoir été stimulées par différents facteurs.....	47
Figure 13 : JAK/STAT régule les récepteurs transmembranaires et la communication nucléaire en quatre étapes	49
Figure 14 : Effets immunorégulateurs de LIF dans l'axe trophoblaste-IL10-macrophages LIF induit la phosphorylation de STAT3 qui participe à l'inhibition de la phosphorylation des voies pro-inflammatoires de l'IFN- γ /STAT1 et du GM-CSF/STAT5 dans les macrophages et les trophoblastes	56

Figure 15 : Effets régulateurs de l'OSM sur l'activité pro-inflammatoires de l'IFN- γ et du GM-CSF dans les trophoblastes lors de l'implantation embryonnaire.....	155
Figure 16 : Mécanisme de régulation hypothétique de l'OSM dans la régulation de STAT1 par STAT3 au travers de la formation d'hétérodimère STAT3/STAT1 dans les cellules SVT/BeWo..	158
Figure 17 : Semi-quantification de la protéine STAT3 normalisée à la tubuline dans des CTB cultivés provenant de placentas de premier trimestre et à terme	160
Figure 18 : Schéma illustrant les deux voies de signalisation de l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc -cAMP) impliquées dans la syncytialisation et la différenciation fonctionnelle des trophoblastes humains.....	161
Figure 19 : Mécanisme de régulation hypothétique de l'OSM dans la régulation de STAT5 par STAT3 ou p-CREB dans les cellules VST/BeWo.	162
Figure 20 : Plasticité et polarisation des macrophages M1 ou M2 en réponse à des signaux spécifiques de leur microenvironnement	170
Figure 21 : Augmentation du CD31 dans les tissus utérins avec LIF et OSM.....	172

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à l'ensemble des membres du jury, Dre Geneviève Pépin, Dre Cathy Vaillancourt ainsi que le Dr Benoît Barbeau pour leur temps, leur expertise et leurs précieux conseils dans l'évaluation de cette thèse. Vos observations et remarques constructives m'ont permis d'enrichir ce travail et d'en affiner la portée. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre engagement tout au long de ce processus.

Je souhaite également adresser mes remerciements les plus sincères à ma direction de thèse, Carlos et Céline pour leur encadrement et leur soutien constant au fil des années. Vos conseils avisés, votre rigueur scientifique, ainsi que vos encouragements avec bienveillance m'ont permis de progresser et d'aboutir à la réalisation de ce projet. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, Carlos, en me confiant ce projet et en m'accueillant dans ton équipe durant ces années de doctorat ! Merci pour ta patience, ton écoute et ta bienveillance, qui apportent beaucoup d'humanité à ton rôle de directeur de thèse. Merci également pour la liberté que tu nous accordes en tant qu'étudiants dans notre parcours et notre expérience, non seulement au sein de ton laboratoire, mais aussi en tant que chercheurs. Et merci pour cet esprit de famille que tu t'efforces toujours de maintenir dans ton laboratoire, ce qui représente énormément pour des étudiants parfois loin de leur propre famille.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à mes collègues du laboratoire (particulièrement Laurie pour ces protocoles toujours bien écrits) sans qui la réalisation des expériences n'aurait pas été possible. Votre aide précieuse, vos discussions enrichissantes et votre soutien quotidien ont été essentiels dans l'avancement de ce travail. Un remerciement tout particulier à Julie, pour son accompagnement constant, son expertise technique et ses encouragements. Ta disponibilité et ton soutien, tant sur le plan scientifique que personnel, ont grandement facilité mon parcours. Bien que j'attende toujours les biscuits que tu nous promets depuis longtemps, je te suis très reconnaissante pour toute ton aide et tous ces moments de partage au cours de ces sept années passées au laboratoire. Je n'oublie pas les étudiants que j'ai eu la chance de former : Ingrid, Shanie et Célia qui ont également contribué à ce projet, et dont

certains sont devenus des amis, voire des collègues. Je pense notamment à Célia qui, à défaut de co-écrire une revue, m'a apporté un précieux soutien à travers les fous rires et les moments partagés durant son stage au Québec.

Je remercie également l'ensemble des chercheurs de notre département qui m'ont apporté des conseils et des perspectives variées sur mon projet, contribuant ainsi à enrichir ce travail de longue haleine qu'est le doctorat. Je tiens également à remercier la Pre Cathy Thornton, qui m'a accueillie dans son laboratoire pour un stage doctoral à l'Université de Swansea. Ce fut une expérience professionnelle extrêmement enrichissante, qui m'a permis d'élargir mes horizons et d'approfondir ma réflexion sur mon projet. Merci aussi à ses étudiants, Megan et Tyler, pour leur aide précieuse, leur collaboration et leur patience face à mon temps d'adaptation en milieu anglophone.

J'ai aussi une pensée profonde pour ma famille et mes amis qui, malgré la distance, m'ont toujours soutenue. Je pense particulièrement à mes parents, Marie Lucienne et Stéphane, dont la patience et le soutien inébranlable m'ont accompagnée dès le début de cette aventure, entamée en 2012 lorsque j'ai quitté la Réunion pour le Québec. Merci pour votre amour indéfectible, pour tous les sacrifices consentis – anniversaires manqués, Noël's passés loin les uns des autres... Aujourd'hui, ce doctorat est aussi un peu le vôtre, une preuve de patience et de persévérance partagée.

Enfin, je ne pourrais conclure ces remerciements sans penser à mes deux acolytes du quotidien, sans qui ma thèse n'aurait pas eu la même saveur ni les mêmes couleurs : Mélanie et Looly. Merci d'avoir apporté tant de légèreté à mes soirées après le labo et à mes journées d'écriture. Merci de m'avoir forcée à lever la tête du guidon lorsque j'étais trop absorbée par mes expériences, en me rappelant qu'il existait une vie en dehors du labo. Merci de m'avoir toujours rappelé que, même lorsque les résultats ne correspondaient pas exactement à mes attentes, il y avait toujours du positif à en tirer. Et surtout, merci d'avoir nourri mon capital rire tout au long de ces années !

Et pour finir, petit clin d'œil à moi-même : Bravo ! *(Petite tape dans le dos.)*

Ti hach y coup gros bois. Ti pa ti pa, n'arrivé !

Résumé :

L'inflammation à l'interface fœto-maternelle représente un enjeu majeur, non seulement pour la réparation et la fonctionnalité des tissus endométrial et embryonnaire, mais également dans la mise en place de la grossesse au travers de la régulation d'étapes clés telles que l'implantation embryonnaire et la placentation. Toutefois, la gestion de cette inflammation demeure un véritable défi. Elle est principalement régulée par des facteurs immunologiques tels que des hormones, des cytokines et des facteurs de croissance, qui assurent un dialogue cellulaire fluide et coordonné entre les différentes populations cellulaires de l'utérus.

Dans ce contexte, notre laboratoire s'est particulièrement intéressé aux cytokines gestationnelles appartenant à la famille des interleukines-6 (IL-6), tel que le facteur gestationnel *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF). Des travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire, ont mis en lumière le rôle essentiel de LIF dans la communication entre les macrophages et les trophoblastes, contribuant ainsi à la régulation de la réponse immune lors d'un stress inflammatoire contribuant à préserver l'intégrité des fonctions trophoblastiques. Cette régulation repose sur l'activation de la voie anti-inflammatoire STAT3 par le LIF, permettant ainsi l'inhibition des voies pro-inflammatoires telles que STAT1 et STAT5, respectivement activées par les facteurs pro-inflammatoires interféron gamma (IFN- γ) et le *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF). Néanmoins, à l'interface fœto-maternelle, le LIF induit également l'expression de d'autres cytokines de la famille des IL-6 à caractère immunorégulateur comme l'Oncostatine M (OSM). Le rôle de l'OSM est souvent resté en retrait dans l'activité immunomodulatrice à cette interface, comparé au LIF. Ainsi, peu d'études ont exploré ou décrit son rôle immunomodulateur et protecteur sur les fonctions trophoblastiques ou les tissus utérins en situation de stress inflammatoire.

Les travaux présentés dans cette thèse mettent en lumière, pour la première fois, le rôle immunomodulateur de l'OSM dans les trophoblastes, tout en décrivant certains mécanismes sous-jacents à son action, notamment en présence des facteurs pro-inflammatoires IFN- γ et du GM-CSF. Dans son rôle immunomodulateur, l'OSM présente des similarités avec le LIF, notamment en activant directement la phosphorylation de voies anti-inflammatoires telles que STAT3, mais aussi en stimulant indirectement des voies comme SMAD2 via l'expression du facteur immunorégulateur *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β). Ces résultats sont principalement

décrits dans une première étude centrée sur le stress inflammatoire dans les trophoblastes humains grâce à l'utilisation d'un modèle *in vitro*. En effet, l'utilisation du modèle BeWo a permis de mettre en évidence la capacité de l'OSM à préserver des fonctions trophoblastiques essentielles, telles que la production de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) et le processus de fusion, qui sont altérées lors d'un stress inflammatoire induit par l'IFN- γ ou le GM-CSF. De plus, une seconde étude présentée dans cette thèse met en évidence le rôle immunomodulateur de l'OSM dans les tissus utérins ainsi que dans les macrophages (M ϕ) péritonéaux à l'aide d'un modèle murin au travers d'expériences *in vivo*. Cette étude démontre la capacité de l'OSM à prévenir et atténuer les effets pro-inflammatoires du lipopolysaccharide (LPS) une endotoxine bactérienne associée au développement de l'endométrite dans le milieu utérin. Pour la première fois, ces travaux mettent en avant la capacité de l'OSM à moduler l'expression d'enzymes immunorégulatrices, telles que l'Oxyde Nitrique Synthase (iNOS) et l'Arginase 1 (Arg-1) dans les tissus utérins lors d'une réponse inflammatoire induite par le LPS. Par ailleurs, le caractère immunomodulateur de l'OSM est également démontré au niveau des M ϕ péritonéaux, qui, après sensibilisation à l'OSM, adoptent un profil anti-inflammatoire de type M2. Ce profil se caractérise notamment par l'expression accrue d'Arg-1, du Cluster de Différentiation (CD) 163, ainsi que par l'activation de voies anti-inflammatoires telles que STAT3 et SMAD2, malgré la présence de LPS.

En soulignant l'importance du rôle immunomodulateur de l'OSM dans les populations cellulaires de l'interface fœto-maternelle lors de stress inflammatoires, l'ensemble des travaux présentés dans ma thèse ouvrent la voie à de nouvelles approches thérapeutiques ou préventives impliquant des membres de la superfamille des IL-6, tels que le LIF et l'OSM. Ces approches pourraient être utilisées pour traiter ou contrôler l'inflammation intra-utérine associée à des complications ou des échecs de grossesse, ainsi que pour traiter ou prévenir des pathologies gynécologiques liées à une inflammation intra-utérine récurrente ou chronique, comme l'endométrite, tout en soutenant l'environnement immunitaire de l'endomètre. De plus, ces travaux permettraient de mieux situer l'impact de l'OSM par rapport à celui du LIF, offrant ainsi une compréhension plus claire des interactions cytokiniques qui régulent l'inflammation à l'interface fœto-maternelle, tout en favorisant les fonctions protectrices et défensives du système immunitaire intra-utérin.

Mots-clés : Inflammation intra-utérine, trophoblastes, endométrite, Oncostatine M (OSM), Leukemia Inhibitory Factor (LIF), LPS, hCG, macrophages, hCG.

Liste des abréviations et des sigles :

Arg-1 - Arginase

CD - Cluster of differentiation

COX - Cyclooxygenase

CTB - Cytotrophoblaste

CSE - Cellule stromale endométriale

CSD - Cellule stromale déciduale

CST - Cellule souche de trophoblaste

DAMP - Danger-associated molecular pattern

EGF - Epithelium growth factor

EVT - Trophoblaste extravilleux

FIV - Fécondation in vitro

GE - Glande endothéliale

GM-CSF - Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

hCG - Human Chorionic Gonadotropin

IFN- γ - Interféron gamma

IL - Interleukine

iNOS - Oxyde Nitrique Synthase

LIF - Leukemia inhibitory Factor

LPS - Lipopolysaccharides

M ϕ - Macrophage

MCI - Masse cellulaire interne

MMP - Matrix Metalloprotéase

NK - Natural Killer

NO - Oxyde nitrique

OSM - Oncostatine M

PAMP - Pathogen-associated molecular pattern

PE - Prééclampsie

PMA - Procréation médicalement assistée

RCF - Retard de croissance fœtale

SMAD - Signal Mediator and Dependent

STAT - Signal Transducer and Activator of Transcription

STB - Syncytiotrophoblaste

TE - Trophectoderme

TNF - Tumor necrosis factor

TLR - Toll-Like receptor

TP - Trophoblaste primaire

TGF - Transforming Growth Factor

vCTB - Cytotrophoblaste villos

2 CHAPITRE I

2.1 Introduction

2.1.1 Préambule

Chez les espèces vivipares, la mise en place de l'interface fœto-maternelle débute par l'implantation de l'embryon dans la cavité utérine. C'est pourquoi, elle représente une étape critique dans l'établissement de l'interface fœto-maternelle après la fécondation. Cependant, chez l'humain, l'efficacité de la reproduction est dépeinte par un faible pourcentage des conceptions naturelles, comparé à d'autres espèces de mammifères, qui aboutissent à des naissances vivantes soit entre 25 à 30 % [2]. De fait, environ 30 % de toutes les conceptions sont perdues en raison d'un échec d'implantation, et 30 % supplémentaires se terminent souvent par un avortement peu après l'implantation [2]. Ce premier constat soulève les questions du « Pourquoi ? » et « À qui la faute ? ».

De plus, bien que, l'implantation embryonnaire soit au cœur des questions de gestation, que serait-elle sans un utérus prêt à recevoir l'embryon ? Par analogie, que seraient des semences sans un sol fertile ? Ainsi, la fonctionnalité et la santé des tissus utérins représentent deux bases indispensables au succès de la grossesse. En effet, la réceptivité utérine, plus particulièrement la viabilité de l'endomètre utérin pose de plus en plus question dans les échecs d'implantation embryonnaire. Notamment, lorsque l'on se tourne vers certaines pathologies inflammatoires intra-utérines telles que l'endométriose ou l'endométrite chronique [3]. Ces différents contextes problématiques de la grossesse ont un point commun : le système immunitaire intra-utérin. En effet, celui-ci orchestre non seulement la défense et la protection des tissus utérins et fœtaux contre les infections, mais occupe également un rôle central dans la mise en place et le maintien de l'interface fœto-maternelle, notamment lors de l'implantation embryonnaire [3, 4].

Les projeteurs se tournent ainsi vers l'activité immunologique intra-utérine et à l'interface fœto-maternelle qui est au cœur du dialogue entre les différentes populations cellulaires présentes dans l'utérus au cours de la gestation. Parmi les différents facteurs immunitaires acteurs de ce dialogue intra-utérin, les cytokines membres de la famille des IL-6, comme LIF, sont particulièrement importantes [5]. LIF est reconnu pour son rôle essentiel durant l'implantation embryonnaire et son rôle de médiateur anti-inflammatoire décrit dans l'interaction

trophoblaste/macrophage [6, 7]. Cependant, LIF stimule également la production d'autres facteurs de la famille des IL-6 dans l'environnement intra-utérin, tel que l'Oncostatine M (OSM). En effet, la production d'OSM est directement associée à celle du LIF, comme en témoignent les souris LIF KO, où la sécrétion d'OSM au site d'implantation embryonnaire diminue suite à la perte d'expression de LIF [8]. Des études montrent que l'OSM joue non seulement un rôle dans les capacités invasives des trophoblastes mais également dans la production de l'hormone de grossesse [9, 10]. De manière intéressante, bien que ces deux facteurs soient exprimés au site d'implantation embryonnaire et activent des voies de signalisation similaires dans les trophoblastes, leur réponses cellulaires sont pour le moins distinctes [11]. De plus, bien que la présence de l'OSM soit mentionnée à l'interface fœto-maternelle, des interrogations subsistent quant à son implication précise dans les processus d'implantation embryonnaire ou comme médiateur inflammatoire intra-utérin. Notamment dans le maintien de l'immunotolérance à l'interface fœto-maternelle, car rappelons que la grossesse représente un dilemme immunologique. De plus, relativement au LIF, quel est son rôle en tant que médiateur inflammatoire intra-utérin, lors d'un stress inflammatoire susceptible d'altérer les tissus utérins ? C'est pourquoi mon projet de thèse s'est concentré sur ces aspects de l'OSM, une cytokine gestationnelle peu étudiée mais bien présente à l'interface fœto-maternelle.

2.2 Brève introduction à l'immunologie de la reproduction.

Historiquement, la reproduction et l'immunologie étaient considérées comme des disciplines distinctes, mais au travers des âges, les avancées en immunologie ont permis de lever le voile sur certains aspects fondamentaux de la grossesse permettant ainsi de révéler que ces systèmes sont profondément interconnectés.

Le principe d'immunologie dont l'immunité cellulaire, émerge en 1883 avec les travaux de Metchnikoff (1845-1916) avec la découverte de cellules phagocytaires, aujourd'hui appelées macrophages, capables d'engloutir des bactéries par le processus de phagocytose. Par la suite, en 1910, les travaux de Landsteiner (1868-1943) mettent en évidence l'existence des groupes sanguins ABO et l'importance de l'immunisation, un processus de défense immunitaire qui permet de reconnaître et de combattre les agents pathogènes ou étrangers à l'organisme en produisant des anticorps [12]. Des principes fondamentaux qui viendront poser les bases de

l'immunologie moderne et ainsi créer des ponts avec d'autres branches de la biologie comme la reproduction.

Aujourd'hui, l'immunologie de la reproduction est suspectée comme responsable de plusieurs pathologies gestationnelles comme les cas d'avortements précoces/spontanés récurrents ainsi que les échecs d'implantation embryonnaire ou encore les naissances prématurées qui



Peter Medawar avec ces collègues au National Institute

constituent toujours une énigme déconcertante et soulève une question fondamentale : « Pourquoi la mère rejette-t-elle le fœtus ? » Pour aborder cette question, les principes fondamentaux du système immunitaire, à savoir la distinction entre le « soi et le non-soi », attribuent ce rejet du non-soi à la réponse du système immunitaire maternel face au fœtus [13]. Ce concept de « rejet immunologique » a été introduit il y a plus de 70 ans par Sir Peter Medawar (Photo [1]). C'est au début des années 1950 que Medawar a identifié pour la première fois la complexité immunologique unique qui existe à l'interface fœto-maternelle entre la mère et le fœtus, et son importance potentielle dans un

contexte de transplantation [13]. Il décrit "l'analogie de l'allogreffe fœtale", où le fœtus est considéré comme un conceptus semi-allogénique qui contournerait la réponse immunitaire maternelle pour échapper au rejet. En effet, les observations de Medawar autour de la transplantation et de son observation de la grossesse soulèvent une question centrale : comment la mère peut-elle tolérer le fœtus pendant neuf mois ? Ce à quoi Medawar a proposé trois hypothèses: (1) l'isolement du fœtus par rapport au système immunitaire maternel grâce à une barrière mécanique ; (2) la suppression immunologique du système immunitaire maternel ; ou (3) le fœtus pourrait être antigéniquement immature, donc invisible pour la mère [13, 14].

Les hypothèses de Medawar (Photo), qui voyaient l'unité fœto-placentaire comme une allogreffe, ont inspiré de nombreuses recherches. Au fil de nos compréhensions, l'idée que le rejet du fœtus est évité par la suppression du système immunitaire maternel ou la non-reconnaissance des antigènes fœtaux et placentaires ont été écartés. L'évolution de la vision actuelle adoptée autour

de la réponse immunitaire maternel face au fœtus propose des mécanismes d'immunotolérance actifs et identifiés, permettant la reconnaissance des antigènes fœto-placentaires par le système immunitaire maternel [13].

C'est au début des années 1980 que Tom Wegmann avance deux nouvelles théories autour des mécanismes d'immunotolérances durant la grossesse : l'une étant la théorie de l'immunotrophisme et l'autre, la proposition selon laquelle "la grossesse allogénique est un phénomène Th2 soit tolérogène" [15]. Néanmoins, le paradigme que "la grossesse est un phénomène Th2" a été redéfinie, notamment avec la découverte de l'importance d'un environnement pro-inflammatoire transitoire et contrôlé lors de l'implantation embryonnaire.

Limiter la grossesse à un simple environnement immunologique Th2 était une représentation réductionniste de l'importance de l'activité immunologique à l'interface fœto-maternelle. C'est pourquoi les recherches se sont davantage appliquées à comprendre les mécanismes immunologiques, moléculaires et cellulaires derrière cette symbiose fœto-maternelle unique qui accompagne chaque étape de la grossesse. Certaines études ont soulevé le rôle clé des cellules Natural Killer (NK) [16], d'autres l'importance des molécules d'adhésion lors de l'implantation embryonnaire [17] ou encore l'implication des molécules inflammatoires toujours dans l'implantation [18, 19].

Les découvertes récentes sur les mécanismes de tolérance immunitaire, incluant le rôle des cellules NK, des macrophages, des lymphocytes T CD4⁺ et de leurs sous-types Th1 et Th2, ainsi que des divers médiateurs immunitaires, ont conduit à l'intégration de nouveaux paradigmes. Parmi eux, la théorie du danger et de l'activité tolérogène, proposée en 1990 par Polly Matzinger, suggère que le système immunitaire ne se limite pas à distinguer le « soi » du « non-soi », mais réagit plutôt lorsqu'il détecte une menace pour l'intégrité de l'organisme, d'un organe ou d'une cellule [20]. Ainsi, des antigènes, des cellules ou des organes transplantés, bien qu'allogéniques mais sains, n'induisent pas toujours de réponse immunitaire, tout comme un embryon viable et prêt pour l'implantation [21]. De plus, en lien avec le rôle des cellules immunitaires dans le maintien de l'immunotolérance à l'interface fœto-maternelle, l'intervention des cytokines telles que le TGF- β , le GM-CSF et l'IFN- γ a été largement explorée, notamment à travers la théorie de l'« immunotrophisme », proposée par Wegmann et mentionnée précédemment [15]. Ainsi, la régulation de l'inflammation par ces cytokines est désormais reconnue comme un pilier central

pour favoriser la vascularisation et le flux sanguin nécessaires à la croissance du fœtus et à la placentation [56].

2.3 La viabilité de l'endomètre utérin : point de départ de la grossesse.

2.3.1 Description macroscopique de l'endomètre utérin : cellules et glandes endométriales.

La santé et la fonctionnalité des tissus utérins sont essentielles au succès de la gestation. La viabilité de l'endomètre utérin, qui accueille l'embryon et soutient son développement précoce, repose sur des changements morphologiques et fonctionnels étroitement liés à l'influence des hormones systémiques et locales. Ces adaptations, survenant au cours du cycle menstruel ou pendant la grossesse, déterminent la capacité de l'utérus à permettre l'implantation de l'embryon et à établir l'interface fœto-maternelle.

Anatomiquement, l'endomètre représente la paroi interne de l'utérus surmontée d'un épithélium luminal et se compose de deux principales structures : le stroma formé de cellules stromales endométriales et les glandes utérines (figure 1). Bien que ces deux structures soient distinctes, elles interagissent et dépendent l'une de l'autre pour les fonctions utérines. Le stroma endométrial, représente la plus grande portion de l'endomètre et contrôle la prolifération, le remodelage et la dégradation des tissus pendant le cycle menstruel. Il assure le maintien de l'endomètre et contient les vaisseaux sanguins qui irriguent les glandes utérines dont il régule la croissance et les fonctions. Il abrite également des cellules immunitaires résidentes, qui assurent la protection et la défense immunitaire des tissus environnants tout en participant à la régénération et au maintien des fonctions endométriales tout au long du cycle menstruel [22]. Quant aux glandes endométriales, elles sécrètent des facteurs essentiels aux fonctions de l'endomètre, notamment, lors du premier contact entre l'épithélium luminal intra-utérin et l'embryon précoce favorisant ainsi l'implantation embryonnaire. Un fonctionnement anormal des cellules stromales endométriales (CSE) ou des glandes endométriales (GE) peut non seulement compromettre l'implantation embryonnaire, mais également altérer le développement normal de la grossesse, ce qui peut entraîner une perte précoce de l'embryon [23, 24].

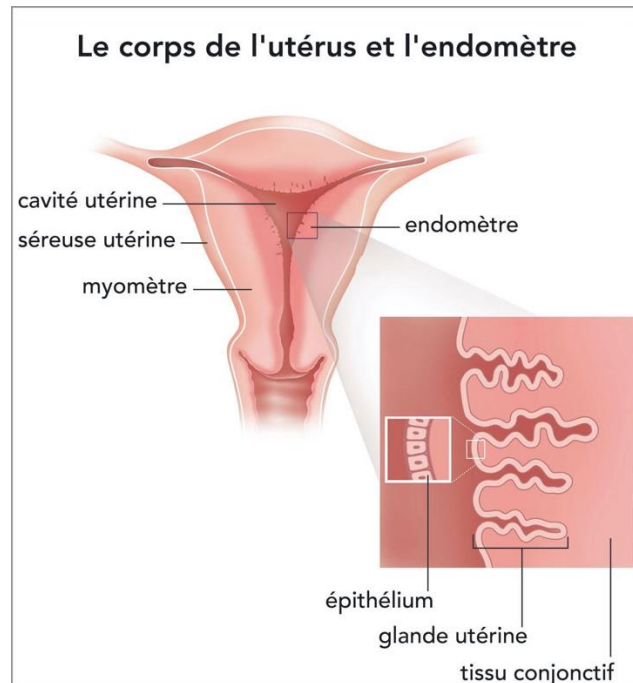


Figure 1 : Le corps de l'utérus. Paroi utérine composée de trois couches distinctes : couche séreuse externe, couche de muscle lisse ou myomètre, couche muqueuse interne ou endomètre. L'endomètre tapisse la cavité utérine et ce constitue lui-même d'une première couche de cellules qui forment l'épithélium et un tissu conjonctif ou stroma qui contient les glandes endométriales. (Source : Les traitements du cancer de l'endomètre, collection Guides patients Cancer info, INCa, mai 2013)

2.3.2 Le cycle menstruel.

L'endomètre est un tissu complexe, dynamique et hétérogène composé de plusieurs types de cellules. Cette composition cellulaire change régulièrement au cours du cycle menstruel et tout au long de la grossesse en réponse aux changements hormonaux systémiques et locaux [22].

Le cycle menstruel chez la femme dure en moyenne 28 jours. Durant celui-ci, l'endomètre subit des changements successifs pour se préparer à une éventuelle implantation embryonnaire. La première moitié du cycle (jour 1 à 14), appelée phase proliférative ou phase folliculaire, est caractérisée par une croissance cellulaire active. Sous l'influence des œstrogènes produits par l'ovaire, la croissance des CSE et des GE sera stimulée afin de promouvoir l'épaississement de l'endomètre (figure 2). La diminution des œstrogènes entraîne un état de latence de l'endomètre qui en absence de conceptus ne développera pas les structures nécessaires à l'implantation.

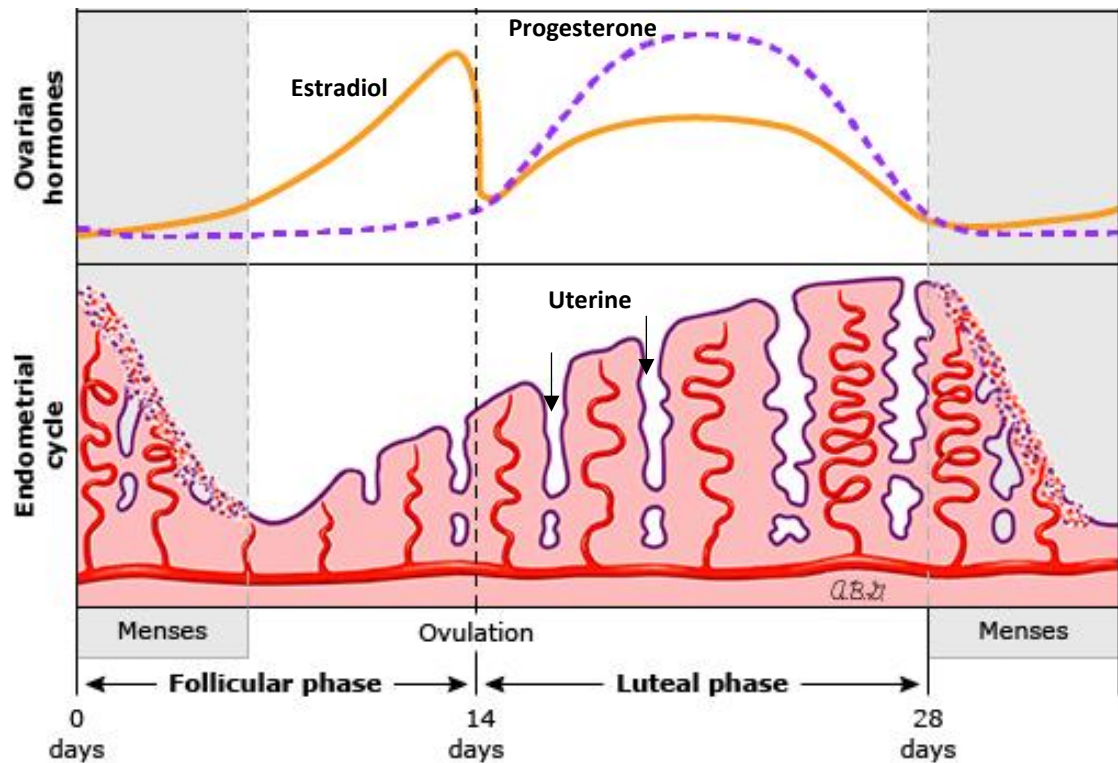


Figure 2 : Le cycle menstruel : Il dure 28 jours et commence par la phase menstruelle (*menses*) avec le premier jour des règles et dure 3 à 7 jours. Cette phase survient lorsque l'ovule du cycle précédent n'a pas été fécondé. Les niveaux d'œstrogènes et de progestérone chutent et entraîne l'élimination de la muqueuse utérine. La phase folliculaire (*follicular phase*) commence le premier jour des menstruations et se poursuit jusqu'à l'ovulation. Les niveaux d'œstrogènes augmentent favorisant la croissance des cellules stromales ce qui induit l'épaississement de l'endomètre utérin. L'ovulation, au jour 14 est suivi de la phase lutéale (*luteal phase*) qui dure jusqu'au jour 28 du cycle menstruel. Les niveaux de progestérone augmentent et induit le processus de décidualisation. En absence de conceptus, les niveaux de progestérone et d'œstrogènes diminuent, ce qui déclenche la phase menstruelle, le cycle recommence. (Source : Quizlet, modifié)

L'ovulation marque le début de la seconde phase du cycle menstruel au jour 14, entraînant la production ovarienne de progestérone. Cette phase, appelée phase sécrétoire ou lutéale (jour 14 à 28), est marquée par la substitution de la progestérone aux œstrogènes (figure 2).

La progestérone inhibe la croissance des CSE tout en favorisant leur différenciation en cellules stromales déciduals (CSD), un processus connu sous le nom de décidualisation. Durant cette phase du cycle menstruel, les GE se présentent sous la forme de vacuoles sécrétoires visibles au microscope, d'où l'appellation de phase sécrétoire. L'ensemble de ces processus a lieu en vue

d'accueillir un embryon dans la cavité utérine. Kliman HJ, McSweet JC, Grunert GM, Cardone VRS, Cadesky K, Keefe DL. The endometrial function test (EFT) directs care and predicts ART outcome. Fertil Steril 2002;78:S17.

2.3.3 La décidualisation

La décidualisation désigne les modifications fonctionnelles, morphologiques et immunologiques de l'endomètre durant la phase sécrétoire qui conduisent à faciliter l'implantation embryonnaire [25]. La capacité des CSE à transitionner à cet état cellulaire alternatif de CSD semble être le facteur clé du processus de décidualisation. Les CSD ne sont pas simplement des CSE modifiées ; elles constituent un type de cellule distinct, avec une reprogrammation génétique différente des CSE. Cette reprogrammation inclut la régulation négative des gènes associés à la réponse pro-inflammatoire et à la résistance à l'invasion tissulaire, ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes qui favorisent la prolifération cellulaire, la tolérance et l'invasion tissulaire [22]. De plus, les CSD subissent une adaptation notable de leur métabolisme du glucose. Elles sont capables d'absorber de grandes quantités de glucose, qu'elles stockent sous forme de glycogène (figure 3). Cette capacité de stockage leur permet de répondre aux besoins nutritionnels de l'embryon précoce en fournissant une réserve énergétique, notamment durant la grossesse précoce avant la placentation [26].

Cette transition déciduale implique également un enrichissement des leucocytes intra-utérins, la formation des artères spiralées dans l'endomètre, par un élargissement de l'endothélium et une vacuolisation, accompagnée d'une désorganisation des muscles lisses, permettant de faciliter une future invasion de l'embryon par le trophoblaste (figure 3) [27].

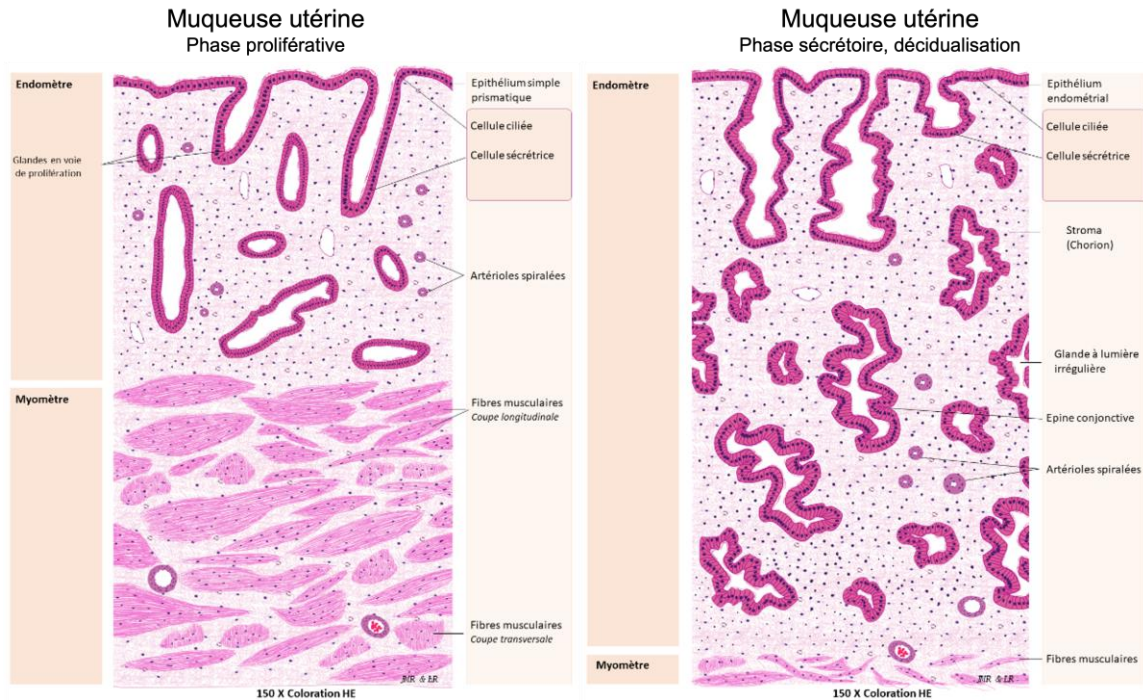


Figure 3 : Description de la muqueuse utérine en phase proliférative versus pendant la décidualisation: Phase proliférative : épithélium superficiel constitué de cellules prismatiques simples, avec des cellules ciliées et sécrétrices et formation de glandes tubuleuses droites. À la fin de la phase de prolifération, les glandes prennent un aspect sinueux. Tissu conjonctif ou stroma, présente une prolifération cellulaire notable, augmentant l'épaisseur de la muqueuse, et est vascularisé par des artéριοles profondes (artères spiralées) qui forment un réseau capillaire sous-épithélial. Phase sécrétoire, décidualisation : Muqueuse plus épaisse, fin de division des cellules épithéliales et stromales. Les glandes ont une forme irrégulière, contournée avec une lumière large et rétrécie avec des « épines conjonctives », aspect en dentelle. Les cellules épithéliales se chargent en glycogène ; des sécrétions apparaissent dans la lumière glandulaire. Artères spiralées plus nombreuses et dilatées. (Source :umontpellier histologie et pathologie des organes)

En réprimant les gènes pro-inflammatoires, les CSD adoptent une activité anti-inflammatoire dépendante de la progestérone au sein de la couche déciduale [28]. Cela permet d'établir et de maintenir un environnement immunotolérant pour l'embryon, réduisant ainsi le risque de rejet de ce dernier ; perçu comme une semi-allogreffe par le système immunitaire maternel [29]. Ainsi, au cours de la grossesse, les CSD et les cellules immunitaires locales coopèrent pour former une matrice spécialisée pour contrôler l'invasion des cellules embryonnaires et la formation du placenta [22].

Durant cette période, l'endomètre connaît une période de réceptivité embryonnaire maximale, de 4 à 6 jours chez l'humain, appelée « fenêtre d'implantation embryonnaire » [25]. Période

durant laquelle l'embryon a le plus de chances de s'implanter dans la couche déciduale et d'initier la mise en place de l'interface fœto-maternelle de concert avec les cellules utérines [2] [23]. Chez l'humain, la décidualisation se produit à chaque cycle menstruel même en absence d'embryon contrairement à chez les murins où la décidualisation est déclenchée par la présence d'embryon dans l'utérus [17]. C'est pourquoi, la transition déciduale complète, chez l'humain, se produit lorsque le blastocyste (embryon précoce) interagit avec l'endomètre. De ce fait, en cas d'implantation embryonnaire dans l'utérus, la réaction déciduale se poursuivra ; autrement, la décidue sera éliminée lors des menstruations, un processus déclenché par le retrait de la progestérone à la fin de phase sécrétoire (figure 2) [30].

2.4 Mise en place de l'interface fœto-maternelle.

2.4.1 L'implantation embryonnaire : initiation de la mise en place de l'interface fœto-maternelle.

Chez l'humain, le blastocyste se forme environ 5 à 6 jours après la conception. Il est constitué de deux lignées cellulaires primaires : une masse cellulaire interne (MCI) (Figure 4) destinée à former les futures structures fœtales, et une couche externe de cellules extra-embryonnaires, trophoblaste (TE) qui entoure la MCI, destinée à former les structures placentaires. Formé au niveau des trompes de Fallope, le blastocyste précoce migre dans la cavité utérine, sort de la zone pellucide et entre en contact avec l'épithélium endométrial. L'implantation est déclenchée lorsque les cellules du trophoblaste traversent la couche épithéliale superficielle de la décidue et se déroule en trois étapes successives : l'apposition, l'attachement et l'invasion (Figure 4) [25].

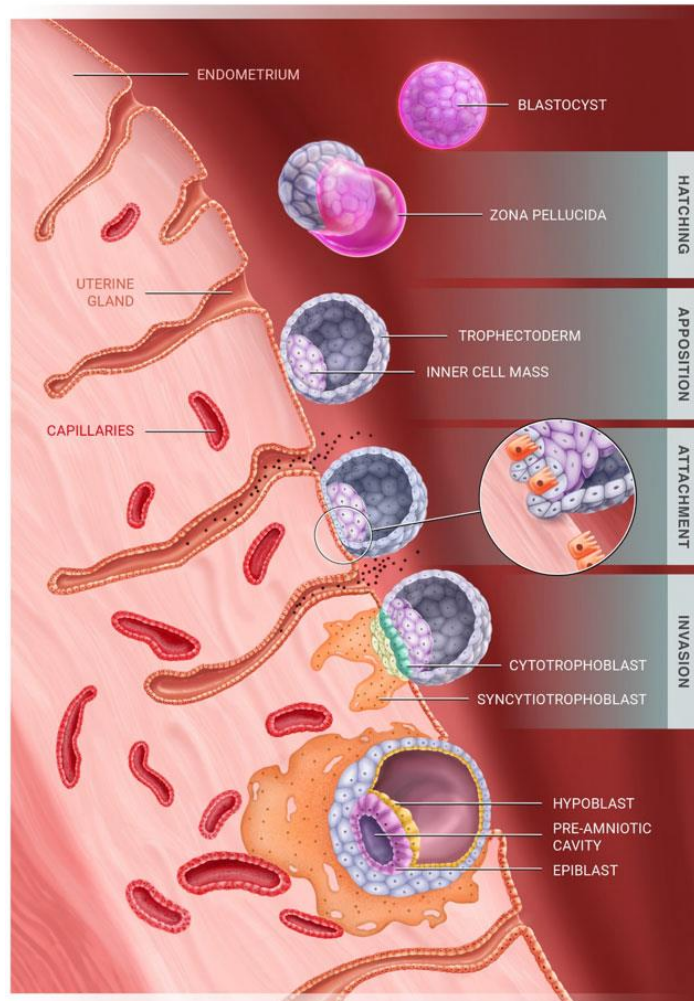


Figure 4 : Étapes de l'implantation embryonnaire chez l'humain. *Hatching* : le blastocyste précoce émerge de la zone pellucide et entre en contact avec l'endomètre. *Apposition* : faible adhésion initiale du blastocyste et de l'épithélium endométtrial par l'interaction des molécules (intégrines, cadhérines et sélectines). *Attachment* : renforcement de la jonction embryo-endométriale. *Invasion* : rétraction épithéliale et différenciation du trophoblaste en couches de cytotrophoblastes (CTB) et de syncytiotrophoblastes (STB) qui envahissent l'endomètre stromal. La masse cellulaire interne entame alors le processus de développement embryonnaire, qui commence par la différenciation en tissus distincts (hypoblaste et épiblaste) [25].

L'apposition, représente le premier contact du TE avec l'endomètre. Au travers d'une faible interaction entre le blastocyste et l'endomètre, l'attachement du blastocyste est initié durant cette première étape. C'est le début d'un dialogue cellulaire étroit entre les tissus embryonnaire et utérin menant à une adhésion moléculaire plus forte entre le blastocyste et la paroi utérine (figure 4) [17].

L'attachement, est l'association du TE et de l'épithélium utérin résultant de l'expression et de l'interaction de molécules d'adhésion telles que les intégrines, les sélectines et les cadhérines permettant de renforcer la liaison de l'embryon à la matrice utérine. À ce stade, la présence de récepteurs de surface ainsi que la sécrétion hormonale au sein de l'utérus permettent de consolider l'interaction entre l'embryon et l'endomètre (épithélium utérin). Cette interaction induit « l'ouverture » de l'épithélium endométrial, permettant au trophoblaste de traverser et d'accéder directement au tissu stromal décidual (figure 4) [17].

L'invasion est la dernière étape du processus d'implantation embryonnaire. Le trophoblaste envahi le tissu stromal décidual, les cellules du trophoblaste prolifèrent et se différencient en types cellulaires spécialisés : le syncytiotrophoblaste (STB) et le cytotrophoblaste (CTB) (figure 4). La prolifération et la différenciation continue des cellules trophoblastiques représentent des points critiques dans la formation et le maintien des fonctions placentaires [25, 31].

2.4.2 La placentation

L'implantation embryonnaire marque le début du processus de la placentation. Le placenta est un organe unique à la grossesse, ce dernier assure les échanges entre la mère et le fœtus. Durant les premières semaines de grossesse, il connaît un développement rapide ainsi que des changements dynamiques dans sa structure et ses fonctions. Tout au long de la grossesse, le placenta assure un ensemble de fonctions essentielles au développement fœtal, telles que l'adaptation physiologique et métabolique de la mère, le maintien de l'immunotolérance à l'interface fœto-maternelle, les échanges de nutriments et de gaz entre la mère et le fœtus et l'élimination des déchets [32].

Au cours des neuf mois de gestation, les villosités placentaires subissent des transformations morphologiques dynamiques et vont jusqu'à former un réseau ramifié de 12-14 m² afin d'assurer un apport nutritif optimal à la croissance fœtale. La formation et les transformations successives de ces villosités placentaires résultent de la différenciation des trophoblastes qui régissent les différentes étapes du processus de placentation [32].

2.4.3 Différenciation et fonction des cellules trophoblastiques, principaux acteurs de la placentation.

Durant les premières semaines de grossesse, le placenta humain génère des cellules trophoblastiques, issues du trophoctoderme du blastocyste (figure 4). Ces dernières sont impliquées dans diverses fonctions biologiques, incluant l'attachement de l'embryon aux cellules utérines, la mise en place d'une nutrition histiotrophique précoce (alimentation du fœtus par les sécrétions glandulaires déciduales) et l'adaptation vasculaire de l'utérus maternel. C'est pourquoi, la différenciation et la spécialisation des cellules trophoblastiques dès le premier trimestre de grossesse sont fondamentales pour soutenir le développement et le maintien des fonctions placentaires tout au long de la grossesse [33]. Le placenta humain est formé de trois principales sous-populations de cellules trophoblastiques : le cytotrophoblaste (CTB), le cytotrophoblaste extravilleux (EVT), et le syncytiotrophoblaste (STB) [34]. Leur différenciation s'initie après l'implantation, à partir des cellules souches du TE qui génère la première lignée de trophoblastes : les cytotrophoblastes (CTB). Les cellules du CTB sont indifférenciées et prolifératives, elles expriment des marqueurs de pluripotence telles que les facteurs Wnt et EGF (Facteur de croissance épithéliale) et présentent une inhibition des facteurs de différenciation cellulaire telles que TGF- β , HDAC (histone désacétylase) et ROCK (Kinase régulée par le domaine Rho) [34] (Figure 5). Sous l'effet de facteurs micro-environnementaux, elles se différencient et donnent naissance aux cellules du EVT et du STB (figure 5) [35].

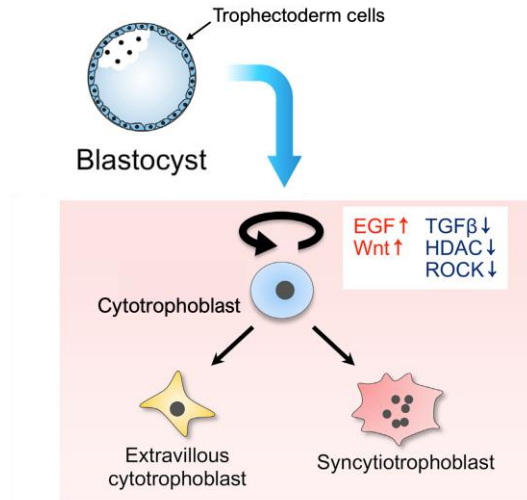


Figure 5 : Différentiation des trophoblastes : Différentiation des cellules du trophoblaste en cytotrophoblaste (*cytotrophoblast*). Les cellules cytotrophoblastiques présentent une programmation génétique semblable aux cellules souches avec une expression d'EGF et de Wnt et une répression des facteurs TGF- β , HDAC et ROCK, ce qui les maintient indifférenciées. Différentiation de cellules cytotrophoblastiques en cytotrophoblaste extravilloux (*Extravillous cytotrophoblast*) ou en syncytiotrophoblaste (*syncytiotrophoblast*). (Modifié, [34])

Les cellules du EVT sont principalement invasives et se subdivisent en sous-types. Les EVT interstitiels qui envahissent le compartiment déciduel maternel et interagissent intimement avec les cellules immunitaires déciduales et stromales utérines pour contrôler l'invasion des trophoblastes et les propriétés immunologiques placentaires. Les EVT endovasculaires migrent dans les artères spiralées utérines pour les remodeler afin d'augmenter le flux sanguin vers le placenta et favoriser le développement fœtal. Des dysfonctionnements dans le système d'invasion des EVT endovasculaires pourraient mener à des complications de grossesse telles que la prééclampsie ou le retard de croissance intra-utérin du fœtus, en raison d'anomalies dans la formation des artères spiralées, essentielles pour la vascularisation placentaire [36].

D'un autre côté, la différenciation et la fusion cellule-cellule du CTB mène à la formation d'un acteur essentiel dans l'élaboration de l'interface fœto-maternelle, le syncytiotrophoblaste (STB) (figure 5). Pendant le développement embryonnaire, deux types distincts de syncytiotrophoblaste ont été identifiés : le syncytium primitif qui assure l'implantation précoce de l'embryon au cours de la deuxième semaine après fécondation et le syncytium définitif qui tapisse les villosités chorales à partir de la troisième semaine. L'une des étapes clés de la différenciation trophoblastique menant à l'invasion de l'embryon précoce dans les tissus utérins est la formation

du STB primitif. Lorsque les cellules du TE entre en contact avec les cellules épithéliales utérines, elles commencent à proliférer et à se différencier en cellules CTB. Ces dernières initient le processus de fusion cellule-cellule et génèrent une large cellule à plusieurs noyaux. Le regroupement des multiples cellules multinucléées aboutie à la formation du syncytiotrophoblaste primitif soit une couche multinucléée qui a perdu sa capacité proliférative. Il semble que seule cette couche multinucléée soit capable de pénétrer l'endomètre utérin et permettre l'intégration de l'embryon dans le stroma [37]. Une fois l'implantation embryonnaire achevée, le STB primitif enveloppe l'embryon, formant une couche continue et multinucléée immergée dans le sang maternel. C'est pourquoi le placenta humain est défini comme hémochorial [37]. Le STB primitif occupe diverses fonctions biologiques indispensables au succès de la grossesse : il sécrète des hormones essentielles au maintien de cette dernière, facilite le transport des nutriments, les échanges gazeux entre la mère et le fœtus, favorise l'immunos tolérance et offre une protection contre les pathogènes [38].

2.4.4 Différentiation biochimique et morphologique du CTB en STB : de la formation initiale du STB.

Le STB a une durée de vie limitée et nécessite un renouvellement régulier. Grâce à la différenciation contrôlée et à la fusion continue des CTB, il est constamment approvisionné en cytoplasme et en noyaux frais tout au long de la grossesse. Ce processus de différenciation, appelé syncytialisation, est hautement régulé par des facteurs micro-environnementaux et induit des changements biochimiques avec l'apparition de fonctions endocriniennes ainsi que des changements morphologiques, formation de la couche multinucléée, propres au STB lui permettant de remplir ces fonctions au sein de l'interface fœto-maternelle. Bien que les différenciations biochimique et morphologique soient coordonnées, elles semblent être orchestrées par des processus intracellulaires distincts. La différenciation des cytotrophoblastes implique l'intégration de multiples voies de signalisation et de facteurs de transcription tels que la Protéine de liaison à la réponse C-AMP (CREB), l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC)/protéine kinase A (PKA), ainsi que de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK). Sur le plan morphologique, la fusion des cytotrophoblastes implique une transition épithélio-mésenchymateuse qui entraîne la perte de protéines de jonction comme l'E-cadhérine, la réorganisation du cytosquelette et le mélange du contenu intracellulaire entre les cellules. Cette fusion intercellulaire est principalement médiée par l'expression de gènes de fusion appelés

syncytines, soit les syncytine-1 et syncytine-2 dans le cas du STB [35]. Parallèlement la différenciation biochimique ou fonctionnelle de CTB passe principalement par la capacité du STB à produire la gonadotrophine chorionique humaine (*human chorionic gonadotrophin*) (hCG), la première hormone à être spécifiquement synthétisée par l'embryon après l'implantation. Durant le premier trimestre de grossesse, elle participe à favoriser l'invasion des trophoblastes, notamment en stimulant l'expression de protéases telles que les métalloprotéases (MMP)-2 et 9 ainsi que l'expression de facteurs immunitaires gestationnels comme le *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) [39]. Il a été démontré que l'hCG pourrait être le lien placentaire favorisant le développement de la tolérance immunitaire autour du trophoblaste pour faciliter l'invasion trophoblastique en réduisant la prolifération des cellules endométriales tout en favorisant l'apoptose de ces dernières, par l'expression de la protéine FasL [40]. Elle joue également un rôle dans la différenciation du trophoblaste durant son pic d'activité et diminue progressivement jusqu'à la 19^{ème} semaine de grossesse [33, 41]. La production de hCG par le STB dépend étroitement du taux de différenciation de CTB, néanmoins, sa synthèse est régulée par plusieurs facteurs indépendants, tels que l'hormone de libération de la gonadotrophine placentaire (GnRH) et la leptine, qui provoquent tous deux une libération pulsatile de hCG. Les cytokines comme l'interleukine (IL)-1 et l'IL-6, le facteur de croissance épithélial (EGF) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) stimulent également la production de hCG, tandis que la progestérone et l'œstradiol inhibent sa production [42, 43]. La hCG joue un rôle antigonadotrophique en inhibant les hormones LH et FSH, ce qui prévient l'ovulation pendant la grossesse. Elle exerce une activité immunomodulatrice qui sera discutée ultérieurement. De plus, au début de la grossesse, la hCG stimule la production de progestérone par le corps jaune, puis par le trophoblaste plus tard dans la grossesse [42]. À la fin du premier trimestre, la hCG participe à la différenciation des STB villeux (définitif) pour initier la formation des villosités placentaires en s'associant aux CTB prolifératifs [35, 44]

2.4.5 Transition du STB primitif en STB définitif ou villeux.

La transition du syncytium primitif au syncytium définitif ou villeux est un processus complexe et essentiel dans le développement du placenta. Au travers de cette vaste couche multinucléée que forme le STB primitif, les noyaux des cellules syncytiales présentent également une certaine diversité morphologique. En effet, ces derniers s'agglomèrent pour former des agrégats nucléaires syncytiaux, caractérisés par des regroupements comptant au moins dix noyaux, formant des

structures spécifiques au STB comprenant : des germes « *sprout* », des ponts « *bridges* » et des nœuds « *knots* » [45]. Les germes ou « sprouts » syncytiaux sont principalement observés dans le placenta au premier trimestre et marquent le début du développement des villosités (figure 6). Les ponts « bridges » sont des zones fortement nucléées qui connectent deux villosités. Quant aux nœuds « knots » syncytiaux, ces derniers se forment proche du terme et dépassent la surface des villosités [45]. La formation de ces différents sous-types de STB est directement impliquée dans le développement du placenta humain.

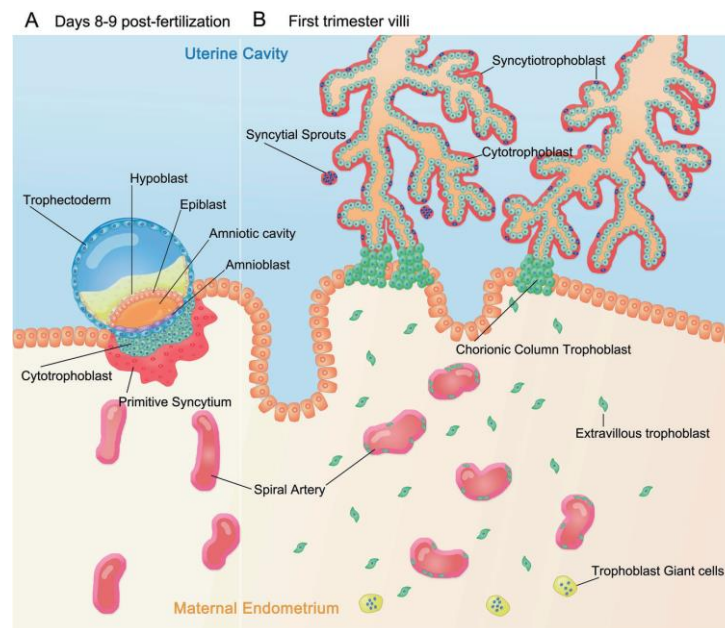


Figure 6 : Formation du syncytiotrophoblaste: A Implantation du blastocyste dans l'endomètre maternel entre les jours 5 et 7 après la fécondation. Aux jours 8 à 9, différenciation du trophectoderme en cytotrophoblastes, qui fusionnent pour former un syncytium primitif multinucléé. Forte capacité invasive du syncytium primitif et régulation de la tolérance immune à l'interface fœto-maternel. Après invasion, le syncytium primitif entoure l'embryon. B Début du premier trimestre, formation des villosités placentaires à partir des CTB mononucléés prolifératifs internes et des STB multinucléés externes. Germes syncytiaux « syncytial *sprout* » correspondent à la formation de nouvelles villosités. À la fin du premier trimestre, l'arbre villositaire est formé et le EVT envahit profondément l'endomètre. Cellules géantes de trophoblaste (*Trophoblast Giant cells*) proviennent de la différenciation des EVT. (Modifié, [35])

À mesure que l'implantation progresse, les villosités choriales se développent à partir de la surface du STB primitif. Ces villosités augmentent la surface de contact entre l'embryon et l'endomètre, facilitant les échanges nutritifs et gazeux. Les villosités choriales se ramifient et se complexifient,

formant une structure plus élaborée. Le STB primitif se transforme en STB définitif ou villex par la différenciation des CTB restants. Ces CTB prolifèrent et fusionnent pour former un STB plus mature et fonctionnel. Le STB définitif constitue la couche externe des villosités choriales. Il joue un rôle clé dans l'échange des nutriments et des gaz entre la mère et le fœtus et dans la protection du fœtus contre les réponses immunitaires maternelles. Une fois mature, le STB définitif établit des contacts étroits avec les vaisseaux sanguins maternels dans le placenta, facilitant les échanges sanguins et nutritifs nécessaires au développement fœtal et participe également à la production de divers hormones [35].

Des anomalies dans les structures spécifiques du STB, ainsi que dans la formation des villosités placentaires, pourraient être associées à certaines complications de la grossesse, par exemple, une augmentation des nœuds syncytiaux durant le développement du placenta peut mener à des grossesses pathologiques avec des complications telles que la prééclampsie ou le retard de développement fœtal [46].

2.4.6 La placentation humaine : le STB en première ligne.

Durant la période précoce de la placentation humaine, huit jours post-conception, le STB primitif connaît une prolifération rapide ainsi qu'une capacité invasive importante qui facilite l'invasion précoce de l'embryon dans le tissu décidual en détruisant les capillaires et les glandes endométriales [37]. Des cavités, appelées lacunes, se forment dans le STB primitif (Figure 7). Ces dernières approvisionnent l'embryon précoce en nutriments provenant du sang et des sécrétions glandulaires provenant du tissu décidual érodé.

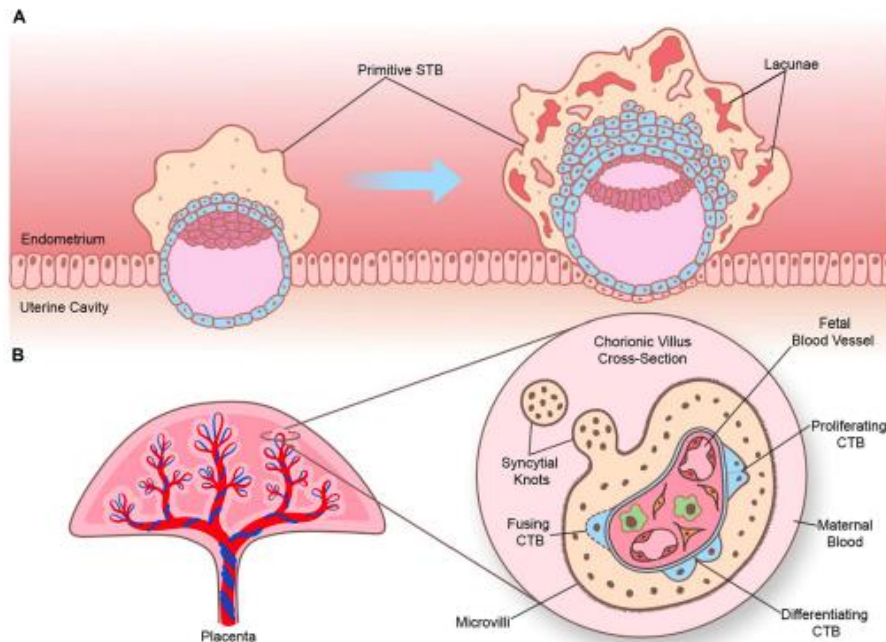


Figure 7 : Développement du placenta humain au cours des 3 premières semaines de gestation : (A) Évolution de l'embryon humain aux jours 7 et 8 de la gestation (péri-implantation ; gauche) et aux jours 9 et 10 (post-implantation ; droite). (B) Coupe transversale d'une villosité chorale à la fin de la gestation. Le noyau villositaire contient des vaisseaux sanguins qui se connectent à la circulation foetale, ainsi que différents types de cellules (telles que les cellules de Hofbauer et les fibroblastes). (Modifié, [35])

Tout au long de sa progression et de sa formation, le STB primitif met en place un environnement propice au développement et à la prolifération de colonnes de CTB pour former les villosités primaires (Figure 7). Ces dernières traversent la couche de STB primitif et fusionnent afin de former une « coquille » de cytotrophoblastes autour de l'embryon permettant un encreage complet de celui-ci dans l'endomètre utérin. Concrètement, c'est à la suite de la formation de la « coquille » trophoblastique que les cellules CTB vont se différencier en EVT invasifs aux extrémités des villosités [32]. Les villosités se ramifient pour créer de plus petites villosités flottantes, qui restent dans les espaces intervilloux, augmentant ainsi la surface de l'arbre villositaire, des villosités chorioniques se forment au cours de la troisième semaine [47].

Durant le processus de placentation, les villosités primaires se différencient en villosités secondaires ; leur surface épithéliale se ramifie et s'étend grâce à la prolifération et à la fusion continue des CT villositaires (vCTB). Ce processus conduit à la formation de la couche STB multinucléée, qui constitue l'interface entre la mère et le fœtus pour le transport des nutriments

et l'échange de gaz dans les villosités flottantes. C'est cette couche de STB qui est à l'origine de la sécrétion des hormones essentielles à la grossesse, telles que la hCG. Enfin, au 17^e jour post-conception, les villosités secondaires se transforment en villosités tertiaires, où les vaisseaux placentaires vont se développer (figure 7). Ainsi, le réseau vasculaire placentaire va se développer jusqu'à se connecter au système vasculaire fœtal après la quatrième semaine de grossesse [47].

2.5 Activité immunologique à l'interface fœto-maternelle : pilier des processus clés à l'interface fœto-maternelle.

2.5.1 Les phases immunologiques de la grossesse.

Pendant longtemps et avec la notion d'immunotolérance à l'interface fœto-maternelle, la grossesse était perçue comme un processus uniforme où l'activité des cellules immunitaires et l'environnement immunologique restaient constant durant les trois trimestres. Cependant, au fil des découvertes et de nos compréhensions nous avons réajusté notre concept selon lequel la grossesse ne présente qu'un environnement anti-inflammatoire ou tolérogène. La réalité est que chaque étape du développement de la grossesse exige un environnement immunologique spécifique afin de soutenir et protéger l'interface fœto-maternelle (figure 8) [14].

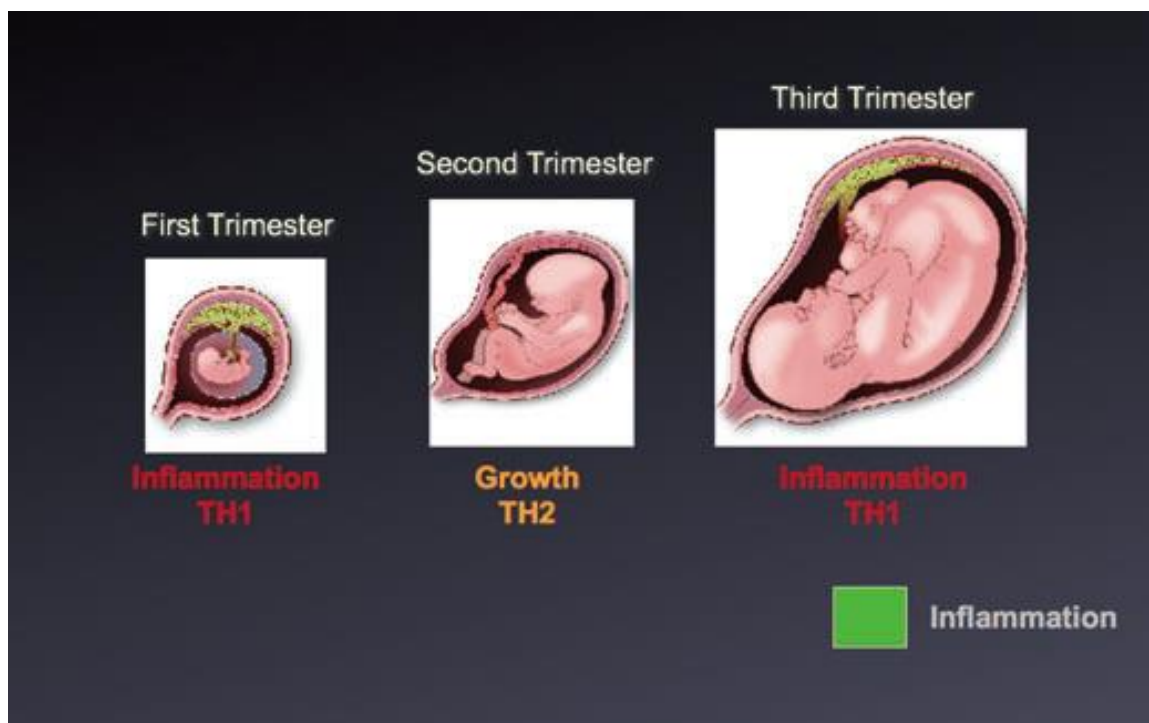


Figure 8 : Phases immunologiques de la grossesse : Chaque étape de la grossesse est caractérisée par un environnement inflammatoire unique. Les premier et troisième trimestres sont pro-inflammatoires (TH1), tandis que le deuxième trimestre représente une phase anti-inflammatoire, également connue sous le nom d'environnement TH2. ([40])

Au début de la grossesse et jusqu'au second trimestre de grossesse, l'implantation, ainsi que la placentation s'apparentent à une « plaie ouverte » dans la cavité utérine. Cette phase de la grossesse nécessite une réponse inflammatoire intense caractérisée par un environnement immunologique de type Th1. Durant cette phase, le blastocyste doit traverser la paroi épithéliale de l'utérus pour s'implanter dans l'utérus, endommageant de fait le tissu endométrial pour l'envahir. Pendant cette période d'activité accrue du système immunitaire maternel, le corps de la mère s'efforce de s'adapter à la présence du fœtus. Cette réponse inflammatoire, en plus des changements hormonaux et d'autres facteurs, est responsable de certains symptômes de grossesse comme les nausées matinales (figure 8) [40].

Le passage de la première à la seconde phase immunologique est un moment charnière de la grossesse. Il est en partie initié par certaines cellules immunitaires de l'endomètre telles que les cellules dendritiques qui adoptent un phénotype spécifique pour favoriser la tolérance aux antigènes paternels en sécrétant des facteurs immunomodulateurs tels que l'IL-10, le TGF- β , l'IL-

6 et l'IL-8. Ces cytokines modifient le phénotype des cellules immunitaires de l'endomètre et initient un environnement tolérogène à l'interface fœto-maternelle [48].

La deuxième phase immunologique de la grossesse est souvent perçue comme une période idéale pour la mère. Cette période est marquée par une prédominance de l'état anti-inflammatoire avec un environnement immunologique de type Th2 tolérogène (figure 8). Le maintien de cet environnement immunotolérant est indispensable au fœtus qui connaît à ce moment une croissance et un développement rapide et une symbiose s'établit entre la mère, le placenta et le fœtus. Ainsi, la femme ne souffre plus de nausées ni de fièvre comme c'était le cas au début de la grossesse [40].

Enfin, durant la troisième et dernière phase immunologique de la grossesse, le fœtus a terminé son développement; tous ses organes sont fonctionnels et prêts à rencontrer et affronter le monde extérieur. À ce stade, la mère doit accoucher, ce qui ne peut se produire qu'avec une réactivation de l'activité inflammatoire dans la cavité utérine. Un environnement de type Th1 va s'installer induisant un afflux de cellules immunitaires et déclencher le processus inflammatoire indispensable à l'accouchement (figure 8). Cet environnement pro-inflammatoire favorise la contraction de l'utérus, l'expulsion du nouveau-né et le rejet du placenta [40].

Ainsi, la grossesse se caractérise par une alternance de phases pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, orchestrées par divers acteurs immunitaires tels que des cytokines des chimiokines, des hormones ou des facteurs de croissance qui interagissent et participent au développement normal des tissus embryonnaires.

2.5.2 Portraits de l'IFN- γ , du GM-CSF, de LIF et de l'OSM, des cytokines actrices dans le processus d'implantation embryonnaire.

Lors de l'implantation du blastocyste, une communication efficace entre les cellules invasives du trophoblaste et l'endomètre maternel revêt une importance cruciale [49]. C'est pourquoi, les cellules immunitaires et trophoblastiques de l'interface fœto-maternelle établissent un dialogue précis grâce à la production de cytokines, de chimiokines, de facteurs de croissance et d'hormones.

Dès la fécondation, avant même l'établissement de la grossesse, la présence de liquide séminal dans le conduit reproducteur induit la production de cytokines par l'endomètre utérin, telles

qu'IL-1 β , IL-6 et le LIF [3]. Cette activité inflammatoire transitoire est nécessaire au niveau utérin afin de moduler la fonction des cellules immunitaires endométriales et induire l'expression des récepteurs de l'épithélium endométrial requis lors de l'attachement embryonnaire et indispensable à l'initiation de l'implantation embryonnaire [50]. Durant le processus de placentation, ces facteurs immunologiques contribueront également au remodelage des artères spiralées en favorisant, d'une part, l'accumulation des macrophages décidaux responsables de la production de métalloprotéases matricielles (MMP) et, d'autre part, en stimulant leur activité en coopération avec les cellules NK pour la production de facteurs angiogéniques tels que l'angiopoïétine et le VEGF essentiels à la formation du placenta [29].

Parmi les cytokines présentes lors de l'implantation embryonnaire, le facteur immunologique interféron gamma (IFN- γ) fait partie des cytokines pro-inflammatoires sécrétées majoritairement par les cellules NK durant le premier trimestre de grossesse [51] (figure 9). Pendant le processus d'implantation, l'IFN- γ limite l'invasion excessive des cellules trophoblastiques dans la paroi utérine. De plus, l'IFN- γ sécrété par les cellules NK participe activement au remodelage des artères spiralées en activant la voie de signalisation STAT1. La sécrétion d'IFN- γ diminue de manière significative jusqu'à la fin de la grossesse, où seul un faible signal d'IFN- γ est détecté dans le trophoblaste extravilleux au niveau de la décidue. Son intervention est également nécessaire en réponse inflammatoire à la suite de dommages placentaires, potentiellement causés par des infections. Cependant, son activité doit être soigneusement régulée pour éviter d'entraver l'implantation embryonnaire ou d'induire une résorption embryonnaire [52]. L'activité de l'IFN- γ renforce la production d'autres cytokines au profil Th1 comme le GM-CSF à l'interface fœto-maternelle. En effet, l'activation des macrophages par l'IFN- γ peut augmenter la production de GM-CSF, ce qui à son tour peut renforcer la réponse immunitaire et l'inflammation [53].

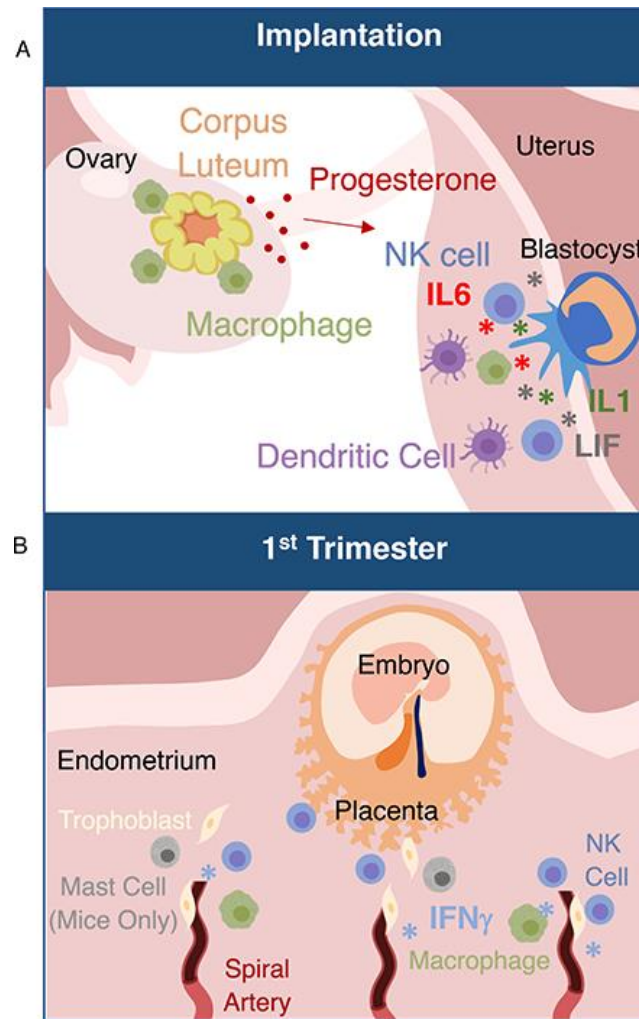


Figure 9 : Réponse immunitaire nécessaire pour l'implantation embryonnaire : (A) Le blastocyste se fixe à l'endomètre utérin maternel et l'envahit. Ce processus s'accompagne d'une réponse inflammatoire conservée au cours de l'évolution, qui comprend l'IL-6, l'IL-1 et le LIF. Les principaux types de cellules nécessaires au début de la grossesse, comme l'ont démontré les modèles murins, comprennent les cellules dendritiques, qui sont essentielles à la décidualisation, et les macrophages, qui sont essentiels au maintien du corps jaune dans l'ovaire. Les cellules NK entourent directement les trophoblastes après l'implantation. (B) Pendant le développement du placenta au cours du premier trimestre, les cellules immunitaires, y compris les cellules NK et les mastocytes, sont nécessaires au remodelage de l'artère spiralée utérine, comme l'ont démontré des modèles de souris. La cytokine IFN- γ est également nécessaire à ce processus dans les modèles murins. (Modifié, [52])

Parmi les nombreuses cytokines présentes durant l'implantation embryonnaire, le GM-CSF est exprimé en quantités importantes [54]. En effet, pendant l'implantation, les lignées cellulaires des

villosités choriales du placenta, les cytotrophoblastes, ainsi que les macrophages placentaires, contribuent à la production de GM-CSF [55]. Ce dernier joue un rôle dans la régulation et la production de hCG au début de la grossesse et par l'activation de STAT5, joue des rôles essentiels dans la morphogenèse placentaire et le développement fœtal en agissant à la fois comme un facteur de tolérance immunitaire maternelle et un facteur trophique de croissance et de viabilité dans les embryons préimplantatoires [56-58]. Le GM-CSF joue un rôle crucial en régulant l'activité et la plasticité des cellules immunitaires, telles que les macrophages, en favorisant la chimiotaxie, l'adhésion, la phagocytose et la cytotoxicité. Cependant, à l'instar de l'IFN- γ , une dérégulation de l'expression de GM-CSF peut être associée à des complications de grossesse, telles que le développement de choriocarcinome [58].

Lors de la mise en place de l'interface fœto-maternelle, un autre groupe de cytokines joue un rôle crucial dans la reproduction. Il s'agit des membres de la famille des IL-6, qui agissent via le récepteur gp130, incluant le LIF, l'IL-11, l'IL-6, ainsi que l'Oncostatine M [5, 8]. À l'interface fœto-maternelle, le LIF prépare l'endomètre à l'implantation en stimulant le processus de décidualisation et induit la différenciation des cellules trophoblastiques (figure 9) [59]. En ce qui concerne le LIF, il est exprimé dans l'endomètre tout au long du cycle menstruel, avec une augmentation notable pendant la phase sécrétoire et au début de la grossesse [60]. Il est exprimé dans les glandes endométriales utérines au quatrième jour de la grossesse, et cette montée d'expression, régulée par des mécanismes maternels, précède systématiquement l'implantation du blastocyste [61]. La sécrétion de LIF est régulée par divers facteurs immunologiques et hormones, tels que la progestérone, la hCG, l'IL-1 et le facteur de croissance épidermique (EGF), qui stimulent sa sécrétion, mais également par l'IFN- γ qui à l'inverse, exerce un effet inhibiteur sur sa sécrétion [60, 62].

Le LIF joue également un rôle crucial dans l'activité et le recrutement des macrophages utérins pour le remodelage des artères spiralés lors de l'implantation embryonnaire [60]. Au niveau des macrophages, le LIF joue un rôle immunomodulateur en induisant la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10, pouvant également participer au maintien de l'immunotolérance à l'interface fœto-maternelle grâce à l'axe macrophages/trophoblastes/IL-10 en inhibant l'activité de l'IFN- γ [7]. Ainsi, une dérégulation de la sécrétion endométriale de LIF durant les phases proliférative et sécrétoire du cycle menstruel peut contribuer à l'infertilité inexplicée et aux échecs d'implantation répétés.

De plus, l'expression de LIF au site d'implantation embryonnaire stimule la sécrétion de l'Oncostatine M (OSM), une autre cytokine de la famille des IL-6. En effet, des études montrent que chez les souris LIF KO, où l'échec d'implantation embryonnaire est notable et chez lesquelles on observe également une diminution de la production d'OSM au niveau utérin au site de l'implantation embryonnaire [10]. Bien que dans ce contexte le rôle d'OSM ne soit pas mis en exergue dans le processus d'implantation embryonnaire, l'OSM est exprimé durant la phase précoce de la grossesse chez la souris et joue un rôle dans le processus de décidualisation afin de promouvoir l'implantation embryonnaire [8]. D'autres études démontrent le rôle d'OSM dans l'expression de MMPs dans les trophoblastes, enzymes indispensables à l'invasion trophoblastique [63]. L'OSM influence également la fonction endométriale en régulant l'expression de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et la réponse immunitaire. Par exemple, l'OSM peut stimuler la production de facteurs de croissance et de cytokines qui favorisent la réceptivité de l'endomètre à l'implantation embryonnaire [64]. De plus, certaines études démontrent que la production de hCG est également liée à la production d'OSM [10]. Cela souligne l'importance de l'OSM dans la préparation de l'endomètre à l'implantation et au soutien de la grossesse. Cependant, son rôle précis dans la modulation des facteurs inflammatoires au sein des populations cellulaires à l'interface fœto-maternelle reste à élucider. Ces aspects seront approfondis ultérieurement.

Ce bref aperçu de ces quatre cytokines de l'interface fœto-maternelle souligne la complexité de la régulation des cellules immunitaires et l'importance cruciale des cytokines en tant que médiateurs de la communication entre le fœtus et la mère, éléments essentiels pour une grossesse saine. Par conséquent, certaines infections ou états inflammatoires chez les femmes enceintes peuvent toucher le système reproducteur de manière grave et avoir des effets délétères sur le développement du fœtus. Dans la progression de ce document, nous approfondirons le rôle des cytokines mentionnées non seulement dans la différenciation du trophoblaste, mais aussi dans le maintien de l'intégrité intra-utérine, afin de préserver l'homéostasie endométriale et la fertilité.

2.6 Les macrophages utérins ont un profil spécifique pour les fonctions endométriales.

Dans l'environnement intra-utérin, les populations de cellules immunitaires sont diversifiées et présentent un phénotype et des fonctions propres à l'environnement utérin. Parmi ces populations, on trouve 65 à 70 % de cellules NK spécifiques à l'utérus (uNK), 10 à 20 % de macrophages dont le pourcentage peut aller jusqu'à 30 % lors de la grossesse, 2 à 4 % de cellules dendritiques et 1 à 2 % de cellules T [40]. Ces différentes populations cellulaires jouent un rôle clef dans la protection contre les pathogènes, l'adaptation immunitaire intra-utérine durant le cycle menstruel et la mise en place de l'interface fœto-maternelle, en particulier les cellules NK et les macrophages, au début de la grossesse [65].

Les macrophages utérins proviennent du recrutement des monocytes sanguins ou provenant du réservoir splénique qui se différencient en macrophages utérins, capables d'accomplir des rôles essentiels tels que la phagocytose, le maintien de l'homéostasie tissulaire, la régulation de la cicatrisation, les interactions trophiques, et la régulation des autres populations de cellules immunitaires [66]. De fait, le phénotype des macrophages et leur impact sur la fonction des tissus sont influencés par leur environnement immédiat. La plasticité des macrophages est également influencée par des facteurs métaboliques et environnementaux qui modifient leur microenvironnement [67], notamment dans les phases de grossesse ou encore dans la régulation des fonctions endométriales jouant ainsi un rôle prépondérant dans leur activité immune [68].

Par ailleurs, dans l'utérus, les macrophages de type anti-inflammatoire dits M2 sont prédominants et jouent un rôle essentiel dans la création d'un environnement immunitaire favorable à l'implantation et au développement du fœtus [69]. Ils sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance qui favorisent la vascularisation et le remodelage tissulaire, ce qui est crucial pour le développement du placenta et la nutrition du fœtus [70]. En cas de grossesse, les macrophages intra-utérins ou décidaux présentent principalement un phénotype M2, caractérisé par une forte sécrétion de cytokines et chimiokines immunosuppressives comme l'IL-10, TGF- β , et le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) qui favorisent la réparation des tissus, l'angiogenèse et le maintien d'un milieu tolérogène et la présence des marqueurs de membrane typiques des cellules M2, CD163 et CD206 (Figure 10). Cette population de macrophages semble être régulée en partie par les hormones sexuelles œstrogène et progestérone que l'on retrouve durant le cycle menstruel [71, 72].

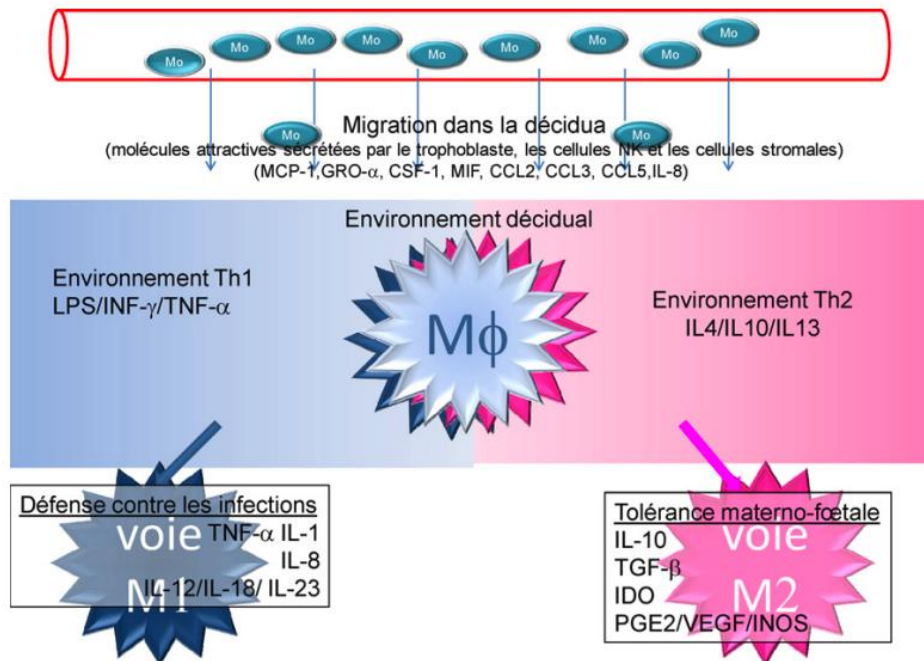


Figure 10 : Dualité (M1/M2) du fonctionnement des macrophages. Les monocytes circulants sont attirés dans la décidue par des molécules produites par les cellules stromales, les cellules trophoblastiques et les cellules Natural Killer. Selon le type de microenvironnement, les macrophages s'orientent vers la voie M1 défensive ou vers la voie M2 tolérante. Les macrophages déciduaux dans les grossesses normales sont plutôt de type M2. ([21])

2.6.1 Les macrophages : principaux acteurs de l'activité inflammatoire intra-utérine

Les macrophages sont les principales cellules présentatrices d'antigène dans de nombreux tissus de l'organisme dont l'utérus ainsi qu'à l'interface fœto-maternelle et leur activité immunomodulatrice dépend de leur remarquable plasticité [48]. En effet, en réponse aux stimuli inflammatoires, les macrophages activent diverses voies de signalisation intracellulaires qui entraînent des schémas de polarisation spécifiques basés sur leur capacité de différenciation classique ou alternative de leur activation [73].

Les macrophages intra-utérins sont impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire innée. Lorsqu'une infection bactérienne survient dans la cavité utérine, notamment à la suite d'une infection ascendante provenant du vagin ou de l'utérus, les bactéries pénètrent dans la cavité

utérine et peuvent déclencher une réponse inflammatoire, entraînant une accumulation de cellules immunitaires et la libération de cytokines pro-inflammatoires qui implique également une activation des macrophages utérins [74]. L'activation des macrophages passent notamment par l'activation des récepteurs TLR (*Toll-Like receptor*) qui détectent les agents pathogènes et initient la réponse immunitaire. Ces récepteurs PRR (*Pattern Recognition Receptor*) se divisent en différentes familles, dont les récepteurs TLR, très conservés chez les mammifères et jouent un rôle clé dans l'activation de la réponse inflammatoire [75]. Plus de dix membres de la famille TLR ont été identifiés, parmi lesquelles, le TLR4 activé par les endotoxines bactériennes dits PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*) telles que le LPS (lipopolysaccharides) présent à la surface des bactéries Gram négatif comme *E.Coli* [76]. Le récepteur TLR4 peut reconnaître à la fois les signaux de dangers, DAMP et les pathogènes, PAMP, ce qui suggère des similitudes entre les réponses inflammatoires infectieuses et non infectieuses (figure 11) [77].

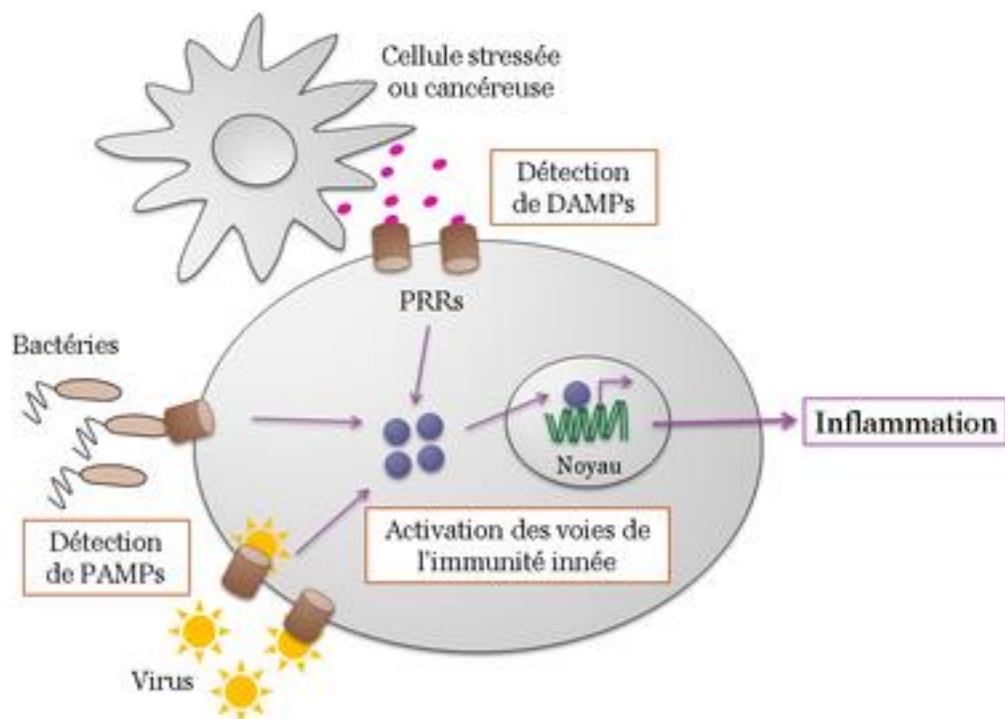


Figure 11 : Activation des récepteurs PRR par des PAMP ou des DAMP : La reconnaissance des microorganismes pathogènes tels que les virus, les bactéries, ou les champignons active les PAMP. Les DAMP, quant à eux, sont activés par la détection de molécules signalant un danger ou un stress cellulaire, comme celles libérées par des cellules cancéreuses. Ces deux types de stimuli déclenchent des voies de l'immunité innée et initient la réponse inflammatoire. (ifé, institut français de l'éducation)

Cette reconnaissance est essentielle pour prévenir les infections et les dommages tissulaires qui pourraient compromettre la grossesse et les tissus utérins [78]. Cependant, l'infection bactérienne intra-utérine et l'inflammation qui en résulte constituent des défis majeurs pour la santé reproductive et la fertilité.

Ainsi, lors de leur activation, les macrophages utérins adoptent une polarisation classique/pro-inflammatoire de type M1 et libèrent des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , IL-6, TNF α , l'IFN- γ , et le GM-CSF [79]. Parallèlement, des médiateurs secondaires, comme l'oxyde nitrique (NO) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS), jouent un rôle clé dans les lésions tissulaires associés à cette réponse inflammatoire [80]. L'établissement de cet environnement Th1 dans la cavité utérine favorise la polarisation M1 des macrophages via un rétrocontrôle positif, produisant des cellules pro-inflammatoires aux fonctions microbicides et tumoricides lors de la réponse inflammatoire (figure 12) [72]. Cette réponse inflammatoire est certes nécessaire pour éliminer les agents pathogènes, mais peut également avoir des effets délétères sur les tissus utérins et la fertilité si elle est excessive ou mal régulée. Lors de la réponse à l'infection, les macrophages utérins adoptent un phénotype classique ou pro-inflammatoire de type M1 associé à une production accrue de cytokines inflammatoires. Cependant, il est crucial que ces cellules puissent se reprogrammer vers un phénotype anti-inflammatoire ou alternatif de type M2, pour la réparation des tissus et la résolution de l'inflammation [81]. Un déséquilibre dans cette polarisation peut conduire à des complications telles que des lésions tissulaires, une altération de la fonction utérine, voire des problèmes de fertilité [82].

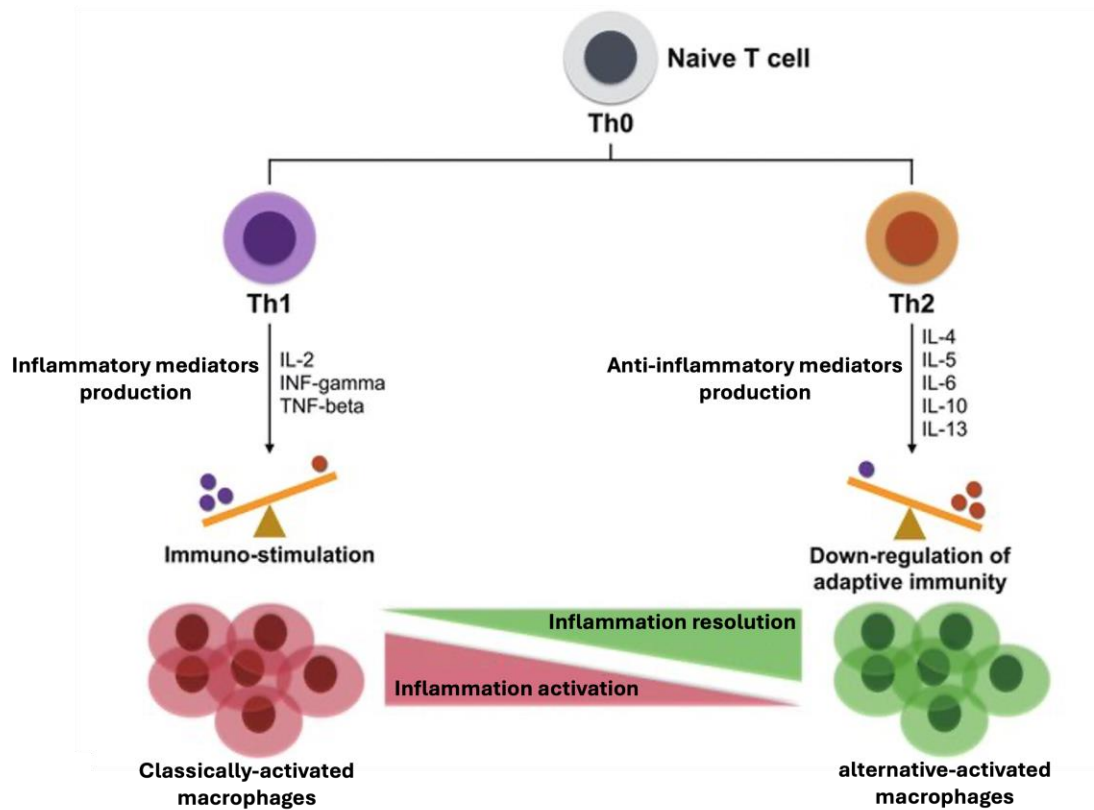


Figure 12 : Effets de Th1/Th2 sur la progression de l'inflammation : Les cellules T naïves deviennent des cellules Th1 ou Th2, après avoir été stimulées par différents facteurs. Dans l'immunité Th1, les cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-2 (IL2), l'interféron-gamma (IFN- γ) et le facteur de nécrose tumorale bêta (TNF- β). Dans l'immunité Th2, les cellules produisent des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13. Dans des circonstances normales, l'immunité Th1 et l'immunité Th2 se rapprochent d'un équilibre. Pour la résolution de l'inflammation (*inflammation resolution*) on observe une augmentation de l'immunité Th2 et une diminution de l'activation de l'inflammation (*inflammation activation*) soit une diminution de l'immunité Th1. De plus, l'immunité Th1 induit l'activation classique des macrophages M1 (*classically-activated macrophages*) et l'immunité Th2 induit le phénotype alternative M2 des macrophages (*alternative-activated macrophages*) pour une résolution de l'inflammation. (Lin et al., 2017, modifié.)

C'est pourquoi, dans le cadre du schéma classique de l'inflammation, sa résolution est essentielle pour maintenir l'homéostasie au sein du tissu affecté, notamment dans les tissus utérins. Ainsi, le phénotype inflammatoire des macrophages est réversible, permettant la transition d'une activité dominante Th1 vers une réponse immune tolérante de type Th2. Grâce à la production de cytokines modulatrices, associées à une activité anti-inflammatoire, la résolution de l'inflammation sera initiée. Celle-ci est en partie induite par la sécrétion d'IL-10, une cytokine immunosuppressive majeure. Les effets de l'IL-10 induisent l'expression de cytokines anti-

inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-13, qui contribuent à la réparation des tissus et à la résolution de l'inflammation et instaure un environnement tolérogène au site de l'inflammation, notamment dans l'utérus [83].

3 Régulation de l'inflammation: la voie de signalisation JAK/STAT, carrefour dans la régulation de la réponse inflammatoire.

L'activation des voies de signalisation intracellulaires par des stimuli inflammatoires primaires joue un rôle clé dans la réponse inflammatoire et implique l'intervention et la production de médiateurs inflammatoires. Parmi les principales voies de signalisation impliquées dans la réponse immune on retrouve, le facteur nucléaire NF- κ B et le signal de transduction JAK/STAT [84].

Parmi les voies importantes de l'activité inflammatoire la voie de signalisation *Janus kinase-signal transducer and transcription activator pathway* (JAK/STAT), hautement conservée est considérée comme l'un des nœuds de communication centraux dans la fonction cellulaire. Plus de 50 cytokines et facteurs de croissance ont été identifiés dans la voie de signalisation JAK/STAT, tels que les hormones, les interférons (IFN), les interleukines et les facteurs de stimulation des colonies. Les événements médiés par JAK/STAT varient et comprennent l'hématopoïèse, la réponse immunitaire, la réparation des tissus, l'inflammation, l'apoptose et l'adipogenèse, donc fonctions relatives à l'activité immunologique. La perte ou la mutation des composants JAK/STAT est liée à de nombreuses maladies chez l'homme. Les JAK sont associés de manière non covalente aux récepteurs des cytokines, assurent la médiation de la phosphorylation de la tyrosine des récepteurs et recrutent une ou plusieurs protéines STAT. Les STATs phosphorylées au niveau de la tyrosine se dimérisent et sont transportées dans le noyau à travers la membrane nucléaire pour réguler des gènes spécifiques. Bien que les STAT puissent être activés par des cytokines qui se chevauchent partiellement, les différents STAT ont des effets biologiques non redondants [85] (figure 13).

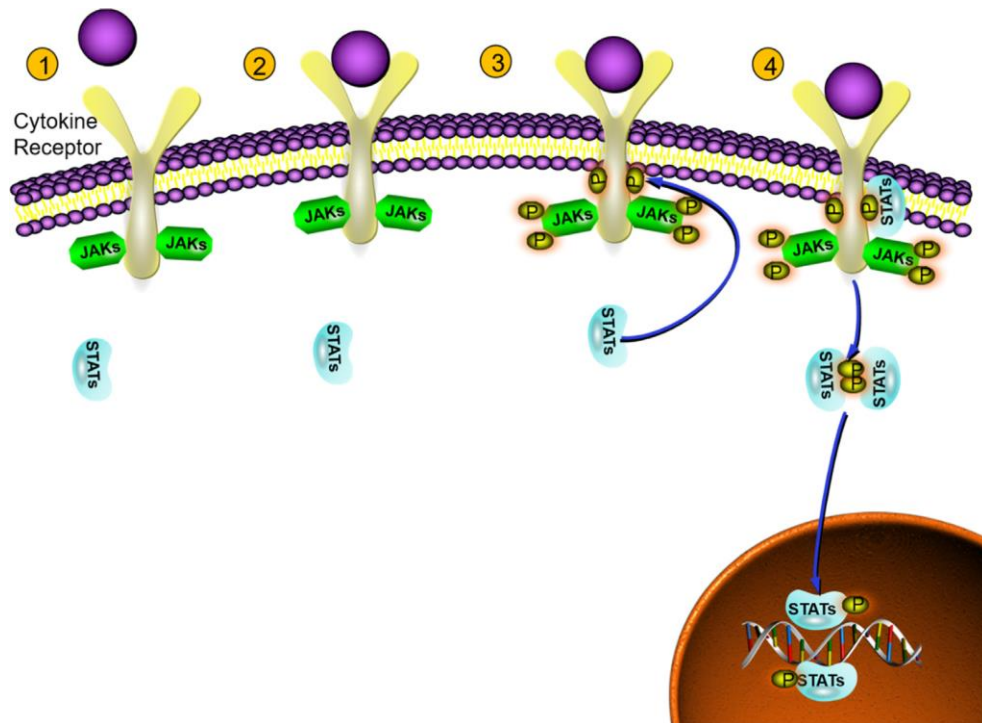


Figure 13 : JAK/STAT régule les récepteurs transmembranaires et la communication nucléaire en quatre étapes. (1) Les cytokines se lient aux récepteurs, ce qui entraîne la dimérisation des molécules réceptrices, et les JAK s'activent et se phosphorylent mutuellement, ainsi que la queue intracellulaire de leurs récepteurs. (2) La protéine STAT est recrutée sur le site d'arrimage formé par ces sites de tyrosine phosphorylés. (3) Les STAT sont phosphorylés et activés, ce qui leur permet de se dimériser. (4) Les dimères STAT-STAT se déplacent vers le noyau et régulent l'expression des gènes [86].

La famille des protéines JAK compte 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Quant à la famille des STAT, présente dans le cytoplasme, représente une cible en aval des JAK et constitue l'un des facteurs de transcription les plus importants activés par les cytokines dans le processus de la réponse immunitaire. Elle est composée de sept membres : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6 [85]. Dans le contexte de la régulation de l'inflammation et de l'activation des cellules du système immunitaire inné, telles que les macrophages, nous examinerons les STAT1, STAT3 et STAT5, en décrivant leurs fonctions et rôles immunologiques de manière détaillée.

3.1 STAT1

STAT1 se présente sous deux formes d'isomères : STAT1 α et STAT1 β qui occupent des fonctions différentes. Néanmoins, l'activation de STAT1 joue un rôle polyvalent et crucial dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'inhibition tumorale et la régulation immunitaire [85].

Au niveau de la réponse adaptative immunologique, il participe aux processus de présentation de l'antigène dépendant du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et est impliqué dans le développement précoce des cellules B. STAT1 est principalement activé par l'IFN, notamment l'IFN- γ cependant d'autres cytokines, telles que l'IL-2, l'IL-6, l'EGF et le TNF. L'activation de STAT1 par l'IFN- γ , une cytokine primaire de la réponse inflammatoire, induit la production de d'autres médiateurs inflammatoires au site de l'inflammation et contribue également à la polarisation des macrophages vers un état de type M1 dit activité ou macrophage d'amorçage « *priming* », qui se caractérise par une activité pro-inflammatoire accrue avec une résistance aux facteurs tolérogènes et anti-inflammatoires. Ainsi dans l'activité inflammatoire l'activation IFN- γ -STAT1 joue un rôle clé dans les changements épigénétique des macrophages et l'expression de gènes inflammatoires directement impliqués dans la défense de l'organisme [87].

3.2 STAT3

Comme STAT1, STAT3 possède deux isoformes STAT3 α et STAT3 β avec des fonctions différentes. STAT3 joue un rôle plus complexe dans les fonctions biologiques, son activation est principalement impliquée dans la régulation négative ou l'inhibition de différents processus biologiques comme la réponse inflammatoire, la croissance cellulaire, la différenciation et de l'apoptose. Sa phosphorylation ou son activation constitutive ou non contrôlée peut avoir un effet tumorigène favorisant le développement de métastases. Néanmoins son activation joue un rôle prépondérant dans la régulation immunitaire. En effet son activation dépend de multiples médiateurs immunologiques, notamment des membres de la famille des IL-6 tel qu'IL-6, *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) ou encore l'Oncostatine M (OSM), des membres de la famille des IL-10 et d'autres facteurs immunitaires tels que le G-CSF ou encore les INF de type I. L'activation de STAT3 par ces différents acteurs joue un rôle immunosuppresseur chez les macrophages et favorise leur polarisation vers un état de type M2, également appelé alternative induisant une réponse anti-inflammatoire menant à la résolution de l'inflammation [7, 88].

3.3 STAT5

Le dernier membre de la famille des STAT que nous aborderons est le STAT5. Les activateurs transcriptionnels de STAT5 comprennent STAT5a et STAT5b, dont les principaux activateurs sont des cytokines et des facteurs de croissances tels que l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF. L'activation de STAT5 par ces différents facteurs, résultent en plusieurs fonctions biologiques non-redondante comme la prolifération, la survie et l'apoptose cellulaire. Dans un contexte immunologique, l'activation de GM-CSF/STAT5 dans les macrophages joue un rôle indispensable dans leur différenciation [89].

3.4 Inhibiteurs de la voie de signalisation JAK/STAT

La régulation de la voie de signalisation JAK/STAT nécessite également une modulation négative de son activité. À cette fin, plusieurs régulateurs négatifs ont été identifiés, tels que le suppresseur de la signalisation des cytokines (SOCS), les inhibiteurs de la protéine STAT activée (PIAS) et la protéine tyrosine phosphatase (PTP) (figure 12) [86]. Dans cette description, nous porterons une attention particulière aux inhibiteurs de la famille des SOCS, dont les effets et le rôle seront détaillés par la suite.

3.5 Les SOCS: *Suppressor of cytokine signal*

Les SOCS, également connues sous le nom de protéines inhibitrices de STAT induites par STAT, *STAT-induced STAT inhibitory proteins* (SSI), voient leur expression induite par l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT. La famille SOCS comprend huit membres : *cytokine-inducible SH2-containing protein* (CIS), SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6 et SOCS7. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la régulation immunitaire notamment, CIS et SOCS1-3 qui réalisent une boucle de rétroaction négative sur la signalisation des cytokines via la voie JAK/STAT, modulant ainsi l'activité cytokinique durant la réponse inflammatoire (figure 14) [86].

4 Problématique

4.1 Présence d'une réponse inflammatoire non-contrôlée dans l'environnement utéro-placentaire.

Comme précédemment amené, la réponse inflammatoire participe aux trois étapes clé de la grossesse : l'implantation embryonnaire, le maintien de la grossesse et l'accouchement [17, 18]. Rappelons que les périodes de réceptivité utérine, de péri-implantation et d'accouchement sont associées à une réponse pro-inflammatoire de type-Th1 transitoire ou à terme alors qu'un environnement anti-inflammatoire tolérogène de type-Th2 durant la mi-gestation, est indispensable pour le maintien de la grossesse et le développement fœtal. Cependant, une activation prolongée ou prématurée du processus inflammatoire de type Th1 peut engendrer un effet néfaste dans l'avancement et le maintien de la grossesse [2].

En effet, durant le processus d'implantation embryonnaire, comme décrit précédemment, le ST initie l'invasion et la fixation de l'embryon dans la cavité utérine. Cette portion du placenta établie un contact étroit avec les cellules immunes maternelles. Cette promiscuité cellulaire entre les macrophages utérins et les cellules du trophoblaste génère la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le GM-CSF ou le TNF- α induisant ainsi un environnement propice à la génération des macrophages de type M1, soit pro-inflammatoires [50, 54, 90, 91]. Ces derniers, peuvent provoquer un stress inflammatoire intra-utérin si leur activité n'est pas contrôlée. Ainsi, une suractivité pro-inflammatoire peut avoir des répercussions néfastes sur les cellules endométriales utérines et provoquer des dommages vasculaires et une ischémie placentaire, conduisant à une perte de l'embryon en affectant la progression et la différenciation des cellules trophoblastique lors de l'implantation embryonnaire. C'est pourquoi, au cours de l'implantation embryonnaire, la production de cytokines et de facteurs tolérogènes et immunomodulateurs est favorisé localement et contribue au maintien de la différenciation trophoblastique ainsi qu'au support du développement embryonnaire, à l'activité endocrinienne ainsi qu'à la production de facteurs de croissance destinés au placenta [7, 92, 93]. Dans le cas d'une activité excessive des macrophages de type M1 ou d'une inflammation chronique, les facteurs pro-inflammatoires tels que l'IFN- γ et le GM-CSF jouent un rôle clé en activant des voies de signalisation intracellulaire à caractère inflammatoire telles que STAT1 et STAT5, respectivement [52, 89]. Bien que ces facteurs soient bénéfiques à l'implantation embryonnaire,

leur activité prolongée peut entraîner l'apparition de diverses pathologies gestationnelles, telles que la prééclampsie, les avortements précoces ou spontanés, ainsi que les infections intra-utérines. Ces complications affectent directement la survie embryonnaire, compromettent la santé maternelle et menacent la continuité de la grossesse [52, 54]. Des études démontrent notamment qu'une activité élevée de l'IFN- γ dans les tissus décidaux utérins et placentaires est associée à des réponses inflammatoires anormales, à une dysfonction placentaire et à des risques accrus d'avortement précoce et de prééclampsie [52, 94]. De surcroît, une expression ou une activité de GM-CSF au-dessus ou en dessous du seuil à l'interface fœto-maternelle induit des complications de la grossesse telles que la prééclampsie (PE) et un retard de croissance fœtale (RCF), liés à un développement et une fonction placentaires insuffisants [54]. Dans ces complications gestationnelles, la polarisation et l'activité des macrophages utérins est également responsable de l'initiation de l'inflammation à l'interface fœto-maternelle [95]. Par ailleurs, une hyperactivation ou une activité prolongée et répétée du système immunitaire au niveau local peut endommager l'endomètre et perturber les changements morphologiques et fonctionnels du cycle utérin, notamment lors de la décidualisation. Cette inflammation non contrôlée peut être déclenchée par divers facteurs environnementaux ou des conditions physiologiques et/ou pathologiques chez la mère [96]. Dans certains cas, c'est une affection de l'endomètre qui serait compromettante au succès de la grossesse. Notamment en cas d'endométrite aiguë ou chronique où l'on rencontre une activité inflammatoire persistante ou répétée dans le tissu endométrial, communément attribuée à des infections bactériennes, ces dernières issues du tractus reproducteur [97]. Dans d'autres cas, une inflammation anormale des tissus utérins associée à l'endométriose, peut altérer la structure, la morphologie ou encore les fonctions des tissus utérins [98, 99]. Souvent ces atteintes à l'endomètre répétées et prolongées contribuent à l'apparition de problèmes de fertilité et altèrent la réceptivité endométriale [23, 24] .

Dans ces affections endométriales, les macrophages M1 peuvent également être impliqués, particulièrement dans la réponse aux infections et ainsi contribuer à une amplification des lésions tissulaires responsables d'une perte de restauration et de réparation de l'endomètre et ainsi avoir des conséquences lourdes sur l'établissement de la grossesse [100]. Notamment au travers de la production d'oxyde nitrique (NO) induit lors d'infection bactérienne, stimulé entre autres par le LPS, qui joue un rôle essentiel dans la protection des tissus [101]. De fait, les macrophages M1 activés, produisent du NO grâce à l'activité de l'enzyme *inductible nitric oxyde synthase* (iNOS),

stimulant parallèlement la libération de cytokines inflammatoires pour protéger contre les infections ou les produits bactériens. Cependant, une production prolongée de NO peut entraîner des dommages tissulaires, tels que la dilatation vasculaire, la septicémie ou une altération du fonctionnement du milieu utérin [102]. Néanmoins, plusieurs études rapportent que l'intervention de facteurs immunomodulateurs représente une clé de la résolution de l'inflammation intra-utérine pouvant induire les complications de grossesse telle que la naissance prématurée tout en engageant une polarisation M2 des macrophages dans les tissus gestationnels [95].

4.2 Les stratégies thérapeutiques face à l'inflammation intra-utérine non-réglée sont limitées.

Face aux problèmes de fertilité et aux complications de grossesse, tels que l'échec d'implantation embryonnaire ou la perte embryonnaire, souvent liés à un dysfonctionnement inflammatoire à l'interface fœto-maternelle, les techniques de diagnostic et de traitements demeurent d'une efficacité limitée. En effet, malgré plus de quatre décennies de pratique des techniques de procréation médicalement assistée (PMA) à l'échelle mondiale, plus de 60 % des femmes traitées par fécondation in vitro (FIV) ne parviennent toujours pas à concevoir après un premier transfert d'embryon. De plus, près de 20 % des patientes font face à des échecs répétés d'implantation inexpliqués ou à des pertes de grossesse répétées. La littérature identifie diverses causes de ces échecs, principalement multifactorielles, endométriales ou idiopathiques [24]. Cependant, les approches thérapeutiques actuelles tendent à privilégier l'immunomodulation de l'environnement intra-utérin afin de favoriser le succès de l'implantation embryonnaire, en particulier dans le cadre de FIV [3]. Dans le cas d'une hypothétique suractivité inflammatoire au niveau de l'endomètre lors de l'implantation embryonnaire, des stratégies anti-inflammatoires telles que l'utilisation de corticostéroïdes ou d'aspirine sont également proposées afin de réduire l'expression et l'activité de facteurs inflammatoires tels que la cyclooxygénase (COXs) dans le milieu utérin. En effet, l'aspirine à faible dose a été proposée pour augmenter la réceptivité endométriale en augmentant le flux sanguin endométrial et utérin, ce qui favoriserait les fonctions endométriales grâce aux propriétés vasoactives et antiplaquettaires de l'aspirine [103]. Par ailleurs, il a été démontré que l'aspirine réduit le recrutement local des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes T. Cependant, il n'est pas certain que l'aspirine à faible dose exerce des fonctions immunomodulatrices dans l'endomètre. Bien qu'elle soit fréquemment utilisée

comme adjuvant à la FIV, l'incorporation systématique de faibles doses d'aspirine avant ou pendant la conception dans les protocoles de FIV n'a pas montré d'amélioration des taux de grossesse clinique ou des taux de naissance vivante par rapport au placebo dans deux méta-analyses [104, 105]. Une autre stratégie propose également l'utilisation des héparines. En effet, en plus de leur rôle antithrombotique, l'héparine non fractionnée et l'héparine de bas poids moléculaire sont supposées présenter des propriétés anti-inflammatoires en empêchant l'activation du complément et en neutralisant les cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, empêchant ainsi la migration des leucocytes vers les zones d'inflammation [106]. Cependant, il n'est pas certain que les héparines exercent un effet immunomodulateur au niveau du tissu endométrial [3].

Récemment, des études ont suggéré que l'endométrite représente également un facteur crucial associé à l'infertilité et à l'échec des techniques de reproduction assistée, suscitant un questionnement majeur quant aux approches thérapeutiques de PMA [100]. En effet, des études ont montré que l'activité persistante des cellules immunitaires infiltrées dans le milieu utérin entraîne une perturbation de l'environnement immunitaire endométrial, pouvant conduire à l'infertilité chez les patientes atteintes d'endométrite. Les traitements conventionnels, notamment d'antibiotiques, sont limités en raison de leur manque de régulation de l'inflammation intra-utérine [100].

Ainsi, l'inflammation intra-utérine demeure un enjeu central dans les problèmes de fertilité. Il est donc crucial de mieux comprendre le rôle de facteurs immunomodulateurs comme l'OSM dans les différentes populations cellulaires de l'interface fœto-maternelle, ainsi que dans la prévention des dysfonctionnements utérins et placentaires en cas de stress inflammatoire.

5 Hypothèse

Notre laboratoire a démontré précédemment que parmi les éléments régulateurs de la réponse immune dans les populations cellulaires gestationnelles, LIF représente un élément clé dans l'axe trophoblaste-IL10-macrophages [107]. LIF exerce ainsi un effet indirect sur l'activation des macrophages, via l'action régulatrice de l'IL10 produite par le syncytiotrophoblaste. L'action anti-inflammatoire directe de LIF sur les macrophages et les cellules trophoblastiques a été mise en évidence en montrant que 1) LIF réduit l'activation de STAT1 et STAT5 induites respectivement par l'IFN- γ et le GM-CSF ; et 2) LIF inhibe les effets stimulants des macrophages activés par l'IFN- γ et le GM-CSF sur les cellules trophoblastiques (Figure 13) [7, 107].

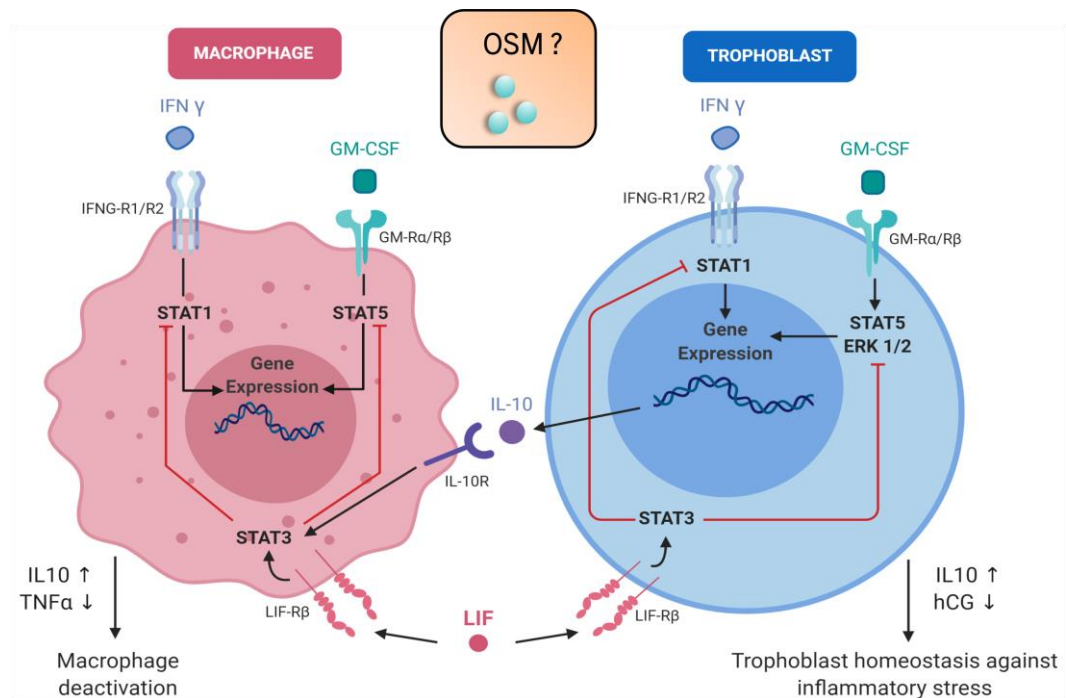


Figure 14 : Effets immunorégulateurs de LIF dans l'axe trophoblaste-IL10-macrophages LIF induit la phosphorylation de STAT3 qui participe à l'inhibition de la phosphorylation des voies pro-inflammatoires de l'IFN- γ /STAT1 et du GM-CSF/STAT5 dans les macrophages et les trophoblastes. LIF induit la production de facteurs anti-inflammatoires comme IL-10 par le trophoblaste pour désactiver les macrophages et réduire l'expression de facteurs pro-inflammatoires comme TNF- α et réduire le stress inflammatoire dans les trophoblastes. (Modifié, [107])

LIF induit l'expression de l'OSM dans l'endomètre lors de l'implantation embryonnaire [108]. De plus, en tant que membre de la famille des cytokines IL-6, l'OSM est impliquée dans la régulation de la réponse inflammatoire et dans la modulation de l'homéostasie hépatique et joue un rôle

significatif durant la phase aiguë de l'inflammation hépatique, notamment en réponse à des stimuli tels que le LPS. En effet, l'OSM est rapidement exprimée par les cellules immunitaires, y compris les macrophages [109]. Cette activité immunomodulatrice de l'OSM est également associée à un effet anti-inflammatoire de cette dernière, permettant de moduler la sécrétion de TNF- α et d'IL-6, contribuant ainsi à un équilibre entre les réponses pro- et anti-inflammatoires [110]. De plus, l'OSM favorise la régénération des tissus, favorisant la survie et la prolifération cellulaire, un processus crucial dans le maintien des fonctions tissulaires [111].

L'OSM est également impliquée dans la modulation de la polarisation des macrophages. Il a été démontré que celle-ci favorise la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 associé à une réponse anti-inflammatoire par la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4 ainsi qu'à la réparation des tissus [112]. De plus, des études *in vitro* démontrent que l'exposition des macrophages à l'OSM conduit à une augmentation de l'expression des marqueurs M2, tels que CD206 et Arg-1, indiquant une transition vers un état de polarisation favorable à la réparation tissulaire [113]. Dans ce rôle de facteur immunomodulateur, l'OSM renforce également l'activité anti-inflammatoire de certains facteurs comme le M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), pour induire le phénotype M2 des macrophages notamment dans un contexte d'inflammation chronique et mener à la résolution de l'inflammation [113].

Bien que le rôle du LIF en tant que régulateur de l'inflammation ait été largement étudié et documenté, notamment dans l'utérus lors d'infections bactériennes, celui de l'OSM demeure encore peu exploré dans le contexte de l'inflammation intra-utérine. C'est pourquoi cette thèse s'est concentrée sur l'importance et le rôle de l'OSM en tant que facteur immunorégulateur anti-inflammatoire dans la polarisation des macrophages et de sa capacité à maintenir l'intégrité des tissus utérins lors d'un stress inflammation intra-utérin. Par ailleurs, mes travaux ont également mis en lumière la contribution de l'OSM, à l'instar du LIF, dans la protection et la préservation des fonctions trophoblastiques en présence de facteurs pro-inflammatoires tout en promouvant l'activation de voies intra-cellulaires et facteurs solubles anti-inflammatoires.

6 Objectifs et méthodologie

6.1 Étude du rôle et de l'effet immunorégulateur de l'OSM dans un modèle de trophoblastes humains *in vitro* lors d'un stress inflammatoire induit par l'IFN- γ ou le GM-CSF.

Il est bien établi qu'une surexpression ou une expression prolongée des facteurs immunitaires IFN- γ ou GM-CSF à l'interface fœto-maternelle peut nuire à l'implantation embryonnaire et au processus de placentation [58, 94]. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à leur activité délétère restent partiellement décrits, notamment en ce qui concerne les fonctions trophoblastiques. Par ailleurs, étant donné que l'expression de ces facteurs pourrait avoir un effet abortif sur l'embryon, la question se pose de savoir si l'OSM, alors exprimé au site d'implantation embryonnaire, joue un rôle d'immunorégulateur dans l'activité de l'IFN- γ ou du GM-CSF au niveau des trophoblastes, permettant ainsi de préserver leurs fonctions à l'interface fœto-maternelle en situation de stress inflammatoire, particulièrement lors de la différenciation morphologique et biochimique du cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste [7, 107]. Pour répondre à ce premier objectif, j'ai utilisé le modèle cellulaire BeWo, dérivé d'une lignée de choriocarcinome humain, largement utilisé pour étudier les trophoblastes en raison de leurs caractéristiques qui imitent certaines fonctions des cellules trophoblastiques humaines. Les cellules BeWo sont principalement composées de cytotrophoblastes, qui peuvent fusionner pour former le syncytiotrophoblaste [114, 115]. Ce modèle est particulièrement pertinent pour des études sur la différenciation trophoblastique, car les cellules BeWo peuvent être induites à fusionner et à sécréter de la hCG en réponse à des traitements de forskoline (FK) [116]. De plus, les Bewo sont recommandées pour des études de mécanismes de communication cellulaire au sein du placenta et de la réponse immunitaire dans les trophoblastes [35].

6.2 Analyse des effets immunomodulateurs et anti-inflammatoire de LIF et de l'OSM sur le microenvironnement immunitaire utérin et les macrophages dans un modèle murin d'endométrite induite par le LPS.

L'endométrite se développe à la suite d'une infection ascendante, où des bactéries provenant du vagin ou du col de l'utérus pénètrent dans la cavité utérine. Une fois à l'intérieur de l'utérus, ces bactéries déclenchent une réponse inflammatoire, entraînant une accumulation de cellules immunitaires et la libération de cytokines pro-inflammatoires. À long terme ou à répétition, cette inflammation peut perturber les processus normaux d'implantation embryonnaire, compromettant ainsi la capacité de l'utérus à soutenir une grossesse [98]. Les conséquences de l'endométrite sur la fertilité sont multiples. Une inflammation chronique peut altérer l'endomètre, rendant l'environnement utérin moins réceptif à l'implantation de l'embryon, même après le traitement de l'infection. Cette situation est souvent due à une réparation inadéquate de l'endomètre à la suite des dommages tissulaires causés par l'infection [100, 117]. C'est pourquoi, étant donné leurs fonctions immunomodulatrices et anti-inflammatoires, nous proposons l'utilisation du LIF et de l'OSM comme stratégies thérapeutiques pour traiter l'endométrite, en rétablissant l'équilibre immunitaire et en soutenant la fonction endométriale dans les cas d'inflammation intra-utérine causée par le LPS et associée à l'endométrite. Pour répondre à cet objectif, nous avons choisi le modèle murin femelle CD-1. Les souris CD-1 sont connues pour leur robustesse et leur facilité d'élevage [118]. Un des avantages majeurs du modèle CD-1 est sa capacité à reproduire des conditions physiologiques humaines, notamment en ce qui concerne les réponses immunitaires [119]. Des recherches ont également démontré que les souris CD-1 présentent des réponses immunitaires similaires à celles observées chez les humains, ce qui est crucial pour étudier les effets des traitements immunomodulateurs [118].

7 Chapitre II

Article #1: Oncostatin M and STAT3 Signaling Pathways Support Human Trophoblast Differentiation by Inhibiting Inflammatory Stress in Response to IFN γ and GM-CSF

Marion Ravelojaona ^{1,2,3}, Julie Girouard ^{1,2,3}, Emmanuelle Stella Kana Tsapi ¹, Megan Chambers ⁴, Cathy Vaillancourt ^{2,3,5}, Céline Van Themsche ^{1,2,3}, Catherine A. Thornton ⁴ and Carlos Reyes-Moreno ^{1,2,3,*}

¹ Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire (GRSC), Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 Boul. des Forges, Trois-Rivières, QC G8Z 4M3, Canada ² Centre de Recherche Interuniversitaire en Reproduction et Développement-Réseau Québécois en Reproduction (CIRD-RQR), Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; ³Regroupement Intersectoriel de Recherche en Santé de l'Université du Québec (RISUQ), Université du Québec, Québec, QC G1K 9H7, Canada ⁴ Medical School, Swansea University, Swansea SA2 8PP, UK ⁵ Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), Laval, QC H7V 1B7, Canada

* Correspondence: carlos.reyes-moreno@uqtr.ca; Tel.: +1-(819)-376-5011 (ext. 3308)

7.1 Statut de l'article 1#.

Le contenu de ce chapitre a été publié dans la revue Cells, du journal MDPI. L'article a été accepté pour publication le 23 janvier 2024. Cells 2024, 13, 229.

7.2 Contribution des auteurs.

La conceptualisation du projet a été réalisée par Carlos.R.-M., la méthodologie a été élaborée par Carlos.R.-M. et Julie.G. La validation des résultats a été assurée par Marion.R., Julie.G. et Emmanuell.S.K.T. L'analyse formelle a été effectuée par Carlos.R.-M. et Marion.R., et l'investigation par Marion.R. et Julie.G. La gestion du matériel nécessaires au projet a été assurée par Julie.G. La rédaction du manuscrit a été effectuée par Marion.R. et Carlos.R.-M., tandis que la révision et l'édition ont été réalisées par Cathy.A.T. et Megan.C. La supervision a été assurée par Carlos.R.-M., Cathy.V., Céline.V.T. et Cathy.A.T. La gestion administrative du projet a été prise en charge par Carlos.R.-M., et l'acquisition des financements a été réalisée par Carlos.R.-M., Cathy.V., et Céline.V.T.

7.3 Résumé de l'article 1#.

Les cytokines de la superfamille de l'interleukine 6 (IL-6) jouent un rôle essentiel pendant la grossesse humaine en favorisant la différenciation du trophoblaste, l'invasion et la fonction endocrine, et en maintenant l'immunos tolérance et la protection de l'embryon. En revanche, l'activité déséquilibrée de facteurs pro-inflammatoires tels que l'interféron gamma (IFN γ) et le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) à l'interface materno-fœtale a des effets néfastes sur la fonction et la différenciation du trophoblaste. Cette étude démontre comment l'oncostatine M (OSM), membre de la famille des cytokines IL-6, et l'activation de STAT3 régulent la fusion du trophoblaste et la fonction endocrine en réponse au stress pro-inflammatoire induit par l'IFN γ et le GM-CSF. En utilisant des cellules BeWo (CT/BW) de type cytotrophoblaste humain, différenciées en cellules syncytiotrophoblastes villositaires (VST/BW), nous montrons que la production de bêta-gonadotrophine chorionique humaine (β hCG) et le processus de fusion cellulaire sont affectés en réponse à l'IFN γ ou au GM-CSF. Cependant, ces effets sont abrogés par l'OSM en modulant l'activation des voies de signalisation IFN γ -STAT1 et GM-CSF-STAT5. La stimulation OSM augmente l'expression de STAT3, la phosphorylation de STAT3 et SMAD2, et l'induction de régulateurs négatifs de l'inflammation (par exemple, IL-10 et TGF β 1) et de la signalisation des cytokines (par exemple, SOCS1 et SOCS3). En utilisant des cellules VST/BW déficientes en STAT3, nous montrons que l'expression de STAT3 est nécessaire pour qu'OSM régule les effets de l'IFN γ sur la β hCG et l'expression de la E-cadhérine. En revanche, OSM conserve son effet modulateur sur l'activation de la voie GM-CSF-STAT5 même dans les cellules VST/BW déficientes en STAT3, ce qui suggère qu'OSM utilise des mécanismes dépendants et indépendants de STAT3 pour moduler l'activation des voies pro-inflammatoires IFN γ -STAT1 et GM-CSF-STAT5. De plus, la déficience de STAT3 dans les cellules VST/BW conduit à la production d'une grande quantité de β hCG et à une expression accrue de STAT5 activé induite par GM-CSF, indépendamment de l'OSM, suggérant un rôle clé de STAT3 dans la production de β hCG et la différenciation du trophoblaste à travers la modulation de STAT5. En conclusion, notre étude décrit pour la première fois le rôle critique joué par l'OSM et les voies de signalisation STAT3 pour préserver et réguler les fonctions biologiques du trophoblaste pendant un stress inflammatoire.

7.4 Article (*version publiée*)

Oncostatin M and STAT3 Signaling Pathways Support Human Trophoblast Differentiation by Inhibiting Inflammatory Stress in Response to IFN γ and GM-CSF.

Abstract: Interleukin-6 (IL-6) superfamily cytokines play critical roles during human pregnancy by promoting trophoblast differentiation, invasion, and endocrine function, and maintaining embryo immunotolerance and protection. In contrast, the unbalanced activity of pro-inflammatory factors such as interferon gamma (IFN γ) and granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) at the maternal–fetal interface have detrimental effects on trophoblast function and differentiation. This study demonstrates how the IL-6 cytokine family member Oncostatin M (OSM) and STAT3 activation regulate trophoblast fusion and endocrine function in response to pro-inflammatory stress induced by IFN γ and GM-CSF. Using human cytotrophoblast-like BeWo (CT/BW) cells, differentiated in villous syncytiotrophoblast (VST/BW) cells, we show that beta-human chorionic gonadotrophin (β -hCG) production and cell fusion process are affected in response to IFN γ or GM-CSF. However, those effects are abrogated with OSM by modulating the activation of IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 signaling pathways. OSM stimulation enhances the expression of STAT3, the phosphorylation of STAT3 and SMAD2, and the induction of negative regulators of inflammation (e.g., IL-10 and TGF β 1) and cytokine signaling (e.g., SOCS1 and SOCS3). Using STAT3-deficient VST/BW cells, we show that STAT3 expression is required for OSM to regulate the effects of IFN γ in β hCG and E-cadherin expression. In contrast, OSM retains its modulatory effect on GM-CSF-STAT5 pathway activation even in STAT3-deficient VST/BW cells, suggesting that OSM uses STAT3-dependent and-independent mechanisms to modulate the activation of pro-inflammatory pathways IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5. Moreover, STAT3 deficiency in VST/BW cells leads to the production of both a large amount of β hCG and an enhanced expression of activated STAT5 induced by GM-CSF, independently of OSM, suggesting a

key role for STAT3 in β -hCG production and trophoblast differentiation through STAT5 modulation. In conclusion, our study describes for the first time the critical role played by OSM and STAT3 signaling pathways to preserve and regulate trophoblast biological functions during inflammatory stress.

Keywords: beta-human chorionic gonadotrophin; granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; inflammatory stress; interferon gamma; oncostatin M; pregnancy; placenta; syncytiotrophoblast.

1. Introduction

The placenta has a central role in promoting the homeostatic environment necessary for successful pregnancy [1,2]. Placental structures undergo dynamic changes to coordinate and assure fetal development during pregnancy. Therefore, the placenta is a complex structure that evolves throughout gestation through the differentiation of the fetal trophoblast [1,2]. Trophoblast cells are derived from the trophectoderm through the continuous proliferation of cytotrophoblast (CT) cells and their subsequent differentiation into villous syncytiotrophoblast (VST) and extravillous trophoblast (EVT) cells [3,4]. EVT cells are migratory and invasive mononuclear cells that penetrate the maternal endometrium and anchor the placental villi into the maternal decidua [5]. VST cells form a multinucleated placental surface bathed in the maternal blood and contribute to a successful pregnancy by secreting the hormones necessary for pregnancy, transporting nutrients, mediating gas exchange, balancing immunotolerance, and resisting pathogen infection [6,7]. Aberrations in the formation of VST have been linked to various placental dysfunction syndromes, such as preeclampsia, fetal growth restriction, preterm birth, and stillbirth [6,7]. Therefore, acquiring a comprehensive understanding of the mechanism of syncytium formation will help us further prevent the development of pathological pregnancies. The principal topics in placental syncytium investigations are fusion and endocrine functions. The placental syncytium is formed by the continuous fusion of the

underlying villous cytotrophoblasts [6,7]. The fusion process is led by an enhanced expression of fusogenic proteins such as syncytin-1 [8] and a decreased expression of adhesion molecules such as E-cadherin [9,10]. Two subtypes of the placental syncytium have been identified, the primitive and the definitive syncytium [8]. The primitive syncytium is an invasive type associated with the implanting conceptus characterized by fused trophoblasts, secreting large amounts of human chorionic gonadotrophin (β hCG) and rapidly proliferating to form primary villi [11,12]. The definitive syncytium is formed by the villous syncytiotrophoblast (VST) of the mature placenta [13]. The VST first forms after villi begin to project from the inner cytotrophoblast shell at around the end of two weeks post-coitum. In contrast to the primitive syncytium, the VST forms a single-layered shell over the maternal blood-facing surface of the villi [14]. The VST is also a major endocrine organ, secreting hormones and proteins into the maternal circulation to drive the physiological and metabolic adaptations to pregnancy [15]. Among the various hormones produced by the primitive syncytium and VST, β hCG is the first specific molecule synthesized by the embryo after implantation, stimulating trophoblast invasion and differentiation throughout reaching its peak during the first trimester of pregnancy and gradually decreasing up to the 19th week [16]. During embryo implantation, uterine and placental inflammation represents a normal manifestation of the maternal innate immune system to favor the biological functions of trophoblasts [17,18]. In fact, the innate immune cells and trophoblast cells located at the maternal–fetal interface perform precise cross-talking by producing cytokines, chemokines, and growth factors such as interleukin-10 (IL 10) or transforming growth factor beta (TGF β) to shape and maintain an immunotolerant environment during pregnancy [19]. Moreover, VST cells release a range of immune signaling molecules to drive the maternal immune response to pathogenic infection during pregnancy through the differentiation and activation of immune cells present at the implantation site [20–23]. However, excessive inflammation contributes to the pathogenesis of placental inflammatory diseases (chorioamnionitis, placentitis, or villitis), representing a particularly deleterious state for pregnancy outcomes [24,25]. These unbalanced inflammatory conditions enhance the activation of innate immune

cells, mainly macrophages and NK cells, with the elevated and sustained expression of pro-inflammatory factors such as GM-CSF and IFN γ , which are widely associated with adverse maternofetal outcomes such as abortion, preterm birth, or preeclampsia [26–30]. Among the various actors involved in immune regulation and trophoblast immune programming within the human pregnant uterus, the interleukin-6 (IL-6) family cytokines such as the leukemia inhibitory factor (LIF) and oncostatin M (OSM) have been reported to support the embryo implantation [31,32] and modulate inflammation [33,34]. Several studies described LIF as a critical factor in preparing the uterine endometrium for implantation by stimulating stromal decidualization and regulating trophoblast cell differentiation and function [32,35,36]. Also, β hCG production stimulates the secretion of LIF and controls IL-6 secretion by endometrial cells to support embryo implantation [9]. In this context, our previous studies described the mediating role of LIF to modulate the pro-inflammatory activity of IFN γ and GM-CSF in macrophages and trophoblast cells by reducing the phosphorylation levels of the signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) and -5 (STAT5). LIF activity induces the activation of anti-inflammatory pathways such as STAT3 and promotes the anti-inflammatory factor IL-10 to preserve trophoblast functions: migration and invasion [37,38]. Then, in another previous study, we described LIF involvement in syncytium formation and β hCG production through STAT3-dependent mechanisms [39].

In this present study, we are interested in OSM, a LIF-stimulated cytokine at the maternal–fetal interface [40]. OSM and LIF are the most pleiotropic members of the IL 6 family cytokines and play significant roles in inflammation [41]. Like LIF within the immune system, OSM has been found to maintain an efficient host response to tissue injury and act as a defense against pathogen infections. It provides protection against lipopolysaccharide induced endotoxemia by boosting IL-10 and/or suppressing TNF α and IFN γ [42]. Also, in pregnant women, OSM is highly expressed in chorionic tissue and decidua [31]. In the mouse uterus, OSM is mainly expressed in the uterine glandular epithelium and the luminal epithelium during early pregnancy, and in the decidual stromal cells surrounding embryos with the onset of implantation on days 5 to 8 of

pregnancy [43]. After that, OSM expression is reduced in the decidual stromal cells, concomitantly with decreasing LIF expression [43]. Notably, OSM production is completely absent in the pregnant uterus of LIF-KO mice; thus, OSM production by the luminal epithelium and the stroma adjacent to the embryo is closely related to LIF production [40]. Moreover, during early pregnancy in mice, OSM expression in the uterus induces IL33 expression and supports decidualization via the STAT3-EGR1 signaling pathway [43]. In human trophoblast and decidual cells, OSM expression has an important role in placental endocrine function by stimulating the release of β -hCG and inducing various signaling pathways such as JAK/STAT and ERK1/2 MAP kinases. Through the JAK1 or JAK2 kinase activation, OSM induces STAT1, STAT3, and STAT5 phosphorylation through different tyrosine-dependent mechanisms [31,44]. Through STAT3 activation in human EVT, OSM enhances cell invasion by inducing the expression of the matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9, under normoxia or hypoxia environments, and cell proliferation by downregulating E-cadherin expression [45–47]. Although many studies strongly suggest an important role for OSM in reproduction and inflammation, the direct role of OSM in modulating trophoblast endocrine and immune functions is poorly defined. Therefore, we investigated the interplay between OSM and STAT3 in the modulation of key trophoblast functions such as fusion and endocrine secretion. For these purposes, we used human trophoblast-like BeWo cells differentiated into VST cells [39] to determine the influence of OSM-STAT3 signaling pathway activation on β hCG production, E-cadherin expression, and the activation of IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 signaling pathways.

2. Materials and Methods

Cell culture media, serum, and cell culture reagents were purchased from Wisent (St-Bruno, QC, Canada). Cell culture plates and flasks were obtained from Corning Incorporated (Corning, NY, USA). OSM, IFN γ , and GM-CSF cytokines were purchased from Peprotech (Montreal, QC, Canada). Dimethyl sulfoxide (DMSO), bovine serum albumin (BSA), forskolin, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), monoclonal peroxidase-conjugated mouse anti- β -actin antibody, and all electrophoresis grade

chemicals were obtained from Sigma Chemical Company (Oakville, ON, Canada). Protease and phosphatase inhibitors cocktail EDTA-Free were obtained from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). Beta-human chorionic gonadotrophin (β hCG) ELISA kit was purchased from DRG International Inc. (Springfield, NJ, USA). Trizol reagent and PCR primers were obtained from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Taq DNA polymerase and M-MuLV reverse transcriptase were obtained from New England Biolabs (Pickering, ON, Canada). Rabbit polyclonal antibodies targeting phospho-STAT1 (pY701; #9171), STAT1 (#9172), phospho-STAT3 (pY705; #9145), STAT3 (#4904), phospho-STAT5 (pY694; #9359), STAT5 (#9358), phospho-SMAD2 (pS465/467; #3108), and SMAD2 (#5359) were purchased from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA), and used at 1:1000 dilution in a phosphate-buffered saline (PBS) solution containing 5% BSA (PBS/5% BSA). The horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG was obtained from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada) and used at 1:5000 dilution in PBS/5% BSA. The chemiluminescence detection kit (Ultra Science FemtoWestern Substrate; #CCH365) was purchased from FroggaBio (Concord, ON, Canada). For immunofluorescence analysis, rabbit anti-E-cadherin (#3195) and goat anti-rabbit IgG Fab2 Alexa Fluor. 488-conjugated (#4412) antibodies were used, which were purchased from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA).

2.1. Cell Culture and Differentiation of Human Trophoblast-like BeWo Cells

The human placental choriocarcinoma BeWo cell line (#CCL-98) was obtained from ATCC (Rockville, MD, USA). Cytotrophoblast-like BeWo (CT/BW) cells were maintained as monolayers in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C and were grown in RPMI-1640 cell culture media supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, and 50 µg/mL gentamicin. To maintain an efficient cell culture workflow, adherent cells were inspected daily under an optical microscope to determine cell health and confluency. For cell passaging (every 3 to 4 days) and subculturing, adherent cells at 75% confluency or less were removed through 0.25%

trypsin–EDTA–enzymatic treatment for 5–7 min at 37 °C and then harvested and split into 175 cm² culture flasks or counted and subcultured in 24- or 96-well cell culture plates for further experimental needs. Forskolin (FK)-induced CT/BW cell differentiation into VST (VST/BW) cells was performed as previously described [39]. Briefly, cells at a density of 5.0×10^5 cells/500 μ L/well were seeded in a 24-well cell culture plate in 10% FBS-RPMI 1640 cell culture media and incubated overnight. To circumvent any changes in cell behavior during the study, all experiments in this study were restricted to using BeWo cells from passages 8 to 15.

2.2. Cell Transfection and Clonal Selection

BeWo cells were transfected with SureSilencing™ control or STAT3 small hairpin RNA (shRNA) expression plasmids, containing the puromycin resistance cassette, according to the manufacturer's instructions (QIAGEN, Toronto, ON, Canada). The transfection method we used was previously optimized for other plasmids into the BeWo cell line, which resulted in high transfection efficiencies. Briefly, cells were seeded into 24-well plates at 70–90% cell confluency and transfected using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). To generate stable CT/BW cell clones expressing shRNA, transfected cells were selected using 1 μ g/mL puromycin via several passages to produce scrambled (sh-scr) and silencing STAT3 (sh-STAT3) cells. As expected, SureSilencing shRNA plasmids knocked down the expression of the target gene by at least 70% in transfected cells in target shRNA-transfected cells relative to negative control shRNA-transfected cells upon selection for antibiotic resistance. After individual clone selection, the efficacy of sh-STAT3 plasmids in interference with STAT3 was confirmed using Western blotting, and cell viability was evaluated using MTT assays as previously described [37–39]. For subsequent experiments, the selected sh-scr and sh-STAT3 CT/BW cell clones were grown in an RPMI-1640 culture medium, supplemented with 10% FBS, in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂.

2.3. Protein Immunodetection

BeWo cells at a density of 5.0×10^5 cells/500 μ L/well were seeded into 24-well plates in 10% FBS-RPMI 1640 cell culture media overnight. Cells were then starved in RPMI-1640 without FBS for 3-4 h and treated with the cytokines of interest. After cytokine stimulation periods, cells were lysed by adding preboiled (95 °C) 1° SDS solubilization buffer containing 1.25 mM Tris-Base pH 6.8, 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol, 18% glycerol, 0.03% bromophenol blue, and 2% protease and phosphatase inhibitors. Protein samples were resolved using SDS-PAGE, under reducing conditions and then transferred to the PVDF membrane. Blots were probed with rabbit polyclonal primary antibodies against total (t) or phosphorylated (p) forms of STAT1, STAT3, STAT5, and SMAD2 proteins at 1:1000 dilution at 4 °C overnight. To study E-cadherin expression, blots were probed with rabbit polyclonal primary antibodies against E-cadherin proteins at 1:1000 dilution at 4 °C overnight. Membranes were then incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab at 1:3000 dilution for 1 h at room temperature. Also, β -actin at 1:40,000 dilution was used as a loading control. The detected proteins were visualized using an image analyzer system (Alpha Innotech FluorChem FC2 Imaging System).

2.4. RNA Isolation and mRNA Quantification by PCR

BeWo cells were plated at a cell density of 1.0×10^6 cells/2 mL/well into 6-well plates and incubated at 37 °C in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS overnight. After cytokine treatment, cells were lysed using TRIzol (In Vitrogen, Montreal, QC, Canada), and cellular RNA was isolated using a Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Burlington, ON, Canada). The mRNA expression profile was evaluated using standard reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) as previously described [37,38], with the following primers: human IL10 gene 5'-ACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGC-3' (S) and 5'-TCACATGCGCCTTGATGTCTG-3' (AS); human TGF β 1 gene 5'-CACCCGCGTGCTAATGG-3' (S)

and 5'-ATGCTGTGTGTACTCTGCTTGAAC-3' (AS); and human GAPDH gene 5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3' (S) and 5'-TGAGCTTGACAAAGTGGTCG-3' (AS).

2.5. Detection of β hCG Secretion by ELISA Assay

As previously described [39], cells were plated into 24-well plates at a cell density of 2.0×10^5 cells/500 μ l/well and incubated at 37 °C in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS overnight. At the end of the treatment period with forskolin alone or combined with the cytokines of interest, the media were harvested, clarified using low-speed centrifugation (500 $\times$ g), and kept at -20 °C until quantification using β hCG ELISA kits as per manufacturer's instructions (DRG International Inc.). Each assay was performed in triplicate and exhibited consistent reproducibility. sh-STAT3 samples were diluted at a 1:10 ratio, while the sh-scr samples were diluted at a 1:5 ratio, considering the minimum and maximum values of the standard curve.

2.6. Statistical Analysis

Each assay was performed in triplicate and exhibited consistent reproducibility. Data were expressed as mean $\pm$ SD, and the statistical correlation of data between groups was analyzed via one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test using Prism software, version 9.5.0 (Prism 9). The null hypothesis of no difference of means between the two groups was analyzed via Tukey tests, and p values of ≤ 0.05 were considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. Interplay of OSM and Pro-Inflammatory Cytokines and Their Effects on Forskolin-Induced

E-cadherin Expression and β hCG Secretion To determine the impact of OSM, IFN γ , and GM-CSF on the endocrine function and fusion process of villous cytotrophoblast cells, CT/BW cells were treated for 48 h with DMSO (control); FK alone; FK combined with OSM,

IFN γ , or GM-CSF; or OSM in combination with IFN γ (OSM+IFN γ) or GM-CSF (OSM+GM-CSF) to induce differentiation to VST/BW cells (Figure 1A). E-cadherin (E-cad) is a helpful marker for fusion-competent trophoblast cells as protein expression is downregulated during cellular fusion, and is coincident with enhanced β hCG expression [39,48]. Thus, E-cad expression and β hCG production were, respectively, assessed using Western blotting and ELISA assay. CT/BW cells differentiated with FK alone presented a decrease in E-cad expression (Figure 1B,C,E,F) that was coincident with enhanced β hCG expression compared to control (DMSO) CT/BW cells (Figure 1D,G). CT/BW cells treated with a combination of FK and OSM presented an increase in E-cad expression and a lowered β hCG production (1.52 ± 0.23 IU/mL vs. 0.97 ± 0.12 IU/mL) compared to treatment with FK alone (Figure 1C,D,F,G). Then, in CT/BW cells differentiated with FK combined with IFN γ , we observed a significant increase in E-cad expression concomitant with a significant reduction in β hCG production (1.52 ± 0.23 IU/mL to 0.28 ± 0.04 IU/mL) compared to treatment with FK alone (Figure 1C,D). In contrast, in CT/BW cells treated with FK combined with GM-CSF, we observed a robust decrease in E-cad expression and a significant enhancement of β hCG production (1.52 ± 0.23 IU/mL to 2.70 ± 0.41 IU/mL) compared to treatment with FK alone (Figure 1F,G). However, these opposing effects of IFN γ and GM-CSF on E-cad expression and β hCG secretion were abrogated in the presence of OSM. For instance, E-cad expression decreased in cells treated with OSM+IFN γ compared with IFN γ alone (Figure 1C), while β hCG secretion increased from 0.28 ± 0.04 IU/mL to 1.28 ± 0.15 IU/mL (Figure 1D). In cells treated with OSM+GM-CSF, E-cad expression increased (Figure 1F), and the levels of β hCG secretion decreased from 2.70 ± 0.41 IU/mL to 1.70 ± 0.20 IU/mL (Figure 1G). Collectively, these data suggest that OSM sustains trophoblast morphological and biochemical differentiation by reversing the effects of IFN γ and GM-CSF on E-cad expression and β hCG secretion. This demonstrates the versatility and adaptative effect of OSM to support trophoblast function by inhibiting inflammatory stress in response to IFN γ and GM-CSF.

3.2. Regulatory Effects of OSM on IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 Signaling Pathways

We have previously established that LIF influences the behavior of cytokine-activated trophoblast cells and macrophages indirectly via the regulatory action of IL-10 produced by LIF-stimulated VST cells [38] and directly through inhibition of pro-inflammatory IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 signaling pathways in a STAT3-dependent manner [37–39]. Therefore, in the present study, the influence of OSM on the expression and activation of pro-inflammatory signaling proteins STAT1 and STAT5 was investigated. Hence, after a 48 h forskolin-induced differentiation period, VST/BW cells were pretreated for 48 h with OSM or PBS and then activated with IFN γ or GM-CSF for 5, 15, 30, and 60 min (Figure 2A). Our data indicate that IFN γ -activated p-STAT1 was significantly reduced in VST/BW cells pretreated with OSM compared to PBS-pretreated cells (Figure 2B,C). The respective percentages of the inhibition of IFN γ -induced p-STAT1 were 44% at t = 5 min, 58% at t = 15 min, 38% at t = 30 min, and 35% at t = 60 min. Similar to IFN γ -induced p-STAT1, GM-CSF-induced p-STAT5 was also inhibited when VST/BW cells were pretreated with OSM (Figure 2D,E), showing a significant inhibition rate at 5 min (64%), 15 min (81%), 30 min (79%), and 60 min (85%) of GM-CSF activation. Further analysis of VST/BW cells treated with OSM+IFN γ and OSM+GM-CSF indicated that OSM pretreatment (48 h) did not affect either t-STAT1 or t-STAT5 (Figure 2B,E). These results strongly suggest that OSM regulates the effects of IFN γ and GM-CSF on the biological response in trophoblast cells through the negative modulation of STAT1 and STAT5 protein phosphorylation.

3.3. Impact of OSM in the Activation of Signaling Pathway Proteins and the Expression of Negative Regulators of Cytokine Signaling Pathways

In human trophoblast cells, OSM is known to induce the phosphorylation of different signaling pathway proteins such as STAT1, STAT3, and STAT5 [31,44]. To determine the regulatory mechanisms induced by OSM to modulate and support trophoblast functions, after a 48 h forskolin-induced differentiation period, VST/BW cells were treated with PBS or with 20 ng/mL OSM for relatively short and long periods of stimulation (Figure 3). Then, the activated status of signaling pathway proteins was assessed using Western blotting,

and the expression of genes involved in negative signaling pathway regulation was evaluated with RT-PCR. Upon short periods of stimulation with OSM (5, 15, 30, 60, and 90 min), the phosphorylation levels of STAT3, STAT1, and STAT5 proteins were determined in VST/BW cells (Figure 3A, B). Compared to the levels of STAT3 phosphorylation, which were sustained until 60 min and 90 min of stimulation, the levels of p-STAT1 and p-STAT5 increased at 5 min of stimulation with OSM but were rapidly downregulated after 30 min of stimulation (Figure 3B). Moreover, after long periods of stimulation with OSM (1, 6, and 24 h), VST/BW cells also expressed constant and increased levels of phosphorylated, activated STAT3 compared to STAT1 and STAT5 phosphorylation levels, which were downregulated after 1 h of OSM stimulation (Figure 3C,D). Cytokine signal transduction strength is speculated to be influenced by positive/negative regulatory circuitry controlling intracellular signaling [49–51]. In human and murine cells, the strong induction of suppressor of cytokine signaling (SOCS) mRNA expression is induced as early as 15–30 min after stimulation with LIF or OSM with a peak at 60–90 min and a continuing decline up to 120 min [52]. Subsequently, we investigated whether OSM could also induce the transcription of SOCS genes in VST/BW cells after a short period of OSM stimulation (Figure 3E,F). Indeed, SOCS1 and SOCS3 genes were rapidly and significantly induced with a respective peak after 30 min (35-fold) and 60 min (43-fold) of OSM stimulation but, as expected, gradually decreased after 90 min and 120 min of stimulation (Figure 3F). Interestingly, the expression of these negative regulators of cytokine signaling pathways is consistent with the downregulation of activated p-STAT1 and p-STAT5 proteins after short and long periods of stimulation (Figure 3A–D). This strongly suggests that OSM stimulation induces a negative feedback loop on STAT1 and STAT5 activation while supporting STAT3 activation in trophoblast cells.

3.4. Requirement of STAT3 for OSM to Modulate the Effects of Pro-Inflammatory Cytokines in Trophoblast Differentiation

Because STAT3 is expected to be the main intracellular regulator required by OSM to safeguard trophoblast cell function and prevent the effects of IFN γ and GM-CSF on E-cad

expression and β -hCG secretion, we used plasmid vectors to generate stable CT/BW cell clones expressing shRNA mediating the efficient RNA interference targeting of STAT3. After transfection and clone selection, the efficacy of STAT3 interference was confirmed using Western blotting. Stable cell clones were designated as sh-scr (control) and sh-STAT3 (deficient) CT/BW cells (Figure 4A). In selected, stable clones, the silencing of STAT3 gene expression in sh-STAT3 CT/BW cells resulted in a loss of up to -78% in STAT3 expression compared to the control (Figure 4B). Notably, the viability of transfected sh-STAT3 cells was not affected compared to sh-scr cells (Figure 4C).

3.5. Evaluation of Functional Silencing of STAT3 Protein Expression in VST/BW Cells

To confirm that STAT3 expression and phosphorylation are essential cellular mechanisms induced by OSM to regulate the effects of IFN γ and GM-CSF on β -hCG production and E-cad expression in fusogenic trophoblast cells, sh-scr and sh-STAT3 CT/BW cells were both treated with DMSO (control); forskolin (FK) alone; FK combined with OSM, IFN γ , or GM-CSF; or OSM in combination with IFN γ (OSM+IFN γ) or GM-CSF (OSM+GM-CSF) to induce differentiation to VST/BW cells (Figure 5). STAT3 protein expression and silencing also impacted E-cad expression in FK-differentiated cells (Figure 5A,B). In general, we found that the expression patterns of E-cad in sh-scr cells (Figure 5A,B) were similar to those determined in parental CT/BW cells (Figure 1A,B), with comparable variations in response to FK and cytokines, alone or in combination. Thus, although sh-scr and sh-STAT3 cells were sensitive to FK treatment by reducing E-cad expression, the reduction was higher in sh-scr cells (-63%) than in sh-STAT3 cells (-19%). In addition, treatment with OSM differently affected E-cad expression in both cell types. In sh-scr cells, treatment with FK and OSM led to an increase in the E-cad expression of approximately +16% (Figure 5A,B). In contrast, in sh-STAT3 cells, OSM stimulation had a nonsignificant effect on E-cad expression compared to FK alone (Figure 5A,B). Single treatments with IFN γ or GM-CSF influenced E-cad expression in FK-differentiated cells. In sh-scr cells, E-cad increase was evaluated at +41% after IFN γ stimulation compared to FK alone, whereas in sh-STAT3 cells exposed to IFN γ alone, the E-cad expression was robustly increased by +108% compared

to FK alone (Figure 5B). Interestingly, OSM was able to modulate the effect of IFN γ on E-cad expression in sh-scr cells but not in sh-STAT3 cells. Hence, in sh-scr cells treated with FK and co-stimulated with OSM and IFN γ , the E-cad expression decreased by –82% instead of remaining at +100% as in sh-STAT3 cells co-stimulated with FK, OSM, and IFN γ (Figure 5B). On the other hand, in cells treated with FK and stimulated with GM-CSF, the expression of E-cad decreased to –30% in sh-scr cells and –75% in sh-STAT3 cells (Figure 5B). Notably, these important reductions in the E-cad expression induced by GM-CSF alone were significantly inhibited by OSM co-stimulation, as the relative expression increased by +62% in sh-scr cells and by +58% in sh-STAT3 cells compared to GM-CSF alone (Figure 5B). Moreover, we found that sh-STAT3 cells produced higher amounts of β hCG (9.2 vs. 5.2 IU/mL) than sh-scr cells (Figure 5C). Interestingly, these increased β hCG levels were maintained even after a single stimulation with OSM (9.1 vs. 3.9 IU/mL), IFN γ (9.3 vs. 1.8 IU/mL), or GM-CSF (9.7 vs. 6.9 IU/mL). Secondly, in sh-STAT3 cells, OSM stimulation was unable to abrogate the effects of IFN γ and GM-CSF on β hCG secretion (Figure 5C) compared to sh-scr cells. Overall, these data demonstrate that independently of OSM activity, STAT3 expression and activation orchestrate the signaling pathway mechanisms involved in biochemical and morphological trophoblast differentiation.

3.6. OSM Pretreatment Inhibits IFN-STAT1 and GM-CSF-STAT5 Signaling Pathways

Through this experiment, we sought to demonstrate the direct effect of OSM and STAT3 activity on the activation of IFN-STAT1 and GM-CSF-STAT5 signaling pathways. Sh-scr and sh-STAT3 cells were initially pretreated for 48 h with PBS (control) or 20 ng/mL OSM. Then, both types of cells were left unstimulated (t = 0 min) or stimulated with PBS (control) or with either IFN γ or GM-CSF for 15, 30, and 60 min. Western blotting was performed to assess the levels of phosphorylated (p) and total (t) STAT1 (Figure 6A,B) and STAT5 (Figure 6C,D) proteins. In sh-scr cells pretreated with OSM, we observed a reduction in the level of p-STAT1 compared to the control, PBS-pretreated cells (Figure 6A,B). This significant inhibition in OSM-pretreated cell samples was maintained for all the periods of stimulation with IFN γ , with the inhibition rates determined at –82%, –91%, and –69% after

15, 30, and 60 min of stimulation, respectively (Figure 6B). Interestingly, in sh-STAT3 cells, IFN γ stimulation induced similar levels of p-STAT1 in the absence of OSM compared to sh-scr cells. However, after pretreatment with OSM, the levels of p-STAT1 decreased significantly only at t = 15 min (–65%) but were not significantly affected for other periods of stimulation. Thus, at t = 30 min and t = 60 min, the inhibition of p-STAT1 was no longer significant (–5% and an increase in p-STAT1, respectively) compared to PBS-pretreated cell samples (Figure 6B). This loss of IFN γ -p-STAT1 pathway inhibition induced by OSM in sh-STAT3 cells further confirms that OSM modulatory effect on IFN γ activity depends on STAT3 expression and directly modulates the activation of IFN γ -STAT1 signaling pathways. Concerning the response to GM-CSF stimulation, we found that the levels of p-STAT5 were robustly enhanced in sh-STAT3 cells compared to those induced in sh-scr cells (Figure 6C, D). For instance, at t = 15 min, the relative p-STAT5 expression exhibited a seven-fold increase in sh-STAT3 cells compared to sh-scr cells. However, pretreatment with OSM led to a significant decrease in the levels of p-STAT5 for all periods of stimulation with GM-CSF in both sh-scr cells and sh-STAT3 cells. This result strongly supports the idea that OSM uses a different pathway than STAT3 to modulate STAT5 activated by GM-CSF.

3.7. OSM Induces Immune Mediators and Anti-Inflammatory Signaling Pathways in VST/BW Cells.

The results described above demonstrate that OSM does not prevent the overexpression of E-cad (Figure 5B) or inhibit the phosphorylation of STAT1 induced by IFN γ in sh-STAT3 cells (Figure 6A, B), compared to sh-scr cells. On the other hand, OSM reversed the inhibitory effect of GM-CSF on the expression of E-cad (Figure 5B) and decreased/inhibited the expression of p-STAT5 in both sh-scr and sh-STAT3 cells (Figure 6C,D). Therefore, these two processes would be regulated by OSM via STAT3-dependent and -independent mechanisms. Furthermore, the levels of p-STAT1 and p-STAT5, induced by IFN γ and GM-CSF, respectively, were inhibited when sh-scr cells were pretreated for 48 h with OSM (Figure 6). It was also established that OSM strongly induced the

expression of p-STAT3 after 24 h of stimulation, while the levels gradually decreased after 30 min of stimulation with OSM (Figure 3B, D). Importantly, there was no induction of p-STAT1 or p-STAT5 after 24 h of stimulation with OSM (Figure 3B, D). Consequently, we propose that long periods of stimulation with OSM might induce the expression of immune regulators such as IL10 and TGF β 1, which are known to inhibit pro-inflammatory signaling pathways such as IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 via the activation of STAT3 [37,38] and SMAD2 [51,53,54] proteins, respectively. To confirm this hypothesis, we first aimed to determine the expression and phosphorylation levels of STAT3 and SMAD2 proteins in VST/BW cells pretreated with OSM for 48 h and the impact of IFN γ or GM-CSF in these processes. Our results indicated that after a 48 h pretreatment, OSM induced the expression of p-STAT3 and t-STAT3, while the levels of p-STAT3 gradually decreased in response to IFN γ , and those of t-STAT3 remained stable (Figure 7A, C, E). Moreover, comparable results were observed in response to a 48 h pretreatment with OSM and stimulation with GM-CSF for 15 and 60 min (Figure 7 B,D,F). On the other hand, we found that OSM enhanced the expression levels of p-SMAD2 without affecting those of t-SMAD2 after a 48 h pretreatment. Notably, the levels of p-SMAD2 and those of t-SMAD2 remained stable in response to both IFN γ and GM-CSF (Figure 7 A,B,E,G,H,J). Next, we assessed the expression of the immune regulators IL10 and TGF β 1 in OSM-stimulated VST/BW cells. Thus, cells were treated for 6, 12, 24, and 48 h with 20 ng/mL OSM, and then gene expression was assessed using RT-PCR (Figure 8A). Our results indicated that, compared to PBS-treated cells (control), the IL10 and TGF β 1 genes were significantly induced in OSM-treated cells, and their expression levels gradually increased from 6 h to 24 h but slowly decreased at 48 h (Figure 8B,C). The patterns of IL10 and TGF β 1 expression were consistent with those of STAT3 and SMAD2 activation induced upon long periods of OSM stimulation in VST/BW cells. Collectively, these observations demonstrate that OSM treatment in trophoblast cells enhances anti-inflammatory cytokine production such as IL-10 and TGF β 1, which might be involved in the modulation of IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 signaling pathways. Finally, to confirm that SMAD2 and TGF β 1 expressions were indirectly regulated by OSM treatment through STAT3 activation, sh-scr and sh-STAT3

VST/BW cells were treated for 24 h with PBS or 20 ng/mL OSM, and then STAT3 and SMAD2 activation was assessed using Western blotting (Figure 9A). In sh-scr VST/BW cells, the levels of p-STAT3, t-STAT3, and p-SMAD2 were significantly increased with OSM treatment (Figure 9A–D), while the expression levels of t-SMAD2 remained unchanged compared to PBS-treated cells (Figure 9E). As expected, in sh-STAT3 VST/BW cells, the expression levels of p-STAT3 and t-STAT3 were significantly reduced with similar reduction rates (–61.2%) to those of sh-scr cells (Figure 9B,C). Interestingly, concurrent with this reduction in STAT3 expression in sh-STAT3 cells, we observed a significant reduction in p-SMAD2 expression (–60.8%) compared to sh-scr cells (Figure 9D). In contrast, the expression levels of t-SMAD2 remained unchanged in both PBS- and OSM-treated sh-STAT3 cells (Figure 9E). Thus, these results strongly suggest that STAT3 is the main cellular mechanism induced by OSM to regulate the expression of immune regulatory factors and anti-inflammatory pathways in VST/BW cells.

4. Discussion

It is well established that an unbalanced immunological response at the maternal–fetal interface can result in pregnancy disorders such as preterm birth, spontaneous abortion, or preeclampsia [24,25,55]. Aberrant maternal inflammation is known to affect trophoblast cell motility, survival, and function, potentially leading to negative consequences for pregnancy outcomes [26–30]. In this context, our study aimed to establish whether and how the gestational cytokine OSM and the transcriptional factor STAT3 regulated IFN γ - or GM-CSF-mediated endocrine and immunological functions in a model of villous syncytiotrophoblast cells (VST/BW cells).

Although the effects of OSM activity on trophoblast cell migration and proliferation have been previously published using EVT cell models, such as HTR-8/SVneo, JEG-3, or JAR cells [31,45–47], the impact of OSM on trophoblast syncytialization and endocrine capacities have not been fully investigated. Among the available trophoblast-like cell lines used as models to investigate placental function, fusogenic BeWo cells are commonly dedicated to studying syncytialization, adhesion, and endocrine function, while nonfusogenic JAR or

JEG-3 cell lines are widely chosen to study the molecular mechanisms underlying the proliferation and invasive potential of trophoblast cells [56].

During differentiation, VST cells must undergo morphological and biochemical changes characterized by the syncytialization and production of hormones, such as β hCG and progesterone [57]. The production of placental β hCG is crucial for the maintenance of pregnancy by promoting trophoblast differentiation and immunomodulatory functions [58] by reducing the expression of pro-inflammatory factors [16]. Indeed, a higher expression of pro-inflammatory factors such as $\text{TNF}\alpha$ is known to affect trophoblast cell fusion by reducing β hCG expression [59]. In this setting, we described the effects of $\text{IFN}\gamma$ and GM-CSF on morphological and biochemical changes during forskolin-induced VST cell differentiation. GM-CSF, via STAT5 activation, plays essential roles in placental morphogenesis and fetal development by acting as a maternal immune tolerant factor as well as a trophic growth and viability factor in preimplantation embryos [60,61]. In fact, during early pregnancy, uterine GM-CSF expression remains high for a few days after conception but declines around the time of embryo implantation under the inhibitory influence of progesterone [62]. However, GM-CSF expression or activity at levels above or below the threshold at the maternal–fetal interface induces pregnancy complications such as preeclampsia (PE) and fetal growth restriction (FGR) related to insufficient placental development and function [63]. Depending on the levels secreted in the uterus during early pregnancy, $\text{IFN}\gamma$ also can be either beneficial or detrimental to the outcome of pregnancy [64]. In the immune system, $\text{IFN}\gamma$ is crucial for the stimulation of adaptive immune responses against pathogens [65]. As a gestational factor, $\text{IFN}\gamma$ released by uterine NK cells is involved in inhibiting excessive trophoblast cell invasion into the uterine wall during implantation [66]. Although $\text{IFN}\gamma$ is a necessary cytokine in the establishment and maintenance of pregnancy, the elevated expression or activity levels of $\text{IFN}\gamma$ in uterine decidual and placental tissues are associated with aberrant inflammatory responses, placental dysfunction, and increased risks of abortion and PE [26,27]. Importantly, the molecular process underlying inflammation-related events in PE was established by describing the response of JEG-3 cells to pro-inflammatory cytokines,

including IFN γ and GM-CSF, resulting in the inhibition of trophoblast invasion by downregulating the production of matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 [67]. In this context, our previous studies provide further evidence that human trophoblast and macrophage functions are affected by exposure to IFN γ [37,38]. Aiming to investigate the interplay between LIF and trophoblast cells in the modulation of macrophage functional phenotype, we demonstrated that LIF-differentiated VST cells produced IL10 via sustained STAT3 activation to generate IFN γ -activated macrophages with reduced TNF α expression and cytotoxic function [38]. In addition, we also showed that cell activation with IFN γ inhibited cell invasion and migration, but this immobilizing effect in macrophages and trophoblast cells was abrogated by LIF through the induction of STAT3 activation and MMP9 expression [37]. Here, we demonstrated that IFN γ significantly reduced β hCG levels, while GM-CSF substantially upregulated them in VST/BW cells. Notably, abnormally low (<0.5 μ M) or high (>2.0 μ M) free β hCG levels are generally associated with an increased risk of adverse pregnancy outcomes, i.e., FGR, spontaneous abortion, and preterm birth [68]. Moreover, high total hCG concentration in early pregnancy is associated with an increased risk of PE [69]. Moreover, clinical studies have indicated that abnormal high serum GM-CSF levels are strongly associated with elevated serum β hCG levels in progressive tumor cases of choriocarcinoma [70], suggesting a potential pathological role for higher levels of GM-CSF and β hCG in gestational trophoblastic diseases. The upregulation of β hCG by STAT5 signaling inducers, such as GM-CSF, is consistent with previous studies using BeWo cells as a VST model indicating that FK activates the cAMP-PKA signaling pathway, which in turn upregulates STAT5 signaling activity, resulting in enhanced β hCG production [57]. Interestingly, our results demonstrate that OSM counteracts the effects of IFN γ and GM-CSF on trophoblast hormonal function by nearly restoring the increased or decreased levels of β hCG to those normally induced in VST/BW cells after differentiation with forskolin alone. E-cadherin is a cell–cell adhesion molecule normally expressed in villous trophoblasts, but it diminishes when they differentiate into the VST of the first- and second-trimester placenta [71]. Indeed, as described during the in vitro VST differentiation of human chorionic villi

trophoblasts and BeWo cells, E-cadherin levels are significantly increased during earlier stages of syncytialization but rapidly decreased as syncytialization progresses in the spontaneous and induced syncytialization systems [72]. Although the literature regarding the relationship between E-cadherin expression and gestational pathologies is controversial, it is predominantly in the direction of an increased expression of E-cadherin in PE and FGR [73,74]. In this context, we found that IFN γ and GM-CSF also had opposing effects on morphologic trophoblast differentiation, with IFN γ increasing E-cadherin expression, whereas GM-CSF reduced it in VST/BW cells. However, we found that OSM stimulation efficiently corrected the effect of IFN γ and GM-CSF on morphologic differentiation of trophoblast cells by restoring the increased or decreased levels of E-cadherin expression induced by pro-inflammatory cytokines. Together, these data strongly suggest that functional OSM signaling effectively modulates pro-inflammatory signal transduction in trophoblast cells, and we demonstrated that OSM negatively regulated IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 signaling pathway activation. Interestingly, the OSM inhibitory effect was mirrored by increased total and phosphorylated STAT3 protein levels and accompanied by a significant enhancement of SMAD2 protein phosphorylation. We established that OSM induces the expression of genes encoding for IL10, TGF- β 1, SOCS1, and SOCS3 proteins in trophoblast cells. Notably, the immunomodulatory cytokine IL10 is known to inhibit IFN γ -STAT1 activation and STAT1- dependent gene expression through the STAT3-dependent expression of SOCS1 and SOCS3 genes [75–77]. In contrast, the molecular mechanisms through which TGF- β 1 inhibits IFN γ - STAT1 are mainly dependent on SMAD2/3 pathway activation through the recruitment of SOCS1 [53] and/or PIAS1 (a protein inhibitor of activated STAT1) [54] or the TGF β receptor 1 (TGF- β R1)-mediated phosphorylation of the IFN γ receptor 1 (IFNGR1) [51]. Moreover, SOCS1 also negatively regulates GM-CSF signaling by ubiquitylating the GM-CSF receptor (GMR) for subsequent destruction via the proteasome [78]. Thus, mechanistically, it is conceivable to propose the OSM modulation of IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 signaling pathways in trophoblast cells through different mechanisms, including the expression of IL10 and TGF β 1, the activation of STAT3 and SMAD2, and the recruitment of SOCS1 and

SOCS3 proteins (Figure 10). STAT3 expression is essential for the early development of the embryo, and STAT3 knockout mice undergo a notable loss of fertility due to embryonic lethality in early gestation [79]. Moreover, activated STAT3 is proposed to be a critical modulator of trophoblast invasion, as the inhibition of STAT3 phosphorylation in the mouse endometrium also prevents embryo implantation [80]. However, the role of STAT3 in the human trophoblast differentiation process is not fully understood. Studies have reported that the spontaneous and induced differentiation of trophoblast cells is strongly associated with increased STAT3 expression [81]. In addition, phosphorylated STAT3 protein detection is associated with normal villous and extravillous trophoblast cells of the human first-trimester placenta; afterward, this expression profile disappears in the term placenta [82]. Thus, this observation strongly suggests that STAT3 may play a significant role in the induction and maintenance of trophoblast differentiation and function in early pregnancy. To further understand the impact of OSM and STAT3 on trophoblast functions such as fusion and endocrine secretion, loss-of-function studies were performed using STAT3-deficient BeWo cells. The most impressive effect of STAT3 inactivation during BeWo cell differentiation is the overproduction of β -hCG compared to levels from STAT3-expressing VST/BW cells. Our data are consistent with previous findings reporting a significant increase in β -hCG secretion in transient STAT3-deficient BeWo cells differentiated to VST cells [81]. These findings have potential biological and clinical significance because abnormally increased β hCG expression [83] with decreased STAT3 expression has been reported in placental chorionic villi from idiopathic FGR pregnancies [81]. Thus, our results support the idea that decreased expression or activation of STAT3 may lead to the upregulation of β -hCG, which in turn could prematurely deplete the pool of proliferating trophoblast cells by favoring terminal trophoblast differentiation and syncytialization in FGR. Another major discovery is that functional cytokine signaling is impaired in STAT3-deficient cells. For instance, compared to STAT3-expressing VST/BW cells, stable, higher levels of β -hCG were maintained in STAT3-deficient VST/BW cells even after stimulation with OSM, IFN γ , or GM-CSF individually, or with OSM combined with IFN γ or GM-CSF, STAT3 deficiency in SV/BW cells also resulted in enhanced E-cadherin expression

levels compared to those normally expressed in STAT3-expressing VST/BW cells. In contrast to β hCG, the regulation of E-cadherin expression was maintained to some extent in STAT3-deficient VST/BW cells, as the expression levels were increased in response to OSM alone and even more when stimulated with IFN γ alone but strongly reduced in response to GM-CSF alone compared to STAT3-expressing VST/BW cells.

In combination, OSM stimulation did not reduce enhanced IFN γ -mediated E-cadherin expression but significantly increased the expression of GM-CSF-mediated diminished E-cadherin. Notably, STAT3-deficient VST/BW cells were unable to negatively control the activation of both IFN γ -STAT1 signaling pathways compared to GM-CSF-STAT5 in response to OSM. This suggests that OSM uses different pathways to modulate inflammatory stress signaling in trophoblast cells. In addition, STAT3-deficient VST/BW cells showed an enhanced expression of phosphorylated STAT5 but a reduced expression of E-cadherin in response to GM-CSF compared to STAT3-expressing VST/BW cells. These results are in line with those indicating that the STAT5 signaling pathway is upregulated during forskolin-induced VST differentiation, resulting in enhanced β hCG production and reduced E-cadherin expression [57].

5. Conclusions

Collectively, these data suggest a dependence of OSM for STAT3 in the regulation of β -hCG but not E-cadherin expression, as well as in the regulation of signal transduction in response to activated IFN γ -STAT1 signaling pathway, but they also highlight the ability of OSM to regulate the GM-CSF-STAT5 signaling pathway through a STAT3-independent mechanism (Figure 10). Thus, we propose OSM-induced STAT3 activation as a main molecular mechanism for the regulation of IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 signaling pathways' activation in trophoblast cells. Other mechanisms may involve TGF β 1-SMAD2 signaling pathway activation, and/or the recruitment of SOCS1 and SOCS3 proteins; however, this requires further investigation. These conclusions are based on in vitro experiments with a tumoral cell line (choriocarcinoma), which presents a limitation in the conclusion of this study. However, the immortalized BeWo cell line appears to fulfill many

of the necessary conditions for studying the function of the human placental syncytium and is largely used to study the most pertinent aspects of trophoblast biology [56], often due to ethical restrictions and limited availability of human tissues. Nevertheless, the use of human trophoblast stem cells or placenta explants could be considered for future in vitro investigations. Using trophoblast stem cells would be interesting to explore further fundamental biological effects and the role of OSM in the different trophoblast subtypes. Nonetheless, in the future, we will ascertain whether these OSM mechanisms operate in an in vivo model.

Author Contributions: Conceptualization, C.R.-M.; methodology, C.R.-M. and J.G.; validation, M.R., J.G. and E.S.K.T.; formal analysis, C.R.-M. and M.R.; investigation, M.R. and J.G.; resources, J.G.; writing—original draft preparation, M.R. and C.R.-M.; writing—review and editing, C.A.T. and M.C.; supervision, C.R.-M., C.V., C.V.T. and C.A.T.; project administration, C.R.-M.; funding acquisition, C.R.-M., C.V., C.V.T. and C.A.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC; number RGPIN/6516-2014 to C.R.-M.); the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies-Réseau Québécois en Reproduction (FQRNT-RQR; number 2018-RS4-203214 to C.R.-M.); and the Quebec–Wales joint call for projects program (Welsh Government and the Government of Québec; number MRIF-FSR-PCO 02.805-6690854 to C.T. and C.R.-M.). The RQR-CREATE scholarships program supported M.R., and E.S.K.T. holds an undergraduate scholarship from the NSERC.

Institutional Review Board Statement: The human placental choriocarcinoma BeWo cell line (#CCL-98) was obtained from ATCC (Rockville, MD, USA).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors on request.

Acknowledgments: We thank Ingrid Morin and Shanie Mathieu for technical assistance on some of the biochemical analyses and biological assays.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

1. Maltepe, E.; Fisher, S.J. Placenta: The forgotten organ. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2015, 31, 523–552. [[CrossRef](#)]
2. Burton, G.J.; Fowden, A.L. The placenta: A multifaceted, transient organ. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2015, 370, 20140066. [[CrossRef](#)]
3. Knofler, M.; Haider, S.; Saleh, L.; Pollheimer, J.; Gamage, T.; James, J. Human placenta and trophoblast development: Key molecular mechanisms and model systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 2019, 76, 3479–3496. [[CrossRef](#)]
4. Makrigiannakis, A.; Karamouti, M.; Drakakis, P.; Loutradis, D.; Antsaklis, A. Fetomaternal immunotolerance. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008, 60, 482–496. [[CrossRef](#)]
5. Moser, G.; Weiss, G.; Sundl, M.; Gauster, M.; Siwetz, M.; Lang-Olip, I.; Huppertz, B. Extravillous trophoblasts invade more than uterine arteries: Evidence for the invasion of uterine veins. *Histochem. Cell Biol.* 2017, 147, 353–366. [[CrossRef](#)]
6. Aplin, J.D. Developmental cell biology of human villous trophoblast: Current research problems. *Int. J. Dev. Biol.* 2010, 54, 323–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zeldovich, V.B.; Clausen, C.H.; Bradford, E.; Fletcher, D.A.; Maltepe, E.; Robbins, J.R.; Bakardjiev, A.I. Placental syncytium forms a biophysical barrier against pathogen invasion. *PLoS Pathog.* 2013, 9, e1003821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Roberts, R.M.; Ezashi, T.; Schulz, L.C.; Sugimoto, J.; Schust, D.J.; Khan, T.; Zhou, J. Syncytins expressed in human placental trophoblast. *Placenta* 2021, 113, 8–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Perrier d'Hauterive, S.; Charlet-Renard, C.; Berndt, S.; Dubois, M.; Munaut, C.; Goffin, F.; Hagelstein, M.T.; Noi, A.; Hazout, A.; Foidart, J.M.; et al. Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia

inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium. *Hum. Reprod.* 2004, 19, 2633–2643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Racca, A.C.; Ridano, M.E.; Camolotto, S.; Genti-Raimondi, S.; Panzetta-Dutari, G.M. A novel regulator of human villous trophoblast fusion: The Krüppel-like factor 6. *Mol. Hum. Reprod.* 2015, 21, 347–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. West, R.C.; Ming, H.; Logsdon, D.M.; Sun, J.; Rajput, S.K.; Kile, R.A.; Schoolcraft, W.B.; Roberts, R.M.; Krisher, R.L.; Jiang, Z.;

et al. Dynamics of trophoblast differentiation in peri-implantation-stage human embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2019, 116, 22635–22644. [[CrossRef](#)]

12. Boss, A.L.; Chamley, L.W.; James, J.L. Placental formation in early pregnancy: How is the centre of the placenta made? *Hum. Reprod. Update* 2018, 24, 750–760. [[CrossRef](#)]

13. James, J.L.; Carter, A.M.; Chamley, L.W. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta* 2012, 33, 327–334. [[CrossRef](#)]

14. Enders, A.C. Trophoblast differentiation during the transition from trophoblastic plate to lacunar stage of implantation in the rhesus monkey and human. *Am. J. Anat.* 1989, 186, 85–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Turco, M.Y.; Moffett, A. Development of the human placenta. *Development* 2019, 146, dev163428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Gridelet, V.; Perrier d'Hauterive, S.; Polese, B.; Foidart, J.M.; Nisolle, M.; Geenen, V. Human Chorionic Gonadotrophin: New Pleiotropic Functions for an “Old” Hormone During Pregnancy. *Front. Immunol.* 2020, 11, 343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Hussain, T.; Murtaza, G.; Kalhor, D.H.; Kalhor, M.S.; Yin, Y.; Chughtai, M.I.; Tan, B.; Yaseen, A.; Rehman, Z.U. Understanding the Immune System in Fetal Protection and Maternal Infections during Pregnancy. *J. Immunol. Res.* 2022, 2022, 7567708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Goldstein, J.A.; Gallagher, K.; Beck, C.; Kumar, R.; Gernand, A.D. Maternal-Fetal Inflammation in the Placenta and the Developmental Origins of Health and Disease. *Front. Immunol.* 2020, 11, 531543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ding, J.; Zhang, Y.; Cai, X.; Diao, L.; Yang, C.; Yang, J. Crosstalk Between Trophoblast and Macrophage at the Maternal-Fetal Interface: Current Status and Future Perspectives. *Front. Immunol.* 2021, 12, 758281. [[CrossRef](#)]
20. Koga, K.; Aldo, P.B.; Mor, G. Toll-like receptors and pregnancy: Trophoblast as modulators of the immune response. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2009, 35, 191–202. [[CrossRef](#)]
21. Guleria, I.; Pollard, J.W. The trophoblast is a component of the innate immune system during pregnancy. *Nat. Med.* 2000, 6, 589. [[CrossRef](#)]
22. Abrahams, V.M.; Visintin, I.; Aldo, P.B.; Guller, S.; Romero, R.; Mor, G. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *J. Immunol.* 2005, 175, 8096–8104. [[CrossRef](#)]
23. Mor, G.; Aldo, P.; Alvero, A.B. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* 2017, 17, 469–482. [[CrossRef](#)]
24. Boyle, A.K.; Rinaldi, S.F.; Norman, J.E.; Stock, S.J. Preterm birth: Inflammation, fetal injury and treatment strategies. *J. Reprod. Immunol.* 2017, 119, 62–66. [[CrossRef](#)]

25. Kim, C.J.; Romero, R.; Chaemsaithong, P.; Kim, J.S. Chronic inflammation of the placenta: Definition, classification, pathogenesis, and clinical significance. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015, 213 (Suppl. S4), S53–S69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Nurzadeh, M.; Ghalandarpour-Attar, S.M.; Ghalandarpour-Attar, S.N.; Rabiei, M. The Role of Interferon (IFN)-gamma in Extravillous Trophoblast Cell (EVT) Invasion and Preeclampsia Progression. *Reprod. Sci.* 2023, 30, 1462–1469. [[CrossRef](#)]
27. Yockey, L.J.; Iwasaki, A. Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity* 2018, 49, 397–412. [[CrossRef](#)]
28. Faas, M.M.; De Vos, P. Innate immune cells in the placental bed in healthy pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 2018, 69, 125–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ning, F.; Liu, H.; Lash, G.E. The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2016, 75, 298–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Guenther, S.; Vrekoussis, T.; Heublein, S.; Bayer, B.; Anz, D.; Knabl, J.; Navrozoglou, I.; Dian, D.; Friese, K.; Makrigiannakis, A.; et al. Decidual macrophages are significantly increased in spontaneous miscarriages and over-express FasL: A potential role for macrophages in trophoblast apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 9069–9080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Ogata, I.; Shimoya, K.; Moriyama, A.; Shiki, Y.; Matsumura, Y.; Yamanaka, K.; Nobunaga, T.; Tokugawa, Y.; Kimura, T.; Koyama, M.; et al. Oncostatin M is produced during pregnancy by decidual cells and stimulates the release of HCG. *Mol. Hum. Reprod.* 2000, 6, 750–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Rosario, G.X.; Stewart, C.L. The Multifaceted Actions of Leukaemia Inhibitory Factor in Mediating Uterine Receptivity and

Embryo Implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2016, 75, 246–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Gadiant, R.A.; Patterson, P.H. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: Roles in inflammation and injury. *Stem Cells* 1999, 17, 127–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Wahl, A.F.; Wallace, P.M. Oncostatin M in the anti-inflammatory response. *Ann. Rheum. Dis.* 2001, 60 (Suppl. S3), iii75–iii80. [[PubMed](#)]

35. Camargo-Diaz, F.; Garcia, V.; Ocampo-Barcenas, A.; Gonzalez-Marquez, H.; Lopez-Bayghen, E. Colony stimulating factor-1 and leukemia inhibitor factor expression from current-cycle cannula isolated endometrial cells are associated with increased endometrial receptivity and pregnancy. *BMC Women's Health* 2017, 17, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Hambartsoumian, E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1998, 39, 137–143. [[CrossRef](#)]

37. Hamelin-Morrisette, J.; Dallagi, A.; Girouard, J.; Ravelojaona, M.; Oufqir, Y.; Vaillancourt, C.; Van Themsche, C.; Carrier, C.; Reyes-Moreno, C. Leukemia inhibitory factor regulates the activation of inflammatory signals in macrophages and trophoblast cells. *Mol. Immunol.* 2020, 120, 32–42. [[CrossRef](#)]

38. Dallagi, A.; Girouard, J.; Hamelin-Morrisette, J.; Dadzie, R.; Laurent, L.; Vaillancourt, C.; Lafond, J.; Carrier, C.; Reyes-Moreno, C. The activating effect of IFN-gamma on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation. *Cell. Mol. Immunol.* 2015, 12, 326–341. [[CrossRef](#)]

39. Leduc, K.; Bourassa, V.; Asselin, E.; Leclerc, P.; Lafond, J.; Reyes-Moreno, C. Leukemia inhibitory factor regulates differentiation of trophoblastlike BeWo cells through

the activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP kinase-signaling pathways. *Biol. Reprod.* 2012, 86, 54. [[CrossRef](#)]

40. Fouladi-Nashta, A.A.; Jones, C.J.; Nijjar, N.; Mohamet, L.; Smith, A.; Chambers, I.; Kimber, S.J. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Dev. Biol.* 2005, 281, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. Masjedi, A.; Hajizadeh, F.; Beigi Dargani, F.; Beyzai, B.; Aksoun, M.; Hojjat-Farsangi, M.; Zekiy, A.; Jadidi-Niaragh, F. Oncostatin M: A mysterious cytokine in cancers. *Int. Immunopharmacol.* 2021, 90, 107158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

42. Weber, M.A.; Schnyder-Candrian, S.; Schnyder, B.; Quesniaux, V.; Poli, V.; Stewart, C.L.; Ryffel, B. Endogenous leukemia inhibitory factor attenuates endotoxin response. *Lab. Invest.* 2005, 85, 276–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Fu, T.; Zheng, H.T.; Zhang, H.Y.; Chen, Z.C.; Li, B.; Yang, Z.M. Oncostatin M expression in the mouse uterus during early pregnancy promotes embryo implantation and decidualization. *FEBS Lett.* 2019, 593, 2040–2050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Dey, G.; Radhakrishnan, A.; Syed, N.; Thomas, J.K.; Nadig, A.; Srikumar, K.; Mathur, P.P.; Pandey, A.; Lin, S.K.; Raju, R.; et al. Signaling network of Oncostatin M pathway. *J. Cell Commun. Signal.* 2013, 7, 103–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Wie, J.H.; Ko, H.S.; Choi, S.K.; Park, I.Y.; Kim, A.; Kim, H.S.; Shin, J.C. Effects of Oncostatin Mon Invasion of Primary Trophoblasts under Normoxia and Hypoxia Conditions. *Yonsei Med. J.* 2018, 59, 879–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Ko, H.S.; Park, B.J.; Choi, S.K.; Kang, H.K.; Kim, A.; Kim, H.S.; Park, I.Y.; Shin, J.C. STAT3 and ERK Signaling Pathways Are Implicated in the Invasion Activity by Oncostatin M through Induction of Matrix Metalloproteinases 2 and 9. *Yonsei Med. J.* 2016, 57, 761–768. [[CrossRef](#)]

47. Ko, H.S.; Choi, S.K.; Kang, H.K.; Kim, H.S.; Jeon, J.H.; Park, I.Y.; Shin, J.C. Oncostatin M stimulates cell migration and proliferation by down-regulating E-cadherin in HTR8/SVneo cell line through STAT3 activation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2013, 11, 93.

[\[CrossRef\]](#)

48. Iwahashi, N.; Ikezaki, M.; Matsuzaki, I.; Yamamoto, M.; Toujima, S.; Murata, S.I.; Ihara, Y.; Ino, K. Calreticulin Regulates Syncytialization Through Control of the Synthesis and Transportation of E-Cadherin in BeWo Cells. *Endocrinology* 2019, 160, 359–374.

[\[CrossRef\]](#)

49. Stross, C.; Radtke, S.; Clahsen, T.; Gerlach, C.; Volkmer-Engert, R.; Schaper, F.; Heinrich, P.C.; Hermanns, H.M. Oncostatin M receptor-mediated signal transduction is negatively regulated by SOCS3 through a receptor tyrosine-independent mechanism.

J. Biol. Chem. 2006, 281, 8458–8468. [\[CrossRef\]](#)

50. Zhang, X.; He, B.; Li, H.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Wang, W.; Song, T.; Du, N.; Gu, X.; Luo, Y.; et al. SOCS3 Attenuates GM-CSF/IFN- γ -Mediated Inflammation During Spontaneous Spinal Cord Regeneration. *Neurosci. Bull.* 2020, 36, 778–792. [\[CrossRef\]](#)

51. Takaki, H.; Minoda, Y.; Koga, K.; Takaesu, G.; Yoshimura, A.; Kobayashi, T. TGF- β 1 suppresses IFN- γ -induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 2006, 11, 871–882. [\[CrossRef\]](#)

52. Ehrling, C.; Böhmer, O.; Hahnel, M.J.; Thomas, M.; Zanger, U.M.; Gaestel, M.; Knoefel, W.T.; Schulte am Esch, J.; Hussinger, D.; Bode, J.G. Oncostatin M regulates SOCS3 mRNA stability via the MEK-ERK1/2-pathway independent of p38(MAPK)/MK2. *Cell. Signal.* 2015, 27, 555–567. [\[CrossRef\]](#)

53. Yoshimura, A.; Naka, T.; Kubo, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, 7, 454–465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

54. Reardon, C.; McKay, D.M. TGF-beta suppresses IFN-gamma-STAT1-dependent gene transcription by enhancing STAT1-PIAS1 interactions in epithelia but not monocytes/macrophages. *J. Immunol.* 2007, 178, 4284–4295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cha, J.; Sun, X.; Dey, S.K. Mechanisms of implantation: Strategies for successful pregnancy. *Nat. Med.* 2012, 18, 1754–1767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Hannan, N.J.; Paiva, P.; Dimitriadis, E.; Salamonsen, L.A. Models for Study of Human Embryo Implantation: Choice of Cell Lines?1. *Biol. Reprod.* 2010, 82, 235–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kusama, K.; Bai, R.; Imakawa, K. Regulation of human trophoblast cell syncytialization by transcription factors STAT5B and NR4A3. *J. Cell. Biochem.* 2018, 119, 4918–4927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Nwabuobi, C.; Arlier, S.; Schatz, F.; Guzeloglu-Kayisli, O.; Lockwood, C.J.; Kayisli, U.A. hCG: Biological Functions and Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Leisser, C.; Saleh, L.; Haider, S.; Husslein, H.; Sonderegger, S.; Knofler, M. Tumour necrosis factor-alpha impairs chorionic gonadotrophin beta-subunit expression and cell fusion of human villous cytotrophoblast. *Mol. Hum. Reprod.* 2006, 12, 601–609. [[CrossRef](#)]
60. Bulmer, J.N. Immune aspects of pathology of the placental bed contributing to pregnancy pathology. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* 1992, 6, 461–488. [[CrossRef](#)]
61. Conrad, K.P.; Benyo, D.F. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1997, 37, 240–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Robertson, S.A.; Mayrhofer, G.; Seamark, R.F. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol. Reprod.* 1996, 54, 183–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Robertson, S.A. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007, 18, 287–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Murphy, S.P.; Tayade, C.; Ashkar, A.A.; Hatta, K.; Zhang, J.; Croy, B.A. Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol. Reprod.* 2009, 80, 848–859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Schoenborn, J.R.; Wilson, C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.* 2007, 96, 41–101. [[CrossRef](#)]
66. Hoshida, M.S.; Gorjao, R.; Lima, C.; Daher, S.; Curi, R.; Bevilacqua, E. Regulation of gene expression in mouse trophoblast cells by interferon-gamma. *Placenta* 2007, 28, 1059–1072. [[CrossRef](#)]
67. Lee, C.L.; Veerbeek, J.H.W.; Rana, T.K.; van Rijn, B.B.; Burton, G.J.; Yung, H.W. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Proinflammatory Cytokine-Mediated Inhibition of Trophoblast Invasion in Placenta-Related Complications of Pregnancy. *Am. J. Pathol.* 2019, 189, 467–478. [[CrossRef](#)]
68. Sirikunlai, P.; Wanapirak, C.; Sirichotiyakul, S.; Tongprasert, F.; Srisupundit, K.; Luewan, S.; Traisrisilp, K.; Tongsong, T. Associations between maternal serum free beta human chorionic gonadotropin (β -hCG) levels and adverse pregnancy outcomes. *J. Obstet. Gynaecol.* 2016, 36, 178–182. [[CrossRef](#)]
69. Barjaktarovic, M.; Korevaar, T.I.M.; Jaddoe, V.W.V.; de Rijke, Y.B.; Peeters, R.P.; Steegers, E.A.P. Human chorionic gonadotropin and risk of pre-eclampsia: Prospective population-based cohort study. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2019, 54, 477–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Shaarawy, M.; el-Shobokshy, A.S.; el-Noury, A.I. Serum granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in gestational trophoblastic diseases. *Cytokine* 1995, 7, 171–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

71. Floridon, C.; Nielsen, O.; Holund, B.; Sunde, L.; Westergaard, J.G.; Thomsen, S.G.; Teisner, B. Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblasts during intrauterine, ectopic and molar pregnancy. *Mol. Hum. Reprod.* 2000, 6, 943–950.

[\[CrossRef\]](#)

72. Coutifaris, C.; Kao, L.C.; Sehdev, H.M.; Chin, U.; Babalola, G.O.; Blaschuk, O.W.; Strauss, J.F., 3rd. E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Development* 1991, 113, 767–777. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

73. Atigan, A.; Tan, S.; Cetin, H.; Guler, O.T.; Ozdamar, S.; Karakaya, Y.A. CD97 expression level and its effect on cell adhesion in Preeclampsia. *BMC Pregnancy Childbirth* 2022, 22, 967. [\[CrossRef\]](#)

74. Zhou, H.; Zhao, C.; Wang, P.; Yang, W.; Zhu, H.; Zhang, S. Regulators involved in trophoblast syncytialization in the placenta of intrauterine growth restriction. *Front. Endocrinol.* 2023, 14, 1107182. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

75. Karmakar, S.; Dhar, R.; Das, C. Inhibition of cytotrophoblastic (JEG-3) cell invasion by interleukin 12 involves an interferon gamma-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 55297–55307. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

76. Prele, C.M.; Keith-Magee, A.L.; Yerkovich, S.T.; Murcha, M.; Hart, P.H. Suppressor of cytokine signalling-3 at pathological levels does not regulate lipopolysaccharide or interleukin-10 control of tumour necrosis factor-alpha production by human monocytes. *Immunology* 2006, 119, 8–17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

77. Liu, H.; Wang, W.; Liu, C. Increased expression of IFN-gamma in preeclampsia impairs human trophoblast invasion via a SOCS1/JAK/STAT1 feedback loop. *Exp. Ther. Med.* 2021, 21, 112. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

78. Bunda, S.; Kommaraju, K.; Heir, P.; Ohh, M. SOCS-1 mediates ubiquitylation and degradation of GM-CSF receptor. *PLoS ONE* 2013, 8, e76370. [[CrossRef](#)]

79. Takeda, K.; Noguchi, K.; Shi, W.; Tanaka, T.; Matsumoto, M.; Yoshida, N.; Kishimoto, T.; Akira, S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 3801–3804. [[CrossRef](#)]

80. Catalano, R.D.; Johnson, M.H.; Campbell, E.A.; Charnock-Jones, D.S.; Smith, S.K.; Sharkey, A.M. Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation: A nonsteroidal approach to contraception. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 8585–8590. [[CrossRef](#)]

81. Borg, A.J.; Yong, H.E.; Lappas, M.; Degrelle, S.A.; Keogh, R.J.; Da Silva-Costa, F.; Fournier, T.; Abumaree, M.; Keelan, J.A.; Kalionis, B.; et al. Decreased STAT3 in human idiopathic fetal growth restriction contributes to trophoblast dysfunction. *Reproduction* 2015, 149, 523–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

82. Chan, H.Y.; Siu, M.K.; Zhang, H.J.; Wong, E.S.; Ngan, H.Y.; Chan, K.Y.; Cheung, A.N. Activated Stat3 expression in gestational

trophoblastic disease: Correlation with clinicopathological parameters and apoptotic indices. *Histopathology* 2008, 53, 139–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

83. Chui, A.; Tay, C.; Cocquebert, M.; Sheehan, P.; Pathirage, N.A.; Donath, S.; Fournier, T.; Badet, J.; Evain-Brion, D.; Brennecke, S.P.; et al. Homeobox gene Distal-less 3 is a regulator of villous cytotrophoblast differentiation and its expression is increased in human idiopathic foetal growth restriction. *J. Mol. Med.* 2012, 90, 273–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the

editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Figures Legend

Figure 1. Influence of OSM, IFN γ , and GM-CSF on E-cadherin expression and β hCG production in forskolin-differentiated VST/BW cells: (A) CT/BW cells were treated for 48 h with 0.2% DMSO as a vehicle (control) or differentiated with 10 μ M forskolin (FK) alone; FK combined with OSM (20 ng/mL), IFN γ (5 ng/mL), or GM-CSF (5 ng/mL); or OSM in combination with IFN γ or GM-CSF. Then, β hCG production was measured using ELISA and E-cadherin (E-cad) expression with Western blotting. (B–D) Representative images and/or graphical analysis of relative expression of E-cad and β hCG production in response to OSM alone or in combination with IFN γ . (E–G) Representative images and/or graphical analysis of relative expression of E-cad and β hCG production in response to OSM alone or in combination with GM-CSF. In panels (C,F), the E-cad/ β -actin ratios were determined to express data as relative expression of E-cad at each treatment. In panels (D,G), data are expressed as the number of international units (IU) of β hCG per mL of supernatant. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments; * $p < 0.05$ denotes a significant difference between the cell groups.

Figure 2. Impact of OSM on the activation of IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 signaling pathways in VST/BW cells: (A) VST/cells were pretreated for 48 h with PBS as a vehicle (control) or with OSM (20 ng/mL). Then, cells were stimulated with PBS or with either IFN γ (5 ng/mL) or GM-CSF (5 ng/mL) for 5, 15, 30, and 60 min. The relative levels of phosphorylated (p) and total (t) proteins were assessed using Western blotting. (B, C) Representative images and graphical analysis of relative expression of p-STAT1. (D,E) Representative images and graphical analysis of relative expression of p-STAT5. The p-STAT1/t-STAT, and p-STAT5/t-STAT5 ratios were determined to express data as the relative expression of p-STAT1 and p-STAT5, respectively, at each stimulation time with IFN γ or GM-CSF. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments; * $p < 0.05$ denotes a significant difference between the impact of OSM at each stimulation time.

Figure 3. Analysis of protein phosphorylation of STAT1, STAT3, and STAT5, and gene expression of SOCS1 and SOCS3 in OSM-stimulated VST/BW cells: (A,C) Representative images of phosphorylated (p) and total (t) STAT3, STAT1, and STAT5 proteins as assessed using Western blotting, and (B,D) graphical analysis of relative expression of p-STAT3, p-STAT1, and p-STAT5. Cells were treated for 5, 15, 30, 60, and 90 min (short

periods) and 1, 6, and 24 h (long periods) with either PBS as a vehicle (control) or OSM (20 ng/mL). The p-STAT3/t-STAT3, p-STAT1/t-STAT1, and p-STAT5/t-STAT5 ratios were determined to express data as relative expression of p-STAT3, p-STAT1, and p-STAT5, respectively, at each stimulation time. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments; * $p < 0.05$ denotes a significant difference between the impact of OSM at each stimulation time. (E) Representative images of SOCS1 and SOCS3 gene expression assessed via PCR and (F) graphical analysis induction of genes encoding SOCS1 and SOCS3 relative to GAPDH gene in VST/BW cells stimulated with PBS (control) or with OSM for 30, 60, 90, 120, and 180 min. The SOCS1/GAPDH and SOCS3/GAPDH ratios were determined to express data as the relative expression of SOCS1 and SOCS3, respectively, at each stimulation time. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments; * $p < 0.05$ denotes a significant difference compared to the control.

Figure 4. Effectiveness of STAT3 silencing in viable STAT3-deficient BeWo cells (sh-STAT3 CT/BW cells). (A, B) Representative images and graphical analysis of relative expression of total STAT3 (t-STAT3) in selected CT/BW cell clones stably expressing small hairpin (sh) RNA against control scrambled (sh-scr) mRNA or STAT3 mRNA (sh-STAT3) as evaluated with Western blotting. The t-STAT3/ β -actin ratio was determined to express data as the relative expression of STAT3. (C) Graphical analysis of relative cell viability assessed using MTT assays in selected sh-scr and sh-STAT3 CT/BW cells. Each bar represents the mean $\pm$ SD of four independent experiments; * $p < 0.05$ denotes a significant difference between STAT3 expression in sh-scr CT/BW cells and sh-STAT3 CT/BW cells.

Figure 5. Impact of STAT3 silencing in OSM regulation on IFN γ and GM-CSF effects influencing β hCG secretion and E-cadherin expression in VST/BW cells: (A,B) Representative images and graphical analysis of relative E-cadherin (E-cad) expression in sh-scr and sh-STAT3 TB/BW cells, treated as indicated above, using Western blotting. The E-cad/ β -actin ratio was determined to express data as the relative expression of E-cad. (C) Graphical analysis of β hCG production in sh-scr and sh-STAT3 CT/BW cells treated for 48 h with 0.1% DMSO as a vehicle (control); forskolin (10 μ M), OSM (20 ng/mL), IFN γ (5 ng/mL), or GM-CSF (5 ng/mL) alone; or OSM in combination with IFN γ or GM-CSF. ELISA assay measured β hCG production in cell-free supernatant (values in quadruplicate). Data are expressed as the number of international units (IU) of β hCG per mL of supernatant. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Different superscripts denote significant differences between the samples (* $p < 0.05$) and ns = nonsignificant difference.

Figure 6. Regulatory effects of OSM on STAT1 and STAT5 protein phosphorylation in IFN γ - and GM-CSF-stimulated sh-scr and sh-STAT3 cells: (A,C) Representative images of phosphorylated (p) and total (t) STAT1 and STAT5 proteins and graphical analysis of relative expression of (B) p-STAT1 and (D) p-STAT5. Cells were pretreated for 48 h with either PBS as a vehicle (control) or OSM (20 ng/mL), and then with PBS (t = 0 min), 5 ng/mL IFN γ , or 5 ng/mL GM-CSF for different periods. The p-STAT1/t-STAT1 and p-STAT5/t-STAT5 ratios were determined to express data as the relative expression of p-STAT1 and p-STAT5, respectively, at each stimulation time. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments; * $p < 0.05$ denotes a significant difference between the impact of pretreatment with PBS versus OSM at each stimulation time; ns = non-significant difference.

Figure 7. OSM stimulation regulates STAT3 and SMAD2 protein expression and phosphorylation in VST/BW cells stimulated with IFN γ or GM-CSF: (A,B) Representative images of phosphorylated (p) and total (t) STAT3, SMAD2, STAT1, and STAT5 proteins, and graphical analysis of relative expression of p-STAT3, p-SMAD2, p-STAT1, and p-STAT5 in VST/BW cells pretreated with PBS (control) or with OSM (20 ng/mL) for 48 h, and then activated with IFN γ (C,E,G,I) or GM-CSF (D,F,H,J) for 15 and 60 min. The phosphorylated (p)/total (t) protein ratio was determined to express data as the relative expression of phosphorylated proteins; * $p < 0.05$ denotes a significant difference between PBS versus OSM pretreatment on protein activation, ns = non-significant difference.

Figure 8. OSM stimulation induces IL10 and TGF β 1 gene expression in VST/BW cells: (A) Representative images of IL10 and TGF β 1 gene expression and (B,C) graphical analysis of relative expression of genes encoding IL10 and TGF β 1 relative to GAPDH gene in VST/BW cells stimulated with PBS (control) or with 20 ng/mL OSM for 6, 12, 24, and 48 h. The IL10/GAPDH or TGF β 1/GAPDH ratio was determined to express data as the relative expression of genes. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments; * $p < 0.05$ denotes a significant difference between the impact of PBS versus OSM stimulation on gene expression.

Figure 9. Contribution of STAT3 to OSM regulation of SMAD2 phosphorylation in sh-scr compared to sh-STAT3 VST/BW cells: (A) Representative image of phosphorylated (p) and total (t) STAT3, and SMAD2 proteins and graphical analysis of relative expression of (B) p-STAT3, (C) t-STAT3, (D) p-SMAD2, and (E) t-SMAD2 in sh-scr and sh-STAT3 VST/BW cells. Cells were treated for 24 h with either PBS (control) or OSM

(20 ng/mL). The p-STAT3/ β -actin, t-STAT3/ β -actin, p-SMAD2/ β -actin, and t-SMAD2/ β -actin ratios were determined to express data as the relative expression of p-STAT3, time. Each bar represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments; * $p < 0.05$ denotes a significant difference between sh-scr and sh-STAT3 VST/BW pretreated with OSM.

Figure 10. Graphical conclusion of the modulating effects of OSM and STAT3 signaling pathways on IFN γ -STAT1 and GM-CSF-STAT5 signaling pathways' activation in trophoblast cells.

Figures

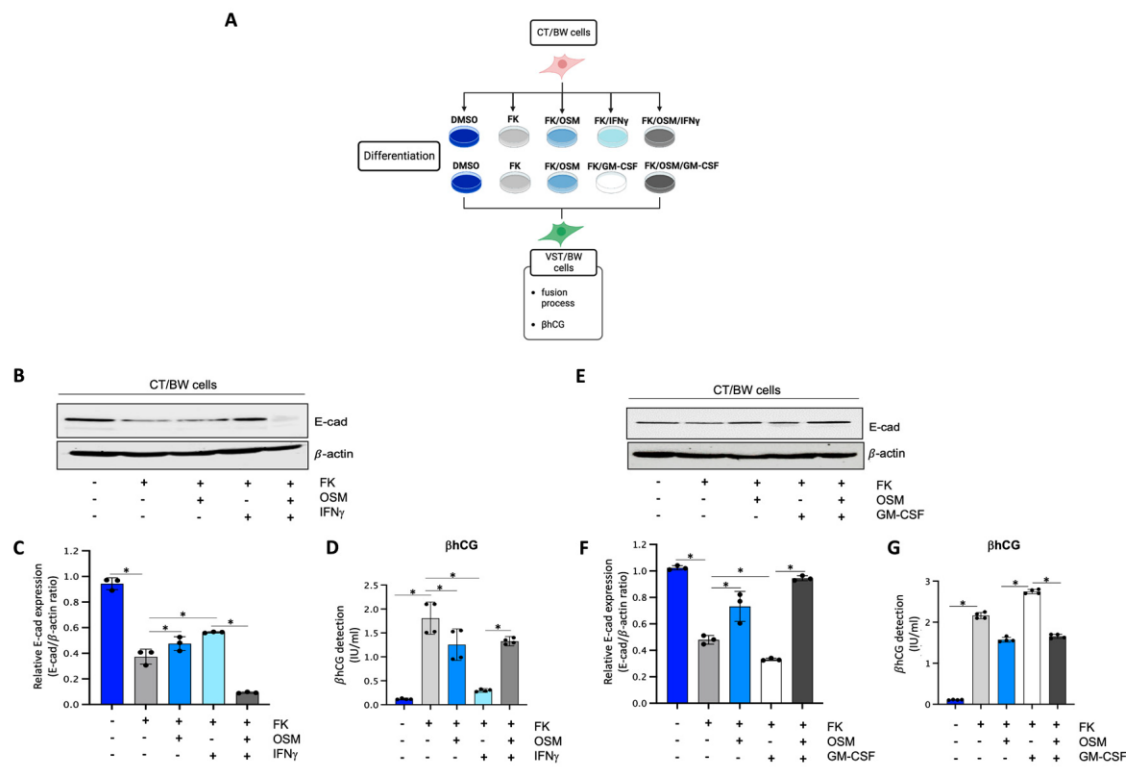


Figure 1.

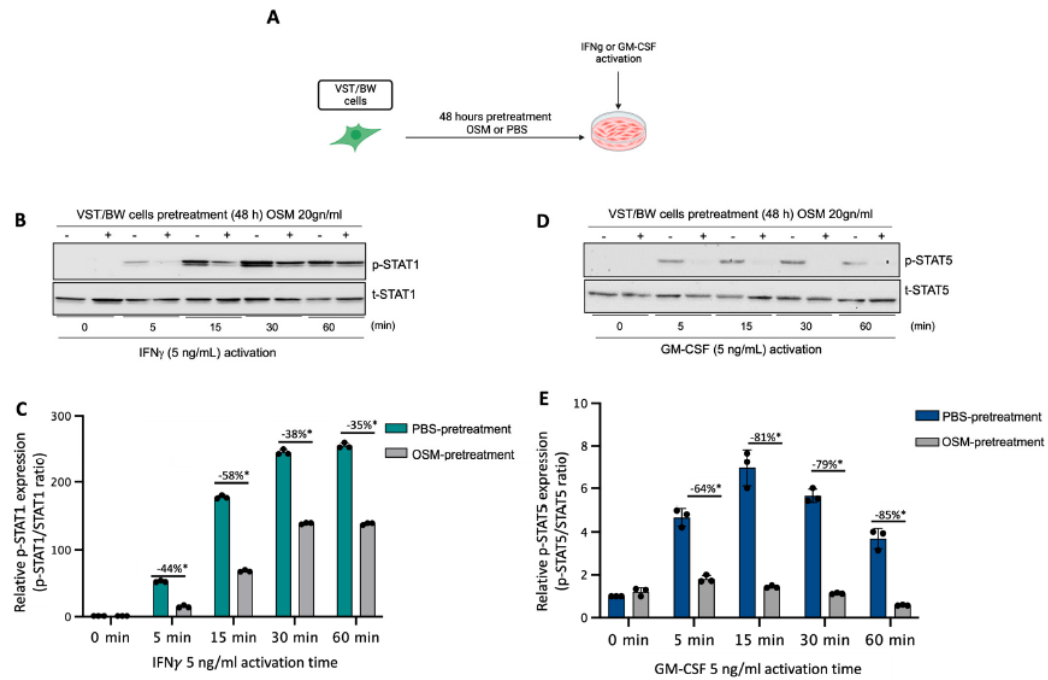


Figure 2.

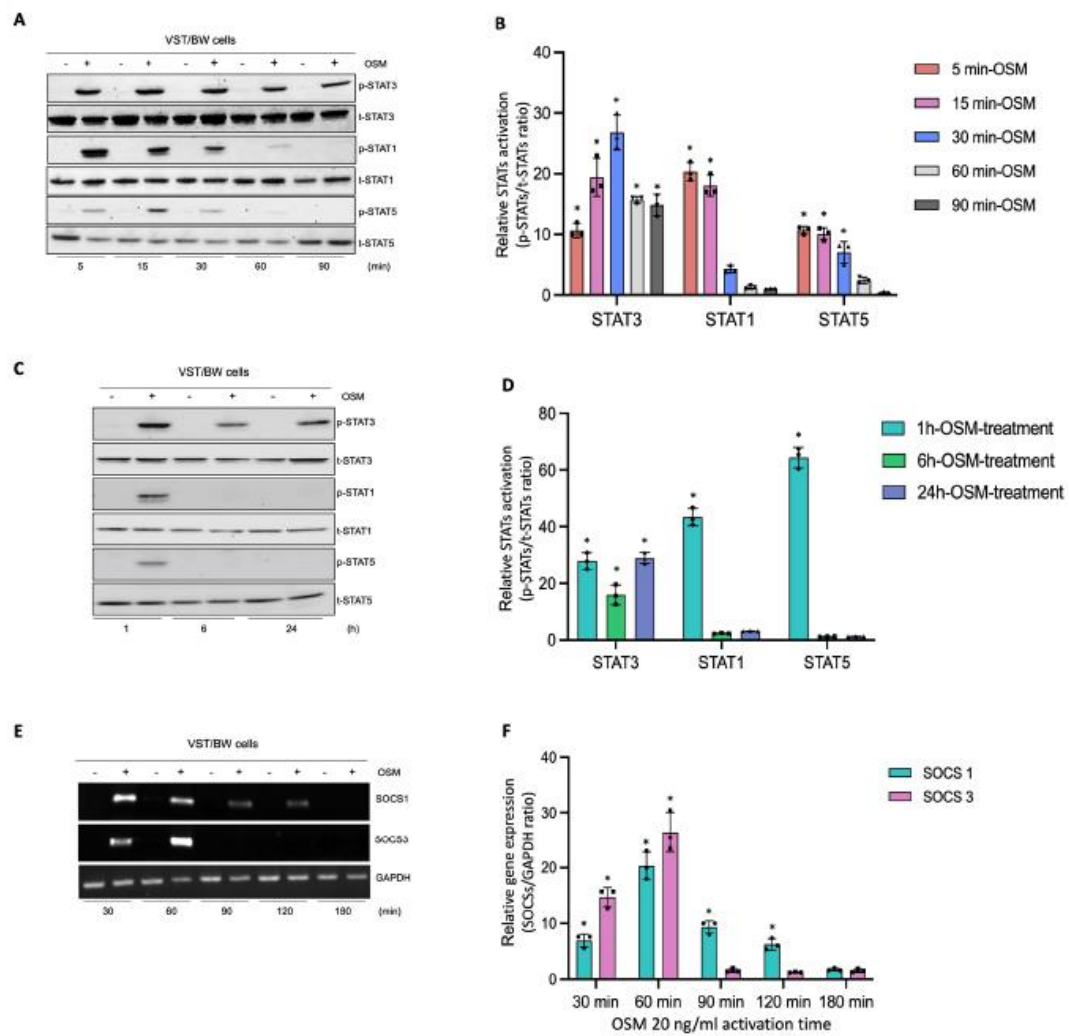


Figure 3.

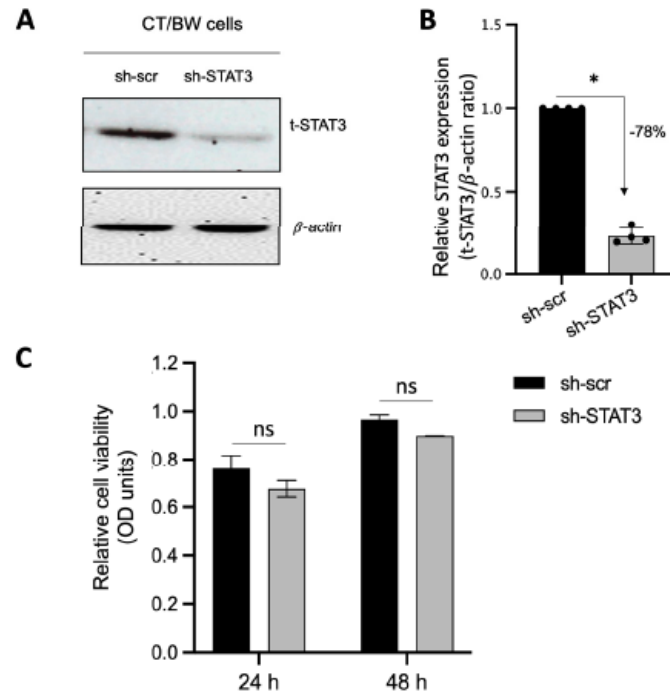


Figure 4.

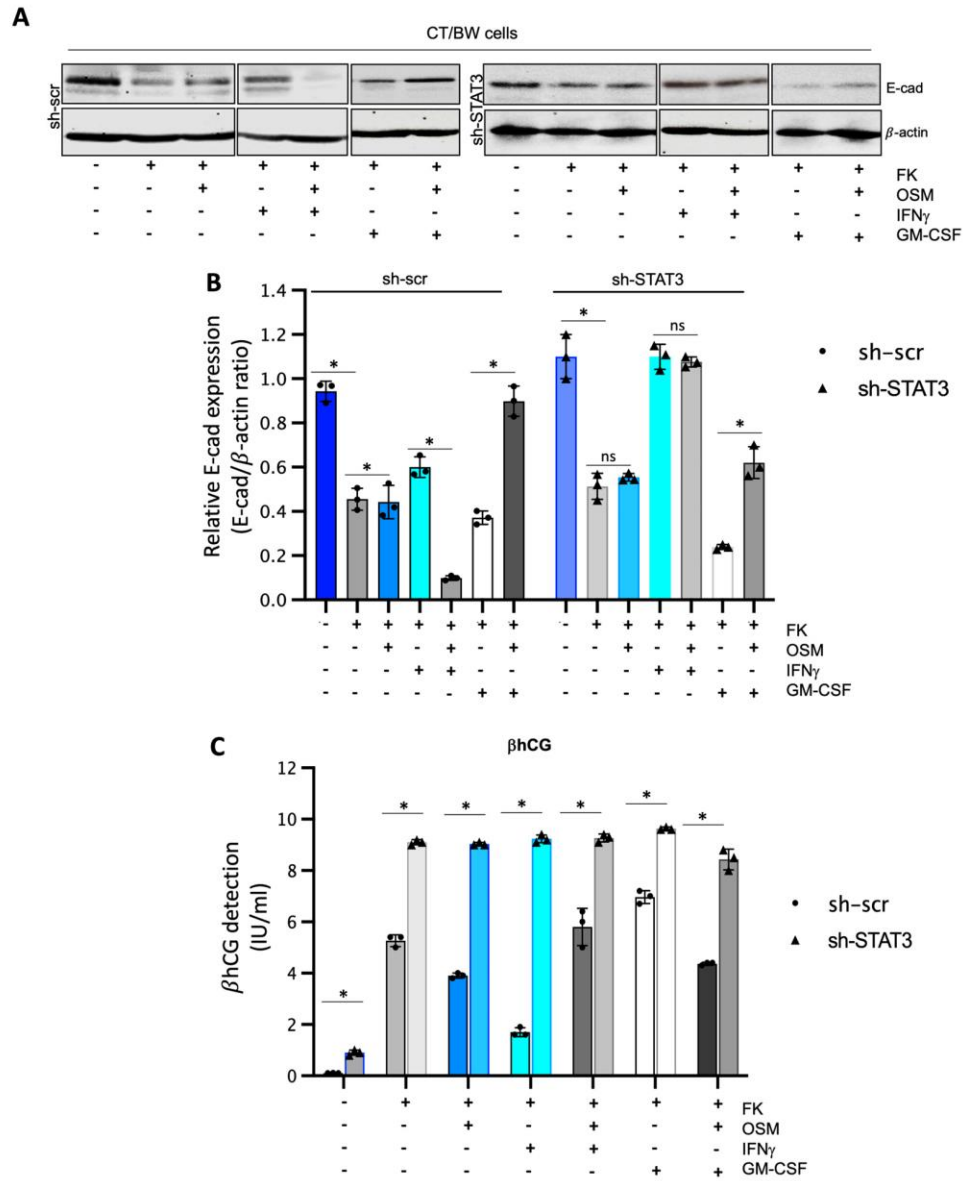


Figure 5.

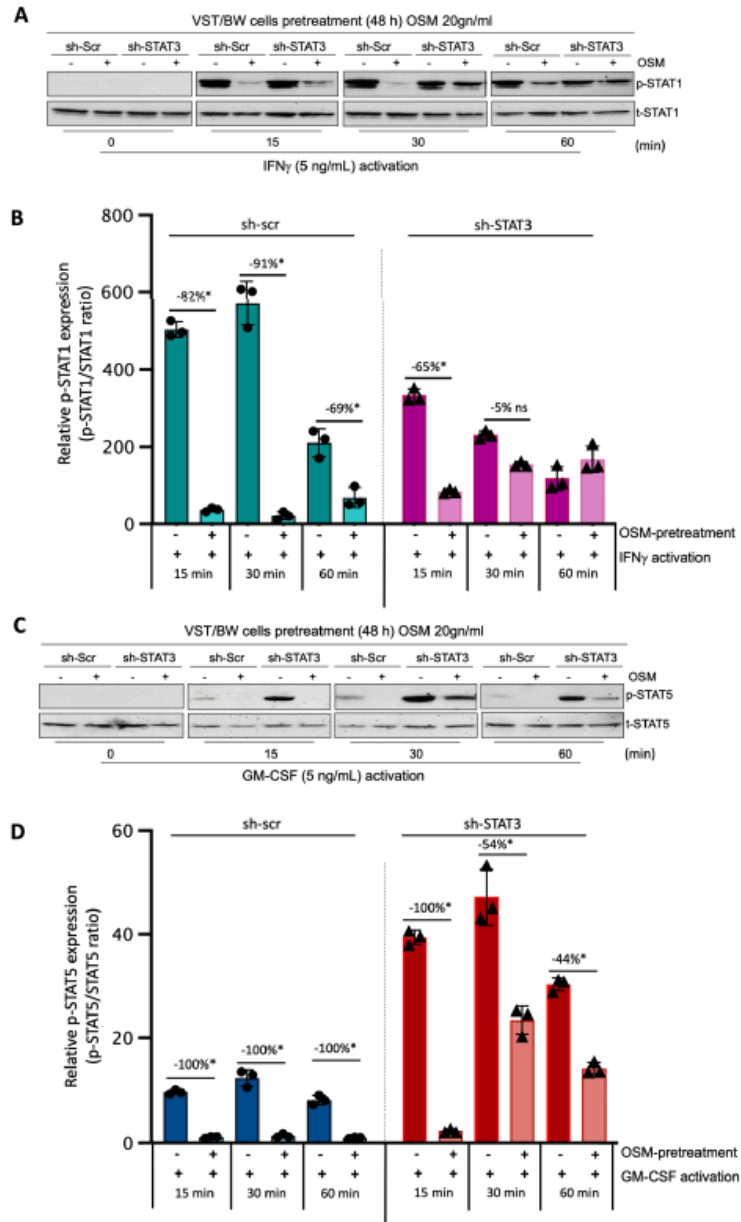


Figure 6.

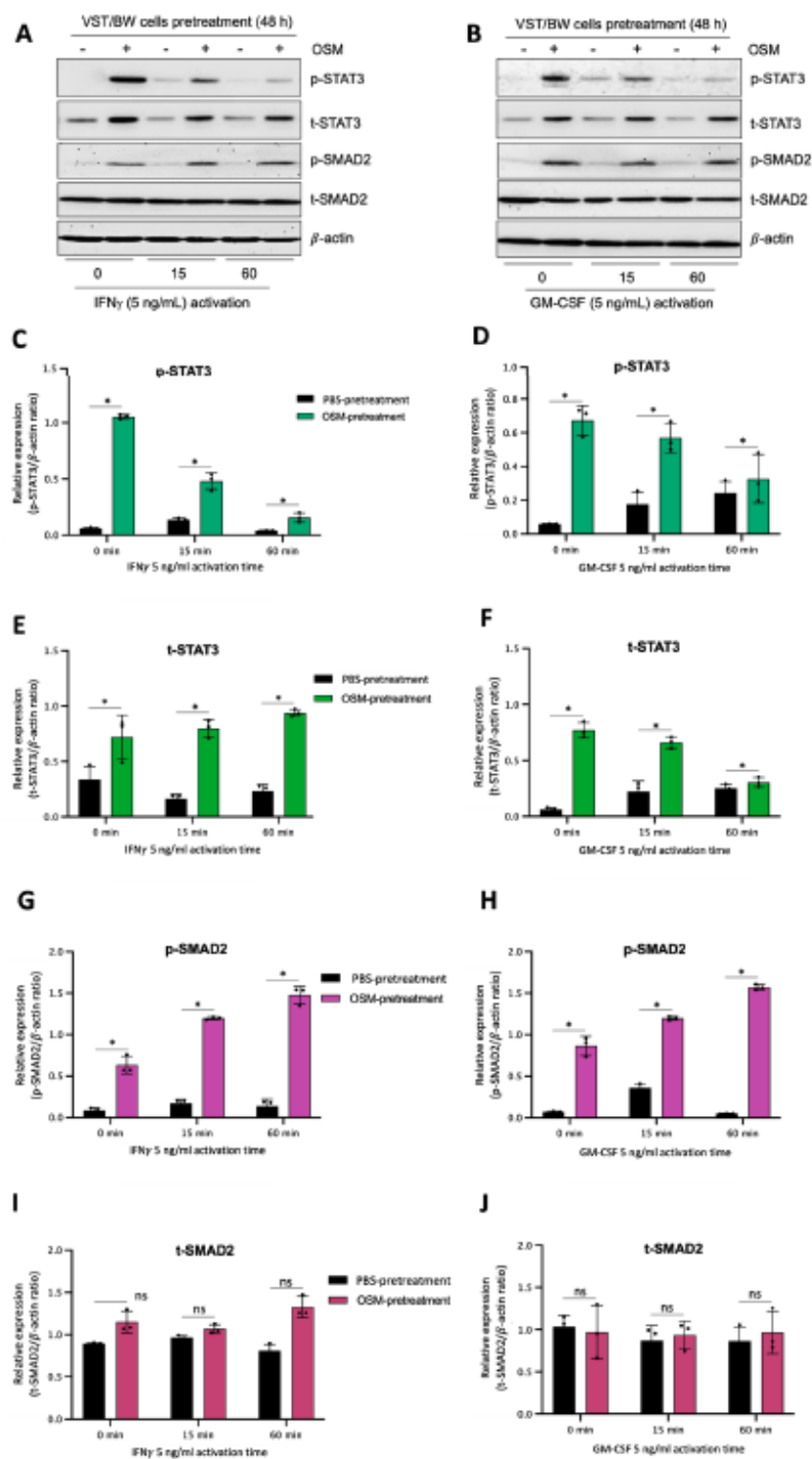


Figure 7.

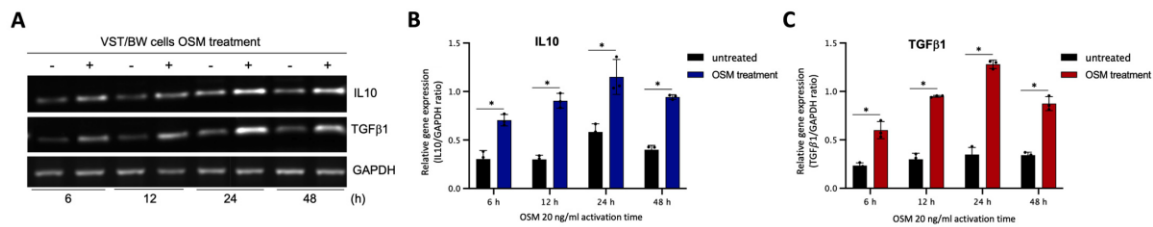


Figure 8.

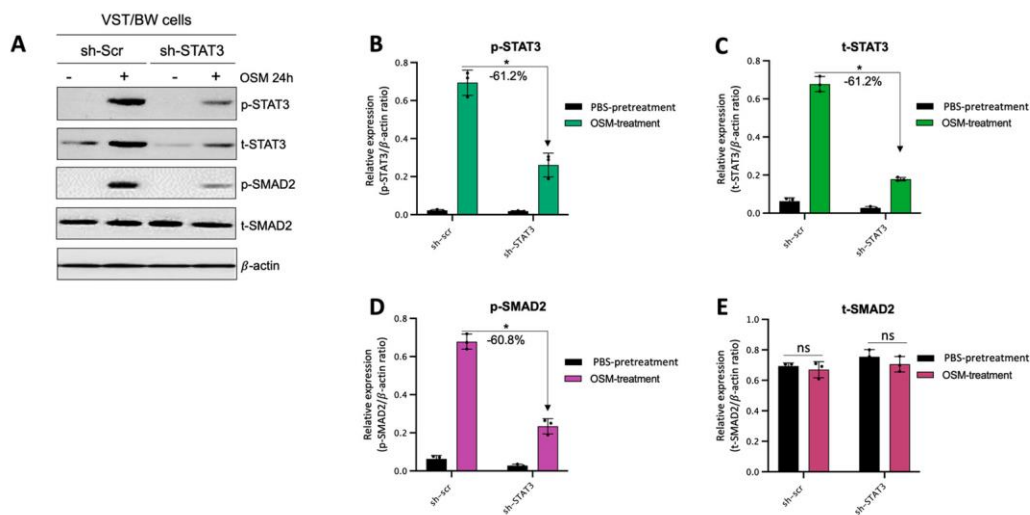


Figure 9.

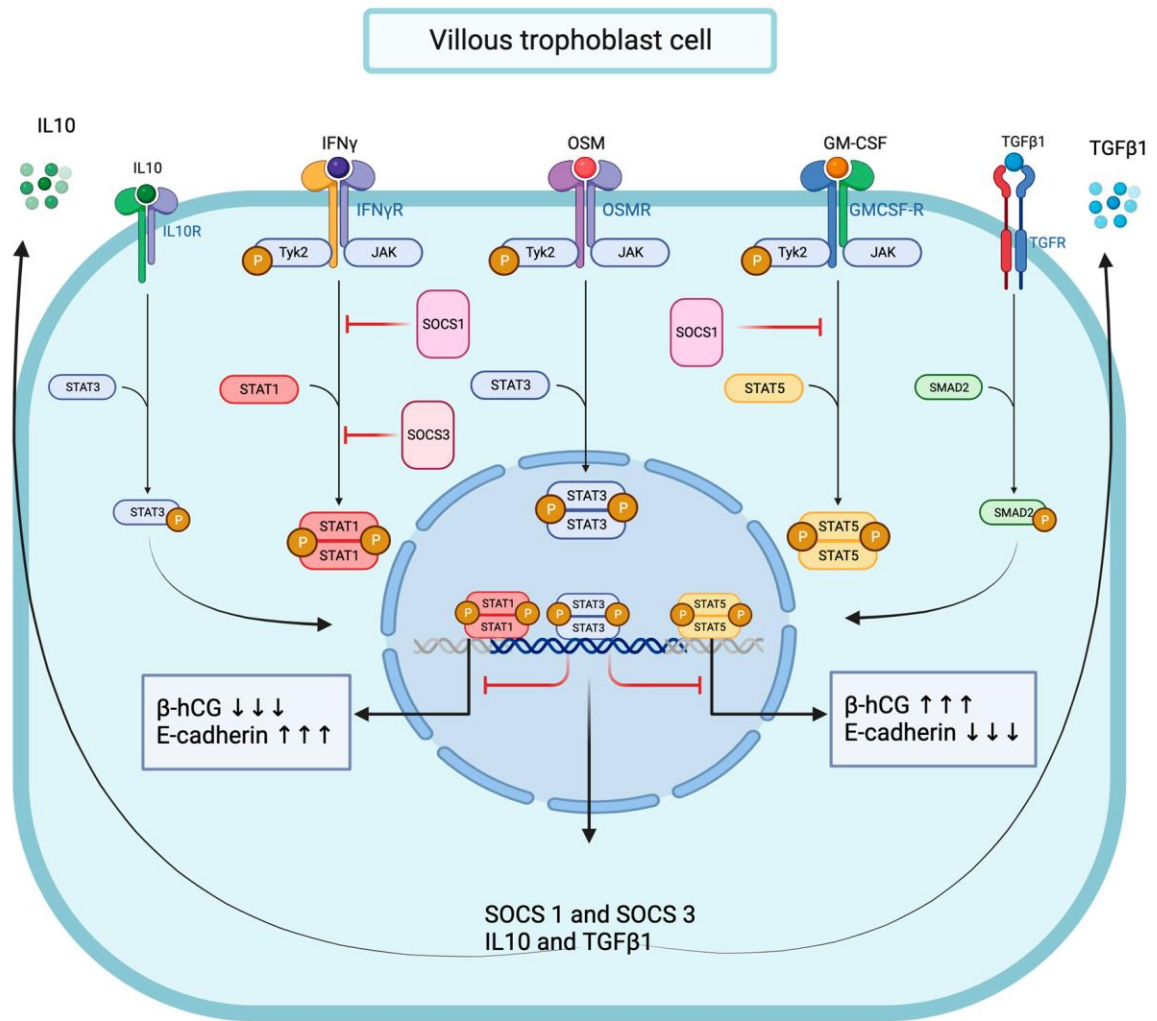


Figure 10. Graphic abstract.

8 Chapitre III

Article #2: Oncostatin M (OSM) and Leukemia Inhibitory Factor (LIF) mitigate LPS-induced endometritis by reducing tissue inflammation and modulating macrophages activation.

Marion Ravelojaona ^{1,2,3}, Julie Girouard ^{1,2,3}, Cathy Vaillancourt ^{2,3,4}, Céline Van Themsche ^{1,2,3}, and Carlos Reyes-Moreno ^{1,2,3}*

¹ Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire (GRSC), Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 Boul. des Forges, Trois-Rivières, QC G8Z 4M3, Canada ² Centre de Recherche Interuniversitaire en Reproduction et Développement-Réseau Québécois en Reproduction (CIRD-RQR), Université de Montréal, St-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; ³ Regroupement Intersectoriel de Recherche en Santé de l'Université du Québec (RISUQ), Université du Québec, Québec, QC G1K 9H7, Canada ⁴ Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), Laval, QC H7V 1B7, Canada

* Correspondence: carlos.reyes-moreno@uqtr.ca; Tel.: +1-(819)-376-5011 (ext. 3308)

8.1 Statut de l'article 2#.

Le contenu de ce chapitre est en préparation pour une prochaine publication. Le journal n'a pas encore été désigné.

8.2 Contribution des auteurs.

La conceptualisation du projet a été réalisée par Carlos.R.-M., la méthodologie a été élaborée par Carlos.R.-M. et Julie.G. La validation des résultats a été assurée par Marion.R. et Julie.G. L'analyse formelle a été effectuée par Carlos.R.-M. et Marion.R., et l'investigation par Marion.R. et Julie.G. La gestion du matériel nécessaires au projet a été assurée par Julie.G. La rédaction du manuscrit a été effectuée par Marion.R. et Carlos.R.-M. La révision et l'édition n'ont pas encore été réalisées mais seront assurées par Cathy.A.T., Cathy.V. et Céline.V.T. La supervision a été assurée par Carlos.R.-M. et Céline.V.T. La gestion administrative du projet a été prise en charge par Carlos.R.-M., et l'acquisition des financements a été réalisée par Carlos.R.-M.

8.3 Résumé de l'article 2#.

L'endométrite, une inflammation de la muqueuse endométriale causée par des infections bactériennes, est de plus en plus souvent associée à l'infertilité et aux complications périnatales. L'endométrite aiguë, caractérisée par une infiltration de neutrophiles et la formation de microabcès, perturbe le microenvironnement endométrial, tandis que l'endométrite chronique (EC) affecte la réceptivité endométriale, entraînant des fausses couches récurrentes et l'échec de la fécondation in vitro (FIV). Les macrophages, en tant que régulateurs immunitaires clés dans l'endomètre, jouent un double rôle dans l'homéostasie et l'inflammation des tissus. Les macrophages M2 favorisent la tolérance immunitaire et la réparation des tissus, tandis que les macrophages M1, activés en réponse à des infections bactériennes via la signalisation des récepteurs Toll-like (TLR), favorisent l'inflammation par la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'oxyde nitrique (NO), le TNF- α et l'IL-6. Des données récentes mettent en évidence le rôle de l'inflammation induite par le lipopolysaccharide (LPS) dans la pathogenèse de l'EC, impliquant l'axe LPS/TLR4 dans l'échec de la reproduction.

Les cytokines de la famille de l'interleukine-6 (IL-6), y compris le *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) et l'Oncostatine M (OSM), ont été identifiées comme des modulateurs clés de l'inflammation. Nos études précédentes ont démontré que le LIF et l'OSM régulent la signalisation inflammatoire dans les macrophages et les cellules du trophoblaste en modulant la phosphorylation de STAT1 et STAT5, préservant ainsi la différenciation et la fonction du trophoblaste. En outre, le LIF et l'OSM favorisent la polarisation des macrophages M2 et exercent des effets anti-inflammatoires au cours de l'inflammation induite par des agents pathogènes, protégeant ainsi contre l'endotoxémie induite par le LPS. Cependant, leurs rôles précis dans la régulation immunitaire de l'endomètre restent mal compris, notamment pour l'OSM.

Dans cette étude, nous avons étudié les effets immunorégulateurs du LIF et de l'OSM dans un modèle murin d'endométrite induite par les LPS. Nous avons évalué les marqueurs inflammatoires tels que l'iNOS dans les tissus endométriaux et analysé les macrophages péritonéaux pour déterminer l'impact du LIF et de l'OSM sur l'activité des cellules immunitaires. Nos résultats donnent un aperçu des propriétés anti-inflammatoires et de protection tissulaire du LIF et de l'OSM dans la modulation des réponses des macrophages et la préservation de l'intégrité de

l'endomètre, offrant ainsi des pistes thérapeutiques potentielles pour la gestion des troubles de la reproduction associés à l'endométrite.

8.4 Article (*version préparation pour publication*)

Oncostatin M (OSM) and Leukemia Inhibitory Factor (LIF) mitigate LPS-induced endometritis by reducing tissue inflammation and modulating macrophages activation.

Abstract: Endometritis, an inflammation of the endometrial mucosa caused by bacterial infections, has been increasingly associated with infertility and perinatal complications. Acute endometritis, characterized by neutrophil infiltration and microabscess formation, disrupts the endometrial microenvironment, while chronic endometritis (CE) affects endometrial receptivity, leading to recurrent miscarriages and in vitro fertilization (IVF) failure. Macrophages, as key immune regulators in the endometrium, play a dual role in tissue homeostasis and inflammation. M2 macrophages support immune tolerance and tissue repair, whereas M1 macrophages, activated in response to bacterial infections via Toll-like receptor (TLR) signaling, promote inflammation through the production of pro-inflammatory mediators such as nitric oxide (NO), TNF- α , and IL-6. Recent evidence highlights the role of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in CE pathogenesis, implicating the LPS/TLR4 axis in reproductive failure.

Cytokines of the interleukin-6 (IL-6) family, including Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Oncostatin M (OSM), have been identified as key modulators of endometrial inflammation. Our previous studies demonstrated that LIF and OSM regulate inflammatory signaling in macrophages and trophoblast cells by modulating STAT1 and STAT5 phosphorylation, thereby preserving trophoblast differentiation and function. Furthermore, LIF and OSM promote M2 macrophage polarization and exert anti-inflammatory effects during pathogen-induced inflammation, protecting against LPS-induced endotoxemia. However, their precise roles in endometrial immune regulation remain poorly understood.

In this study, we investigated the immunoregulatory effects of LIF and OSM in a mouse model of LPS-induced endometritis. We evaluated inflammatory markers such as iNOS in endometrial tissues and analyzed peritoneal macrophages to determine the impact of LIF and OSM on immune cell activity. Our findings provide insights into the anti-inflammatory and tissue-protective properties of LIF and OSM in modulating macrophage responses and preserving endometrial integrity, offering potential therapeutic avenues for managing endometritis-associated reproductive disorders.

Keywords: Oncostatin M (OSM), Leukemia Inhibitory Factor (LIF), Lipopolysaccharides (LPS), endometritis, uterine inflammation, macrophages.

1. Introduction.

The possible interplay between endometrial inflammation and endometritis with infertility and/or perinatal complications represented an emergent area of ongoing research [1]. Endometritis is generally caused by bacterial infections, including both acute and chronic infections [2]. Endometritis pathology is defined as an infection or inflammation of the endometrial mucosa caused by bacterial pathogens, such as *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus*, and *Streptococcus* [3]. These bacterial pathogens are known to cause persistent inflammation of the uterus, which could further result in infertility in severe cases [4] [5]. Moreover, bacterial pathogens trigger acute endometritis as a symptomatic disease characterized by microabscess formation and neutrophil invasion in the endometrial superficial epithelium, gland lumina, and uterine cavity, ultimately resulting in an abnormal endometrial microenvironment [5, 6]. Chronic endometritis (CE) is a persistent inflammation of the endometrium. In the context of CE, endometrial receptivity and immunomodulation are affected, resulting in recurrent miscarriages or repeated *in vitro* fertilization (IVF) failure [7]. Therefore, enhancing the immune microenvironment of the endometrium and promoting endometrial repair are crucial for effectively treating endometritis. Consequently, it is vital to explore and develop methods that address endometrial inflammation and modulate immune cells response to improve the endometrial environment and support fertility.

In the non-pregnant endometrium, macrophages represent the second most abundant leukocyte population, and they play key roles in the breakdown, repair, and regeneration of endometrium during the menstrual cycle [8]. In the endometrial environment, M2 macrophages (M ϕ s) dominate the immune landscape, playing a crucial role in fostering a supportive environment for fetal implantation and development. These predominant M2 M ϕ s, described as intrauterine or decidual macrophages are characterized by the production of immunosuppressive cytokines and chemokines such as IL-10, TGF- β , and VEGF, which facilitate tissue repair, angiogenesis, and the maintenance of immune tolerance, vital for placental formation and fetal nourishment [9] [10]. Also, uterine M ϕ s play a key role in regulating the innate immune response. In the event of a bacterial infection in the uterine cavity, particularly following an ascending infection from the vagina or cervix, bacteria can enter the uterus and initiate an inflammatory reaction. This leads to the recruitment of immune cells and the release of pro-inflammatory cytokines, which in turn activate M1 M ϕ s phenotype [11]. M1 polarization is generated in response to Toll-like receptor (TLR) ligand, such as the bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) resulting in the production of several pro-inflammatory factors including nitric oxide (NO), iNOS, IFN γ , TNF α , interleukin 6 (IL6), or IL8 [12, 13]. However, a recent clinicopathologic study has identified elevated LPS levels in patients with chronic endometritis (CE), suggesting that LPS-induced inflammatory signaling may play a role in the onset of CE by promoting both inflammatory responses and cell cycle activation in the endometrium. Substantial data from animal models and clinical studies also indicates an important role for the LPS/TLR4 system in pregnancy disorders [14]. In preclinical models of acute endometritis, LPS administration generates extensive inflammatory macrophage infiltration of uterine tissue, and enhanced expression of several pro-inflammatory factors [14, 15]. A retrospective study in patients with recurrent reproductive failure revealed that CE is associated with increased infiltration of immune cells in the endometrium. It is suggested that the excessive presence of immune cells, such as macrophages, dendritic cells, and T cells, in CE patients may contribute to reduced endometrial receptivity and recurrent reproductive failure [16].

Also in the endometrial environment, the IL6 cytokine-family members, such as Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Oncostatin M (OSM), have been reported to modulate inflammation and support embryo implantation [17-20]. In this context, our previous studies highlighted that both LIF and OSM play crucial roles in moderating the pro-inflammatory effects of IFN γ and GM-

CSF in macrophages and trophoblast cells. LIF was shown to reduce the phosphorylation levels of STAT1 and STAT5, while OSM modulated the activation of these same pathways, to regulate inflammatory signaling in trophoblast cells thereby preserving trophoblast differentiation and functions [21, 22]. Furthermore, during Mφs activation, OSM and LIF have been reported to promote M2 macrophage polarization by regulating Arg1 activity and increasing the expression of Th2 cytokines and angiogenic factors in mouse macrophages, both *in vitro* and *in vivo* [23, 24]. Additionally, the anti-inflammatory effects mediated by LIF and OSM have also been observed during pathogen infections. In fact, LIF has been identified as a potential anti-inflammatory mediator in the uterine inflammatory response triggered by LPS, complementing the anti-inflammatory effects of progesterone in mouse models [25]. Then, OSM also exhibits anti-inflammatory effects, protecting against LPS-induced endotoxemia by attenuating the inflammatory response and restoring normal homeostasis after tissue injury or infection [20].

The regulation and function of pregnancy-related cytokines such as LIF and OSM in the uterine immune environment and Mφs activity during endometritis remain poorly understood, despite their crucial role in regulating tissue inflammation. Thereby, based on these observations, our study demonstrates the anti-inflammatory and tissue-protective effects of LIF and OSM in a mouse model of LPS-induced endometritis. Moreover, inflammatory factors detrimental to endometrial integrity, such as LPS-induced iNOS expression, were assessed in endometrial tissue from sensitized mice. In parallel, peritoneal macrophages were analyzed to further investigate the anti-inflammatory effects of LIF and OSM by examining key signaling pathways and immune factors involved in immune regulation. These analyses aimed to determine the immunoregulatory roles of LIF and OSM and their impact on macrophage activity during LPS-induced intra-uterine inflammation.

2. Materials and methods.

2.1. Reagents

Cell culture media, serum, and cell culture reagents were purchased from Wisent (St-Bruno, QC, Canada). Cell culture plates and flasks were obtained from Corning Incorporated (Corning, NY, USA). LIF mouse cytokine was purchased from Peprotech (Montreal, QC, Canada), and OSM mouse cytokine was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Phosphate-buffered

saline (PBS), bovine serum albumin (BSA), monoclonal peroxidase-conjugated mouse anti- β -actin antibody, and all electrophoresis grade chemicals were obtained from Sigma Chemical Company (Oakville, ON, Canada). Protease and phosphatase inhibitors cocktail EDTA-Free were obtained from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). Trizol reagent and PCR primers were obtained from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). Taq DNA polymerase and M-MuLV reverse transcriptase were obtained from New England Biolabs (Pickering, ON, Canada). Rabbit polyclonal antibodies targeting iNOS (#2977), Arginase-1 (#93668), phospho-STAT3 (pY705; #9145), STAT3 (#4904), phospho-SMAD2 (pS465/467; #3108), and SMAD2 (#5359) were purchased from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA), and used at 1:1000 dilution in a phosphate-buffered saline (PBS) solution containing 5% BSA (PBS/5% BSA). Mouse monoclonal antibodies targeting CD163 (ED2: sc-58965) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA). Molecular probes anti-mouse IgG ALEXA Fluor (R)-594 (8890S) and anti-rabbit IgG ALEXA Fluor (R)-488 (4412S) were purchased from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA), and used at 1:1000 dilution in antibody dilution buffer for immunofluorescence analysis. The horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG was obtained from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada) and used at 1:5000 dilution in PBS/5% BSA. The chemiluminescence detection kit (Ultra Science Femto Western Substrate; #CCH365) was purchased from FroggaBio (Concord, ON, Canada).

2.2. *Animals and experimental design*

All animal experiments were conducted according to rules of the animal care and use committee of the Université du Québec à Trois-Rivières (Trois-Rivières, Canada). Female CD-1 mice (Charles River Laboratories, Saint-Constant, Canada), weighing 27-29 g at 8- 9 weeks of age, were used for the establishment of LPS-induced endometritis. The mice were housed with free access to food and water on a 12:12 h light:dark cycle with the room temperature maintained at 21 °C. To induce acute inflammation, intraperitoneal (i.p.) administration of LPS at approximately 180 μ g /kg body weight (5 μ g of LPS per mouse) was based on an average mouse weight of 28 g. To assess the potential of LIF or OSM in protecting against LPS-induced injury, mice were distributed into four groups (n = 6): 1) PBS/PBS (control) group; 2) PBS/LPS group, 3) LIF/LPS group; and 4) OSM/LPS group (Fig. 1A).

2.3. Peritoneal Mφs isolation and cell culture

At D3, the mice were sacrificed using pentobarbital anesthesia. Whole peritoneal macrophages were carefully isolated in cold Hank's Balance Salt Solution (HBSS) and kept on ice before being pooled and counted. Briefly, peritoneal cells were retrieved by peritoneal lavage with 5 ml of HBSS. Fluid from the peritoneum was aspirated and dispensed into a 15-ml conical polypropylene centrifuge tube on ice. From this preparation, red blood cells (RBCs) were lysed with Ammonium Chloride Solution by using standard protocol. Then, the peritoneal exudate cells were centrifuged in a refrigerated centrifuge 5 min at 400xg, at 4 °C. The supernatant was discarded, and the cell pellet was resuspended in 2 ml of RPMI-1640 cell culture media supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, and 50 µg/mL gentamicin. Cells were then pooled per group and counted with Coomassie blue to discriminate death cells. For morphological analysis, some peritoneal macrophages were seeded in a 24-wells cell culture plate at a cell density of 5×10^5 cells/0.5 ml in 10% FBS-supplemented RPMI- 1640 cell culture media and incubated overnight in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂. After incubation of 24 hours at 37 °C, non-adherent cells were removed by gently washing twice with warm cell culture media and adherent macrophages were observed by an optical microscope to determine cells' health and morphology. All observations were performed at 20× magnification on cell monolayers. To assess the number of adherent cells, five fields were taken randomly for each different treatment; representative fields are shown.

2.4. Protein immunodetection

After macrophages isolation from peritoneal mice treated as described above, protein expression analysis was performed by using western blot. A part of pooled peritoneal macrophages was lysed by adding 200 µl of preboiled (95 °C) SDS solubilization buffer containing 1.25 mM Tris-Base pH 6.8, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 18% glycerol, 0.03% bromophenol blue, and 2% protease and phosphatase inhibitors. Protein samples were resolved using SDS-PAGE, under reducing conditions and then transferred to the PVDF membrane. Blots were probed with rabbit polyclonal primary antibodies against total (t) or phosphorylated (p) forms of STAT3 and SMAD2 proteins and against the enzymatic proteins iNOS, COX-2 and SOCS3 at 1:1000 dilution at 4 °C overnight. Membranes were then incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG Ab at 1:3000 dilution

for 1 h at room temperature. Also, β -actin at 1:40 000 dilution was used as a loading control. The detected proteins were visualized using an image analyzer system (Alpha Innotech FluorChem FC2 Imaging System).

2.5. RNA detection and mRNA quantification by PCR

After total cellular RNA isolation from peritoneal macrophages, mRNA quantification was assessed as previously described [26] [21]. Briefly, 3×10^6 of pooled peritoneal macrophages were lysed using TRIzol (In Vitrogen, Montreal, QC, Canada), and cellular RNA was isolated using a Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Burlington, ON, Canada). The mRNA expression profile was evaluated using standard reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), with the following primers:

Table 1: Sequences of PCR primers

Primers	Sequence
iNOS	AS: -TCCATGGTCACCTCCAACACAAGA- S: -TTCACCCAGTTGTGCATCGACCTA-
Arg-1	AS: -AGGAGCTGTCATTAGGGACATC- S: -CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG-
COX-2	AS: -GATACACCTCTCCACCAATGACC- S: -CAGACAACATAAACTGCGCCTT-
b-actin	AS: -TTTGGGGGATGTTTGCTCCA-

The mRNA expression of b-actin was used as internal standard. The PCR reaction conditions were chosen when amplification of mRNA was in the middle of the exponential amplification phase to avoid mRNA amplification close to plateau and saturation.

2.6. Immunofluorescence staining and detection.

The levels of protein expression of iNOS, Arg-1, and CD163 was assessed in isolated peritoneal macrophages by immunofluorescence, as we previously described [27]. Briefly, cells were plated at a cell density of 2.0×10^5 cell/2 ml/well on coverslips in 6-wells dishes and incubated overnight at 37 °C in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS. Then, fixed with 1 ml of formalin/well for 15 min at room temperature. Fixed cells were washed twice with PBS, and permeabilized with 1 ml/well of ice-cold methanol for 15 min at -20°C. Permeabilized cells were washed twice with PBS and incubated for 60 min at room temperature with 50 µl/coverslip of blocking buffer, covered by a parafilm piece to avoid evaporation. Thereafter, cells were washed with 1 ml of PBS and incubated with 50 µl/coverslip of IgG anti-goat antibodies (1:1000) for 60 min at room temperature to mask Fc binding sites on macrophage cells. Then, cells were washed with PBS before being incubated overnight at 4°C with primary antibodies: Arg-1 (1:50), iNOS (1:50), and CD163 (1:50). After, cells were rinsed twice with PBS, and incubated for 30 min at room temperature with a fluorescent second antibody: goat anti-rabbit ALEXA-488 (1:1000) or goat anti-mouse ALEXA-594. Finally, nuclei cells were stained by using Prolong Gold + DAPI. Cells were viewed using an Axio Observer inverted microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Germany). All observations were performed at 20× magnification on cell monolayers. Cells stained for Arg-1, iNOS, and CD163 were quantified as the intensity of positive stain in 5 random microscopic (100×) fields in each different treatment, as described (n=5).

2.7. IHC with uterine and liver tissues

In uterine and liver tissues, quantitative protein expression of iNOS, Arg-1, F4/80 was assessed by immunohistochemistry (IHC). Briefly, 5µm thick paraffin sections of mouse liver tissues and transverse sections of the uterus were cut. Tissue sections were dewaxed using a protocol

designed to prevent the drying of blades throughout the process. Paraffin wax was removed by using xylene baths. Subsequently, rehydration was performed by immersing the sections in two baths of 100% ethanol, followed by two baths of 95% ethanol, and washing with water. For antigen unmasking, slides were placed in a citrate solution and subjected to microwave heating, until the citrate solution began to boil, the heating was maintained to keep the solution at a temperature range of 95-98 °C for 10 min. Subsequently, the slides were allowed to cool for 30 °C, then they were washed in water, and incubated in 3% hydrogen peroxide for 10 min to block endogenous peroxidase activity then washed twice with water. Slides were rinsed once in Tris-buffer saline with Tween x 20.0 (TBST) before antibodies incubation and they were incubated with 100-400 µl of blocking buffer/section for 60 min at room temperature. Therefore, the blocking buffer was removed and 100-400 µl of primary antibody dilution was added: Arg-1 (1:100), iNOS (1:100), and F4/80 (1:300), and slides were covered by a parafilm piece and incubated overnight at 4°C. After an incubation period of 24h, primary antibodies were removed, and slides were washed in TBST. Then, 40-120 µl of SignalStain Boost (HRP Rabbit) was added to the slides, which were subsequently incubated in a humidified chamber at room temperature for 30 min and washed again with TBST. Then, 40 µl of SignalStain DAB Substrate was prepared and applied for 10 min to the slides for signal development. Finally, they were washed with TBST, counterstained with hematoxylin, dehydrated and mounted for analysis. IHC evaluation was performed at 10x and 40x magnification on stained tissue. Cells stained (brown) for Arg-1, iNOS, and F4/80 were quantified as the total area of positive stain in 5 random microscopic (100x) fields in each different treatment, as described (n=5) [31].

2.6. Statistical Analysis

Each assay was performed in triplicate and exhibited consistent reproducibility. Data were expressed as mean $\pm$ SD, and the statistical correlation of data between groups was analyzed via one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test using Prism software, version 9.5.0 (Prism 9). The null hypothesis of no difference of means between the two groups was analyzed via Tukey tests, and p values of ≤ 0.05 were considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. *LIF and OSM have protective effect on mice body weight loss induced by LPS-related inflammatory response.*

Intraperitoneal (i.p.) administration of LPS at 140 µg /kg body weight (BW) in mice lead to acute inflammation and decreases BW [28]. The LPS dose administered corresponding to approximately 5 µg of LPS per mouse, based on an average mouse weight of 28 g. To assess the potential of LIF or OSM in preserving BW during LPS-induced inflammatory response, we conducted a randomized study involving mice distributed into four groups. The mice were weighed daily before and after intraperitoneal injections with LIF or OSM as well as LPS administration (Fig. 1A). At the initiation of the study Day 0 (D0), the control group exhibited a mean BW of 27.2 ± 2.8 g, the LPS group 29.0 ± 1.7 g, the LIF/LPS group 28.6 ± 1.9 g, and the OSM/LPS group 29.3 ± 1.4 g (Fig. 1B). On Day 1 (D1), mice were weighed before being injected intraperitoneally with LIF or OSM at 20 µg/mouse for the LIF/LPS and OSM/LPS groups, respectively while control and LPS groups were both injected with 0.1 ml of PBS, as vehicle. No significant variation of BW was observed compared to D0 within each group on D1 (Fig. 1A, B). On Day 2 (D2), mice were weighed again (Fig. 1A). While there was a change in the overall BW in each group, it was not statistically significant. Control group exhibited a mean BW of 27.7 ± 3.1 g on D1 to 28.4 ± 2.8 g on D2 (+ 4.1%), LPS group presented a mean BW of 28.4 ± 1.6 g compared to 28.8 ± 1.1 g (+ 1.5%). Then, after LIF injection, the LIF/LPS group exhibited a mean BW of 28.0 ± 1.9 g on D2 compared to 28.8 ± 2.0 g on D1 reflecting a decrease of - 3% in BW but that was not statistically significant (Fig. 1B). And for the OSM/LPS group, our result also presents no significant variation in the mean BW, with 29.4 ± 1.6 g on D1 to 29.9 ± 1.0 g (+ 1.6%) on D2 (Fig. 1B). Subsequently, after weighing on the same day (D2), mice were intraperitoneally injected. Control group received 0.1 ml of PBS, LPS group was injected with 0.1 ml of PBS containing LPS at 5 µg/mouse and LIF/LPS and OSM/LPS were co-injected with LIF or OSM at 20 µg/mouse coupled with LPS administration (Fig. 1A).

Finally, on Day 3 (D3) before euthanasia, the mice underwent a final weighing session. Weight differences were not significant except in the LPS group, where our results indicate a mean BW of 28.8 ± 1.1 g on D2 to 26.2 ± 1.1 g on D3, reflecting a significant decrease of -9% (Fig. 1B). Interestingly, although weight loss was observed between D2 and D3 in the LIF/LPS group ($28.0 \pm$

1.89 g to 25.8 ± 1.7 g, -8%) and the OSM/LPS group (29.9 ± 0.96 g to 28.1 ± 1.21 g, -6%), these variations were not statistically significant (Fig. 1B). These findings indicate that LIF and OSM may contribute to protect against weight loss induced by LPS-related inflammation, as demonstrated by the observed weight changes during the study.

3.2. *LIF and OSM exert distinct modulatory effects on LPS-induced acute inflammation in uterine and liver tissues.*

Uterus and liver in each group were isolated and the morphological alterations were observed microscopically after H&E staining with pictures at 10× and 40× magnifications (Fig. 2A, C). For the uterine tissue, as illustrated in Figure 2A, the microscopic analysis of uterine sections at low magnification (10× magnification) provides a view of the overall tissue architecture, including the thickness of the endometrial layers and the presence of endometrial glands. In contrast, signs of tissue inflammation, damage, and inflammatory cell infiltration become more apparent at higher magnification (40× magnification). In the control group, the endometrium of mice was found to be intact and the structure of epithelial and stromal layers of the uterine wall was clear and complete with tightly arranged cells (Fig. 2A; 10× magnification). Moreover, the presence of well-developed endometrial glands with the glandular epithelial cells exhibiting regular columnar or square shape (black asterisk and black arrow; Fig. 2A, 40× magnification). Conversely, uterine sections from the LPS group exhibited several signs of inflammation and endometritis features, such as necrosis tissue or edema (yellow arrow), disruption of tissue structure and irregular gland structure (red asterisk) and infiltration of inflammatory cells and red blood cells (red arrow) throughout the endometrial and myometrial tissues indicating inflammation or tissue injury (Fig. 2A; 10× magnification). Furthermore, the uterine tissue from the LPS-induced group showed evident signs of endometrial layer alterations (blue arrow), extensive vascular congestion (red arrow) or necrosis spots (yellow arrow), pus-filled glands (red asterisk), and infiltration of inflammatory cells (black head arrow) (Fig. 2A; 40× magnification). However, the histopathological changes induced by LPS within the endometrium were significantly alleviated by both LIF and OSM. Indeed, the tissular and cellular structure and microenvironment were relatively preserved in the presence of cytokines (Fig. 2A; 10× magnification). In fact, particularly in the OSM/LPS group, the epithelial layer and the glandular epithelium exhibited cubic and regular cell structures (black arrow), which were more discernible under 40× magnification. Additionally, the

endometrial stroma displayed fewer necrotic zones and hemorrhagic spots, with limited amount of inflammatory cells infiltration (black head arrow; Fig. 2A; 40× magnification).

Infiltration of inflammatory cells (ICs) in the endometrium of mice was observed (Fig. 2A) and quantified (Fig. 2B) under high magnification field, as described in the M&M section. The IC populations were consistently sparse, averaging 80 ± 11 cells per field in endometrial sections from the uteri of the control group. However, with LPS treatment, numbers of ICs increased dramatically within the uterine endometrial and myometrial tissues (Fig. 2A; 40× magnification), averaging 328 ± 33 cells per field reflecting an increase of ~ 4-fold, relative to control group (Fig. 2B). It is notable that the LIF/LPS and OSM/LPS groups exhibit a significantly reduced pattern of IC infiltration in response to LPS-induced inflammation, in comparison to the LPS group. The average number of cells per field is 209 ± 50 for the LIF/LPS group and 155 ± 43 for the OSM/LPS group. This reflects a decrease in both groups of approximately 2-fold, relative to the IC count in the LPS group (Fig. 2B). Given that the liver plays a central role in systemic inflammatory regulation [29], we proceeded to analyze and characterize the immunological activity in the liver following our treatments by observing histological sections from mouse livers. Moreover, i.p. LPS injection was shown to simulate exogenous infection and induce hepatic inflammation [30]. Our microscopic analysis of liver sections reveals that the control group show healthy liver tissues with a well-organized architecture as determined by the presence of normal lobules division, normal sinusoidal space, and abundant mononuclear hepatocytes with normal size (green asterisk; Fig. 2C), but rare presence of ICs (black head arrow; Fig. 2C). Liver from the LPS group exhibits pathologic changes with necrotic zones (black circle), hepatocytes changes with ballooning degeneration and presence of binuclear hepatocytes. Also, quantification of IC infiltration under 40× magnification field indicates that IC abundance was increased significantly in the LPS group (Fig. 2D) inducing inflammatory exudates resulting in sinusoidal space expansion (red line) and hemorrhagic areas (Fig. 2C). The liver tissue from the LIF/LPS group also displays pathological alterations akin to liver from the LPS group, characterized by a significant infiltration of ICs (Fig. 2D). The control group exhibited a relatively low IC count, with an average of 60 ± 18 cells per field. The LPS group exhibited a notable elevation in IC infiltration within hepatic tissue, with an average of 104 ± 25 cells per field. This represents an increase of approximately 2-fold compared to the control group. It is noteworthy that the LIF/LPS group also exhibited a considerable increase in IC hepatic infiltration, reaching a level almost equal to that observed in the LPS IC count. This

was evidenced by an average of 115 ± 23 cells per field representing a 2-fold increase compared to the control group (Fig. 2D). The OSM/LPS group exhibited an IC-infiltrated count that was very similar to that of the control group, with an average of 65 ± 18 cells per field. This represents a decrease of approximately 2-fold compared to both the LPS and the LIF/LPS groups (Fig. 2D). Notably, the liver histopathological changes induced by LPS were substantially relieved by OSM injection reflecting by a clearer hepatic tissue structure and a reduced presence of binuclear hepatocytes and necrotic zones (Fig. 2C). The results of these histopathological analyses demonstrate that LIF and OSM can protect against LPS-induced inflammation in the endometrium.

3.3. LIF and OSM regulate iNOS and Arg-1 expression and M ϕ s infiltration during LPS-induced uterine inflammation.

LPS administration triggers the production of various inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1, and IL-6, as well as nitric oxide (NO) by activated macrophages [31]. NO is crucial in the immune response, contributing to the destruction of bacteria, tumor cells, and viruses. Additionally, NO can react with reactive oxygen species (ROS) to produce peroxynitrite, which plays a role in inflammation. However, excessive NO production can lead to tissue damage, widespread vasodilation, hypotension, and ultimately organ failure associated with septic shock. The enzyme induced nitric oxide synthase (iNOS) is responsible for the synthesis of NO from L-arginine, while arginase-1, another enzyme in L-arginine metabolism, converts L-arginine into L-ornithine and urea, thereby reducing NO production. The balance between iNOS and Arginase-1 (Arg-1) in macrophages is critical for modulating inflammatory responses through L-arginine metabolism and also plays a key role in the functional classification of macrophages [32]. We also evaluated iNOS and Arg-1 protein expression in uterine tissue to assess the inflammatory response to LPS, comparing these results with those obtained from LIF and OSM sensitization treatments. This allowed us to examine the density of macrophage populations in the uterine tissue under LPS exposure in contrast to the effects observed with LIF and OSM sensitization.

The levels of iNOS and Arg-1 expression in uterine tissues were evaluated by IHC (Fig. 3A) and quantified by densitometric analyses (Fig. 3B, C), as described in the M&M section. We found that iNOS protein was nearly undetectable in the uterine tissues from the control group (Fig. 3A, B), while at the opposite, high levels of Arg-1 protein expression were prominent, mainly within the

uterine glands and luminal epithelium (Fig. 3A, C). However, the protein expression pattern was completely reversed following LPS administration. The control group exhibited an iNOS mean density of 2.4 ± 1.4 , whereas the LPS-treated group showed a significantly higher mean density of 29.8 ± 2.0 , indicating a roughly 12-fold increase (Fig. 3B). Moreover, in the LPS-treated group, Arg-1 protein expression was virtually undetectable within the uterine glands and very low in the luminal epithelium (Fig. 3A). This was demonstrated by an Arg-1 mean density of 10.3 ± 2.1 in the control group, compared to a significantly lower mean density of 1.4 ± 1.1 in the LPS group, indicating a substantial 7-fold decrease in Arg-1 expression with LPS treatment (Fig. 3C). Notably, the protein pattern changes induced by LPS were completely reversed by LIF and OSM injections, resulting in the total suppression of iNOS expression and a near-complete restoration of Arg-1 expression (Fig. 3A, C).

Increased number of uterine M ϕ s is another key immune response induced by LPS injection in mice model, which reflects levels of inflammation and endometritis features [15]. The uterine immune response triggered by LPS significantly increased M ϕ population, as evidenced by the elevated detection of the F4/80 M ϕ marker (Fig. 3A, D). The control group had an F4/80 mean density of 1.6 ± 0.3 , while the LPS-treated group displayed a substantially higher mean density of 10.3 ± 2.7 , indicating an approximate 6- fold increase (Fig. 3D). Additionally, in the LPS-treated group, M ϕ s were predominantly localized around the uterine gland structures within the endometrial tissue (Fig. 3A), a pattern distinct from the control group. In the LIF/LPS and OSM/LPS groups, M ϕ presence was significantly reduced compared to LPS group, with F4/80 mean densities of 3.6 ± 1.0 and 3.1 ± 0.6 , respectively, reflecting a non-significant 2-fold increase compared to the control group (Fig. 3D). Take all together, these findings underscore the potential of LIF and OSM as therapeutic targets for managing inflammatory conditions in reproductive health contexts.

3.4. *LIF and OSM sustain the population of peritoneal M ϕ during LPS-induced inflammation in vivo and enhances their adherence in ex vivo cultures.*

M ϕ s in the peritoneal cavity provide immune surveillance of the cavity and neighboring tissues [33] but they are also implicated in many pathologies, such as endometriosis and

pancreatitis [34]. Therefore, we have collected, counted, and incubated peritoneal Mφs from mice of the different groups after euthanasia to determine peritoneal Mφs activity depending on the different treatments (Fig. 4A). The number of peritoneal Mφs we obtained by lavage from peritoneal cavity was considerably higher in the control group ($46 \pm 15 \times 10^6$; n=6) than in the LPS group ($25 \pm 13 \times 10^6$; n=6) and the LIF/LPS group ($30 \pm 13 \times 10^6$; n=6). Compared to the control group, the LPS group exhibited a considerable reduction in the count of peritoneal Mφs within the peritoneal cavity, amounting to approximately 55% of the control group's count (Fig. 4B). Similarly, the LIF/LPS group also showed a significant decrease, amounting to approximately 65% of peritoneal Mφ count compared to the control group (Fig. 4B). Notably, stimulation with OSM resulted in a high recovery level of peritoneal Mφs ($38 \pm 14 \times 10^6$; n=6), with a number corresponding approximately 83% of the control group's count (Fig. 4B).

Following the count, Mφs were plated and incubated overnight to assess their ability to adhere within a 24-wells cell culture plate depending on the different *in vivo* treatments (Fig. 4C). From our microscopic analysis, we evaluated the number of adherent cells count per field at 191 ± 25 cells (n = 4 fields) in the control group (Fig. 4C, D). Regarding morphology, peritoneal Mφs exhibited a round or oval shape under microscopy with small extensions and no visible protrusions, suggesting a non-activated state, not engaged in phagocytosis or inflammatory activity [35]. In contrast, the Mφs in the LPS group displayed an activated state, typically characterized by a rounded and irregular shape with protrusions and clusters indicative of apoptosis, reflecting heightened engagement in phagocytosis and inflammatory functions [35]. Additionally, a significant reduction was noted in the number of adherent cells, with a cell count per field at 79 ± 8 cells (n = 4 fields) in the LPS group (Fig. 4C, D). Interestingly, Mφs from the LIF/LPS and OSM/LPS groups exhibited distinct morphologies compared to the LPS and control group, showing a more spread appearance with elongated and fusiform shapes suggesting that LIF or OSM treatments influence the macrophage's morphology differently than LPS or vehicle treatments.

Furthermore, we observed an increase in the number of adherent cells with LIF and OSM injections, with 222 ± 51 cells per field (n = 4 fields) for the LIF/LPS group and 240 ± 44 cells per field (n = 4 fields) for the OSM/LPS group. This result indicates that injections of LIF and OSM help

maintain the survival of Mφs and enhancing the adhesion capacity of peritoneal Mφs compared to LPS treatment.

3.5. *LIF and OSM impact the expression of iNOS and Arg-1 in peritoneal Mφs during LPS-induced inflammation in vivo.*

LPS-activated macrophages express iNOS, an enzyme that metabolizes arginine into nitric oxide (NO) and citrulline to support inflammatory response [32]. In another hand, to promote the resolution of inflammation, macrophages express Arg-1, which hydrolyzes arginine into ornithine and urea, thereby reducing the availability of arginine for NO synthesis. Ornithine is subsequently used as a substrate for the production of polyamines and proline, both essential for cell proliferation and tissue repair [32]. Also, immunofluorescence analysis was conducted to assess the effects of LIF and OSM on iNOS and Arg-1 expression in LPS-activated peritoneal Mφs (Fig. 5A, B). Our results indicate that LPS significantly elevates iNOS expression (MFI = 3.8 ± 0.6) compared to the control group (MFI = 0.7 ± 0.2). However, this increase was mitigated by LIF (MFI = 2.4 ± 0.3) and further reduced by OSM injection (MFI = 1.8 ± 0.6), representing a 47% decrease relative to the LPS group (Fig. 5C). Unlike iNOS, Arg-1 expression remained low in the LPS group (MFI = 0.5 ± 0.1), showing levels comparable to the control group (MFI = 0.4 ± 0.1). However, Arg-1 expression significantly increased in both the LIF/LPS (MFI = 1.3 ± 0.3) and the OSM/LPS groups (MFI = 1.6 ± 0.3), indicating a shift in the arginine metabolism of peritoneal Mφs (Fig. 5D). These results strongly suggest that LIF and OSM modulate arginine metabolism in peritoneal macrophages during LPS-induced inflammation, potentially shaping macrophage plasticity and phenotype, to promote inflammation resolution or enhancing anti-inflammatory activity to support tissue repair in the uterine environment.

3.6. *LIF and OSM modulate the LPS-induced inflammatory response in peritoneal Mφs through iNOS, Arg-1 and COX-2 expression.*

In murin macrophages, cyclooxygenase-2 (COX-2), an inducible form of the COX enzymes, is known to be involved in various inflammatory responses triggered by LPS and inflammatory diseases. Moreover, the enzymatic activity of COX-2 is influenced by pro- inflammatory factors,

including iNOS expression, particularly during LPS-induced inflammation in mouse macrophages [36, 37]. Therefore, to further confirm the roles of LIF and OSM in peritoneal macrophages during LPS-induced inflammation *in vivo* and their effect on macrophages response, we conducted PCR and western blot analysis. In this context, PCR analysis validated a substantial reduction of 4- and 8-fold of iNOS mRNA expression in macrophages from the LIF/LPS and OSM/LPS groups, respectively, compared to the LPS group (Fig. 6A, B). The Arg-1 mRNA expression increased approximately 8-fold in the LPS, LIF/LPS, and OSM/LPS groups compared to the control group (+7.24x for the LPS group, +7.25x for the LIF/LPS group, and +8.03x for the OSM/LPS group). However, compared to LPS and LIF/LPS injections, OSM injection induced a significantly greater increase in Arg-1 expression (Fig. 6A, C). Surprisingly, the fold induction of Cox-2 mRNA varied among LIF and OSM stimulations. In fact, Cox-2 mRNA fold induction in LIF/LPS group, showing no significant difference with LPS group. Conversely, the OSM/LPS group exhibited a significant 3-fold increase in Cox-2 mRNA induction compared to both the LPS and LIF/LPS groups, reaching levels comparable to the control group (Fig. 6A, D). Moreover, western blot analysis confirm the PCR results, as shown in the figure 6E, the relative iNOS expression in peritoneal Mφs was significantly increased in the LPS group (iNOS/b-actin ratio = 1.09 ± 0.09) compared to the control group (0.02 ± 0.02), representing a 49-fold induction. However, the presence of LIF or OSM significantly reduced this enhancement on iNOS expression, the iNOS/b-actin ratio being 0.47 ± 0.15 (21-fold induction) in the LIF/LPS group, and 0.13 ± 0.11 (6-fold induction) in the OSM/LPS group. Compared to the control group, the relative Arg-1 expression was slightly but significantly increased in the LPS group, although even more with LIF and OSM injections (Fig. 6E, G). In contrast to iNOS and Arg-1, the relative highly COX-2 expression detected in the control group (1.08 ± 0.02) was strongly reduced in the presence of LPS (Fig. 6E, H) but substantially restored in the LIF/LPS group (0.58 ± 0.08) and the OSM/LPS group (0.85 ± 0.04). These data confirm that LIF and OSM influence arginine and NO metabolism by decreasing iNOS expression and promoting Arg-1 and COX-2 expression in peritoneal Mφs during the LPS inflammatory response.

3.7. *LIF and OSM induce anti-inflammatory signaling pathways in LPS-activated peritoneal Mφs in vivo.*

Macrophages exposed to LPS undergo classical activation, resulting in M1 polarization, which is marked by the production of pro-inflammatory cytokines and mediators, including increased NO production as observed by elevated iNOS levels, a key player in pro-inflammatory signaling pathways [38]. Conversely, the production of ornithine and polyamines via the arginase pathway leads to M2 Mφs polarization, characterized by the secretion of anti-inflammatory cytokines and intracellular factors [38]. Given the potential impact of LIF and OSM administration in arginine metabolism during the LPS-induced inflammatory response, we assessed the induction of anti-inflammatory signaling pathways and immunomodulatory factors in LPS-activated peritoneal Mφs using western blot. In this context, several studies present STAT3 and SMAD2 signaling pathways involved in iNOS and COX-2 regulation during LPS inflammation depending on early or late phase [39] [40] [41]. Moreover, Mφ polarization is modulated by many transcription factors, where STAT3 [42] and SMAD2 [40] are playing a dominant role in anti-inflammatory effects in macrophages. Therefore, phosphorylated STAT3 (p-STAT3) protein levels were also assessed to evaluate STAT3 activation in peritoneal Mφs. Also, the peritoneal Mφs from Control, LIF/LPS, and OSM/LPS groups showed detectable levels of p-STAT3 (Fig. 7A). Mφs from the OSM/LPS group displayed a significantly higher upregulation of p-STAT3, this upregulation of p-STAT3 induced by OSM injection was markedly enhanced compared to the LPS and control group, however the OSM group showing a 351-fold increase over LPS-activated peritoneal Mφs (Fig. 7A, B). Moreover, among the different groups, exclusively with OSM injection, we also detected a relative higher activation of the p-SMAD2 signaling pathway (Fig. 7 A, C). Noticeable, LPS strongly decrease SMAD expression, but its relative expression is substantially restored in the presence of LIF and OSM (Fig. 7A, C). This suggests that p-SMAD2, alongside STAT3 phosphorylation, may represent an additional cellular mechanism for modulating the inflammatory response and promoting the anti-inflammatory effects in peritoneal Mφs induced by OSM compared to LIF [22].

Additionally, SOCS3 is an important negative regulator of IL6-type cytokine signaling, and is induced during LPS-induced tissue injury, suggesting that generation of SOCS3 may represent a regulatory product during acute inflammation [43]. We found that peritoneal Mφs from the LIF/LPS and the OSM/LPS group exhibited significantly higher levels of SOCS3 expression, with an

approximately 1.5-fold increase compared to the control group and a 3-fold increase compared to the LPS group (Fig. 7A, D). Overall, these results confirm that LIF and OSM modulate macrophage activation and potentially polarization by activating immunomodulatory pathways such as STAT3 and SMAD2. Collectively, these findings strongly indicate that LIF and OSM play crucial roles in modulating and inducing anti-inflammatory pathways and mediators to counterbalance the pro-inflammatory macrophage phenotype during the LPS-induced inflammatory response.

3.8. *OSM induces the expression of CD163, an anti-inflammatory surface marker in LPS- activated peritoneal Mφs, compared to LIF.*

Since LIF and OSM activate anti-inflammatory pathways within peritoneal macrophage, we examined whether these regulatory effects can be associated with phenotypic markers associated with M2 Mφs, such as CD163. In fact, M2 macrophages can be characterized by the upregulation of scavenger receptors or surface markers such as CD163 [38]. To further support a potential switch in Mφ phenotype from M1 to M2, we assess expression of CD163, a scavenger receptor playing protective roles in inflammatory conditions via regulation of inflammatory cytokine expression and suppression of excessive activation of Mφs in endotoxin shock [13]. Therefore, by immunofluorescence analysis, we assessed CD163 expression in peritoneal Mφs (Fig. 8A). CD163 expression levels were comparable between the control group (MFI = 0.17 ± 0.03) and the LPS group (MFI = 0.19 ± 0.05). However, a significant increase was observed exclusively in the OSM/LPS group (MFI = 0.49 ± 0.03), while the LIF/LPS group (MFI = 0.21 ± 0.04) showed levels like those in the control and LPS groups (Fig. 8B). Interestingly, this result suggests that OSM promotes an M2 phenotype characterized by CD163 expression, in contrast to LIF, this cellular mechanism may involve p-SMAD2, which is specifically induced with OSM injections during LPS-induced inflammation.

4. Discussion

Endometritis is an infectious disease of the endometrium and represent a cause of infertility by reducing the endometrial receptivity and affecting embryo implantation [1]. Otherwise, a study showed that some infertile patients with endometritis have no pathogen found in the endometrium, but the immune microenvironment was still altered [44] [45]. Therefore, treating endometritis represented a really challenge due to its unspecific clinical manifestation, but it is closely related with implantation failure and unsatisfactory pregnancy outcomes [46]. Expressing the endotoxin LPS plays an important role in the development of endometrium diseases toward the expression of a typical pro- inflammatory factor such as iNOS that induces NO production during pathogen inflammation [47-49]. However, the excessive production of NO causes tissue damage, extensive systemic vasodilatation and hypotension, leading to organ hypoperfusion and dysfunction in association with septic shock [48]. Mφs are believed to play a crucial role in immune regulation and tissue regeneration. During endometritis, their infiltration into the endometrium has been linked to microbiota imbalances, which can negatively impact pregnancy outcomes [50]. Therefore, the key points of endometritis treatment are to eliminate pathogens and regulate the immune microenvironment to promote endometrium regeneration for endometrial functions and receptivity through macrophage polarization to promote endometrial regeneration and enhancing tissue and maintain viability in uterus cavity [51]. In this context, our data demonstrate that LIF and OSM contribute to preserve and minimize tissue damage in the uterus and liver caused by LPS-induced inflammation. This protective effect is mediated by reducing iNOS levels and increasing Arg-1 production in the uterine endometrial microenvironment and peritoneal macrophages.

Moreover, OSM promote M2 polarization, involved in inflammation resolution and anti-inflammatory immune environment promoting tissue repair and regeneration [23] [52]. While these studies suggest the involvement of LIF and OSM in inflammatory resolution and macrophage activity, their specific role in macrophage polarization during LPS-induced endometritis *in vivo* remains unknown. Thus, to investigate the potential protective effect of LIF or OSM, LPS has been used to mimic an *in vivo* uterine inflammatory mice model with endometritis [6].

Firstly, the phenotypic and anatomical changes induced by LIF and OSM treatments were observed despite the LPS-induced endometritis response. These various macroscopic analyses served as the initial step to confirm the LPS-induced inflammatory response in our mouse model and to assess the effects of LIF or OSM on this inflammation. Treatment with LPS induces distinct changes in metabolite profile and body weight (BW) in mice [53]. Injection with LPS intraperitoneally in mouse led to acute inflammation and decreases BW at 24 h later [54], and increases the lipolysis in visceral adipose tissues [55]. In line with those studies, we administrated a dose of LPS corresponding to approximately 0.17 $\mu\text{g/kg}$ per mouse (5 μg LPS/mouse) alone or co-injected with LIF or OSM, at D3, our results show a significant decreased of BW in mice from LPS group between D2 (LPS injection day) and D3, compared to the others group (fig. 1 C). These results suggest that sensibilization with LIF or OSM have a protective effect on BW loss induced by LPS-related inflammatory response. Also, uterine tissue from mice treated with LPS-induced uterine inflammation displays distinctive features typical of endometritis, including microabscesses within the endometrial tissue, small areas of pus containing dead neutrophils and cellular debris, indicating acute inflammation [56]. Additionally, hyperemia, characterized by increased blood flow in the endometrium, resulting in a reddened appearance with areas of red cell infiltration or hemorrhagic zones [56]. (fig. 2 A). Histologically, these changes resulted from tissue damage and disruption of normal endometrial architecture due to the inflammatory response in uterine environment [5, 56]. Both the LIF- and OSM-sensitized groups showed histopathological changes in the uterus (Fig. 2 A). In the LIF/LPS and OSM groups, morphological alterations were observed in the endometrial layer, luminal epithelium, and glandular epithelium. However, the luminal epithelium in the OSM/LPS group appeared more preserved compared to the LIF/LPS and LPS groups, more similar to the control epithelium, columnar monolayer (Fig. 2 A). Despite minor differences between LIF and OSM sensitization, our findings suggest that these molecules contribute to mitigate the impact of LPS on endometrial tissue. This observation was further explored by assessing inflammatory cell infiltration. In fact, endometritis syndrome can alter the production of cytokines, impair endometrial functions, and induce an abnormal pattern of leukocyte population at the endometrial level, leading to secretion of paracrine factors involved in endometrial receptivity [57]. Thus, our results show a significant number of inflammatory cells colored by hematoxylin stain, could be associated with leukocytes [58], in the endometrial tissue after LPS treatment compared to the control group (Fig. 2 B). This leukocytes accumulation in endometrial layer, affect endometrial receptivity by causing a resistance of apoptosis in

endometrial cells and could disturb trophoblast invasion [57]. Interestingly, LIF or OSM injection significantly reduce inflammatory cells in endometrial environment during LPS inflammation (Fig. 2 B). The LIF/LPS and OSM/LPS groups show a significant reduction of inflammatory cells infiltrated in uterine tissue compared to LPS group, that highlights a diminished inflammatory response to LPS in the presence of the immunomodulatory factors LIF and OSM.

In hepatic tissue, LIF treatment shows similar characteristics to LPS-induced inflammation. These changes include hepatocyte swelling, mild cellular necrosis, and disruption of liver tissue structure due to significant infiltration of inflammatory cells. The presence of binucleated hepatocytes suggests a prolonged cell cycle, which is indicative of acute hepatocyte injury and early liver dysfunction. (Fig, 2 C) [29, 59]. Conversely, OSM treatment shows near-complete resorption and tissue repair, along with a significant reduction in inflammatory cell infiltration. (Fig 2 C). Given that hepatic inflammation is often associated with systemic inflammatory responses, these observations, particularly in hepatic tissue, suggest a difference in the immunoregulatory effect of LIF and OSM in the regulation of the systemic anti-inflammatory response [29]. LIF and OSM similar anti-inflammatory effects in uterine tissue confirmed by inhibition of LPS-induced iNOS production and enhance Arg-1 expression. Our results also show a reduction in macrophage count with these cytokines compared to the LPS control, suggesting a remodeling of the endometrial immune environment, even in the presence of LPS (Fig. 3A, C). Thus, LIF and OSM may be influence macrophage activity to control and reduce the inflammatory response to LPS. During inflammatory response, macrophages from peritoneal cavity accumulate at sites of tissue damage, to remove necrotic cells, promoting revascularization, to facilitate the resolution of tissue damage [60]. In this context, the expressions of iNOS and Arg-1 are crucial for the functional macrophage pro or anti-activity [32]. During the LPS inflammatory response, NF- κ B activation promotes a pro-inflammatory phenotype M1 macrophage inducing a distinctive rounded morphology and apoptosis in macrophages through NO production [61] [48]. Our findings demonstrate that LPS group show a significant loss of 45% of macrophages and a significant iNOS production with a low level of Arg-1 detection reflecting an M1 macrophage activity (Fig, 4B). LIF and OSM have limited macrophages apoptosis *in vivo*, however, OSM is more effectively compared to LIF, 83% preserved macrophage count compared to 65%, respectively (Fig, 5B). These differences might be associated with the differences between LIF and OSM effects in hepatic inflammatory response strongly suggest a different in systemic anti-inflammatory effect

between LIF and OSM immunoregulatory role. However, both LIF and OSM appear to promote the M2 phenotype, firstly by enhancing macrophage survival and promote M2 macrophage morphology, elongated and fusiform shape [35], (Fig, 5C) and inducing Arg-1 production along decreasing iNOS levels in peritoneal macrophages during LPS inflammation (Fig, 6B, D) potentially providing protection to organ systems such as the uterus.

Although LPS dose-dependently enhances COX-2 production, our findings surprisingly show lower COX-2 expression in the LPS group and, LIF or OSM injections restoring its levels. However, COX-2 expression can also be associated with angiogenesis process by VEGF expression [62]. Thus, in this context, COX-2 induced by OSM or LIF support anti-inflammatory effect of Arg-1 by promoting tissue repair and contribute to the resolution of the LPS-induced inflammatory response. However, this point could confirm through the detection of VEGF in uterine tissue or its expression by peritoneal macrophages. In addition to modulating the activity of inflammatory enzymes, the activation of intracellular signaling pathways highlights the mechanisms triggered by LIF and OSM to regulate peritoneal macrophage activity and mitigate LPS-induced inflammation. STAT3 and SOCS3 (Fig 7B, D) emerge as a shared pathway for both molecules, as it is commonly recognized for its role in controlling the inflammatory response in macrophages, we previously observed in studies involving LIF [21]. In previous studies, we established a connection between SOCS3 expression and STAT3 activation induced by LIF or OSM, which correlates with IL-10 production to regulate inflammatory stress [22, 26]. This mechanism, observed in peritoneal macrophages, confirms the anti-inflammatory effect of these cytokines in modulating the LPS inflammatory response *in vivo*. Interestingly, our results demonstrate a variation in the intracellular mechanisms triggered by OSM sensitization, marked by an increase in p- SMAD2 levels (Fig 7C). Notably, our earlier study indicated that OSM pretreatment leads to the phosphorylation of both STAT3 and SMAD2, effectively participating to regulate inflammatory stress in human trophoblast cells. This modulatory effect of OSM in trophoblast cells was associated with TGF- β expression [22]. This similar intracellular mechanism may also play a role in OSM's anti-inflammatory effect, modulating the pro- inflammatory response of macrophages to LPS-induced inflammation. Furthermore, our results show that OSM significantly increases CD163 expression compared to LPS or LIF (Fig. 8B). Similar to SMAD2 activation, this regulation appears to be exclusively driven by OSM, suggesting that OSM may induce CD163 expression indirectly through SMAD2 phosphorylation. Compared to LIF, these findings strongly indicate that

OSM has distinct anti-inflammatory effects, despite both cytokines exerting anti-inflammatory role during the LPS response. Additionally, the adaptability of macrophages to adapt their tissue microenvironment is influenced by a mix of chemokines and cytokines that modulate their behavior [63]. Macrophages undergo a series of differentiation stages to activate either the M1 pro-inflammatory or M2 anti-inflammatory phenotype to meet the functional requirements of the tissue environment [63]. Taken together, our results indicate that the anti-inflammatory activity of OSM may promote a distinct M2 macrophage phenotype compared to LIF, involving the phosphorylation of STAT3 and SMAD2, which subsequently induces CD163 expression. Nonetheless, through these different mechanisms, both LIF and OSM mitigate LPS-induced endometritis by reducing iNOS production and preserving the intrauterine environment through the expression of Arg-1 and COX-2.

5. Conclusion

Collectively, these data indicate that LIF and OSM exert anti-inflammatory effects in the regulation of LPS-induced endometritis, with similar decreases in iNOS levels and increased Arg-1 production observed in both uterine tissue (Fig. 3) and peritoneal macrophages (Fig. 6). However, these anti-inflammatory effects differ in hepatic tissue histopathological analyses (Fig. 2) and in the molecular mechanisms of peritoneal macrophages (Fig. 7).

Thus, we propose that OSM-induced activation of STAT3 serves as a primary molecular mechanism for regulating the LPS inflammatory response in peritoneal macrophages, leading to increased CD163 expression. This may involve the recruitment of the TGF β 1- SMAD2 and IL-10- STAT3 signaling pathways, as well as the recruitment of SOCS3 proteins. In contrast, we suggest that LIF-induced STAT3 activation is the main molecular mechanism regulating the LPS inflammatory response through peritoneal macrophages. This mechanism may also involve the activation of the IL-10-STAT3 signaling pathway and/or the recruitment of SOCS3 proteins; however, further investigation is needed.

These conclusions are based on the expression levels of activated STAT3 and SMAD2 in peritoneal macrophages, but we must confirm the expression of TGF β 1 and IL-10 through RT-qPCR or immunodetection assays to validate their roles as distinct immunoregulatory mediators responsible for the anti-inflammatory effects induced by LIF and/or OSM. Additionally, our

analysis of tissues and macrophages was conducted 24 hours after LPS injections. It would be valuable to sample at different time points following LPS injection to determine the timing of OSM and LIF's regulatory effects on cytokine expression induced by LPS. Moreover, the co-injection of LIF and OSM could provide valuable insights into their combined effects on inflammatory responses. This approach may help determine whether their synergistic action enhances or modifies the regulation of cytokine expression in response to LPS, as well as elucidate the underlying mechanisms involved in their interactions. Additionally, exploring different dosing regimens and timing of co- injections could further clarify their potential therapeutic benefits in managing inflammation. Nonetheless, in the future, we aim to investigate whether the mechanisms of OSM and/or LIF function in an in vivo preterm mouse model to preserve pregnancy outcomes.

6. References

1. Kitaya, K., et al., *Chronic Endometritis: Potential Cause of Infertility and Obstetric and Neonatal Complications*. Am J Reprod Immunol, 2016. **75**(1): p. 13-22.
2. Dong, Y., et al., *Combined Intestinal Metabolomics and Microbiota Analysis for Acute Endometritis Induced by Lipopolysaccharide in Mice*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 791373.
3. Moreno, I., et al., *The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology*. Am J Obstet Gynecol, 2018. **218**(6): p. 602 e1- 602 e16.
4. Czernobilsky, B., *Endometritis and infertility*. Fertil Steril, 1978. **30**(2): p. 119-30.
5. Kitaya, K., et al., *Endometritis: new time, new concepts*. Fertil Steril, 2018. **110**(3): p. 344-350.
6. You, S., et al., *Recombinant humanized collagen remodels endometrial immune microenvironment of chronic endometritis through macrophage immunomodulation*. Regen Biomater, 2023. **10**: p. rbad033.
7. Cicinelli, E., et al., *Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment*. Reprod Sci, 2014. **21**(5): p. 640-7.

8. Ning, F., H. Liu, and G.E. Lash, *The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2016. **75**(3): p. 298-309.
9. Rodriguez-Prados, J.C., et al., *Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 605-14.
10. Quillay, H., et al., *Distinct characteristics of endometrial and decidual macrophages and regulation of their permissivity to HIV-1 infection by SAMHD1*. J Virol, 2015. **89**(2): p. 1329-39.
11. Cappelle`i, M., P. Presicce, and S.G. Kallapur, *Immunobiology of Acute Chorioamnionitis*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 649.
12. Yao, Y., X.H. Xu, and L. Jin, *Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 792.
13. Fujiwara, Y., et al., *CD163 deficiency facilitates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and endotoxin shock in mice*. Clin Transl Immunology, 2020. **9**(9): p. e1162.
14. Yoneda, E., et al., *Evaluation of Lipopolysaccharide and Interleukin-6 as Useful Screening Tool for Chronic Endometritis*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(4).
15. Wu, H., et al., *Thymol mitigates lipopolysaccharide-induced endometritis by regulating the TLR4- and ROS-mediated NF-kappaB signaling pathways*. Oncotarget, 2017. **8**(12): p. 20042-20055.
16. Li, Y., et al., *Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure*. Fertil Steril, 2020. **113**(1): p. 187-196 e1.
17. Rosario, G.X. and C.L. Stewart, *The Multifaceted Actions of Leukaemia Inhibitory Factor in Mediating Uterine Receptivity and Embryo Implantation*. Am J Reprod Immunol, 2016. **75**(3): p. 246-55.
18. Ogata, I., et al., *Oncostatin M is produced during pregnancy by decidual cells and stimulates the release of HCG*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(8): p. 750-7.
19. Gadiant, R.A. and P.H. Pa`erson, *Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury*. Stem Cells, 1999. **17**(3): p. 127-37.
20. Wahl, A.F. and P.M. Wallace, *Oncostatin M in the anti-inflammatory response*. Ann Rheum Dis, 2001. **60 Suppl 3**(Suppl 3): p. iii75-80.

21. Hamelin-Morrisse`e, J., et al., *Leukemia inhibitory factor regulates the activation of inflammatory signals in macrophages and trophoblast cells*. Mol Immunol, 2020. **120**: p. 32-42.
22. Ravelojaona, M., et al., *Oncostatin M and STAT3 Signaling Pathways Support Human Trophoblast Differentiation by Inhibiting Inflammatory Stress in Response to IFNgamma and GM-CSF*. Cells, 2024. **13**(3).
23. Shrivastava, R., et al., *M2 polarization of macrophages by Oncostatin M in hypoxic tumor microenvironment is mediated by mTORC2 and promotes tumor growth and metastasis*. Cytokine, 2019. **118**: p. 130-143.
24. Dubey, A., et al., *Separate roles of IL-6 and oncostatin M in mouse macrophage polarization in vitro and in vivo*. Immunol Cell Biol, 2018. **96**(3): p. 257-272.
25. Aisemberg, J., et al., *Progesterone is essential for protecting against LPS-induced pregnancy loss. LIF as a potential mediator of the anti-inflammatory effect of progesterone*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56161.
26. Dallagi, A., et al., *The activating effect of IFN-gamma on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL- 10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation*. Cell Mol Immunol, 2015. **12**(3): p. 326-41.
27. Leduc, K., et al., *Leukemia inhibitory factor regulates differentiation of trophoblastlike BeWo cells through the activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP kinase-signaling pathways*. Biol Reprod, 2012. **86**(2): p. 54.
28. Yang, Y., et al., *Sustained Inflammation Induced by LPS Leads to Tolerable Anorexia and Fat Loss via Tlr4 in Mice*. J Inflamm Res, 2022. **15**: p. 5635-5648.
29. Chen, S.N., et al., *Deletion of TLR4 a\enuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis*. Acta Pharmacol Sin, 2021. **42**(10): p. 1610-1619.
30. Jirillo, E., et al., *The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings*. J Endotoxin Res, 2002. **8**(5): p. 319-27.
31. Schulte, W., J. Bernhagen, and R. Bucala, *Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 165974.

32. Ando, Y., T. Oku, and T. Tsuji, *Platelet Supernatant Suppresses LPS-Induced Nitric Oxide Production from Macrophages Accompanied by Inhibition of NF-kappaB Signaling and Increased Arginase-1 Expression*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0162208.
33. Wang, J. and P. Kubes, *A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair*. Cell, 2016. **165**(3): p. 668-78.
34. Salm, L., et al., *Gata6(+) large peritoneal macrophages: an evolutionarily conserved sentinel and effector system for infection and injury*. Trends Immunol, 2023. **44**(2): p. 129-145.
35. Wu, H., et al., *Effects of Environmental pH on Macrophage Polarization and Osteoimmunomodulation*. ACS Biomater Sci Eng, 2019. **5**(10): p. 5548-5557.
36. Han, S., et al., *Capillarisin inhibits iNOS, COX-2 expression, and proinflammatory cytokines in LPS-induced RAW 264.7 macrophages via the suppression of ERK, JNK, and NF-kappaB activation*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2013. **35**(1): p. 34-42.
37. Zhou, J., et al., *Prim-O-glucosylcimifugin A\enuates Lipopolysaccharideinduced Inflammatory Response in RAW 264.7 Macrophages*. Pharmacogn Mag, 2017. **13**(51): p. 378-384.
38. Saqib, U., et al., *Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation*. Oncotarget, 2018. **9**(25): p. 17937-17950.
39. Ahuja, A., et al., *STAT3 Differentially Regulates TLR4-Mediated Inflammatory Responses in Early or Late Phases*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(20).
40. Sugiyama, Y., et al., *Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways*. Int Immunol, 2012. **24**(4): p. 253-65.
41. Zhu, J., et al., *COX-2 contributes to LPS-induced Stat3 activation and IL-6 production in microglial cells*. Am J Transl Res, 2018. **10**(3): p. 966-974.

42. Liu, Z.J., et al., *Melatonin protects against ischemic stroke by modulating microglia/macrophage polarization toward anti-inflammatory phenotype through STAT3 pathway*. CNS Neurosci Ther, 2019. **25**(12): p. 1353-1362.
43. Yan, C., et al., *Myeloid depletion of SOCS3 enhances LPS-induced acute lung injury through CCAAT/enhancer binding protein delta pathway*. FASEB J, 2013. **27**(8): p. 2967-76.
44. Achilles, S.L., A.J. Amortegui, and H.C. Wiesenfeld, *Endometrial plasma cells: do they indicate subclinical pelvic inflammatory disease?* Sex Transm Dis, 2005. **32**(3): p. 185-8.
45. Thiruchelvam, U., et al., *The importance of the macrophage within the human endometrium*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(2): p. 217-25.
46. Buzzaccarini, G., et al., *Chronic endometritis and altered embryo implantation: a unified pathophysiological theory from a literature systematic review*. J Assist Reprod Genet, 2020. **37**(12): p. 2897-2911.
47. Deng, Y., et al., *Regulatory roles of PGE(2) in LPS-induced tissue damage in bovine endometrial explants*. Eur J Pharmacol, 2019. **852**: p. 207-217.
48. Kawakami, T., A. Koike, and F. Amano, *Induction of different activated phenotypes of mouse peritoneal macrophages grown in different tissue culture media*. Cytotechnology, 2017. **69**(4): p. 631-642.
49. Li, S., et al., *Bacillus subtilis ameliorates Escherichia coli-induced endometritis in mice via maintaining endometrial barrier and inhibiting inflammatory response*. Microb Pathog, 2022. **166**: p. 105487.
50. Chen, P., et al., *Interaction Between Chronic Endometritis Caused Endometrial Microbiota Disorder and Endometrial Immune Environment Change in Recurrent Implantation Failure*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 748447.
51. Zeng, S., et al., *Research update for the immune microenvironment of chronic endometritis*. J Reprod Immunol, 2022. **152**: p. 103637.
52. Gensel, J.C. and B. Zhang, *Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury*. Brain Res, 2015. **1619**: p. 1-11.
53. Piirsalu, M., et al., *Treatment With Lipopolysaccharide Induces Distinct Changes in Metabolite Profile and Body Weight in 129Sv and B16 Mouse Strains*. Front Pharmacol, 2020. **11**: p. 371.

54. Guo, J., et al., *Alpha-Lipoic Acid Alleviates Acute Inflammation and Promotes Lipid Mobilization During the Inflammatory Response in White Adipose Tissue of Mice*. *Lipids*, 2016. **51**(10): p. 1145-1152.
55. Zu, L., et al., *Bacterial endotoxin stimulates adipose lipolysis via toll-like receptor 4 and extracellular signal-regulated kinase pathway*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(9): p. 5915-26.
56. Zhang, H., et al., *Catalpol ameliorates LPS-induced endometritis by inhibiting inflammation and TLR4/NF-kappaB signaling*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019. **20**(10): p. 816-827.
57. Puente, E., et al., *Chronic Endometritis: Old Problem, Novel Insights and Future Challenges*. *Int J Fertil Steril*, 2020. **13**(4): p. 250-256.
58. Bi, R., et al., *The role of leukocytes in acute ischemic stroke-related thrombosis: a notable but neglected topic*. *Cell Mol Life Sci*, 2021. **78**(17-18): p. 6251-6264.
59. Wu, M., et al., *Celastrol aggravates LPS-induced inflammation and injuries of liver and kidney in mice*. *Am J Transl Res*, 2018. **10**(7): p. 2078-2086.
60. Honda, M., et al., *Directly recruited GATA6 + peritoneal cavity macrophages contribute to the repair of intestinal serosal injury*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 7294.
61. Kim, E.J., M.Y. Lee, and Y.J. Jeon, *Silymarin Inhibits Morphological Changes in LPS-Stimulated Macrophages by Blocking NF-kappaB Pathway*. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2015. **19**(3): p. 211-8.
62. Toomey, D.P., J.F. Murphy, and K.C. Conlon, *COX-2, VEGF and tumour angiogenesis*. *Surgeon*, 2009. **7**(3): p. 174- 80.
63. Chambers, M., et al., *Macrophage Plasticity in Reproduction and Environmental Influences on Their Function*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 607328.

Figures legend

Figure 1: LIF and OSM prevent the loss of body weight in mice induced by LPS administration. (A) Experimental design of mice experimental protocol. Mice at Day 0 (D0) were weighted and separated into four groups. Group 1: Control; Group 2: LPS; Group 3: LIF/LPS; and Group 4: OSM/LPS. The Control group were injected with PBS as control vehicle. Recombinant LIF or OSM proteins were administrated at 20 µg/mouse, representing 560 µg/kg per mouse, to the LIF/LPS or OSM/LPS groups, respectively, by intraperitoneal (i.p.) injections; at D2, the LPS group received the LPS i.p. injection at 5 µg/mouse, representing 140 µg/kg per mouse. Co-injections of LPS with LIF or OSM were administrated to the LIF/LPS or OSM/LPS groups by i.p. injections. Mice groups at D3 were weighted, euthanatized, then peritoneal cells, liver and uterus were collected. (n = 6 per group). (B) Graph of mice mean weight in different groups at Day 0, Day 1, Day 2 and Day 3 before euthanasia. Data were expressed as the mean ± SD. * $p < 0.5$; ns: non-significant.

Figure 2: LIF or OSM injections mitigate LPS-induced inflammation and inflammatory cells (ICs) infiltration in uterine and liver tissues. (A) H&E-assisted histopathological analysis of uterine tissues from Control, LPS, LIF/LPS, and OSM/LPS mice groups (original magnification x10 and x40). Black arrow: simple columnar epithelium; black asterisk: uterine glands; blue arrow: hypercellular layer of columnar epithelium; red arrow: hemorrhagic areas; black arrowhead: inflammatory cells (ICs)-infiltrated areas; red asterisk: cystic endometrial glands; yellow arrow: apoptotic necrosis areas; black arrow: healthier endometrial tissue. (B) Graphical analysis of inflammatory cells (ICs) counts per field in uterine tissues from the different groups. (C) H&E-assisted histopathological analysis of liver tissues from Control, LPS, LIF/LPS, and OSM/LPS mice groups (original magnification x10 and x40). Green asterisk: mononuclear hepatocytes cells; black arrowhead: inflammatory cells (ICs); black circle: necrotic zone or area of hepatocyte degeneration; red asterisk: binuclear hepatocytes cells; red line: expansion of sinusoids; black circle: spotty necrosis. (D) Graphical analysis of ICs counts per field in liver tissues from the different groups. Data are expressed as the mean ± SD (n = 12 fields per group). * $p < 0.5$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: non-significant.

Figure 3: LIF and OSM modulate endometrial inflammatory response, leading to a reduction in LPS-induced endometritis. (A) IHC of mice uterine tissue assessed immune and endocrine factors expression in the different groups. At 10x and a zooming at 40x magnification, IHC for iNOS, Arg-1 and F4/80 from mice uterus were detected for the different groups. Graphical representation of iNOS (B), Arg-1 (C) and F4/80 (D) mean density per field in uterine tissue from different mice groups. Data were expressed as the mean ± SEM (N = 3 fields per group). * $p < 0.5$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: non-significant.

Figure 4: LIF or OSM treatments preserve the morphology of peritoneal macrophages (pMφs) altered by LPS administration. A) Schematic diagram of experimental animal design and pMφs count and morphology for the different groups. At D3 mice were euthanatized, and pMφs were collected, pooled per group, counted for each group, and incubated overnight. B) Averages count of peritoneal Mφs per group and percentages difference of pMφs isolated from each group compared to the control group. The control group is defined as having a baseline count of pMφs set at 100%. C) Pictures of adherent pMφs from the different group at D4 after an overnight incubation. D) Graph of adherent pMφ count per field after an overnight incubation for the different groups. Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (N = 4 fields per group). * $p < 0.5$; *** $p < 0.001$; ns: non-significant.

Figure 5: LIF and OSM treatments modulate LPS-induced inflammatory response by regulating arginine metabolism in peritoneal macrophages (pMφs). Representative images of immunofluorescence detection for iNOS (A) and Arg-1 (B) proteins from mice pMφs for the different groups. Graphical representation of iNOS (C) and Arg-1 (D) mean density per field in pMφs from the different mice groups. Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n= 3 fields per group). * $p < 0.5$; *** $p < 0.001$; ns: non-significant.

Figure 6: Analysis of mRNA and protein expression of enzymes inflammatory activity in peritoneal macrophages (pMφs) (A-H) pMφs from the different groups were lysed after the isolation from peritoneal cavity of mice at D3. (A) Representative images of iNOS, Arg-1 and COX-2, assessed using RT-PCR and PCR. (B, C, D) Graphs analysis of mRNA relative expression of iNOS, Arg-1 and COX-2. The iNOS/ β -actin, Arg-1/ β -actin, and COX-2/ β -actin, ratios were determined to expressed data as the relative mRNA genes expression. IP macrophages mice from the different groups were lysed with Trizol after the isolation from peritoneal cavity of mice at D3. (E) Representative images of iNOS, Arg-1 and COX-2 detection bt western blot. The iNOS/ β -actin, Arg-1/ β -actin and COX-2/ β -actin ratios were determined to expressed data as the relative protein expression. Data were expressed as the mean $\pm$ SD (n = 6 per group). * $p < 0.5$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: non-significant.

Figure 7: Analysis of anti-inflammatory signaling pathways regulated in peritoneal macrophages (pMφs) (A-D) pMφs from the different groups were lysed after the isolation from peritoneal cavity of mice at D3. (A) Representative images of phosphorylated (p) and total STAT3, SMAD2 and SOCS3 as assessed by western blotting. Graphical analysis of relative expression of p-STAT3 (B), p-SMAD2 (C), and SOCS3 (D). The p-STAT3/STAT3, p-SMAD2/SMAD2, and SOCS3/ β -actin ratios were determined to expressed data as the relative protein expression. Data were expressed as the mean $\pm$ SD (n = 6 per group). * $p < 0.5$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: non-significant.

Figure 8: Analysis of surface marker expression regulated in (A-B) pMφs from the different groups were after the isolation from peritoneal cavity of mice at D3. (A) Immunofluorescence detection for CD163 in pMφs from different groups. (B) Graph of CD163 mean density per field express a quantitative expression of CD163 in IP macrophages cells in the different groups. Data were expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 3 fields per group). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: non-significant.

Figure 9 : Graphical conclusion of LIF and OSM modulation of the LPS-induced inflammatory environment in uterine tissue and peritoneal macrophages in a mouse model of LPS-induced endometritis.

Figures

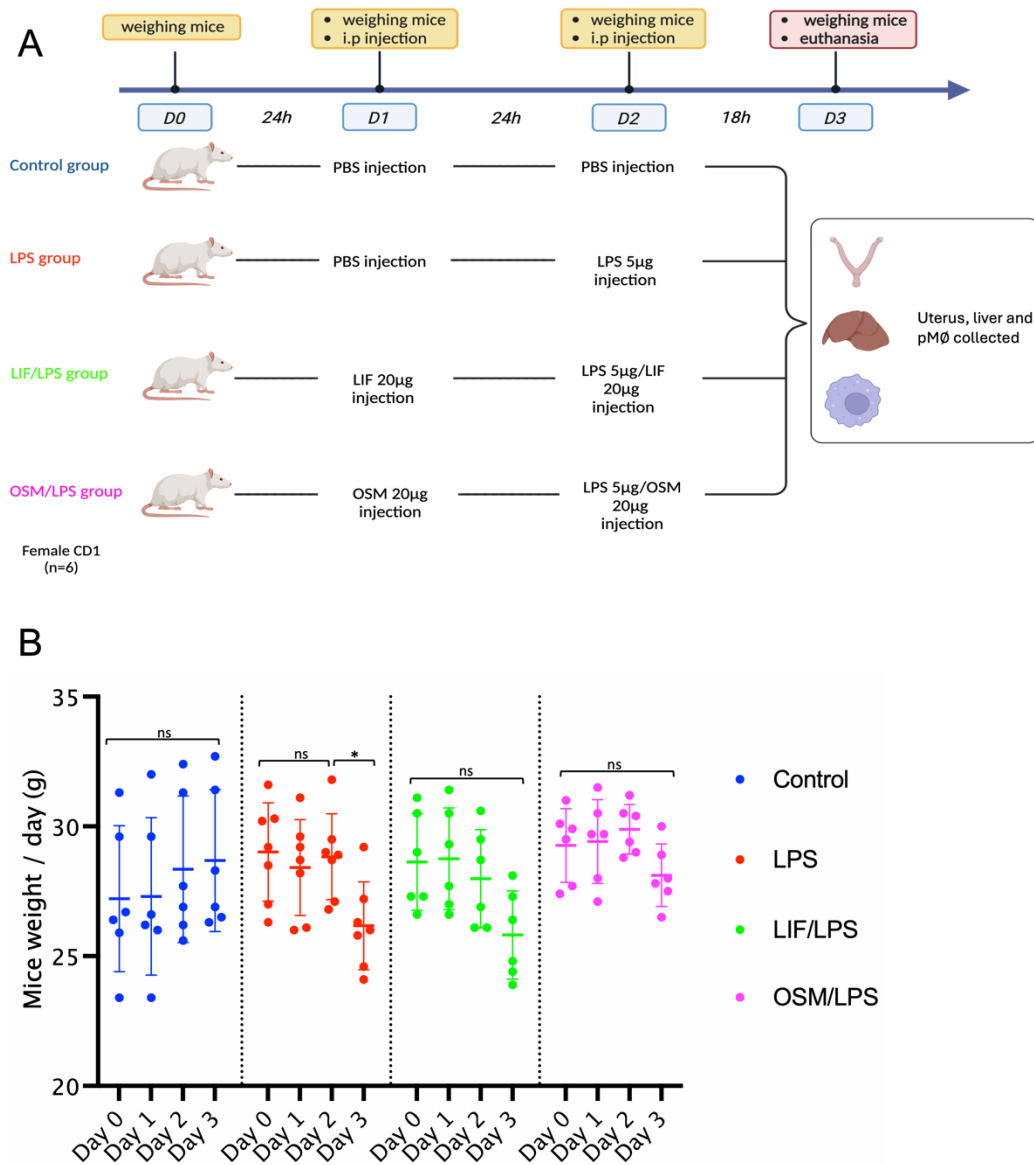


Figure 1

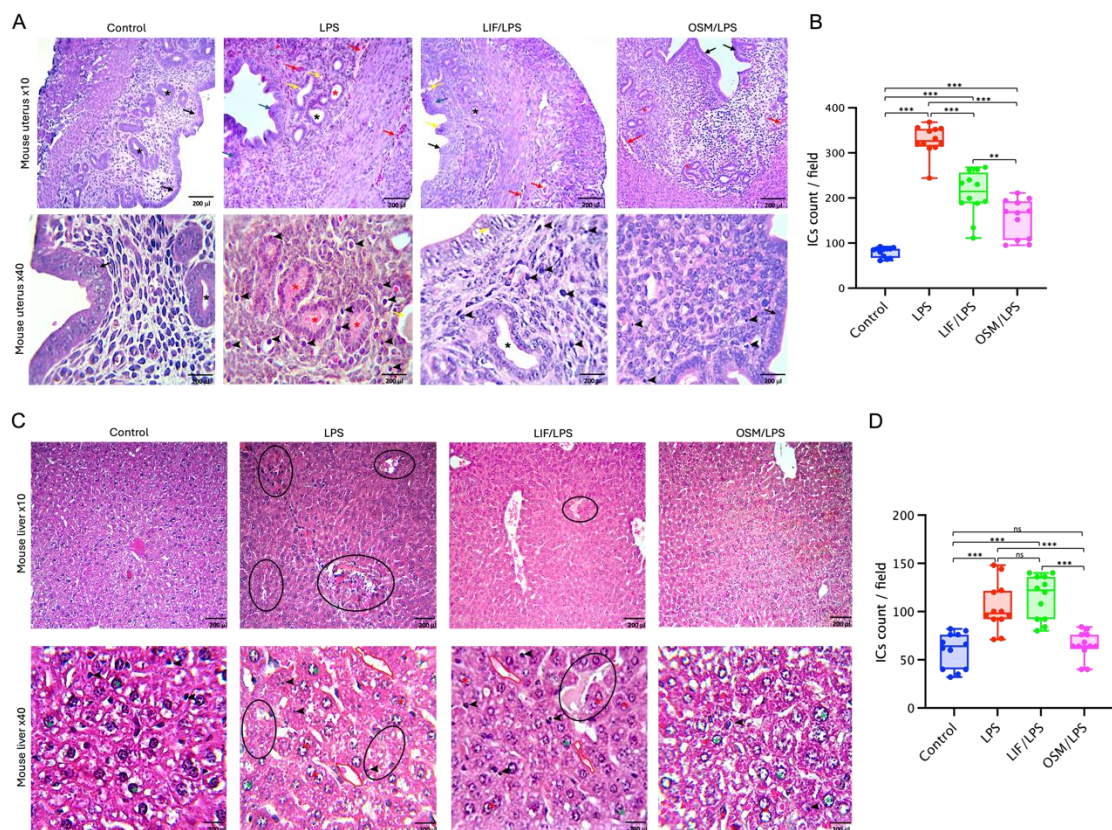


Figure 2

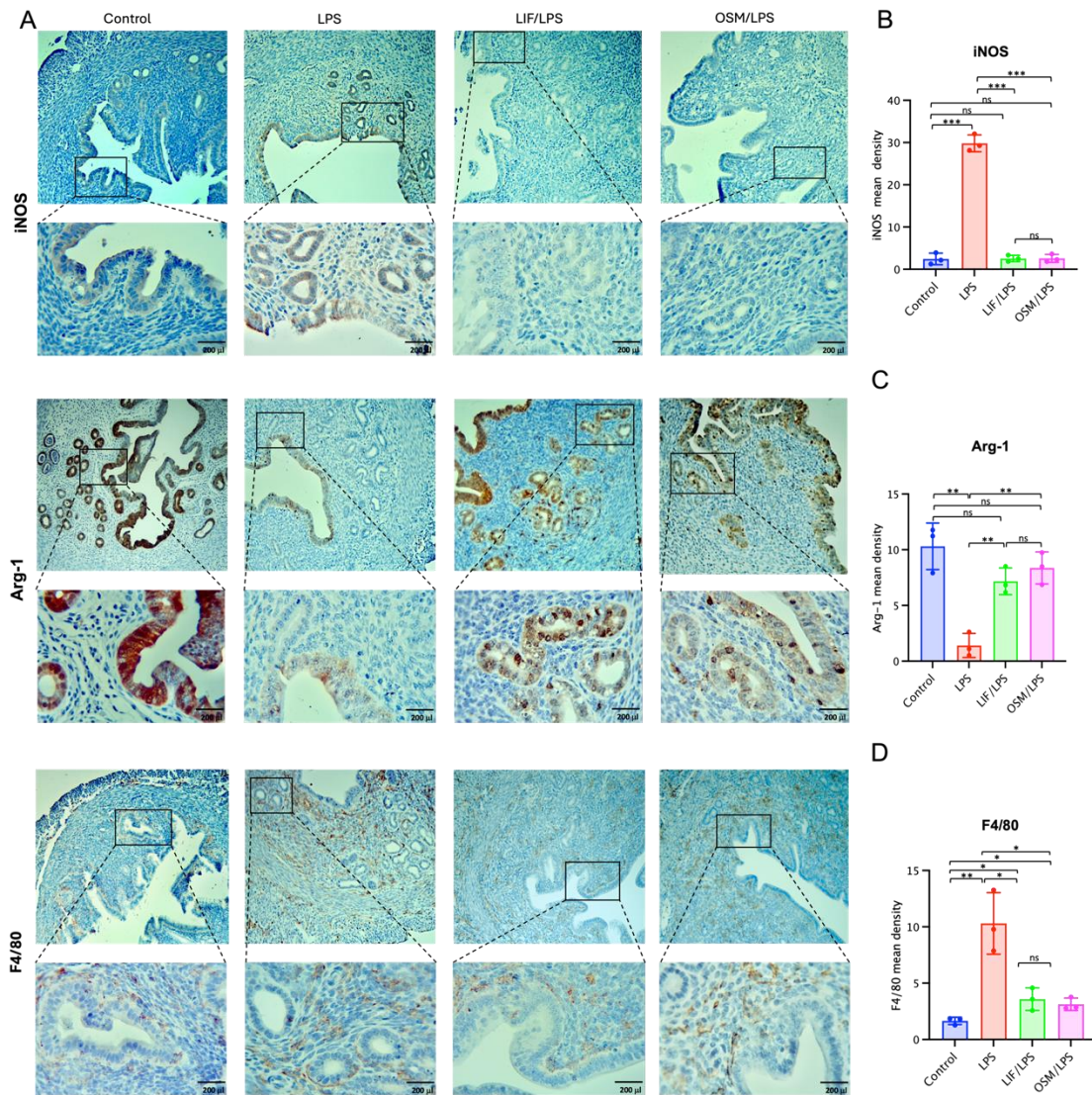


Figure 3

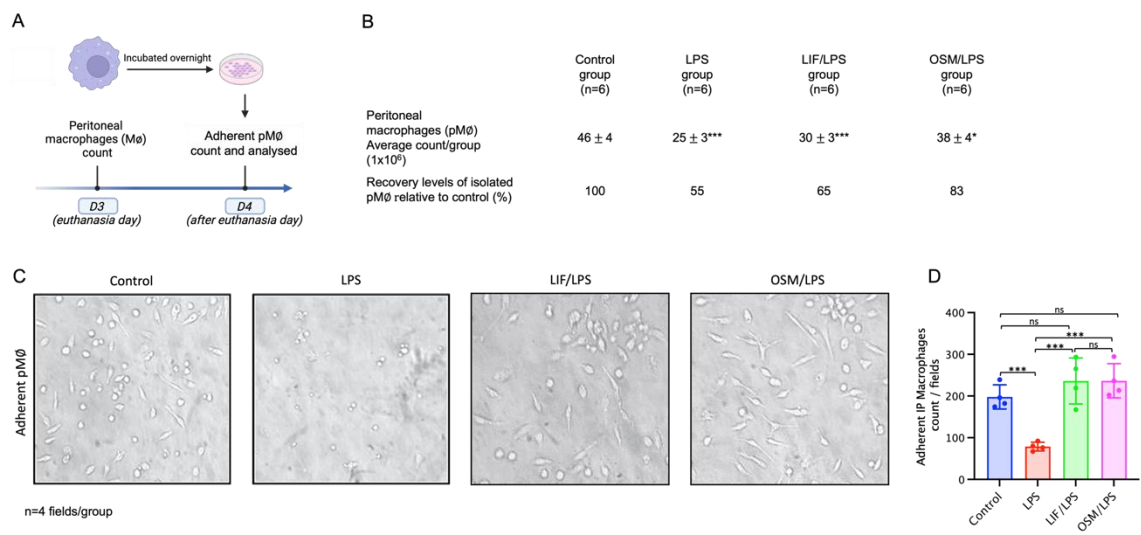


Figure 4

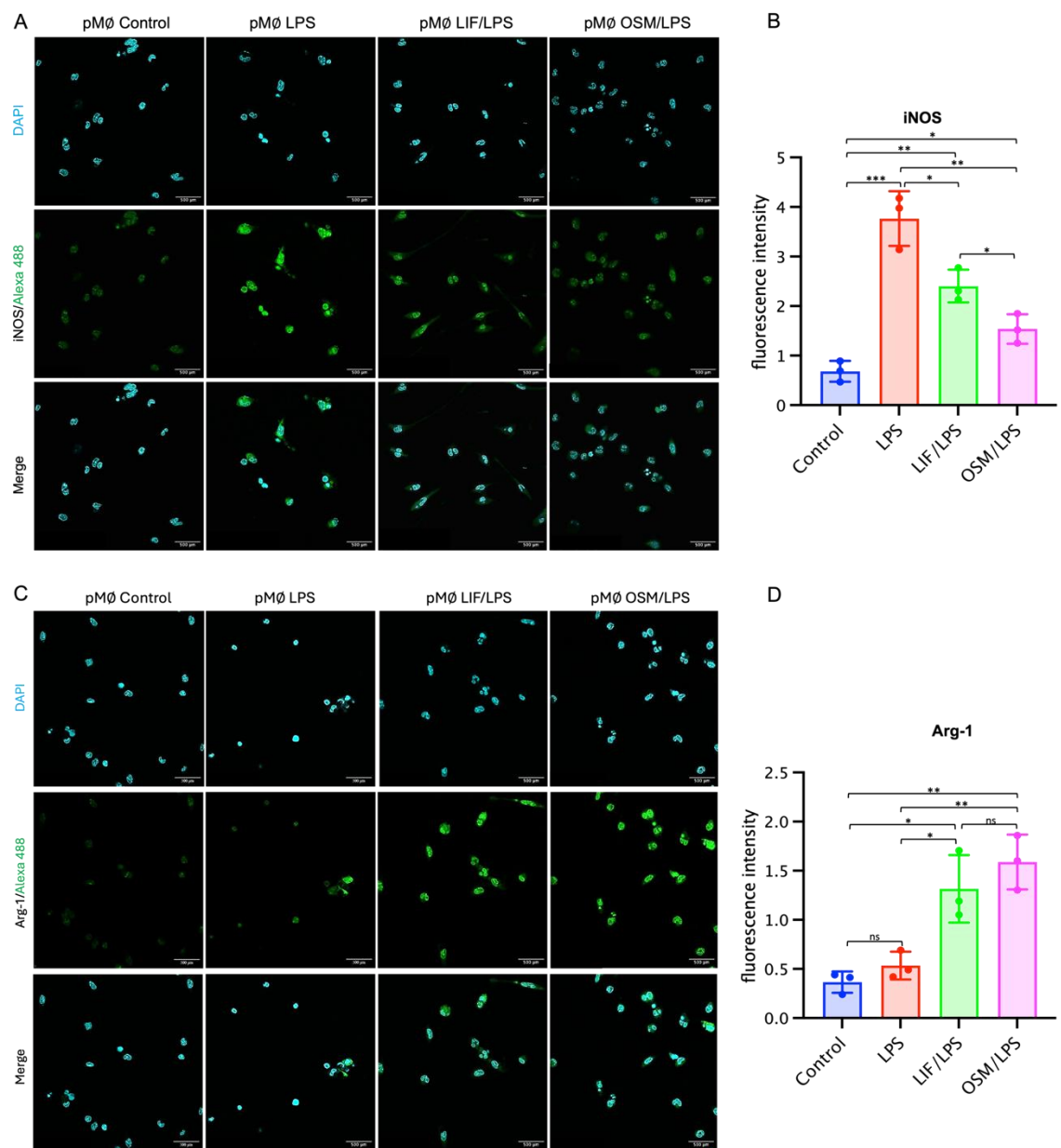


Figure 5

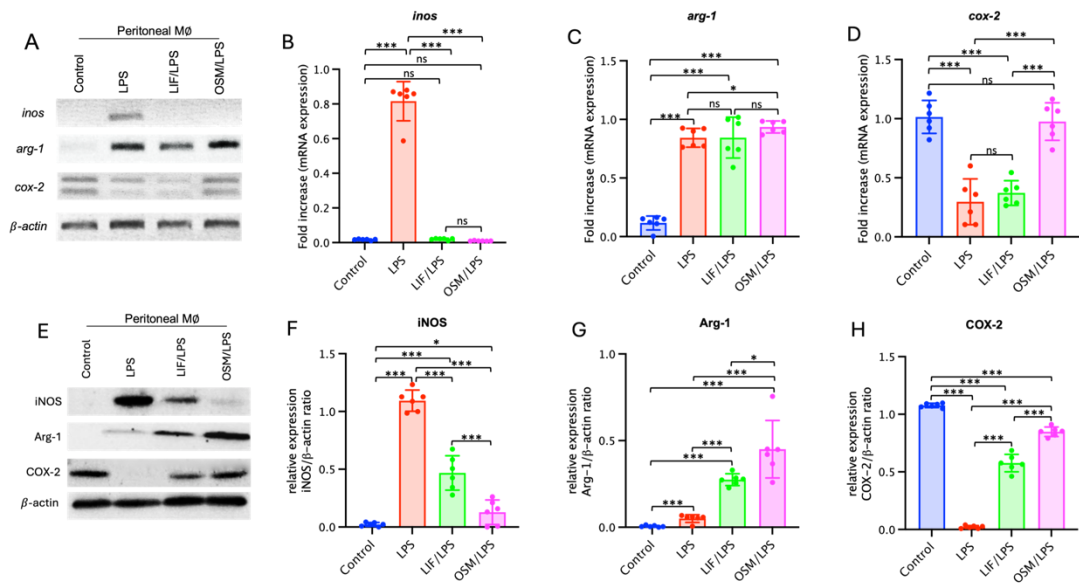


Figure 6

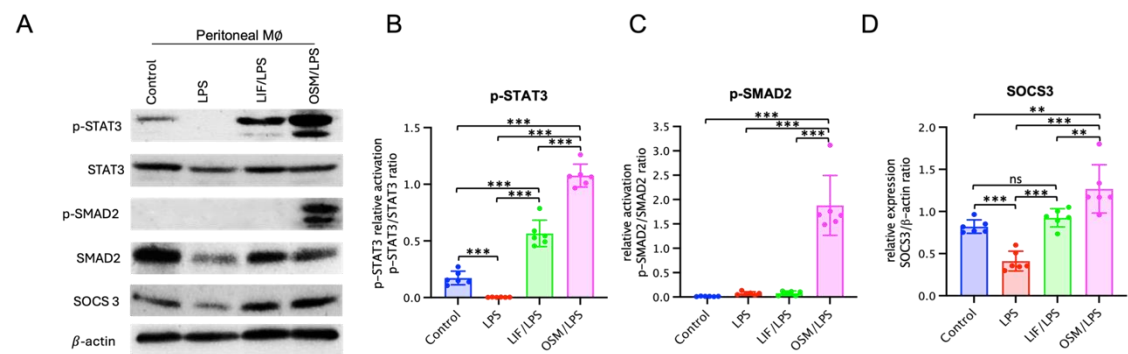


Figure 7

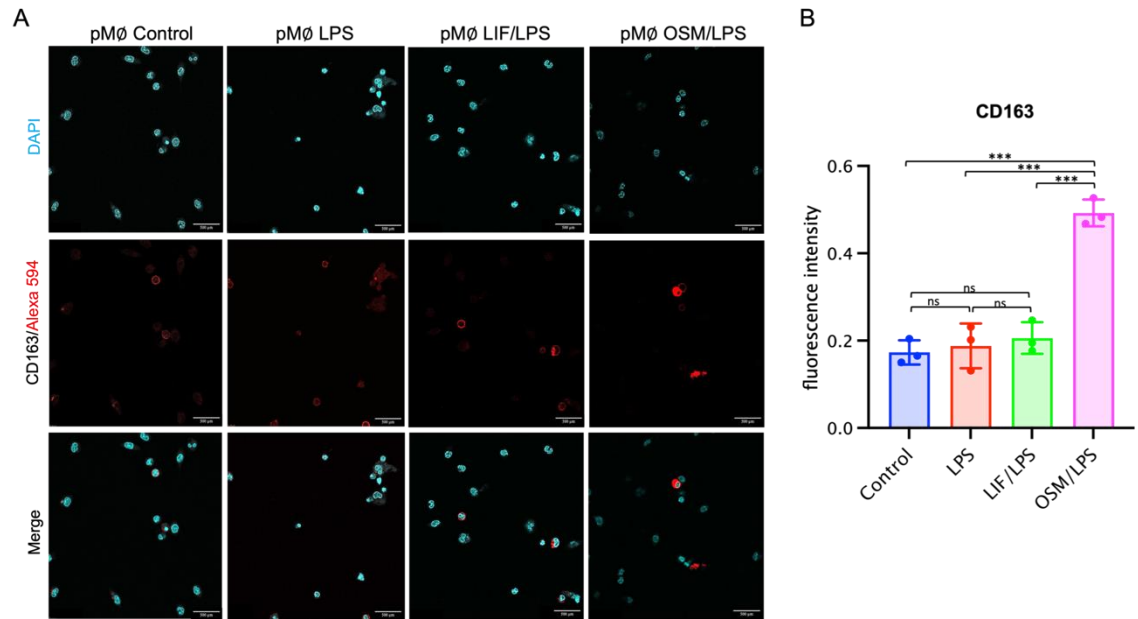
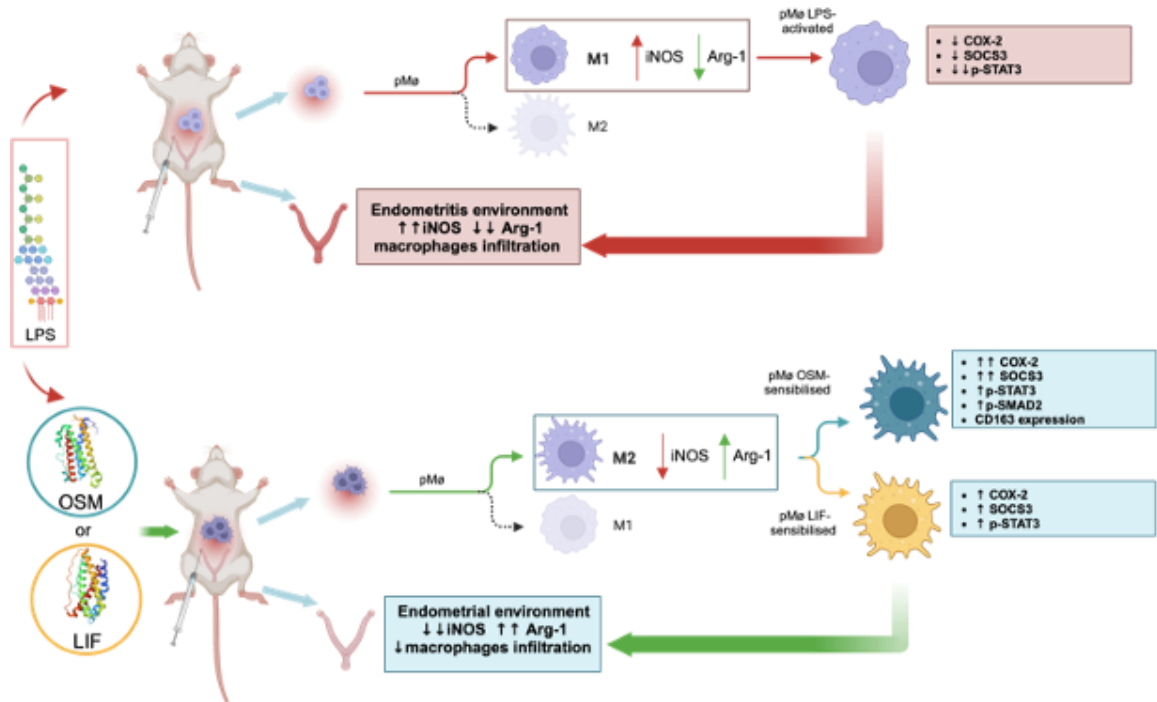


Figure 8



Abstract graph (figure 9)

9 Chapitre IV

9.1 Discussion

9.1.1 L'OSM, immunorégulateur du stress inflammatoire dans différentes populations cellulaires de l'interface fœto-maternelle.

L'OSM, une molécule pléiotropique appartenant à la famille des cytokines IL-6, est souvent étudiée pour son rôle oncogénique dans divers cancers et maladies inflammatoires chroniques. Cependant, en raison de sa nature pléiotropique, elle possède une capacité versatile dans la modulation de l'inflammation, dont les effets varient en fonction du microenvironnement dans lequel elle évolue. Ainsi, les études réalisées dans le cadre de mon projet doctoral ont permis de démontrer et de souligner l'importance de l'OSM dans la régulation du stress inflammatoire dans différentes populations cellulaires qui composent l'interface fœto-maternelle telles que les trophoblastes, les cellules endométriales ainsi que les macrophages. Grâce à des modèles complémentaires d'inflammation, *in vitro* et *in vivo*, ces travaux ont non seulement décrit les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents à l'activité immunorégulatrice de l'OSM, mais permettront également de proposer une nouvelle approche immunothérapeutique face aux pathologies endométriales et aux complications de grossesse liées à l'inflammation intra-utérine.

Dans un premier temps, nous avons démontré que l'OSM via l'activation de la voie STAT3 est un facteur clé dans la modulation des réponses inflammatoires, en régulant les effets néfastes des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le GM-CSF, pouvant altérer les fonctions trophoblastiques. De plus, cette étude a mis en évidence des liens étroits entre certaines pathologies gestationnelles, telles que la prééclampsie, les avortements précoces ou le retard de croissance intra-utérin, et des facteurs pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et le GM-CSF, pouvant être induits par un stress environnemental ou par une régulation défailante de l'inflammation utérine lors de l'implantation embryonnaire (figure 14). Ainsi, dans la régulation inflammatoire face à ces deux facteurs au caractère abortif, la cytokine OSM représente non-seulement un facteur clé dans leur activité mais représente également un moyen préventif ou un traitement potentiel des pathologies gestationnelles liées à l'inflammation intra-utérine.

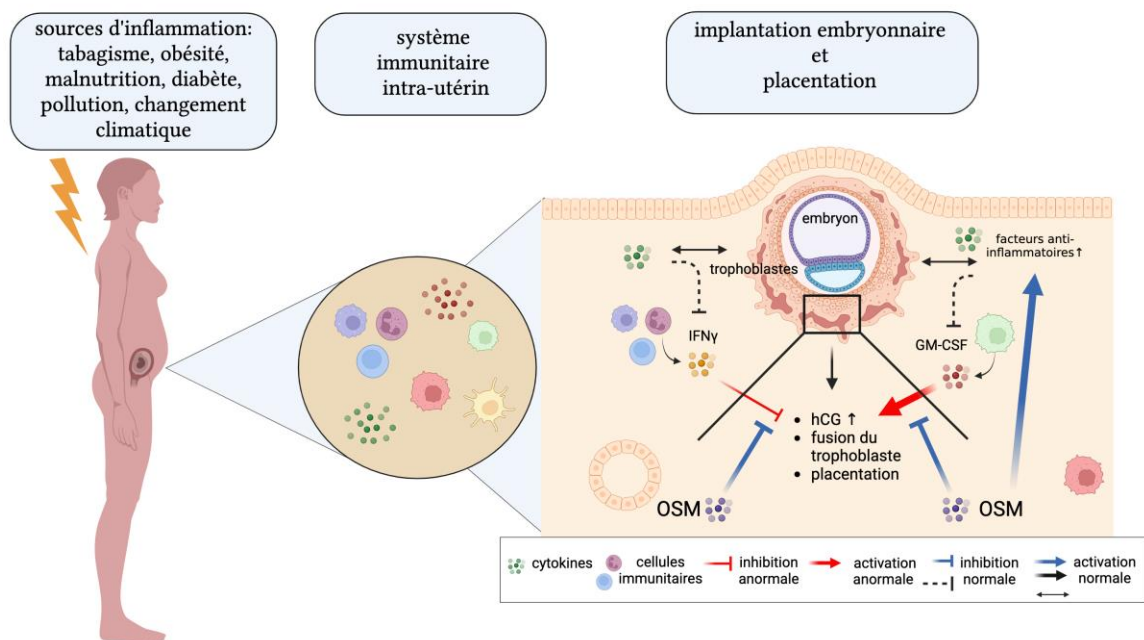


Figure 15 : Effets régulateurs de l'OSM sur l'activité pro-inflammatoires de l'IFN- γ et du GM-CSF dans les trophoblastes lors de l'implantation embryonnaire.

Dans un second temps, nous avons mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires du LIF et de l'OSM dans le remodelage de l'environnement immunitaire intra-utérin et la polarisation des macrophages péritonéaux lors d'une infection bactérienne.

L'ensemble de ces travaux nous ont permis de démontrer l'effet immunomodulateur et anti-inflammatoire de l'OSM, tout comme du LIF, sur les populations cellulaires présentes à l'interface fœto-maternelle. Ces effets régulateurs dépendraient essentiellement de l'activation du facteur de transcription STAT3, principalement impliqué dans la différenciation trophoblastique, la prolifération cellulaire, la régulation de l'inflammation, ainsi que dans l'expression et l'activité de facteurs immunotolérants. Dans l'environnement intra-utérin, ou à l'interface fœto-maternelle, ces processus précédemment cités sont complémentaires et inhérents au maintien des fonctions utérines nécessaires à l'établissement de cette interface ainsi que le maintien de la grossesse. C'est pourquoi, face aux pathologies liées à l'inflammation endométriale, l'utilisation de l'OSM et du LIF représenterait une alternative thérapeutique dans la réparation des tissus endométriaux et la régulation de l'activité inflammatoire des macrophages endométriaux.

9.1.2 Effet immunomodulateur de l'OSM dans les trophoblastes humains lors d'un stress inflammatoire induit par l'IFN- γ /STAT1 et le GM-CSF/STAT5.

9.1.2.1 STAT3, pilier de l'effet immunomodulateur de l'OSM dans les trophoblastes humains.

Inhibition de la voie de signalisation IFN- γ /STAT1 par l'activation de STAT3 via l'OSM dans le modèle in vitro des cytotrophoblastes humains BeWo.

L'IFN- γ joue un rôle crucial durant le premier trimestre de grossesse, en particulier dans la régulation de l'invasion du trophoblaste. Sécrété principalement par les cellules NK déciduales et les trophoblastes eux-mêmes soit les EVT, l'IFN- γ influence de manière significative les processus d'invasion trophoblastique et le développement du placenta [94].

Des études, qui ont d'ailleurs conduit notre choix de cytokines pro-inflammatoires, ont suggéré que des niveaux élevés d'IFN- γ dans le contexte de la grossesse peuvent contribuer à des réponses immunitaires inappropriées, entraînant une invasion trophoblastique insuffisante et une implantation défectueuse [120]. Par exemple, une étude a observé que l'IFN- γ , en synergie avec d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , peut exacerber l'inflammation au niveau de l'interface fœto-maternelle, ce qui pourrait compromettre la santé de la grossesse au travers du développement de pathologies gestationnelles telle que la prééclampsie où l'invasion trophoblastique est souvent insuffisante [120]. Dans ce contexte, nos études ont apporté des éléments supplémentaires concernant les problèmes d'invasion trophoblastique induits par l'IFN- γ via l'activation de STAT1. En effet, rappelons qu'au cours de l'invasion du trophoblaste, l'hCG, en particulier la hCG hyperglycosylée (H-hCG), favorise la migration des cellules EVT dans la décidue, ainsi que la colonisation et le remodelage des artères spiralées, transformant ces vaisseaux en structures à faible résistance et de plus grand diamètre. La croissance fœtale, fortement dépendante de la disponibilité des nutriments, est compromise par l'altération de l'invasion trophoblastique et du remodelage des artères spiralées, ce qui entraîne une perfusion placentaire défectueuse et une restriction de la croissance fœtale [121]. Ainsi, notre étude a établi un lien direct entre les pathologies gestationnelles associées à une diminution de l'hCG et

l'expression de l'IFN- γ . Cependant, une question demeure sur le mécanisme exact de l'activité de STAT1 sur l'inhibition de l'expression de l'hCG dans les trophoblastes. Y a-t-il une implication directe dans la voie de signalisation de hCG ? De plus, nos résultats ont confirmé, dans un modèle de syncytiotrophoblaste, que l'activation de STAT1 par l'IFN- γ augmente l'expression de l'E-cadhérine. Ce phénomène avait déjà été observé dans un modèle de trophoblaste EVT, les HTR8/svneo [122].

Notre étude s'est concentrée sur l'activation de STAT1, principalement induite par l'IFN- γ , qui peut entraîner des complications de grossesse. Nos résultats montrent que l'activation de STAT3 par l'OSM constitue une voie clé pour réguler STAT1, en prévenant ou en inhibant les effets néfastes de l'IFN- γ . Dans notre article, nous mettons en avant l'expression de médiateurs transcriptionnels et immunologiques comme mécanismes intracellulaires responsables de cette régulation. Toutefois, certains points restent à clarifier quant à la régulation de STAT1 par l'activité de STAT3. En effet, certains de nos résultats ont révélé une augmentation de l'expression de STAT3 total dans les échantillons prétraités par l'OSM et activés par l'IFN- γ (Chap. II, article 1, Fig, 7A, C, E). Cette augmentation de STAT3, total et phosphorylé, s'accompagne de l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 (Chap. II article 1, Fig, 6A, B). Cette observation suggère une potentielle hétérodimérisation de STAT1 par STAT3, empêchant ainsi la translocation de STAT1 vers le noyau, un mécanisme cellulaire également décrit dans l'activité intra-cellulaire des cytokines de la famille des IL-6 [123] (figure 15). Cette hypothèse pourrait également être corroborée par la perte de régulation de la voie OSM/STAT3 dans les cellules BeWo shSTAT3, où la diminution de l'expression de STAT3 semble directement liée à l'absence de régulation de STAT1, pouvant résulter d'une non-dimérisation de STAT1 et STAT3. Cela entraînerait le maintien de l'activité de l'IFN- γ /STAT1, même après un prétraitement à l'OSM.

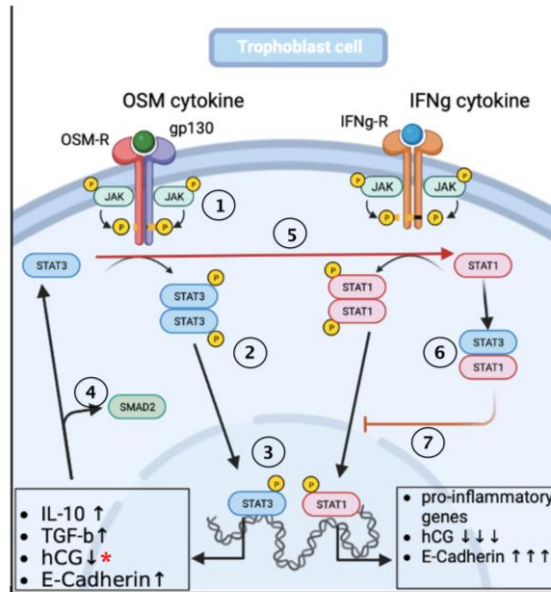


Figure 16 : Mécanisme de régulation hypothétique de l'OSM dans la régulation de STAT1 par STAT3 au travers de la formation d'hétérodimère STAT3/STAT1 dans les cellules SVT/BeWo. 1) OSM se lie à son récepteur OSM-R couplé au gp130 ; 2) induisant la phosphorylation et dimérisation de STAT3 qui migre dans le noyau ; 3) STAT3 phosphorylé se lie à l'ADN tant que facteur de transcription et induit l'expression de gènes favorisant l'expression d'IL-10 et TGF- β , régule l'expression de hCG et de l'E-cadhérine ; 4) l'expression de ces facteurs favorise l'activation de SMAD2 et STAT3 ; 5) STAT3 non-phosphorylé augmenté par l'activité d'OSM se lie à un monomère de STAT1 6) créant la formation d'un hétérodimère STAT3/STAT1 ; 7) cette conformation dimérique inhibe en partie la phosphorylation de STAT1 (p-STAT1) lors de l'activité de IFN- γ /STAT1 diminuant la migration de p-STAT1 dans le noyau, ayant pour conséquence l'inhibition des effets de IFN- γ /STAT1 sur la production de gènes pro-inflammatoires, la diminution de la sécrétion de hCG et l'augmentation drastique de l'E-cadhérine (Biorender).

À partir de cette hypothèse, il serait pertinent d'envisager une coprécipitation des protéines STAT1 et STAT3 afin de vérifier leur dimérisation dans notre modèle cellulaire. De plus, rappelons que notre modèle cellulaire présente des particularités liées à sa nature tumorale. En effet, les cellules BeWo, issues de choriocarcinome humain, peuvent exhiber des mécanismes cellulaires spécifiques aux cellules tumorales, qui ne sont pas nécessairement représentatifs des trophoblastes normaux. Néanmoins, les cellules BeWo restent un modèle cellulaire largement utilisé pour l'étude des fonctions trophoblastiques, notamment en ce qui concerne les processus de fusion et la production de hCG. Les critères justifiant le choix de ce modèle expérimental seront ultérieurement discutés.

Interactions entre les voies de signalisation STAT5 et STAT3 indépendamment de du GM-CSF et de l'OSM dans le modèle in vitro des cytotrophoblastes humains BeWo.

Le GM-CSF est essentiel pour le développement normal du placenta et la croissance fœtale. Il est exprimé par les trophoblastes fœtaux et les cellules immunitaires dans la décidue pendant les premières phases de la grossesse [124]. Une régulation inadéquate du GM-CSF peut entraîner des complications telles que la prééclampsie, des avortements spontanés ou d'autres pathologies gestationnelles, en perturbant l'invasion trophoblastique, la vascularisation placentaire ou encore en favorisant le développement de choriocarcinome [125]. Des études cliniques ont montré que des niveaux élevés de GM-CSF dans le sérum sont fortement associés à des niveaux élevés de β hCG dans les cas de choriocarcinome progressif, ainsi notre étude est venue appuyer ces résultats qui établissent un lien entre l' β hCG et le GM-CSF dans le développement de pathologies gestationnelles [58]. Dans ces études, l'activation de STAT5 n'avait pas été systématiquement mise en avant, cependant d'autres travaux ont démontré une augmentation de STAT5 dans les cas de restriction de croissance fœtale intra-utérine [126]. Ces études ont souligné l'importance des STATs, notamment STAT3 et STAT5, dans le développement fœtal, avec des résultats obtenus à partir d'analyses de placentas issus de restriction de croissance fœtale intra-utérine [126]. Nos résultats concordent avec ces observations, car dans les cellules BeWo si-STAT3, une augmentation de la production de hCG a été rapportée, tout comme dans nos modèles shSTAT3 BeWo. De plus, Borg et al. a souligné l'augmentation de l'expression de STAT3 dans le STB du premier trimestre et dans le STB à terme, par rapport au CTB de la même période (figure 16) [126].

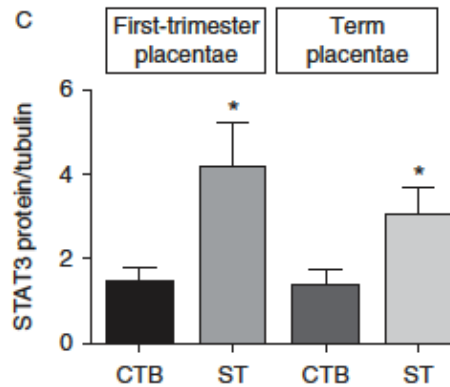


Figure 17 : Semi-quantification de la protéine STAT3 normalisée à la tubuline dans des CTB cultivés provenant de placentas de premier trimestre et à terme. L'astérisque (*) indique une augmentation significative des niveaux de STAT3 total dans les ST différenciés *in vitro* par rapport aux CTB ($P < 0,05$). [126]

Cette observation peut se raccrocher au fait que dans un contexte normal de grossesse, le niveau de hCG diminue progressivement au cours du second trimestre, ce qui pourrait être lié à l'augmentation progressive de l'expression de STAT3 dans les différents types de trophoblastes qui se développe au cours de la grossesse. Ainsi, dans notre étude, la perte de STAT3 accompagnée d'une surexpression de hCG démontre une perte de différenciation syncytiale, confirmant l'implication de STAT3 dans la différenciation trophoblastique. Cependant la question demeure quant aux mécanismes cellulaires directs sous-jacent à la répression de l'hCG par STAT3.

En revanche, notre étude peut laisser entrevoir une piste quant à ce mécanisme, notamment avec l'augmentation significative des niveaux de STAT5 total et phosphorylé. Nous avons ainsi mis en évidence un possible mécanisme de régulation entre STAT3 et STAT5 dans les cellules syncytiales, où l'expression de STAT3 semble maintenir un niveau normal d'activation de STAT5. De fait, la dysrégulation de STAT5 pourrait directement être associée à une surexpression de hCG dans les cas de restriction de croissance fœtale intra-utérine. Néanmoins, ce mécanisme semble totalement indépendant de l'activité de l'OSM, qui, bien qu'intervenant dans la régulation du GM-CSF, ne semble pas impliquer STAT3 dans ce processus. Cependant, la question du lien de régulation entre STAT3 et STAT5 reste ouverte, au-delà du simple recrutement de médiateurs transcriptionnels tels que les SOCS. En effet, l'inhibition de STAT5 est en partie médiée par l'expression de SOCS1 et SOCS2 [127]. Compte tenu de la nature de notre modèle cellulaire, BeWo, certaines hypothèses peuvent être formulées en se basant sur la voie de régulation de la syncytialisation décrite par Kusam et al. dans les BeWo (Figure 17) [128]. En effet, ces auteurs ont

démontré que l'activation de STAT5 induite par l'AMPc joue un rôle clé dans le processus de syncytialisation et la production de hCG dans les BeWo (figure 17). Dans cette signalisation, le facteur CREB active une voie parallèle à STAT5b, recrutant le facteur NR4A3 pour inhiber la phosphorylation de STAT5b (figure 17) [128].

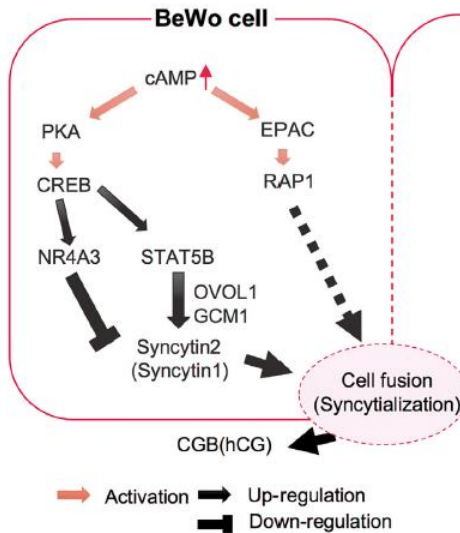


Figure 18 : Schéma illustrant les deux voies de signalisation de l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc -cAMP) impliquées dans la syncytialisation et la différenciation fonctionnelle des trophoblastes humains. L'AMPc intracellulaire active à la fois PKA et EPAC. PKA-CREB régule à la hausse STAT5B, ce qui augmente l'expression de syncytin-2 via GCM1 et OVOL1, entraînant la fusion cellulaire et la production de hCG, tandis que NR4A3, également régulé à la hausse par PKA-CREB, peut diminuer l'expression de syncytin-2. EPAC pourrait induire la fusion cellulaire et la production de hCG via l'activation de RAP1. [128]

Ainsi, une hypothèse serait que STAT3 pourrait stimuler l'activité de NR4A3 via une voie distincte, modulant ainsi l'activité de STAT5 lors de la différenciation des trophoblastes. Cependant, il faudrait vérifier l'expression du facteur NR4A3 dans les trophoblastes humains issus de lignées primaires ou de cellules souches de trophoblastes ou encore dans des explants placentaires provenant de grossesse normale ou présentant une restriction de croissance fœtale intra-utérine.

Si l'on revient à l'effet régulateur de l'OSM sur STAT5, indépendamment de STAT3, une autre hypothèse peut être envisagée. Lors de nos expérimentations, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation du facteur de transcription *C-AMP Response Element-*

binding protein (CREB) dans les cellules BeWo traitées avec l'OSM et différenciées grâce à la forskoline (FK). Selon la voie de signalisation proposée par Kusama et al., dans les BeWo, l'OSM pourrait induire ou renforcer la phosphorylation de CREB, ce qui activerait le facteur NR4A3, réduisant ainsi l'activation de STAT5 par le GM-CSF (figure 18) [128]. Dans un contexte physiologique normal, la régulation de la voie STAT5 pourrait dépendre de plusieurs mécanismes intracellulaires, incluant STAT3. L'OSM viendrait alors renforcer cet effet régulateur. Cependant, en cas de perte de l'expression de STAT3, l'OSM pourrait continuer à réguler l'expression de STAT5 via la phosphorylation de CREB et potentiellement par l'intermédiaire du facteur NR4A3.

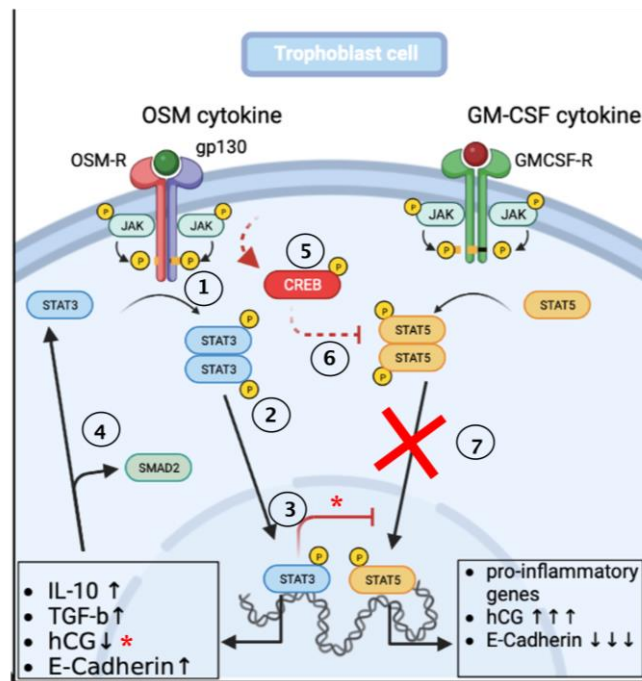


Figure 19 : Mécanisme de régulation hypothétique de l'OSM dans la régulation de STAT5 par STAT3 ou p-CREB dans les cellules VST/BeWo. 1) OSM se lie à son récepteur OSM-R couplé au gp130 ; 2) induisant la phosphorylation et dimérisation de STAT3 qui migre dans le noyau ; 3) STAT3 phosphorylé se lie à l'ADN en tant que facteur de transcription et induit l'expression de gènes favorisant l'expression d'IL-10 et TGF-β, régule l'expression de hCG et de l'E-cadherine ; 4) l'expression de ces facteurs favorise l'activation de SMAD2 et STAT3 ; 5) OSM induit la phosphorylation de CREB (p-CREB) en parallèle de STAT3 ; 6) l'activation de p-CREB induit une inhibition directe ou indirecte de la voie GM-CSF/STAT5 ; 7) cette inhibition de GM-CSF/STAT5 inhibe p-STAT5 ainsi que sa migration au noyau et inhibe ses effets sur la production de gènes pro-inflammatoires, l'hyper sécrétion de hCG et la diminution importante d'E-cadherine. De plus * souligne qu'indépendamment de l'OSM, STAT3 inhibe la voie STAT5 (voir figure 16). (Biorender)

9.1.3 Étudier les effets immunomodulateurs de l'OSM au travers de modèles de fusion trophoblastiques in vitro.

Au début de cette étude, nous avons comparé la réponse à l'OSM dans plusieurs lignées cellulaires trophoblastiques immortalisées, telles que JEG-3, HTR8/SVneo et BeWo. Ces résultats préliminaires ont permis d'établir la cinétique de l'OSM sur les voies de signalisation STAT3, STAT1 et STAT5 activées par ce facteur. Toutefois, le modèle BeWo s'est révélé le plus pertinent en raison de sa cinétique adéquate pour les voies d'intérêt, comme présenté dans notre première étude (Chapitre II, article 1, figure 3). Par ailleurs, les cellules HTR8/SVneo, n'étant pas un modèle de fusion trophoblastique, auraient été plus appropriées pour une étude de l'invasion trophoblastique, comparable à celle des trophoblastes extravilleux [36].

Nous avons écarté les cellules JEG-3 car, en ce qui concerne la production de hCG et le processus de syncytialisation, les cellules BeWo se sont avérées beaucoup plus adaptées, notamment pour l'analyse de l'expression de l'E-cadhérine [35] et la quantité de hCG sécrétée, des caractéristiques cellulaires qui sont également confirmées dans des études comparatives entre des lignées de trophoblastes immortalisées [116]. Notre choix des Bewo comparé à celui de trophoblastes primaires se justifie par leur accessibilité, ainsi que par la facilité avec laquelle il est possible d'induire leur différenciation trophoblastique (juste 48h de traitement à la FK comparé à 4 jours), incluant à la fois la différenciation morphologique (syncytialisation et fusion) et biochimique (production de hCG) [34]. En effet, l'utilisation de certains modèles cellulaires, tels que les trophoblastes primaires, les cellules souches de trophoblastes ou les explants placentaires, requiert non seulement un accès privilégié et des collaborations avec des centres cliniques, mais aussi du matériel supplémentaire pour adapter les protocoles de culture cellulaire. Cela inclut l'emploi de milieux de culture spécifiques, de matériel plastique adapté et de supports comme le collagène, essentiels pour la culture de trophoblastes primaires (TP) ou de cellules souches de trophoblastes (CST) [34]. C'est pourquoi, pour cette étude « pionnière » sur le rôle de l'OSM nous avons opté pour les BeWo. De plus, les études précédentes menées par notre laboratoire ont utilisé ce modèle cellulaire, ce qui nous a permis de comparer indirectement l'effet immunomodulateur de l'OSM à celui du LIF dans un cadre plus ou moins similaire en présence des facteurs inflammatoires, l'IFN- γ et le GM-CSF [7, 107].

Néanmoins, l'utilisation de TP et de CST, serait davantage pertinente pour de prochaines études. De plus, l'utilisation de ces modèle humains de trophoblaste est à privilégier dans le cadre de l'étude de la différenciation trophoblastique précoce, car les trophoblastes de rongeurs, notamment de souris, ne représente pas l'ensemble des mécanismes de différenciation observées chez l'humain [34]. En cherchant dans la littérature, peu d'études ont été réalisées avec des TP ou des CST et l'OSM, rendant nécessaire des travaux supplémentaires similaires à notre protocole pour confirmer nos observations. De plus, notre étude se distingue par l'utilisation simultanée de plusieurs cytokines, ce qui permet d'explorer les interactions complexes entre ces cytokines à l'interface fœto-maternelle. Dans ce contexte, l'utilisation de trophoblastes primaires (TP) ou de cellules souches trophoblastiques (CST) permettrait de développer des modèles *in vitro* plus complexes pour mieux modéliser l'interface fœto-maternelle [35]. Ces modèles, notamment les cultures en 2D ou 3D, pourraient recréer les différents stades de différenciation et types de trophoblastes, tout en étudiant le rôle des cytokines, comme l'OSM, dans des conditions proches des interactions cellulaires et moléculaire que l'on retrouve dans de l'environnement l'interface fœto-maternelle humain, notamment lors de l'implantation embryonnaire. Il est important de reconnaître que cette étape cruciale de la grossesse humaine demeure encore largement inexplorée, en raison des défis liés à l'exécution du phénomène en laboratoire.

9.1.4 Effet immunomodulateur de l'OSM et de LIF dans les macrophages péritonéaux et dans l'environnement immunologique intra-utérin murin lors d'un stress inflammatoire induit par le LPS.

9.1.4.1 Modèles murins d'inflammation intra-utérine pathologique.

Cette seconde étude a permis de démontrer et de déterminer de manière distincte le rôle et les effets anti-inflammatoires des cytokines LIF et OSM dans l'environnement intra-utérin et dans les macrophages péritonéaux dans un contexte d'endométrite induite par le LPS. Dans cette étude prochainement publiée, nous avons opté pour un modèle murin afin de valider nos observations *in vitro* concernant les effets immunomodulateurs du LIF et de l'OSM. Bien que ce modèle ne permette pas de confirmer les effets sur les trophoblastes *in vivo*, car il s'agit de souris non-gestantes, il offre néanmoins l'opportunité d'étudier les interactions entre les différentes populations cellulaires intra-utérines et les macrophages impliqués dans la réponse inflammatoire

dans ce même environnement. Ainsi, nous avons réorienté nos recherches vers les pathologies gynécologiques, telles que l'endométrite chronique (EC), caractérisée par une inflammation intra-utérine persistante. Dans ce contexte, l'utilisation de LPS dans notre modèle murin s'avère particulièrement pertinente, car il est associé à des infections bactériennes, une cause fréquente d'endométrite chronique ou post-partum, souvent induite par des bactéries opportunistes provenant du tractus génital et générant une inflammation utérine. Dans notre modèle, l'inflammation intra-utérine induite par le LPS s'est manifestée par des œdèmes au niveau de l'endomètre, des zones hémorragiques, une désorganisation dans la maturation des cellules épithéliales et stromales, ainsi qu'une infiltration importante de cellules inflammatoires plasmatiques, des caractéristiques typiques de l'EC. Il est bien établi que ces altérations du microenvironnement endométrial peuvent affecter négativement la réceptivité utérine [129]. De plus, les souris utilisées dans cette étude étaient vierges et n'avaient jamais été gestantes, ce qui signifie que les observations effectuées au niveau utérin ne pouvaient pas résulter de précédentes gestations. Cependant, un point à considérer dans cette expérimentation est le manque de synchronisation des cycles œstraux des souris avant les différents traitements. En effet, les modifications morphologiques et fonctionnelles de l'endomètre en fonction de la phase œstrale pourraient interférer avec certaines de nos observations. Pour cette raison, nous avons choisi de ne pas inclure certains marqueurs influencés par les hormones sexuelles (progestérone et œstrogène) et le cycle œstral [130]. Aussi, bien que la détection des récepteurs de la progestérone (r-PR) aurait également pu être pertinente, nous avons également décidé de l'écarter en raison de la synchronisation des cycles. Nous avons tout de même tenté l'analyse de l'expression du r-PR pour immunohistochimie, malheureusement le résultat a été peu fructueux. Néanmoins cette dernière observation aurait été très pertinente, étant donné que des études rapportent l'effet de LIF sur la régulation de la progestérone en présence du LPS dans un modèle murin en gestation, nous aurions pu comparer et proposer, l'effet son effet ainsi que celui l'OSM dans un contexte hors gestation [6].

En plus de l'EC, l'endométriose constitue également une pathologie inflammatoire utérine majeure. Il serait donc pertinent d'utiliser un modèle murin d'endométriose dans lequel LIF et OSM seraient injectés, afin d'étudier leur potentiel immunorégulateur dans ce contexte inflammatoire, qui diffère de celui de l'endométrite. L'endométriose se différencie en effet de l'endométrite, étant donné l'origine de l'inflammation et les symptômes associés. L'endométriose

est une maladie dans laquelle les cellules endométriales migrent en dehors de la cavité utérine et forment des « implants » qui colonisent les tissus distaux, comprenant : les trompes de Fallope, les ovaires et le péritoine. De plus, contrairement à l'endométrite, la croissance des implants endométriaux est dépendante des œstrogènes. Cependant, tout comme l'endométrite chronique, l'endométriose est fréquente chez les patientes souffrant d'infertilité [131]. Les causes d'infertilité liées à l'endométriose sont souvent attribuées à une diminution de la régénération du tissu endométrial en raison d'une inflammation chronique. Dans ce contexte, les problèmes d'infertilité rappellent ceux de l'endométrite, avec une altération de la réparation du tissu endométrial compromettant ainsi la réceptivité optimale de l'utérus lors de l'implantation embryonnaire. Certains groupes de recherche ont développé un modèle murin d'endométriose reproduisant le phénotype humain, mettant en évidence le rôle de l'inflammation endométriale dans le développement de cette pathologie [132]. Ce modèle murin dépend de deux groupes : des souris donneuses, chez lesquelles la décidualisation est induite dans l'une des cornes utérines pour récupérer du tissu décidualisé, qui est ensuite réintroduit chez des souris receveuses dans la cavité péritonéale. Ce transfert de tissu décidual s'apparente au phénomène de menstruation rétrograde dans la cavité péritonéale. En effet, contrairement aux humains, les souris ne subissent pas de décidualisation spontanée à chaque cycle menstruel, d'où la nécessité de stimuler ce processus [132]. Dans ce processus inflammatoire, les auteurs interpellent sur le rôle des œstrogènes, un facteurs inhérent au développement de l'endométriose, soit une implication du système endocrinien utérin. D'ailleurs, de nombreuses thérapies reposent sur cette stratégie, mais elles entraînent souvent des effets secondaires importants sans garantir une efficacité notable. C'est pourquoi il serait intéressant d'intégrer LIF et OSM dans une étude utilisant ce type de modèle. De plus, les auteurs de cette étude soulignent le rôle des macrophages péritonéaux dans le développement et le maintien de l'inflammation, à la fois dans la cavité péritonéale et l'utérus dans cette pathologie utérine [132].

9.1.4.2 Régulation de l'inflammation médiée par l'OSM et le LIF, dans les macrophages péritonéaux activés par le LPS.

Comme mentionné précédemment, les macrophages péritonéaux jouent un rôle central dans l'inflammation des tissus utérins [132]. De plus, les études soulignent l'implication de l'EC dans la production anormale de cytokines, l'altération des fonctions endométriales due à un schéma anormal des populations leucocytaires de l'endomètre, entraînant une altération de la sécrétion de facteurs paracrines impliqués dans la réceptivité endométriale [129]. C'est pourquoi, les macrophages ont été l'une des populations cellulaires portée en étude lors de mon projet doctoral. L'analyse moléculaire des macrophages péritonéaux dans cette étude a révélé non seulement la régulation de iNOS et Arg-1 par OSM et LIF, mais a également permis de confirmer l'implication de STAT3 et SMAD2 dans le rôle immunorégulateur de l'OSM en réponse à un stress cellulaire autre que l'IFN- γ et le GM-CSF. Ces mécanismes sont similaires à ceux observés dans notre première étude sur les trophoblastes [133]. Il est essentiel de souligner que les trophoblastes adoptent un comportement comparable à celui des cellules immunitaires à l'interface fœto-maternelle. Ils jouent un rôle clé dans la régulation des réponses immunologiques de la grossesse en produisant divers médiateurs immunitaires particulièrement impliqués dans les phases cruciales de l'implantation embryonnaire et de la placentation, assurant ainsi un environnement immunologique favorable au développement fœtal [134]. Par conséquent, le mécanisme que nous avons observé chez les macrophages péritonéaux pourrait également inclure la production de facteurs immunomodulateurs tels que l'IL-10 ou le TGF- β détectés par PCR dans notre première étude dans les trophoblastes.

Nous avons effectivement tenté de valider ces hypothèses par PCR, mais aucune régulation des gènes *il-10* et *tgf- β* n'a été confirmée lors de nos analyses. Ainsi, l'utilisation de la RT-qPCR, permettrait d'optimiser le protocole et apporter de plus amples précisions quant à l'expressions de cytokines régulées par OSM ou LIF en présence du LPS dans un modèle *in vivo*. Pour ce type d'analyse, il serait pertinent dans le futur de réaliser un suivi temporel de l'expression des gènes des cytokines afin d'établir une cinétique de l'activité de l'OSM et du LIF *in vivo* dans les macrophages péritonéaux et les tissus utérins à différents temps post-traitement : 30min, 1h, 2h, 4h, ...12h et 24h. En effet, l'expression des cytokines varie en fonction de l'évolution de l'inflammation, de la phase précoce à la phase tardive, ce qui peut induire une large gamme de

phénotypes macrophagiques, exprimant différents marqueurs ou facteurs immunorégulateurs à des niveaux variés [135]. Les variations observées dans l'expression des gènes, en particulier des cytokines ou des facteurs immunitaires, seraient représentatives de la progression phénotypique des macrophages et de l'inflammation.

COX-2 induit par STAT3, un potentiel intervenant anti-inflammatoire induit par LIF et OSM durant le stade tardif de l'inflammation induite par le LPS dans les macrophages péritonéaux

Dans le contexte de l'inflammation induite par le LPS, l'activation du récepteur TLR-4 entraîne l'expression de iNOS et de COX-2. Des études menées sur des macrophages murins ont démontré que la phosphorylation de STAT3 peut inhiber ces deux facteurs pro-inflammatoires, iNOS et COX-2, selon le stade de l'inflammation, qu'il soit précoce ou tardif [136]. Cependant, dans notre deuxième étude, nous avons observé que bien qu'OSM et LIF induisent la phosphorylation de STAT3 et inhibent iNOS, ils entraînent également une augmentation de l'expression de COX-2 (Chap III, article 2, Fig.6 A, D). COX-2, induit par STAT3, est également reconnu pour son rôle dans l'angiogenèse [137, 138]. Cela nous permet de proposer l'hypothèse qu'au stade tardif de l'inflammation, LIF et OSM activent STAT3 pour induire l'expression de COX-2, favorisant potentiellement l'angiogenèse. En revanche, au stade précoce, l'activation de STAT3 par LIF et OSM pourrait réduire l'expression de COX-2 au même titre que iNOS afin de limiter l'inflammation. Ces hypothèses nécessitent toutefois d'être validées par un suivi temporel dans le cadre expérimental. De plus, ces observations confirment la complexité de l'activité pléiotropique de ces deux molécules immunorégulatrices.

CD163, possiblement associé à l'activation de SMAD2 dans un axe de régulation OSM/STAT3/TGF- β /SMAD2 dans les macrophages anti-inflammatoires.

Dans notre étude, nous avons montré que l'OSM induisait l'expression de CD163 chez les macrophages péritonéaux, contrairement au LIF (Chap III, article 2, figure 8B). Ce marqueur est non seulement associé à l'activité anti-inflammatoire des macrophages, correspondant à un phénotype M2, mais il est également présent chez les macrophages intra-utérins [73]. Dans nos analyses, nous avons également souhaité évaluer l'expression de ce marqueur dans les tissus utérins. Cependant, les anticorps disponibles n'étaient malheureusement pas adaptés pour réaliser des analyses immunohistochimiques. Ce qui aurait permis de déterminer non seulement l'effet de LIF et OSM sur les macrophages endométriaux, mais aussi, en partie, l'infiltration de

macrophages péritonéaux M2 dans les tissus endométriaux. Cela dit, ces résultats soulèvent une question intéressante : étant donné que le CD163 n'est exprimé qu'en présence d'OSM, il ne semble pas être régulé par la voie STAT3, car il serait alors également exprimé en présence de LIF. Ainsi, cela suggère que l'expression de CD163 soit plutôt régulée par des facteurs dépendants de SMAD2, comme le TGF- β , potentiellement induit par l'OSM dans les macrophages. En effet, la régulation du CD163 induite par l'OSM dans les macrophages, est un fait rapporté dans la littérature [139]. Cependant le mécanisme cellulaire sous-jacent à cette activité de l'OSM, ou de la régulation du CD163 n'est pas établie. Notre étude ouvre ainsi une piste à explorer quant au mécanisme de régulation de CD163 par l'activité de l'OSM au travers d'un axe hypothétique : OSM/STAT3/TGF- β /SMAD2/CD163.

Dans la littérature, il est bien établi que la différenciation des macrophages M2 suit un spectre complexe, plutôt qu'une simple classification binaire [73]. Le but de mon projet de doctorat n'était pas nécessairement de caractériser en détail les sous-types de macrophages M2 induits par l'OSM par rapport au LIF. Cependant, au regard des éléments précédemment évoqués, on peut émettre l'hypothèse que l'OSM favorise l'induction d'un phénotype M2c chez les macrophages anti-inflammatoires. En effet, ces macrophages sont principalement activés par l'expression de l'IL-10 et du TGF- β (figure 19) [135], et expriment exclusivement le CD163. Leur fonction est liée à la résolution de l'inflammation ainsi qu'à la réparation tissulaire [140]. Tandis que LIF pourrait favoriser l'induction d'un type de macrophages M2b, dont l'activité est associée aux cytokines IL-4 et IL-13 [135] (figure 19), ainsi qu'à l'expression du CD206 plutôt que du CD163. Il est intéressant de noter que ces deux types de macrophages M2 n'interviennent pas au même stade de l'inflammation. En effet, les macrophages M2a/b sont principalement exprimés et actifs au début de l'inflammation (stade précoce), tandis que les M2c prédominent durant la phase tardive, lors de la résolution de l'inflammation [135]. Cette observation est d'autant plus pertinente lorsqu'on la relie à l'expression de COX-2, précédemment décrite qui est plus prononcée en présence de l'OSM par rapport au LIF dans nos résultats (Chap III, article 2, fig. 7). Cela suggère fortement que l'OSM induit une résolution plus rapide de l'inflammation que le LIF au travers d'un phénotype plus mature de macrophages M2 au travers de l'expression de COX-2, IL-10 et TGF- β .

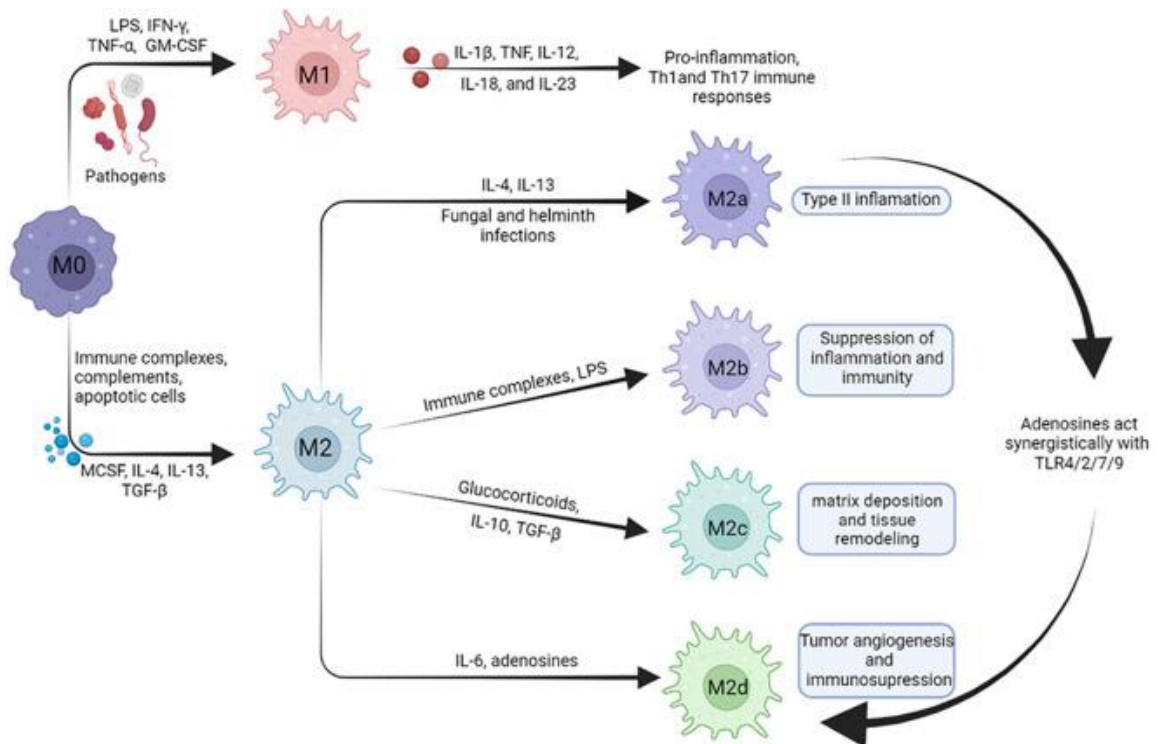


Figure 20 : Plasticité et polarisation des macrophages M1 ou M2 en réponse à des signaux spécifiques de leur microenvironnement. Les macrophages M1, caractérisés par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de médiateurs inflammatoires, favorisent les lésions tissulaires et une réponse inflammatoire intense. Les macrophages M2 se divisent en sous-types : M2a, M2b, M2c et M2d. Dans certaines conditions, M2a peut évoluer en M2d. Les M2a sont impliqués dans l'inflammation de type II, les M2b dans la suppression de l'inflammation et de la réponse immunitaire, les M2c dans le remodelage tissulaire et les M2d dans l'angiogenèse tumorale et l'immunosuppression. [135]

Pour valider ces hypothèses, des analyses complémentaires seraient particulièrement utiles. Cela inclue la détection des cytokines IL-10, TGF-β, IL-4 et IL-13 par RT-qPCR ou par immunodétection via des tests ELISA. De plus, la détection du marqueur CD206 par immunofluorescence aurait également été pertinente, bien que ce dernier puisse également être exprimé par les macrophages de type M2c.

9.1.5 Effets complémentaires de LIF et OSM, dans la progression de l'inflammation intra-utérine.

Au cours de cette deuxième étude, les populations cellulaires de l'environnement intra-utérin ont également été partiellement analysées. Les résultats ont montré qu'à l'instar du LIF, l'OSM possède également un effet immunorégulateur au sein de l'utérus. Bien que l'OSM soit généralement reconnu comme étant sécrété par les cellules déciduales et son effet anti-inflammatoire établi dans l'utérus, son impact comparé au LIF lors d'un stress inflammatoire à l'interface fœto-maternelle reste peu connu. Dans un premier temps, nos résultats ont démontré que tout comme LIF, OSM inhibe la production de iNOS et favorise celle de l'Arg-1 dans la résolution de l'inflammation intra-utérine (Chap III, article 2, Fig 3B, C).

Cependant certains résultats obtenus durant mon second projet, mais non-inclus dans l'article 2, car non confirmés pour le moment, semblent montrer des variations dans la régulation du facteur vasculaire CD31 entre LIF et OSM (figure 20) [141]. Le CD31 semble significativement induit par le LIF et semble moins augmenté avec l'OSM (figure 19). Ce paramètre revêt un intérêt particulier, et mériterait confirmation, en effet, le facteur CD31 n'assume pas les mêmes fonctions selon son stade d'apparition durant l'inflammation. Au début de l'inflammation, il induit le recrutement des leucocytes sur le site inflammatoire et favorise la réponse aux facteurs pro-inflammatoires [142]. À mesure que l'inflammation progresse, CD31 joue plutôt un rôle dans sa résolution, en facilitant les processus d'angiogenèse pour la réparation tissulaire.

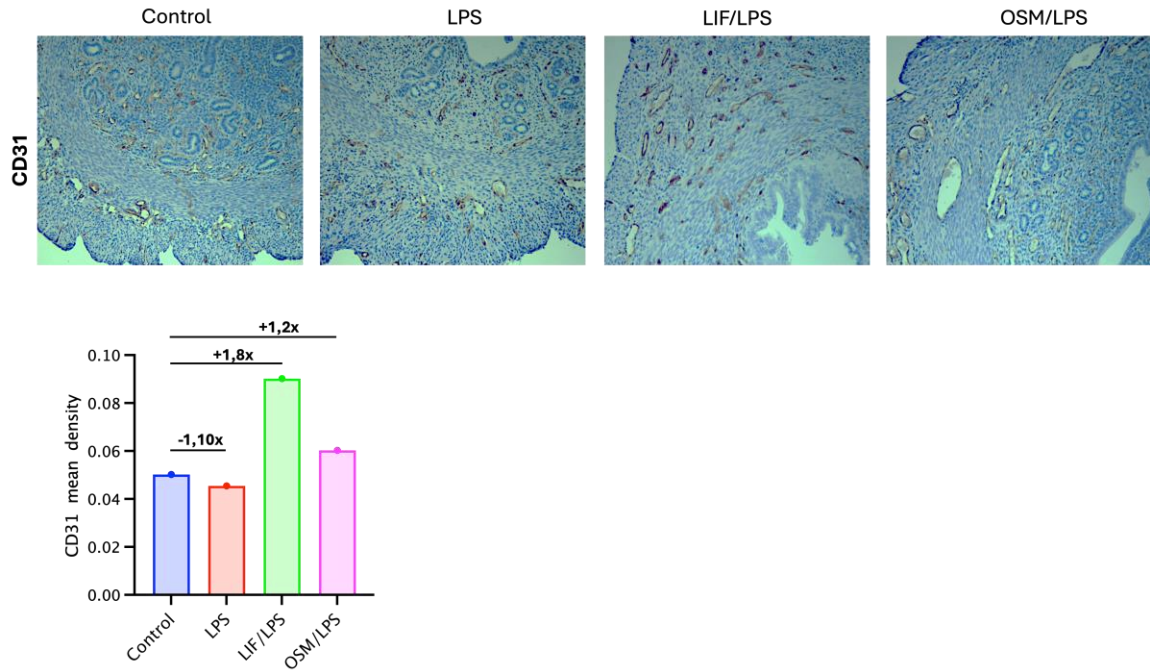


Figure 21 : Augmentation du CD31 dans les tissus utérins avec LIF et OSM. Résultat préliminaire à confirmer.

Par ailleurs, certaines études soulignent également le rôle de CD31 dans l'expression des intégrines, des protéines essentielles lors de l'implantation, dont l'expression est également régulée par LIF [143]. Ainsi, durant la réponse inflammatoire intra-utérine, LIF induit l'expression du CD31. En revanche l'OSM n'induit pas une augmentation aussi importante du CD31 comparé au LIF, n'ayant pas réalisé les tests statistiques, il n'est pas possible de dire s'il s'agit néanmoins d'une augmentation significative par rapport au contrôle ou au LPS. Rappelons qu'en considérant les différentes observations de l'effet immunorégulateur de LIF durant cette étude, notamment l'hypothétique phénotype M2a associé au stade précoce de l'inflammation, il est raisonnable de penser que nous sommes dans une phase précoce de l'inflammation intra-utérine, d'où une augmentation de l'activité du CD31 induite par LIF. Ainsi, l'OSM pourrait réguler l'expression du CD31 au cours de l'inflammation, conférant ainsi un effet angiogénique à ce marqueur au stade tardif de l'inflammation. On peut également supposer une complémentarité dans les effets du LIF et de l'OSM sur l'activité et l'expression du CD31 pendant la réponse inflammatoire intra-utérine.

Bien que notre modèle murin ne soit pas directement lié au contexte d'implantation embryonnaire, d'après l'expression du CD31, on pourrait suggérer un rôle complémentaire de l'OSM par rapport au LIF dans la progression de l'inflammation à l'interface fœto-maternelle,

notamment lors de l'implantation embryonnaire. L'hypothèse suivante pourrait émerger : le LIF induit l'expression du CD31, facilitant ainsi le recrutement de leucocytes, y compris des macrophages, à l'interface fœto-maternelle pour favoriser l'implantation embryonnaire, ce qui nécessite une régulation adéquate de cette phase transitoire inflammatoire. Dans ce cadre, le LIF stimule également l'expression de l'OSM, qui à son tour régule l'expression du CD31, induisant son activité angiogénique tout en maintenant un profil anti-inflammatoire, notamment par l'activation des macrophages M2c pour mener à la résolution de l'inflammation intra-utérine.

Par ailleurs, la complémentarité entre le LIF et l'OSM dans la modulation de la réponse inflammatoire pourrait être influencée par leurs demi-vies respectives *in vivo*. Le LIF présente une demi-vie relativement courte, limitant ainsi la durée de son action. Instable dans le plasma, il est rapidement dégradé et éliminé par l'organisme, avec une demi-vie d'environ 30 minutes observée chez les modèles animaux et humains. À l'inverse, l'OSM a une demi-vie plus longue, comprise entre 1 et 2 heures, selon les conditions expérimentales [144] [110]. Cette meilleure stabilité pourrait être liée à divers facteurs, notamment les récepteurs auxquels il se lie, ses mécanismes de dégradation, ainsi que sa structure moléculaire. De paramètres physiologiques et moléculaires qui pourrait éventuellement être discutés en vue de stratégies thérapeutiques potentielles.

9.2 Perspectives

Étant donné l'ensemble des résultats présentés, plusieurs perspectives pourraient représenter un intérêt réel pour confirmer ces résultats et approfondir l'étude de l'OSM et du LIF. Ces perspectives pourraient se concrétiser par des expériences *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*.

Dans l'immédiat, la perspective expérimentale la plus pertinente serait l'utilisation d'un modèle murin OSM K.O. Cela permettrait de démontrer le rôle crucial de l'OSM dans la régulation de l'inflammation à l'interface foeto-maternelle, en complémentarité avec le LIF. En effet, des modèles murins LIF K.O ont déjà mis en évidence l'importance du LIF dans l'implantation embryonnaire, l'absence de LIF entraîne une perte embryonnaire. Mais qu'en serait-il avec la présence de LIF et l'absence d'OSM ? L'implantation embryonnaire se déroulerait-elle malgré tout ? Ce modèle permettrait de montrer que, bien que le LIF soit essentiel pour initier l'implantation en activant les signaux anti-inflammatoires au stade précoce de l'inflammation, l'absence d'OSM pourrait compromettre la suite de la gestation. Cette approche offrirait une vision plus précise de la synergie et des interactions entre ces deux cytokines clés, tant dans l'implantation que dans la réponse inflammatoire.

Modèles in vitro.

Pour approfondir la compréhension des mécanismes sous-jacents à la contribution de l'OSM dans l'induction d'un environnement tolérogène à l'interface foeto-maternelle, il serait pertinent de mener des études *in vitro*. Celles-ci permettraient de modéliser l'interface humaine grâce à une co-culture de cellules trophoblastiques (CST) ou de trophoblastes primaires (TP) avec des cellules déciduales. Ces expériences pourraient éclairer le rôle précis de l'OSM dans les interactions cellulaires et la régulation immunitaire à l'interface foeto-maternelle. Cela permettrait d'étudier les interactions entre le LIF et l'OSM au sein de ces populations cellulaires. De plus, l'ajout de facteurs pro-inflammatoires serait particulièrement pertinent, en références aux études réalisées au cours de ma thèse, permettant d'offrir une meilleure compréhension du rôle du LIF et de l'OSM dans le réseau de facteurs immunomodulateurs induits lors de la réponse inflammatoire et de la différenciation des populations cellulaires de cette interface. Il s'agirait d'une étude fonctionnelle qui permettrait non seulement de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et cytokiniques

impliqués dans le développement de pathologies gestationnelles liées à l'inflammation, mais aussi d'optimiser l'élaboration de stratégies thérapeutiques. Cela pourrait ainsi améliorer les techniques de procréation médicalement assistée (PMA) ou de fécondation in vitro (FIV).

Modèles ex vivo.

Quant aux contextes expérimentaux *ex vivo*, l'utilisation de populations cellulaires provenant de placentas humains serait essentielle pour caractériser le rôle immunomodulateur du LIF et de l'OSM. Par exemple, l'utilisation d'explants ou de macrophages placentaires traités avec du LPS, de l'IFN- γ ou du GM-CSF permettrait de recréer des réponses inflammatoires similaires à celles observées lors des naissances prématurées ou des risques de restriction de croissance fœtale, il serait alors possible de définir l'effet de nos molécules à leur rencontre. Ce type d'étude avec les macrophages placentaires humains est d'autant plus pertinent, compte tenu de la nature spécifique de ces cellules. En effet, il est suggéré dans certaines recherches que les macrophages placentaires pourraient être d'origine embryonnaire. Par conséquent, leur réponse à l'OSM ou au LIF pourrait différer de celle des macrophages maternels. Cependant, très peu d'études ont exploré l'effet de ces cytokines sur les macrophages placentaires, ce qui rend ce domaine de recherche encore largement inexploré. Ce protocole expérimental pourrait prendre la forme d'une co-culture de macrophages placentaires avec des explants placentaires, afin d'étudier comment l'OSM et le LIF influencent le dialogue cellulaire entre ces deux populations, notamment dans des conditions de stress inflammatoire. Une telle approche permettrait de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ces cytokines contribuent à la modulation de la réponse immunitaire au sein du placenta.

Modèles in vivo.

L'utilisation de modèles *in vivo* serait particulièrement pertinente pour étudier les inflammations gestationnelles ou gynécologiques. En effet, nous avons déjà démontré le rôle anti-inflammatoire et immunorégulateur de l'OSM et du LIF chez des souris non gestantes, mais cela reste à confirmer pendant la gestation en présence de LPS, particulièrement pour l'OSM. Les injections de LPS permettraient de créer des modèles murins représentant des situations de naissances prématurées ou de prééclampsie. Ce type d'expérience viendrait créer un lien entre les deux études présentées dans ma thèse.

L'utilisation d'un modèle murin d'endométriose, serait particulièrement intéressant à explorer. En effet, dans ce modèle, tout comme chez les femmes atteintes de cette pathologie, des études ont mis en évidence une augmentation de l'expression du facteur CD31 au niveau des lésions [132]. Cela ouvre une piste de recherche intéressante concernant le rôle et l'effet de LIF et OSM dans ce contexte. En approfondissant cette approche, il serait possible d'étudier leur impact sur la régulation des œstrogènes dans un environnement inflammatoire intra-utérin. Ce point est particulièrement pertinent et pourrait avoir des répercussions non seulement dans le cadre de l'endométriose, mais également dans un contexte gestationnel, où l'équilibre hormonal joue un rôle crucial.

Contextes inflammatoires divers.

Enfin, les dernières perspectives que je souhaiterais aborder concernent les différentes sources de stress inflammatoires. Dans les études présentées, nous avons principalement exploré l'impact direct de facteurs pro-inflammatoires et de l'inflammation bactérienne. Cependant, il serait pertinent d'examiner d'autres sources pro-inflammatoires, telles que certains polluants environnementaux, notamment les nanoparticules de plastique capables de traverser la membrane placentaire et d'induire une inflammation placentaire. Bien que le rôle inflammatoire de ces polluants ait été démontré, la modulation de cette inflammation reste encore mal comprise. C'est pourquoi, dans ce mécanisme inflammatoire OSM et LIF pourraient occuper un rôle immunomodulateur à définir.

De plus, l'exploration de l'inflammation virale ou parasitaire serait tout aussi pertinente. En effet, les agents pathogènes du groupe TORCH représentent les principaux agents capables de franchir la barrière placentaire. Le rôle immunomodulateur du LIF et de l'OSM face à ces agents demeure peu étudié, notamment en ce qui concerne des virus comme le COVID-19 ou le Zika. Ce type d'expérimentations permettrait également de mieux définir l'effet de ces cytokines sur d'autres populations leucocytaires, telles que les cellules NK et les lymphocytes T.

Ainsi, l'ensemble ces possibles perspectives offrirait une vue d'ensemble du rôle immunorégulateur des facteurs gestationnels, comme le LIF et l'OSM, sur les différentes populations cellulaires de l'interface fœto-maternelle en réponse à différents stress inflammatoires.

9.3 Conclusion générale.

La présentation de l'ensemble de mes travaux, ainsi que la discussion approfondie dans ma thèse, nous permettent d'établir une conclusion globale sur le rôle et l'effet immunorégulateur de l'OSM dans les populations cellulaires qui composent l'interface fœto-maternelle.

En conclusion, l'OSM joue un rôle complémentaire indispensable au LIF dans la progression et le maintien de l'activité anti-inflammatoire dans les trophoblastes, les macrophages et le tissu intra-utérin : LIF intervient principalement au début de l'inflammation, favorisant une réponse anti-inflammatoire initiale, tandis que l'OSM prendrait le relais à des stades plus avancés pour conduire l'inflammation vers sa résolution et compléter les effets anti-inflammatoires amorcés par le LIF, principalement via les axes STAT3/IL-10 et TGF- β /SMAD2. Cette complémentarité pourrait également se manifester au niveau de l'utérus lors de l'implantation embryonnaire, un processus qui nécessite une inflammation transitoire et contrôlée, où LIF initierait la réaction anti-inflammatoire et OSM pourrait contribuer à sa progression et à son maintien.

Ainsi, bien que le LIF soit un facteur nécessaire, il ne peut à lui seul garantir le maintien de la gestation. En parti grâce à l'induction de l'OSM par ce dernier, les signaux tolérogènes sont renforcés à l'interface fœto-maternelle. Ainsi l'OSM joue un rôle crucial dans l'immunotolérance entre les populations cellulaires de l'environnement intra-utérin lors de la grossesse et devient également un facteur indispensable dans la régulation de l'inflammation intra-utérine.

9.4 Bibliographie

1. Ribatti, D., *Peter Brian Medawar and the discovery of acquired immunological tolerance*. Immunol Lett, 2015. **167**(2): p. 63-6.
2. Ashary, N., A. Tiwari, and D. Modi, *Embryo Implantation: War in Times of Love*. Endocrinology, 2018. **159**(2): p. 1188-1198.
3. Genest, G., et al., *Immunomodulation for unexplained recurrent implantation failure: where are we now?* Reproduction, 2023. **165**(2): p. R39-R60.
4. Mor, G., P. Aldo, and A.B. Alvero, *The unique immunological and microbial aspects of pregnancy*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(8): p. 469-482.
5. Gadiant, R.A. and P.H. Patterson, *Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury*. Stem Cells, 1999. **17**(3): p. 127-37.
6. Aisemberg, J., et al., *Progesterone is essential for protecting against LPS-induced pregnancy loss. LIF as a potential mediator of the anti-inflammatory effect of progesterone*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56161.
7. Hamelin-Morrisette, J., et al., *Leukemia inhibitory factor regulates the activation of inflammatory signals in macrophages and trophoblast cells*. Mol Immunol, 2020. **120**: p. 32-42.
8. Fu, T., et al., *Oncostatin M expression in the mouse uterus during early pregnancy promotes embryo implantation and decidualization*. FEBS Lett, 2019. **593**(15): p. 2040-2050.
9. Ko, H.S., et al., *The effects of oncostatin M on trophoblast cells: influence on matrix metalloproteinases-2 and -9, and invasion activity*. Placenta, 2012. **33**(11): p. 908-13.
10. Ogata, I., et al., *Oncostatin M is produced during pregnancy by decidual cells and stimulates the release of HCG*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(8): p. 750-7.
11. Chaiwangyen, W., et al., *Oncostatin M and leukaemia inhibitory factor trigger signal transducer and activator of transcription 3 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways but result in heterogeneous cellular responses in trophoblast cells*. Reprod Fertil Dev, 2016. **28**(5): p. 608-17.
12. Billington, W.D., *Origins and evolution of reproductive immunology: a personal perspective*. J Reprod Immunol, 2015. **108**: p. 2-5.
13. Rendell, V., N.M. Bath, and T.V. Brennan, *Medawar's Paradox and Immune Mechanisms of Fetomaternal Tolerance*. OBM Transplant, 2020. **4**(1).
14. Mor, G., *Introduction to the immunology of pregnancy*. Immunol Rev, 2022. **308**(1): p. 5-8.
15. Wegmann, T.G., *Placental immunotrophism: maternal T cells enhance placental growth and function*. Am J Reprod Immunol Microbiol, 1987. **15**(2): p. 67-9.
16. Chaouat, G., *Inflammation, NK cells and implantation: friend and foe (the good, the bad and the ugly?): replacing placental viviparity in an evolutionary perspective*. J Reprod Immunol, 2013. **97**(1): p. 2-13.
17. Aplin, J.D. and P.T. Ruane, *Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance*. J Cell Sci, 2017. **130**(1): p. 15-22.

18. Hiby, S.E., et al., *Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success*. J Exp Med, 2004. **200**(8): p. 957-65.
19. Loke, Y.W., A. King, and T.D. Burrows, *Decidua in human implantation*. Hum Reprod, 1995. **10 Suppl 2**: p. 14-21.
20. Sattler, S., *The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1003**: p. 3-14.
21. Hanssens, S., M. Salzert, and D. Vinatier, *[Immunological aspect of pregnancy]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2012. **41**(7): p. 595-611.
22. Ng, S.W., et al., *Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(11).
23. Lessey, B.A. and S.L. Young, *What exactly is endometrial receptivity?* Fertil Steril, 2019. **111**(4): p. 611-617.
24. Benkhalifa, M., et al., *Endometrium Immunomodulation to Prevent Recurrent Implantation Failure in Assisted Reproductive Technology*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(21).
25. Ojosnegros, S., et al., *Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques*. Hum Reprod Update, 2021. **27**(3): p. 501-530.
26. Chen, Z., K. Sandoval, and M. Dean, *Endometrial glycogen metabolism during early pregnancy in mice*. Mol Reprod Dev, 2022. **89**(9): p. 431-440.
27. Pijnenborg, R., L. Vercruysse, and I. Brosens, *Deep placentation*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2011. **25**(3): p. 273-85.
28. Muter, J., C.S. Kong, and J.J. Brosens, *The Role of Decidual Subpopulations in Implantation, Menstruation and Miscarriage*. Front Reprod Health, 2021. **3**: p. 804921.
29. Zhang, X. and H. Wei, *Role of Decidual Natural Killer Cells in Human Pregnancy and Related Pregnancy Complications*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 728291.
30. Zhang, S., et al., *Physiological and molecular determinants of embryo implantation*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(5): p. 939-80.
31. Kaufmann, P., S. Black, and B. Huppertz, *Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia*. Biol Reprod, 2003. **69**(1): p. 1-7.
32. Knofler, M., et al., *Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(18): p. 3479-3496.
33. Boss, A.L., L.W. Chamley, and J.L. James, *Placental formation in early pregnancy: how is the centre of the placenta made?* Hum Reprod Update, 2018. **24**(6): p. 750-760.
34. Okae, H., et al., *Derivation of Human Trophoblast Stem Cells*. Cell Stem Cell, 2018. **22**(1): p. 50-63 e6.
35. Li, X., et al., *A comprehensive review of human trophoblast fusion models: recent developments and challenges*. Cell Death Discov, 2023. **9**(1): p. 372.
36. Bilban, M., et al., *Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures*. Placenta, 2010. **31**(11): p. 989-96.
37. Gauster, M., et al., *Early human trophoblast development: from morphology to function*. Cell Mol Life Sci, 2022. **79**(6): p. 345.

38. Zeldovich, V.B., et al., *Placental syncytium forms a biophysical barrier against pathogen invasion*. PLoS Pathog, 2013. **9**(12): p. e1003821.
39. Yu, N., et al., *HCG-Activated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) Promote Trophoblast Cell Invasion*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0125589.
40. Mor, G., et al., *Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1221**(1): p. 80-7.
41. Gridelet, V., et al., *Human Chorionic Gonadotrophin: New Pleiotropic Functions for an "Old" Hormone During Pregnancy*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 343.
42. Bischof, P. and I. Irminger-Finger, *The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(1): p. 1-16.
43. Islami, D., P. Bischof, and D. Chardonens, *Possible interactions between leptin, gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-I and II) and human chorionic gonadotrophin (hCG)*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003. **110**(2): p. 169-75.
44. Malassine, A. and L. Cronier, *Hormones and human trophoblast differentiation: a review*. Endocrine, 2002. **19**(1): p. 3-11.
45. Calvert, S.J., et al., *Studies of the dynamics of nuclear clustering in human syncytiotrophoblast*. Reproduction, 2016. **151**(6): p. 657-71.
46. Heazell, A.E., et al., *Formation of syncytial knots is increased by hyperoxia, hypoxia and reactive oxygen species*. Placenta, 2007. **28 Suppl A**: p. S33-40.
47. Jaremek, A., et al., *Omics Approaches to Study Formation and Function of Human Placental Syncytiotrophoblast*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 674162.
48. Liu, S., et al., *The role of decidual immune cells on human pregnancy*. J Reprod Immunol, 2017. **124**: p. 44-53.
49. Beaman, K.D., *Nidation, tolerance, and immunotrophism*. Am J Reprod Immunol, 1990. **23**(2): p. 54-6.
50. Robertson, S.A., et al., *Cytokine-leukocyte networks and the establishment of pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 1997. **37**(6): p. 438-42.
51. Jijon, H., et al., *Elevated interferon-gamma levels during pregnancy are associated with adverse maternofetal outcomes in IBD*. Gut, 2020. **69**(10): p. 1895-1897.
52. Yockey, L.J. and A. Iwasaki, *Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development*. Immunity, 2018. **49**(3): p. 397-412.
53. Rothchild, A.C., et al., *Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Production by T Cells during Mycobacterium tuberculosis Infection*. mBio, 2017. **8**(5).
54. Robertson, S.A., *GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(3-4): p. 287-98.
55. Jokhi, P.P., A. King, and Y.W. Loke, *Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes*. Hum Reprod, 1994. **9**(9): p. 1660-9.
56. Conrad, K.P. and D.F. Benyo, *Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia*. Am J Reprod Immunol, 1997. **37**(3): p. 240-9.
57. Baldwin, G.C., *The biology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: effects on hematopoietic and nonhematopoietic cells*. Dev Biol, 1992. **151**(2): p. 352-67.

58. Shaarawy, M., A.S. el-Shobokshy, and A.I. el-Noury, *Serum granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in gestational trophoblastic diseases*. Cytokine, 1995. **7**(2): p. 171-5.
59. Rosario, G.X. and C.L. Stewart, *The Multifaceted Actions of Leukaemia Inhibitory Factor in Mediating Uterine Receptivity and Embryo Implantation*. Am J Reprod Immunol, 2016. **75**(3): p. 246-55.
60. Arici, A., et al., *Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(6): p. 1908-15.
61. Stewart, C.L., et al., *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 76-9.
62. Camargo-Diaz, F., et al., *Colony stimulating factor-1 and leukemia inhibitor factor expression from current-cycle cannula isolated endometrial cells are associated with increased endometrial receptivity and pregnancy*. BMC Womens Health, 2017. **17**(1): p. 63.
63. Wie, J.H., et al., *Effects of Oncostatin M on Invasion of Primary Trophoblasts under Normoxia and Hypoxia Conditions*. Yonsei Med J, 2018. **59**(7): p. 879-886.
64. Recker, T., et al., *Directed covalent immobilization of fluorescently labeled cytokines*. Bioconjug Chem, 2011. **22**(6): p. 1210-20.
65. Jena, M.K., et al., *Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2019. **67**(5): p. 295-309.
66. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
67. Lavin, Y., et al., *Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(12): p. 731-44.
68. Thiruchelvam, U., et al., *The importance of the macrophage within the human endometrium*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(2): p. 217-25.
69. Van den Bossche, J., J. Baardman, and M.P. de Winther, *Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-derived Macrophages Using Real-time Extracellular Flux Analysis*. J Vis Exp, 2015(105).
70. Rodriguez-Prados, J.C., et al., *Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation*. J Immunol, 2010. **185**(1): p. 605-14.
71. Quillay, H., et al., *Distinct characteristics of endometrial and decidual macrophages and regulation of their permissivity to HIV-1 infection by SAMHD1*. J Virol, 2015. **89**(2): p. 1329-39.
72. Yao, Y., X.H. Xu, and L. Jin, *Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 792.
73. Chambers, M., et al., *Macrophage Plasticity in Reproduction and Environmental Influences on Their Function*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 607328.
74. Cappelletti, M., P. Presicce, and S.G. Kallapur, *Immunobiology of Acute Chorioamnionitis*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 649.
75. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.

76. Zu, L., et al., *Bacterial endotoxin stimulates adipose lipolysis via toll-like receptor 4 and extracellular signal-regulated kinase pathway*. J Biol Chem, 2009. **284**(9): p. 5915-26.
77. Rubartelli, A. and M.T. Lotze, *Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox*. Trends Immunol, 2007. **28**(10): p. 429-36.
78. Alexopoulou, L., B. Desnues, and O. Demaria, *[Toll-like receptor 8: the awkward TLR]*. Med Sci (Paris), 2012. **28**(1): p. 96-102.
79. Ernst, L.M., et al., *Inflammation-induced preterm birth in a murine model is associated with increases in fetal macrophages and circulating erythroid precursors*. Pediatr Dev Pathol, 2010. **13**(4): p. 273-81.
80. Aziz, M., et al., *Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(3): p. 329-42.
81. Murray, P.J. and T.A. Wynn, *Protective and pathogenic functions of macrophage subsets*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 723-37.
82. Gnainsky, Y., et al., *Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation*. Fertil Steril, 2010. **94**(6): p. 2030-6.
83. Turner, M.D., et al., *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(11): p. 2563-2582.
84. Chen, L., et al., *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*. Oncotarget, 2018. **9**(6): p. 7204-7218.
85. Hu, X., et al., *The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic*. Signal Transduct Target Ther, 2021. **6**(1): p. 402.
86. Xin, P., et al., *The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases*. Int Immunopharmacol, 2020. **80**: p. 106210.
87. Ivashkiv, L.B., *IFNgamma: signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(9): p. 545-558.
88. Hermanns, H.M., *Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(5): p. 545-58.
89. Nagenborg, J., et al., *GM-CSF-activated STAT5A regulates macrophage functions and inflammation in atherosclerosis*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1165306.
90. Chavan, A.R., O.W. Griffith, and G.P. Wagner, *The inflammation paradox in the evolution of mammalian pregnancy: turning a foe into a friend*. Curr Opin Genet Dev, 2017. **47**: p. 24-32.
91. Murphy, S.P., et al., *Interferon gamma in successful pregnancies*. Biol Reprod, 2009. **80**(5): p. 848-59.
92. Nagamatsu, T. and D.J. Schust, *The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 460-71.
93. Renaud, S.J. and C.H. Graham, *The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy*. Immunol Invest, 2008. **37**(5): p. 535-64.

94. Nurzadeh, M., et al., *The Role of Interferon (IFN)-gamma in Extravillous Trophoblast Cell (EVT) Invasion and Preeclampsia Progression*. *Reprod Sci*, 2023. **30**(5): p. 1462-1469.
95. Shan, Y., et al., *Term and Preterm Birth Initiation Is Associated with the Macrophages Shifting to M1 Polarization in Gestational Tissues in Mice*. *Biology (Basel)*, 2022. **11**(12).
96. Mor, G. and I. Cardenas, *The immune system in pregnancy: a unique complexity*. *Am J Reprod Immunol*, 2010. **63**(6): p. 425-33.
97. Kitaya, K., et al., *Chronic Endometritis: Potential Cause of Infertility and Obstetric and Neonatal Complications*. *Am J Reprod Immunol*, 2016. **75**(1): p. 13-22.
98. Czernobilsky, B., *Endometritis and infertility*. *Fertil Steril*, 1978. **30**(2): p. 119-30.
99. Kitaya, K., et al., *Endometritis: new time, new concepts*. *Fertil Steril*, 2018. **110**(3): p. 344-350.
100. You, S., et al., *Recombinant humanized collagen remodels endometrial immune microenvironment of chronic endometritis through macrophage immunomodulation*. *Regen Biomater*, 2023. **10**: p. rbad033.
101. Deng, Y., et al., *Regulatory roles of PGE(2) in LPS-induced tissue damage in bovine endometrial explants*. *Eur J Pharmacol*, 2019. **852**: p. 207-217.
102. Kawakami, T., A. Koike, and F. Amano, *Induction of different activated phenotypes of mouse peritoneal macrophages grown in different tissue culture media*. *Cytotechnology*, 2017. **69**(4): p. 631-642.
103. Zhang, X., et al., *Low-dose aspirin treatment improves endometrial receptivity in the midluteal phase in unexplained recurrent implantation failure*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2022. **156**(2): p. 225-230.
104. Kumar, P. and S. Mahajan, *Preimplantation and postimplantation therapy for the treatment of reproductive failure*. *J Hum Reprod Sci*, 2013. **6**(2): p. 88-92.
105. Siristatidis, C.S., et al., *Aspirin for in vitro fertilisation*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016. **11**(11): p. CD004832.
106. Mulloy, B., *The non-anticoagulant promise of heparin and its mimetics*. *Curr Opin Pharmacol*, 2019. **46**: p. 50-54.
107. Dallagi, A., et al., *The activating effect of IFN-gamma on monocytes/macrophages is regulated by the LIF-trophoblast-IL-10 axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation*. *Cell Mol Immunol*, 2015. **12**(3): p. 326-41.
108. Wanggren, K., et al., *Leukaemia inhibitory factor receptor and gp130 in the human Fallopian tube and endometrium before and after mifepristone treatment and in the human preimplantation embryo*. *Mol Hum Reprod*, 2007. **13**(6): p. 391-7.
109. Zeaiter, Z., et al., *Helicobacter pylori induces expression and secretion of oncostatin M in macrophages in vitro*. *Dig Dis Sci*, 2011. **56**(3): p. 689-97.
110. Richards, C.D., *The enigmatic cytokine oncostatin m and roles in disease*. *ISRN Inflamm*, 2013. **2013**: p. 512103.
111. Pritchard, M.T., et al., *Early growth response-1 attenuates liver injury and promotes hepatoprotection after carbon tetrachloride exposure in mice*. *J Hepatol*, 2010. **53**(4): p. 655-62.

112. Bertani, L., et al., *Serum oncostatin M at baseline predicts mucosal healing in Crohn's disease patients treated with infliximab*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2020. **52**(2): p. 284-291.
113. Clavel, C., et al., *Among human macrophages polarised to different phenotypes, the M-CSF-oriented cells present the highest pro-inflammatory response to the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing ACPA*. *Ann Rheum Dis*, 2016. **75**(12): p. 2184-2191.
114. Omata, W., et al., *Trophoblast cell fusion and differentiation are mediated by both the protein kinase C and a pathways*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e81003.
115. Orendi, K., et al., *The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins*. *Reproduction*, 2010. **140**(5): p. 759-66.
116. Rothbauer, M., et al., *A comparative study of five physiological key parameters between four different human trophoblast-derived cell lines*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 5892.
117. Zhang, H., et al., *Catalpol ameliorates LPS-induced endometritis by inhibiting inflammation and TLR4/NF-kappaB signaling*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2019. **20**(10): p. 816-827.
118. Koma, T., et al., *The Ectodomain of Glycoprotein from the Candid#1 Vaccine Strain of Junin Virus Rendered Machupo Virus Partially Attenuated in Mice Lacking IFN-alpha/beta/gamma Receptor*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016. **10**(8): p. e0004969.
119. Lashley, V.D., et al., *Investigating the Suitability of a Laboratory Mouse Model to Study the Pathogenesis of Abortifacient Campylobacter jejuni*. *Vet Pathol*, 2019. **56**(4): p. 555-564.
120. Yang, Y., et al., *Interleukin-18 and interferon gamma levels in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis*. *Am J Reprod Immunol*, 2014. **72**(5): p. 504-14.
121. Chen, C.P., et al., *Expression of Interferon gamma by Decidual Cells and Natural Killer Cells at the Human Implantation Site: Implications for Preeclampsia, Spontaneous Abortion, and Intrauterine Growth Restriction*. *Reprod Sci*, 2015. **22**(11): p. 1461-7.
122. Verma, S., et al., *BST2 regulates interferon gamma-dependent decrease in invasion of HTR-8/SVneo cells via STAT1 and AKT signaling pathways and expression of E-cadherin*. *Cell Adh Migr*, 2020. **14**(1): p. 24-41.
123. Ogata, A., N. Nishimoto, and K. Yoshizaki, *[Advances in interleukin-6 therapy]*. *Rinsho Byori*, 1999. **47**(4): p. 321-6.
124. Bechi, N., et al., *Environmental levels of para-nonylphenol are able to affect cytokine secretion in human placenta*. *Environ Health Perspect*, 2010. **118**(3): p. 427-31.
125. Wu, Z.M., et al., *Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts*. *Placenta*, 2012. **33**(3): p. 188-94.
126. Borg, A.J., et al., *Decreased STAT3 in human idiopathic fetal growth restriction contributes to trophoblast dysfunction*. *Reproduction*, 2015. **149**(5): p. 523-32.

127. Hennighausen, L. and G.W. Robinson, *Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B*. Genes Dev, 2008. **22**(6): p. 711-21.
128. Kusama, K., R. Bai, and K. Imakawa, *Regulation of human trophoblast cell syncytialization by transcription factors STAT5B and NR4A3*. J Cell Biochem, 2018. **119**(6): p. 4918-4927.
129. Puente, E., et al., *Chronic Endometritis: Old Problem, Novel Insights and Future Challenges*. Int J Fertil Steril, 2020. **13**(4): p. 250-256.
130. Bi, Y., et al., *HOXA10 improves endometrial receptivity by upregulating E-cadherin*. Biol Reprod, 2022. **106**(5): p. 992-999.
131. Mate, G., L.R. Bernstein, and A.L. Torok, *Endometriosis Is a Cause of Infertility. Does Reactive Oxygen Damage to Gametes and Embryos Play a Key Role in the Pathogenesis of Infertility Caused by Endometriosis?* Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 725.
132. Greaves, E., et al., *A novel mouse model of endometriosis mimics human phenotype and reveals insights into the inflammatory contribution of shed endometrium*. Am J Pathol, 2014. **184**(7): p. 1930-9.
133. Ravelojaona, M., et al., *Oncostatin M and STAT3 Signaling Pathways Support Human Trophoblast Differentiation by Inhibiting Inflammatory Stress in Response to IFN γ and GM-CSF*. Cells, 2024. **13**(3).
134. Yang, L., et al., *Innate immune signaling in trophoblast and decidua organoids defines differential antiviral defenses at the maternal-fetal interface*. Elife, 2022. **11**.
135. Chen, Y., L. Yang, and X. Li, *Advances in Mesenchymal stem cells regulating macrophage polarization and treatment of sepsis-induced liver injury*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1238972.
136. Ahuja, A., et al., *STAT3 Differentially Regulates TLR4-Mediated Inflammatory Responses in Early or Late Phases*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(20).
137. Zhu, J., et al., *COX-2 contributes to LPS-induced Stat3 activation and IL-6 production in microglial cells*. Am J Transl Res, 2018. **10**(3): p. 966-974.
138. Toomey, D.P., J.F. Murphy, and K.C. Conlon, *COX-2, VEGF and tumour angiogenesis*. Surgeon, 2009. **7**(3): p. 174-80.
139. Torossian, F., et al., *Macrophage-derived oncostatin M contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications*. JCI Insight, 2017. **2**(21).
140. Yang, P., et al., *Adoptive transfer of polarized M2c macrophages ameliorates acute rejection in rat liver transplantation*. Am J Transl Res, 2020. **12**(6): p. 2614-2626.
141. Schluter, A., et al., *CD31 and VEGF are prognostic biomarkers in early-stage, but not in late-stage, laryngeal squamous cell carcinoma*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 272.
142. Brudecki, L., et al., *Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response*. Infect Immun, 2012. **80**(6): p. 2026-34.
143. Andreata, F., et al., *CD31 signaling promotes the detachment at the uropod of extravasating neutrophils allowing their migration to sites of inflammation*. Elife, 2023. **12**.

144. Metcalf, D., *The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor*. Stem Cells, 2003. **21**(1): p. 5-14.