

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION TGF $\beta$ 1/SMAD2 DANS  
L'ADAPTATION MÉTABOLIQUE DES CELLULES TROPHOBLASTIQUES EN  
CONDITION HYPERGLYCÉMIQUE *IN VITRO***

**THÈSE PRÉSENTÉE**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE DU**

**DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE**

**PAR**

**NIHAD KHIAT**

**DÉCEMBRE 2025**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE (DOCTORAT)

**Direction de recherche :**

Carlos Reyes Moreno, Ph. D.

Prénom et nom

Directeur de recherche

Céline Van Themsche, Ph. D.

Prénom et nom

Codirectrice 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

Alexandre Fiset, Ph. D.

Prénom et nom

Président du jury

Jean-Philippe Leduc Gaudet, Ph. D.

Prénom et nom

Évaluateur interne

Cathy Vaillancourt, Ph. D.

Prénom et nom

Évaluateur externe

## Table des matières :

Listes des figures :..... 5

Chapitre I : Introduction..... 18

1 La Grossesse.....	18
1.1 Généralités.....	18
1.2 Implantation embryonnaire .....	19
1.2.1 La décidualisation .....	21
1.2.2 La placentation .....	22
1.3 Changements physiologiques durant la grossesse.....	25
1.3.1 Adaptation métabolique durant la grossesse .....	25
1.3.2 Le métabolisme glucidique durant la grossesse .....	29
1.3.2.1 Alteration de la sensibilité à l'insuline durant la grossesse .....	31
1.3.2.2 Glycogénogenèse hépatique .....	32
1.3.2.3 Utilisation du glucose par le placenta.....	33
1.3.2.4 Transport cellulaire du glucose.....	33
1.4 Métabolisme du glucose dans le trophoblaste.....	38
1.4.1 Catabolisme du glucose en aérobie .....	38
1.4.1.1 La glycolyse .....	38
1.4.1.2 Décarboxylation oxydative du pyruvate.....	39
1.4.1.3 Oxydation de l'acétyl-CoA dans le cycle du citrate .....	41
1.4.1.4 La phosphorylation oxydative .....	42
1.4.2 Catabolisme du glucose en anaérobie .....	44
1.4.2.1 Réduction du pyruvate en lactate .....	44
1.4.3 Régulation cellulaire du métabolisme du glucose dans le trophoblaste .....	45
1.5 Régulation de la grossesse par les cytokines.....	51
1.5.1 La superfamille des TGF $\beta$ .....	53
1.5.1.1 Synthèse et activation des TGF $\beta$ 1 .....	53
1.5.1.3 Mécanisme d'action des TGF $\beta$ 1.....	54
1.5.2 Rôle de la superfamille du TGF $\beta$ dans la fonction reproductive.....	56
1.5.3 Régulation du métabolisme du glucose par TGF $\beta$ 1 .....	58
1.6 Altération de l'adaptation métabolique lors de la grossesse.....	59
1.6.1 Effet de l'hyperglycémie maternelle sur le fonctionnement du trophoblaste.....	61
1.6.2 Prise en charge de l'hyperglycémie.....	64

2 Problématique .....	65
3 Hypothèse.....	65
4 Objectifs et approches expérimentales.....	66
4.1 Caractériser l'impact de l'hyperglycémie sur le métabolisme glucidique des cellules trophoblastiques humaines .....	67
4.2. Déterminer l'influence du TGFβ1 sur les altérations métaboliques des cellules JEG-3 induites par un environnement hyperglycémique : .....	68
<b>Chapitre II.....</b>	<b>69</b>
Statut de l'article : .....	69
Contribution des auteurs : .....	69
Résumé de l'article : .....	70
Article (Version publiée).....	71
<b>Chapitre III : Discussion :.....</b>	<b>107</b>
5 Effet de l'hyperglycémie sur la plasticité métabolique des trophoblastes humains .....	107
6 Dysfonction mitochondriale des cellules trophoblastiques JEG-3 en réponse au stress hyperglycémique .....	110
7 Perturbation du flux glucidique du trophoblaste par l'hyperglycémique.....	113
8 Hyperglycémie et dérèglement du métabolisme du glucose dans le trophoblaste : implications des voies HIF-1α et PPARγ .....	115
9 TGFβ1 : Une cytokine clé à l'interface fœto-maternelle.....	118
10 Interrelation entre l'hyperglycémie et le TGFβ1 .....	121
11 Effet restaurateur du TGFβ1 sur la fonction énergétique mitochondriale .....	122
12 TGFβ1 restaure le transport du glucose dans les cellules JEG-3 .....	124
13 Régulation du métabolisme glucidique par le TGFβ1 dans les trophoblastes en condition hyperglycémique : implication de HIF1α, PPARγ et AMPK .....	125
14. Limitations de l'étude : .....	131
15. Conclusion générale : .....	134
16 Perspectives.....	136
<b>Références.....</b>	<b>139</b>
<b>ANNEXE A.....</b>	<b>154</b>
Effets du TGFβ1 sur l'expression des protéines mitochondriales en réponse à différentes concentrations de glucose.....	154

## Listes des figures

Figure 1 : Développement morphologique et fonctionnel du fœtus au cours des trois trimestres de la grossesse .....	18
Figure 2 : Processus d'implantation embryonnaire et différenciation précoce des tissus trophoblastiques .....	20
Figure 3 : Développement dynamique du trophoblaste et formation des structures villositaires placentaires humaines.....	24
Figure 4 : Modulations du métabolisme glucidique chez la femme enceinte. ....	27
Figure 5 : Distribution des transporteurs de glucose (GLUTs) dans le placenta humain : localisation cellulaire et orientation transplacentaire .....	35
Figure 6 : Vue d'ensemble des voies métaboliques dérivées du glucose : glycolyse, cycle de Krebs, chaîne respiratoire. ....	40
Figure 7 : Contrôle post-traductionnel de HIF- $\alpha$ par les PHDs et le complexe pVHL en fonction de la disponibilité en oxygène.....	46
Figure 8 : Déséquilibre entre cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires au cours de la grossesse .....	52
Figure 9 : Voies de signalisation canoniques et non-canoniques de TGF $\beta$ : mécanismes SMAD-dépendants et indépendants dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. ....	55
Figure 10 : Modulation des interactions fœto-maternelles par la signalisation TGF $\beta$ dans le placenta humain au cours de la gestation .....	57
Figure 11 : Répartition des cas d'hyperglycémie pendant la grossesse selon l'étiologie : diabète gestationnel, préexistant ou nouvellement diagnostiqués.....	60

Figure 12 : Conséquences du diabète gestationnel sur la mère et le nouveau-né : issues métaboliques, obstétricales et développementales à court et long terme. ....	62
Figure 13 : Mécanismes de régulation post-traductionnelle de HIF-1 $\alpha$ en fonction du statut en oxygène : normoxie, hypoxie et pseudo-hypoxie. ....	127
Figure 14 : Rôle régulateur du TGF $\beta$ 1 dans la restauration de l'homéostasie métabolique trophoblastique en condition d'hyperglycémie gestationnelle. ....	135

## **Listes des tableaux :**

<u>Tableau 1</u> : Hormones placentaires et leurs rôles dans la réorganisation endocrino-métabolique lors de la grossesse.....	28
<u>Tableau 2</u> : Différents types de transporteurs sodium-glucose couplés et leurs localisations...	36
<u>Tableau 3</u> : Différents types de transporteurs de glucose par diffusion facilitée et leurs localisations. ....	37

## Tableau des abréviations :

### Abréviations :

### Définition :

ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ADP	Adénosine diphosphate
AKT	Protéine kinase B
ALK	Activin receptor-like kinase
AMH	Hormone antimüllérienne
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP
ARID1A	Protéine 1A contenant un domaine interagissant avec des régions riches en adénine (A) et thymine (T)
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	ATP synthase
BMP	Protéine morphogénétiques osseuses
CDKN1A	Inhibiteur 1A des kinases dépendantes des cyclines
CES	Cellules stromales endométriales
CLCD	Concentré lipidique chimiquement défini
CoQ	Coenzyme Q (ubiquinone)

CRM	Chromosome region maintenance 1
CS	Citrate synthase
CTB	Cytotrophoblaste
CTE	Chaîne de transport des électrons
CTEV	Cellules trophoblastiques extravilleuses
CTEVi	Cellules trophoblastiques extravilleuses interstitielles
CTEVe	Cellules trophoblastiques extravilleuses endovasculaire ?
ERK1/2	Kinase régulée par les signaux extracellulaires 1/2
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADH <sub>2</sub>	Flavine adénine dinucléotide réduite
FMN	Flavine mononucléotide
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GLP-1	Peptide glucagon-like de type 1
GLUT	Transporteur de glucose
GSIS	Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose
HIF1 $\alpha$	Facteur induit par l'hypoxie 1- $\alpha$
HK1-2	Hexokinase 1-2
IDH	Isocitrate déshydrogénase

IGF-1	Facteur de croissance analogue à l'insuline de type 1
IRS-1	Substrat du récepteur à l'insuline 1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LDHA	Lactate déshydrogénase A
LKB1	Protéine kinase B1 d'origine hépatique.
MCT1	Transporteur de monocarboxylates 1
MEC	Matrice extracellulaire
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
METTL3	Méthyltransférase de type 3
miARN	Micro-ARN
miR	Micro-ARN
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MTCO1	Cytochrome c oxydase I codé par l'ADN mitochondrial (complexe IV)
mTOR	Cible mécanistique de la rapamycine
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (réduit)
NDUF88	Sous-unité de la NADH déshydrogénase (complexe I)
OXPPOS	Phosphorylation oxydative
PDH	Complexe pyruvate déshydrogénase
PDC	Protéine découplante

PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFKFB3	6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase 3
PFKL	Phosphofructokinase isoforme L
PFKP	Phosphofructokinase isoforme P
PGC-1 $\alpha$	Coactivateur 1-alpha du récepteur PPAR $\gamma$
PGH	Hormone de croissance placentaire
PGK1	Phosphoglycérate kinase 1
PHD	Prolyl hydroxylases
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKM2	Pyruvate kinase M2
PPAR $\gamma$	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes $\gamma$
PRKN	Ligase E3 ubiquitine-protéine Parkin de type RBR
RXR	Récepteur des rétinoïdes X
SA- $\beta$ -gal	$\beta$ -galactosidase associée à la sénescence
SDHB	Succinate dehydrogenase subunit B
SGLT	Cotransporteur sodium-glucose
SMURF2	Régulateur de l'ubiquitination de SMAD de type 2
SOD	Superoxyde dismutase
STB	Syncytiotrophoblaste

SWEET	Sugars Will Eventually be Exported Transporters
TCA	Cycle du citrate
TGF $\beta$ 1	Facteur de croissance transformant $\beta$ 1
TIMPs	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
T $\beta$ RI	Récepteur de type I du TGF- $\beta$
UQCRC2	Protéine centrale 2 de l'ubiquinol-cytochrome c réductase
USP9X	Peptidase spécifique de l'ubiquitine 9, liée à l'X
VDAC	Canal anionique dépendant du voltage
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VHL	Protéine de Von Hippel–Lindau

## Remerciements

Cette thèse marque l'aboutissement d'un rêve né il y a treize ans, sur les bancs de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, en première année de sciences de la vie et de la nature. Portée par une passion sincère pour la recherche scientifique, j'ai quitté mon pays et traversé deux continents pour lui donner vie. Mais au-delà des données, des expériences et des analyses, cette section est sans doute la plus essentielle de toute la thèse. Car si ce travail représente ma persévérance, il n'aurait jamais pu aboutir sans le soutien indéfectible, l'accompagnement bienveillant et la confiance de celles et ceux à qui je rends hommage ici :

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury : Dr Alexandre Fisette, Dr Jean-Philippe Leduc Gaudet, Dre Cathy Vaillancourt. J'admire la qualité de leur travail et leur contribution à leurs domaines de recherche respectifs, et j'apprécie vivement qu'ils aient accepté d'évaluer cette thèse. Je suis convaincue que leurs expertises, leurs regards critiques et leurs remarques constructives permettront d'enrichir ce travail et d'en affiner les perspectives. Je les remercie par avance pour le temps qu'ils y consacreront et pour leur engagement.

Ensuite, Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes directeurs de thèse, Carlos et Céline, pour leur accompagnement précieux tout au long de ces années. Leur exigence scientifique, leurs orientations éclairées et leur soutien constant ont été des repères essentiels dans la conduite de ce projet.

Carlos, je te remercie sincèrement pour m'avoir confié ce travail de recherche et pour m'avoir accueillie au sein de ton équipe. Ton écoute, ta patience et la liberté que tu nous laisses en tant qu'étudiants ont largement contribué à mon épanouissement. L'esprit de cohésion et de bienveillance que tu cultives dans ton laboratoire crée un cadre rassurant, en particulier pour celles et ceux qui évoluent loin de leurs attaches familiales.

Céline, je tiens à te remercier pour ta bienveillance et ton attention toujours présente envers les étudiants. Ton souci sincère de notre équilibre personnel et de notre santé mentale, souvent

négligé dans le milieu académique, a été pour moi une source précieuse de réconfort et de stabilité. Ton soutien humain, autant que scientifique, a profondément marqué mon parcours.

Dans la continuité, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mes collègues de laboratoire, qui ont grandement contribué à rendre ce parcours plus riche et plus humain. Je pense en particulier à Julie et Laurie, qui incarnent à mes yeux les véritables piliers du laboratoire. Merci pour votre aide précieuse, votre patience, votre écoute et votre bonne humeur constante. Votre présence à mes côtés a fait toute la différence, et je sais que je n'aurais jamais pu aller au bout de cette aventure sans vous.

Je souhaite également adresser quelques mots à mes parents. Même si je ne le dis pas souvent, merci. Merci pour toutes ces nuits écourtées, ces matins pressés, pour chaque petit sacrifice que vous pensiez invisible, pour chaque fois où vous vous êtes privés afin que je ne manque de rien. Vous m'avez appris ce que signifie donner sans rien attendre en retour. Vous m'avez montré que l'amour se manifeste dans mille gestes discrets à travers les journées de travail sans fin, les rêves mis de côté, l'amour offert sans condition. En grandissant, je vous croyais invincibles, persuadée que vous aviez réponse à tout. Aujourd'hui, je comprends que vous faisiez simplement de votre mieux, avec courage, pour que tout tienne debout. Je porte en moi des fragments de vous : vos leçons, votre douceur, votre force silencieuse. Alors même si les mots me manquent parfois, je tiens à vous remercier sincèrement. Merci d'avoir été un appui constant, pour votre confiance et pour votre soutien indéfectible.

À ma sœur, j'aimerais que cette thèse soit pour toi la preuve qu'aucun rêve n'est hors de portée. Avec de la persévérance et un peu de confiance en soi, tout peut devenir possible.

À mes frères, merci pour votre soutien indéfectible malgré les kilomètres qui nous séparent. Grandir à vos côtés a été une force, et même éloignés, vous êtes restés présents, en particulier mon grand frère, dont le soutien m'a été précieux.

À mon mari, sans qui je ne serais probablement jamais arrivée jusqu'ici. Lotfi, tu as été une bénédiction dans ma vie depuis le tout premier jour. Merci d'avoir toujours cru en moi, même quand moi je n'y arrivais plus. Merci de m'avoir soutenue sans relâche, d'avoir été avec moi dans mes moments les plus difficiles pour m'aider à remonter, encore et encore. Merci de m'avoir montré qu'il y a autre chose que la thèse, qu'il y a aussi des instants de calme, de joie

et de simplicité à préserver. Je t'ai souvent dit que mes remerciements de thèse seraient une ode à toi. Alors aujourd'hui, je te le dis : merci. Pour ta patience, ta force, ta présence constante, et pour avoir été à mes côtés à chaque étape. I love you more than everything and anything in the whole world.

À mes ami(e)s, merci d'avoir été une oreille attentive, même quand je radotais à propos de mes cellules et de mes expériences. Rusty, merci d'avoir été un rayon de soleil, et d'avoir couru lentement avec moi. À mes ami(e)s de l'autre côté de l'Atlantique, merci pour votre soutien et votre présence émotionnelle, sans lesquels je ne sais pas comment j'aurais tenu. Un merci tout particulier à Jeanne, Sarah, ainsi qu'à mes voisins de la résidence Écla.

Enfin, merci à tous les organismes de financement qui ont soutenu ce projet de recherche. Je tiens à adresser un remerciement chaleureux à la Fondation Club Avenir pour avoir récompensé ma persévérance. La symbolique de votre prix m'a profondément portée et m'a donné la force de continuer cette thèse. Je vous promets de faire honneur à la confiance que vous avez placée en moi.

Je déclare également que l'intelligence artificielle (ChatGPT) a été utilisée dans l'écriture de ce manuscrit, pour améliorer la formulation, la grammaire, l'orthographe et la syntaxe du texte.

## Résumé de la thèse :

L'hyperglycémie au cours de la grossesse constitue un facteur de risque majeur, associée à une altération du fonctionnement placentaire à l'interface fœto-maternelle et à une augmentation du risque de complications tant maternelles, telles que la prééclampsie et le diabète gestationnel, que fœtales, comme la macrosomie, le retard de croissance ou des anomalies du développement. Le placenta utilise principalement le glucose comme source d'énergie. Ce dernier est métabolisé dans le trophoblaste par la glycolyse dans le cytoplasme et la respiration oxydative dans les mitochondries pour produire de l'énergie sous forme d'ATP. La voie de signalisation TGF $\beta$ 1/SMAD2, ainsi que les facteurs de transcription PPAR $\gamma$ , HIF1 $\alpha$  et AMPK, sont considérés comme des acteurs importants du métabolisme cellulaire, en particulier dans la régulation de la différenciation et des fonctions trophoblastiques. HIF1 $\alpha$  semble favoriser une orientation métabolique glycolytique, tandis que PPAR $\gamma$  et AMPK sont généralement associés à la promotion du métabolisme oxydatif. Cependant, les interactions potentielles entre TGF $\beta$ 1 et ces régulateurs métaboliques dans les cellules trophoblastiques restent encore peu élucidées.

Cette étude vise à évaluer les altérations induites par des concentrations élevées de glucose sur le métabolisme énergétique des cellules trophoblastiques, ainsi qu'à déterminer dans quelle mesure TGF $\beta$ 1 peut moduler ou atténuer ces effets. Dans cette optique, les cellules trophoblastiques JEG-3 ont été incubées pendant 24 heures dans des milieux contenant du glucose à concentration normale (5 mM) ou élevée (25 mM), en présence ou en absence de TGF $\beta$ 1. Les niveaux d'expression des protéines phospho-SMAD2, GLUT1/3, HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , phospho-AMPK, ainsi que de certaines sous-unités des complexes mitochondriaux OXPHOS ont été analysés. La production d'ATP et de lactate a été quantifiée afin d'évaluer l'état du métabolisme énergétique cellulaire.

L'exposition des cellules JEG-3 à une concentration de 25 mM de glucose a entraîné une diminution de la production d'ATP sans modification significative de la production de lactate. Ces altérations ont été accompagnées d'une baisse d'expression de GLUT1/3 et des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale et de PPAR $\gamma$ , et d'une augmentation de l'expression de HIF1 $\alpha$ . En contraste, le traitement par TGF $\beta$ 1 en condition hyperglycémique *in vitro* a entraîné

une diminution de l'expression de HIF1 $\alpha$ , accompagnée d'une augmentation de l'expression de GLUT1/3, PPAR $\gamma$ , phospho-AMPK et des protéines mitochondriales, permettant ainsi une restauration de la production d'ATP. Nos résultats indiquent que des conditions hyperglycémiques perturbent le métabolisme glucidique des cellules trophoblastiques en altérant la respiration mitochondriale oxydative et en réduisant la production d'ATP. Le traitement par TGF $\beta$ 1 semble corriger ces effets, probablement en stimulant à la fois la glycolyse et le métabolisme mitochondrial, suggérant un rôle régulateur potentiel de TGF $\beta$ 1 dans le métabolisme glucidique des cellules JEG-3.

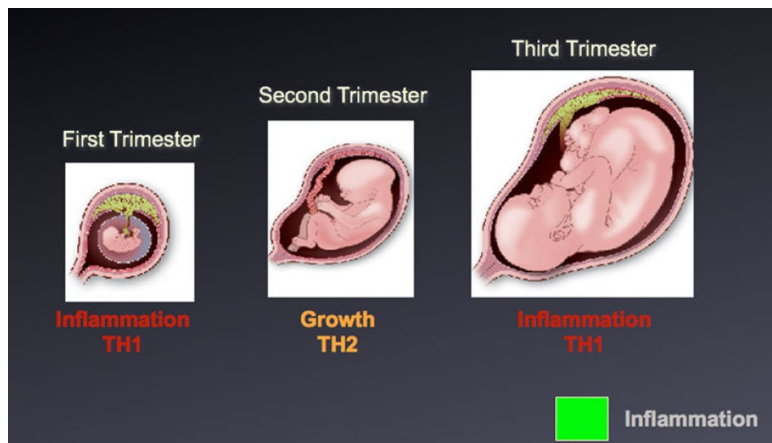
**Mots-clés : AMPK, Glycolyse, HIF1 $\alpha$ , Hyperglycémie gestationnelle, Métabolisme énergétique, PPAR $\gamma$ , Placenta, Respiration mitochondriale, TGF $\beta$ 1, Trophoblaste.**

# Chapitre I : Introduction

## 1 La Grossesse

### 1.1 Généralités

La grossesse correspond à un processus physiologique propre aux mammifères femelles. Elle débute généralement par la fécondation d'un ou de plusieurs ovules et implique le développement d'un embryon, puis d'un fœtus, dans l'utérus maternel jusqu'à la naissance [1]. Ce processus s'accompagne de profondes transformations physiologiques affectant l'ensemble des systèmes organiques afin de soutenir la croissance et le développement du fœtus. Chez la femme enceinte, la grossesse dure en moyenne entre 36 et 40 semaines à partir du premier jour du dernier cycle menstruel. La grossesse est divisée en trois trimestres [2] (Fig. 1) :



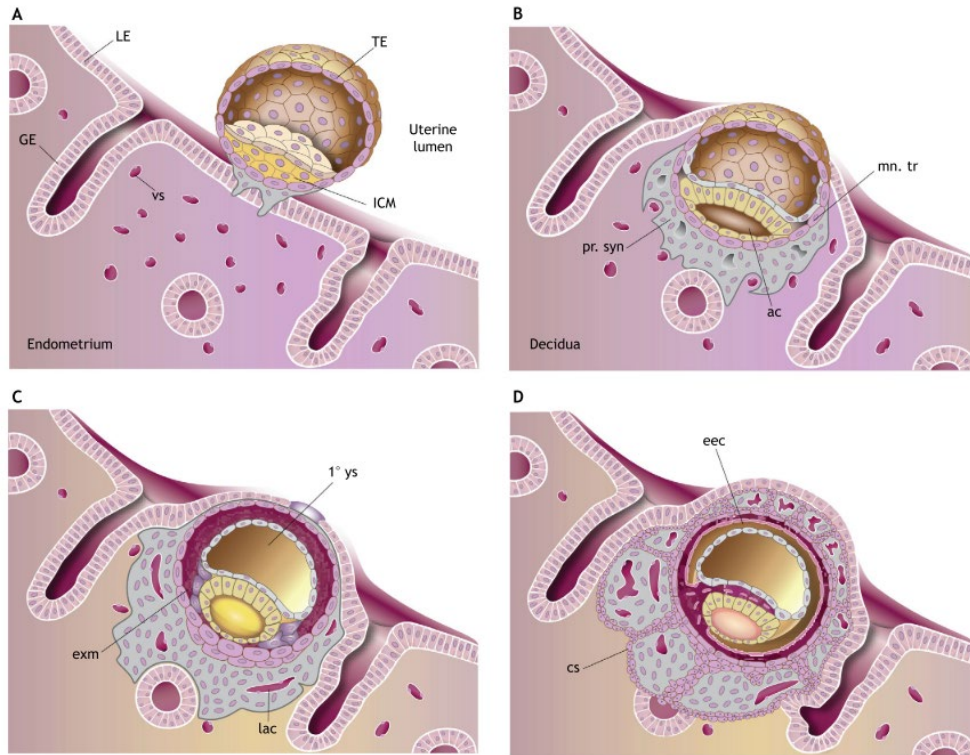
**Figure 1 : Développement morphologique et fonctionnel du fœtus au cours des trois trimestres de la grossesse.** Au premier trimestre (de la fécondation à la semaine 14), l'implantation de l'embryon et l'organogenèse ont lieu, avec la mise en place des principaux organes ainsi que du placenta. Le deuxième trimestre (semaines 14 à 27) correspond à une phase de croissance et de maturation progressive des organes, tandis que le placenta assure pleinement les échanges fœto-maternels. Le troisième trimestre (de la semaine 27 à l'accouchement) est caractérisé par une croissance rapide, la maturation fonctionnelle des organes, notamment des poumons et du cerveau, et l'accumulation des tissus adipeux en préparation à la vie extra-utérine [3].

## 1.2 Implantation embryonnaire

Chez les mammifères, au début du premier trimestre, l'implantation embryonnaire constitue une étape cruciale, déterminante pour l'avenir de la grossesse. Elle débute par la formation d'un zygote à la suite de la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde au niveau des trompes de Fallope. Ce zygote subit ensuite plusieurs cycles de divisions et de morphogenèse, aboutissant à la formation du blastocyste, un stade embryonnaire caractérisé par deux lignées cellulaires distinctes : le trophoctoderme épithélial spécialisé, en périphérie, et la masse cellulaire interne, au centre. Avant de pénétrer l'endomètre maternel afin de s'y implanter, le blastocyste doit préalablement être activé par un processus appelé « activation embryonnaire » [4]. Cette activation est induite par une interaction complexe de divers facteurs et voies de signalisation, entraînant une activation métabolique, une intensification des divisions cellulaires, une augmentation de la synthèse d'ADN ainsi que des modifications morphologiques. L'implantation du blastocyste s'effectue au cours d'une période spécifique appelée « fenêtre d'implantation », qui correspond à un intervalle de temps limité durant lequel l'endomètre utérin est réceptif à l'implantation embryonnaire. Une fois implanté, le blastocyste initie un processus fondamental impliquant la décidualisation et la placentation, étapes essentielles à l'établissement de l'interface fœto-maternelle [5].

L'implantation embryonnaire est un processus complexe impliquant 3 étapes principales [5] (Fig. 2) :

- **L'apposition** : Le trophoctoderme se rapproche étroitement de l'épithélium luminal de l'endomètre utérin et une adhésion stable entre eux est initiée.
- **L'adhésion ou l'attachement** : Une adhésion stable est complétée entre le trophoctoderme du blastocyste et l'épithélium luminal de l'utérus, impliquant diverses molécules d'adhésion, telles que les intégrines, les sélectines et le complexe trophinine-tastine-bystine.
- **La pénétration** : L'embryon commence à pénétrer à travers l'épithélium luminal pour atteindre le stroma sous-jacent. Cette étape initie la décidualisation du stroma et marque ainsi le début de la formation de l'interface fœto-maternelle.



**Figure 2 : Processus d'implantation embryonnaire et différenciation précoce des tissus trophoblastiques.** Cette figure décrit les événements précoces qui suivent l'implantation du blastocyste. (A) et (B) Représentent l'apposition et l'adhésion du trophoctoderme à l'épithélium luminal de l'utérus, marquant l'établissement d'un contact stable entre l'embryon et l'endomètre, facilité par l'expression de molécules d'adhésion. (C) Illustre le début de la pénétration du syncytiotrophoblaste dans l'épithélium utérin, avec la formation de lacunes qui accueilleront les échanges fœto-maternels. (D) Montre la poursuite de l'invasion trophoblastique et l'émergence des premières villosités, amorçant ainsi la mise en place de l'interface fœto-maternelle ac, cavité amniotique; cs, coque cytotrophoblastique; eec, cœlome extra-embryonnaire; exm, mésoderme extra-embryonnaire; GE, épithélium glandulaire; ICM, masse cellulaire interne; lac, lacunes; LE, épithélium luminal; mn.tr, trophoblaste mononucléé; pr.syn, syncytium primaire; TE, trophoctoderme; vs, vaisseaux sanguins; ys, sac vitellin primaire (Adapté de Zhang et al., *Molecular Aspects of Medicine* 2013, 34(5))

### 1.2.1 La décidualisation

L'implantation de l'embryon dans le stroma utérin déclenche une transformation cellulaire appelée décidualisation, qui favorise la différenciation du tissu maternel. En retour, cette décidualisation crée un environnement immunologique et structural propice à la croissance embryonnaire, à l'invasion contrôlée du trophoblaste et au déroulement optimal de la grossesse [5].

La décidualisation correspond à la différenciation des cellules mésenchymateuses du stroma utérin, elle s'accompagne de profondes modifications morphologiques, biochimiques et fonctionnelles du stroma, qui se transforme alors en décidue. Cette transformation morphologique survient au cours du cycle menstruel et en début de grossesse, environ six jours après l'ovulation, au moment de l'ouverture de la fenêtre d'implantation et s'initie autour des artères spiralées dans les deux tiers supérieurs de l'endomètre. Chez l'humain, ce processus est marqué par plusieurs modifications physiologiques [6] :

- Une transformation morphologique des cellules stromales endométriales (CES) qui passent du type mésenchymateux/fibroblastique et allongé à épithélioïde et arrondi
- Une optimisation sécrétoire des glandes utérines.
- Un afflux de cellules tueuses naturelles utérines (uNK).
- Un remodelage vasculaire permettant d'assurer un apport sanguin maternel adéquat à l'embryon qui s'y développerait.

Les CES décidualisées, qui constituent la principale population cellulaire de la décidue, jouent un rôle essentiel dans la nutrition du blastocyste implanté. Des études ultra structurales des cellules déciduales humaines révèlent plusieurs caractéristiques notables [6] :

- La présence de granules sécrétoires denses et liés à la membrane.
- Une accumulation cytoplasmique de glycogène et de gouttelettes lipidiques.
- Une expansion du réticulum endoplasmique rugueux et du complexe de Golgi, soulignant ainsi leur activité sécrétoire accrue.

### 1.2.2 La placentation

Le placenta est un organe endocrinien temporaire qui se développe durant la grossesse à partir du trophoctoderme du blastocyste. Le placenta joue un rôle fondamental dans le maintien de la grossesse et de la santé et du bon développement du fœtus. L'une des principales fonctions du placenta est de préserver l'implantation de l'embryon [7]. En assurant un apport continu de sang maternel à proximité immédiate du sang fœtal, le placenta permet un échange efficace d'oxygène, de nutriments et de déchets entre les circulations fœtale et maternelle. Il joue également un rôle essentiel dans la régulation de la température corporelle de la mère et la protection contre le microenvironnement maternel et les infections, contribuant notamment à l'établissement de la tolérance immunologique du fœtus [8].

Après la phase d'attachement du blastocyste à l'épithélium de surface utérin, le trophoblaste, tissu périphérique dérivé du trophoctoderme, se différencie en deux couches distinctes [9] :

- Une couche interne constituée de cytotrophoblaste (CTB), formée de cellules mononuclées reposant sur une membrane basale (Fig. 2),
- Une couche externe, le syncytiotrophoblaste (STB), issue de la fusion des cellules trophoblastiques, formant un syncytium plurinucléé sans limites cellulaires distinctes (Fig. 2).

La fusion des premières cellules trophoblastiques pour former ce syncytium primaire correspond à la phase pré-lacunaire du développement placentaire. Ce syncytiotrophoblaste, en continuité avec le cytotrophoblaste, envahit ensuite activement l'épithélium utérin et atteint l'endomètre sous-jacent, lequel se transforme progressivement en décidue [10].

Au sein de la masse syncytiale, des espaces remplis de liquide apparaissent, s'élargissent puis fusionnent pour former un réseau lacunaire, marquant le début de la phase lacunaire. Le syncytiotrophoblaste érode également les glandes déciduales, permettant la diffusion de leurs sécrétions dans les lacunes et le milieu péri cellulaire [10].

Pendant ce temps, les cellules cytotrophoblastiques prolifèrent sous la couche syncytiale et forment des projections qui traversent le syncytiotrophoblaste pour constituer les villosités primaires. Ces structures se composent d'un axe central de cytotrophoblaste entouré par une

couche externe de syncytiotrophoblaste, définissant l'entrée dans la phase villositaire du développement placentaire [10].

L'arborescence villositaire se développe alors par prolifération et ramifications progressives des villosités issues de la plaque chorale. Les lacunes fusionnent entre elles, formant progressivement l'espace intervilloux, dans lequel circulera ultérieurement le sang maternel. Simultanément, les cellules cytotrophoblastiques traversent le syncytiotrophoblaste et fusionnent latéralement pour former une coque cytotrophoblastique continue entre les villosités et la décidue [10].

À ce stade, le blastocyste est enveloppé par trois structures trophoblastiques distinctes :

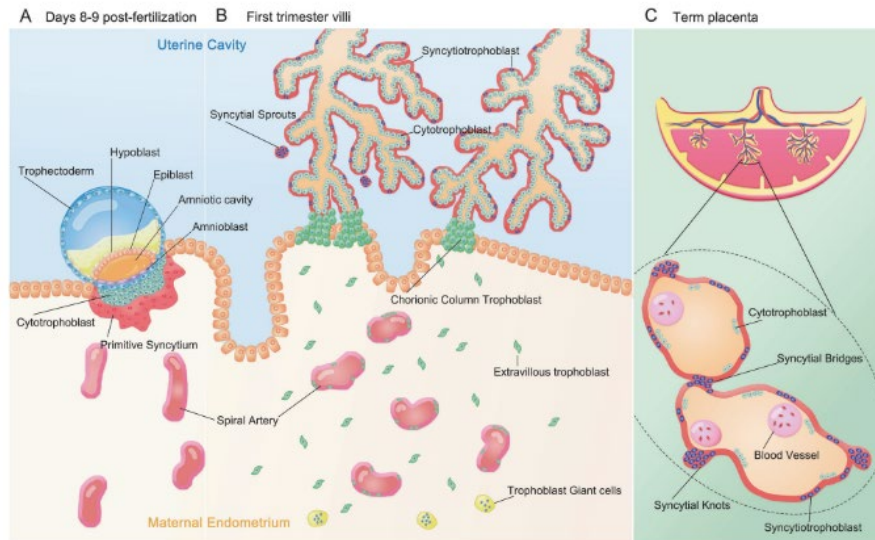
- La plaque chorale interne, tournée vers la cavité amniotique,
- Les villosités chorales, baignées dans l'espace intervilloux,
- La coque cytotrophoblastique, en contact direct avec la décidue.

Peu après cette organisation tridimensionnelle, des cellules mésenchymateuses extra-embryonnaires pénètrent dans l'axe des villosités primaires, donnant naissance aux villosités secondaires. L'apparition de capillaires fœtaux à l'intérieur de ces structures marque leur transition en villosités tertiaires, assurant les premiers échanges fœto-maternels. L'arborescence villositaire se complexifie alors rapidement à partir de la plaque chorale [10].

Enfin, au niveau de l'interface fœto-maternelle, certaines cellules du CTB quittent la coque et migrent dans la décidue sous forme de cellules trophoblastiques transformation extravillieuses (CTEV), jouant un rôle clé dans l'invasion maternelle et la des artères utérines. Ces cellules migrent dans la décidue en suivant deux voies de différenciation (Fig. 3) [11, 12]:

- Les CTEV interstitiels (CTEVi) traversent le stroma décidual en direction des artères spiralées maternelles, où ils forment une gaine cellulaire autour des vaisseaux. Ce processus entraîne une perte de vaso-activité et la transformation des vaisseaux en structures à haute conductance et basse pression, une adaptation essentielle à une grossesse normale (Fig. 3).

- Les CTEV endovasculaires (CTEVe) progressent à l'intérieur des artères spiralées et forment un bouchon temporaire, empêchant l'entrée du sang maternel dans l'espace intervilloux. Ce bouchon est maintenu jusqu'à la fin du premier trimestre, moment où la circulation hémochoriale complète est établie (Fig. 3).



**Figure 3 : Développement dynamique du trophoblaste et formation des structures villositaires placentaires humaines.** (A) Aux jours 8–9 post-fécondation, le trophoctoderme s'implante dans l'endomètre maternel et se différencie en cytotrophoblaste (CTB), dont certaines cellules fusionnent pour former un syncytiotrophoblaste primitif (STB). Celui-ci entoure l'embryon, initie l'invasion de l'endomètre et contribue à l'établissement de la tolérance immunitaire. (B) Au cours du premier trimestre, les villosités choriales se développent : le STB entoure les CTB formant les villosités primaires, puis secondaires et tertiaires, tandis que les trophoblastes extra villeux (CTEV) migrent dans la décidue pour remodeler les artères spiralées. (C) À terme, la couche de CTB s'amincit et le STB devient majoritaire. Les capillaires fœtaux se rapprochent de la surface des villosités pour faciliter les échanges, et des structures syncytiales comme les nœuds et ponts apparaissent [13].

## **1.3 Changements physiologiques durant la grossesse**

Lors de la grossesse, le corps de la femme subit une série de modifications physiologiques à tous les niveaux afin de s'adapter et de répondre aux exigences de la gestation. Ces modifications visent à maintenir un équilibre optimal entre la mère et le fœtus, tout en garantissant un développement fœtal adéquat [14]. Ces changements se produisent de manière progressive mais continue tout au long de la grossesse et affectent divers systèmes, notamment les systèmes cardiovasculaire, digestif, pulmonaire, hématologique et endocrinien. Ces adaptations se renversent progressivement après la naissance de l'enfant et suite à la délivrance du placenta. Ces modifications se manifestent à travers divers symptômes cliniques, tels qu'une augmentation du volume plasmatique, de la fréquence cardiaque et du débit plasmatique, ainsi qu'une augmentation du débit ventilatoire. D'autres symptômes incluent l'apparition de nausées, de vomissements, de reflux gastrique et de constipation, une augmentation de la production des hormones thyroïdiennes, ainsi que des changements métaboliques influençant l'utilisation des substrats énergétiques (Sucre, Lipides) [15, 16].

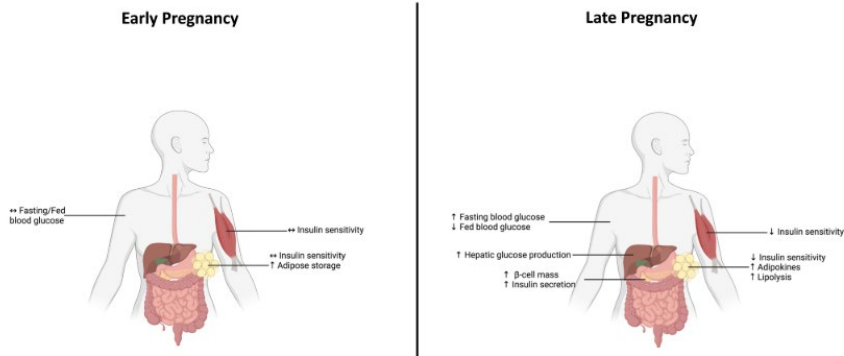
### **1.3.1 Adaptation métabolique durant la grossesse**

Le métabolisme regroupe l'ensemble des réactions biochimiques qui se déroulent en continu dans les cellules et qui assurent la synthèse (anabolisme) et la dégradation (catabolisme) des molécules nécessaires à la vie. Il permet de convertir les nutriments en énergie sous forme d'ATP ainsi qu'en composants essentiels au maintien de la croissance, de la survie et du fonctionnement cellulaire [17, 18]. Parmi les multiples processus métaboliques, le catabolisme du glucose joue un rôle central dans la biosynthèse de l'ATP, notamment via la glycolyse qui se déroule dans le cytoplasme, mais également via la phosphorylation oxydative mitochondriale (communément appelée respiration) à partir de molécules de stockage d'énergie (acétyl-CoA, NADH+ H<sup>+</sup>, forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide, et FADH<sub>2</sub>), produites au cours de l'oxydation du pyruvate et du cycle du citrate [19].

La grossesse est un processus énergétiquement exigeant qui nécessite une synchronisation des échanges entre la mère et le fœtus. Le développement fœtal et placentaire induit une augmentation progressive des besoins énergétiques maternels, entraînant ainsi une

élévation de la dépense énergétique au repos ainsi que de la dépense énergétique totale afin de soutenir le développement et la croissance fœtale [1]. La grossesse se caractérise par une réorganisation endocrino-métabolique complexe et la grossesse se divise en deux phases distinctes [20]:

- **Phase anabolique** : Elle s'étend sur le premier trimestre ainsi que la première partie du deuxième trimestre de la grossesse. Cette phase se caractérise par une augmentation des réserves glucidiques et lipidiques ainsi qu'une sensibilité accrue à l'insuline, permettant de répondre aux besoins maternels et fœto-placentaires en prévision de la fin de la gestation et de la lactation (Fig. 4)
- **Phase catabolique** : se déroule pendant le troisième trimestre. Cette phase est orientée vers la croissance fœtale. Elle se caractérise par une réduction significative de la sensibilité à l'insuline et une augmentation des concentrations maternelles de glucose et d'acides gras libres (Fig.4).



**Figure 4 : Modulations du métabolisme glucidique chez la femme enceinte.** Description des adaptations maternelles du métabolisme glucidique en début et en fin de grossesse. En début de grossesse, la sensibilité à l’insuline est globalement maintenue, permettant le stockage énergétique sous forme de tissu adipeux, sans variation significative de la glycémie. En fin de grossesse, une résistance à l’insuline s’installe au niveau des tissus périphériques tel que le muscle, le tissu adipeux et du foie, induisant une augmentation de la production hépatique de glucose, une élévation des glycémies à jeun et postprandiales, ainsi qu’une hyperinsulinisme compensatoire liée à l’expansion de la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques. Ces ajustements favorisent un transfert accru de glucose vers le fœtus, essentiel à sa croissance (Adapté de Yeo et al., Journal of Endocrinology 2022, 253(1).)

Le placenta joue un rôle central dans la réorganisation endocrino-métabolique de la grossesse. En effet, il assure une fonction endocrine en produisant de nombreuses hormones impliquées dans la régulation métabolique. Ces hormones et leurs fonctions sont détaillées dans le tableau 1 [21].

**Tableau 1 : Hormones placentaires et leurs rôles dans la réorganisation endocrinométabolique lors de la grossesse.** (Tiré de [21, 22] )

Hormones	Fonctions
Hormone de croissance placentaire (PGH)	Régulation de la gluconéogenèse et de la lipolyse maternelles Modulation de la résistance à l'insuline Soutient les adaptations métaboliques maternelles pendant la grossesse
Hormone lactogène placentaire humaine (hPL)	Augmentation des niveaux de glucose maternel Réduction de l'utilisation du glucose par la mère Stimulation de la lipolyse et promotion de la résistance à l'insuline Stimulation de la prolifération des cellules $\beta$ pancréatiques
Ghréline	Stimulation de l'appétit et de l'hyperphagie Régulation de l'équilibre énergétique Activation de la gluconéogenèse hépatique
Leptine	Régulation de la prise alimentaire et la dépense énergétique Modulation la différenciation des trophoblastes Favorise l'angiogenèse placentaire et le transport des nutriments
Irisine	Augmentation de la dépense énergétique en convertissant le tissu adipeux blanc en tissu adipeux brun Régulation du métabolisme du glucose et des lipides Amélioration de la sensibilité à l'insuline
Adiponectine	Favorisation du métabolisme du glucose et l'oxydation des acides gras Amélioration de la sensibilité à l'insuline Régulation de l'inflammation locale et systémique
Progestérone	Favorisation de la lipogenèse au cours de la phase anabolique de la grossesse pour assurer un stockage énergétique maternel Soutien de la fonction placentaire et module la sensibilité à l'insuline Maintien la grossesse en empêchant les contractions utérines
Œstrogènes	Favorisation de la lipogenèse au cours de la phase anabolique Augmentation de l'expression de la lipoprotéine lipase Régulation de la sensibilité à l'insuline et du métabolisme du glucose Contribution à l'adaptation vasculaire pour l'apport en nutriments au fœtus.

### 1.3.2 Le métabolisme glucidique durant la grossesse

Le maintien de l'homéostasie glucidique est essentiel au bon déroulement de la grossesse. Le glucose constitue en effet le principal substrat énergétique de l'unité fœto-placentaire. En raison de l'incapacité du fœtus à réaliser la gluconéogenèse, le transport placentaire du glucose représente son unique source d'approvisionnement énergétique [23]. Chez la femme enceinte, les glucides alimentaires principalement sous forme de disaccharides (saccharose, lactose, maltose) et de certains monosaccharides constituent la source principale de glucose. Leur digestion débute dans la cavité buccale avec l'action combinée de la mastication et de l'alpha-amylase salivaire sur l'amidon, puis se poursuit dans l'intestin grêle via l'amylase pancréatique, qui hydrolyse la majorité des polysaccharides. Enfin, les enzymes de la bordure en brosse des entérocytes (lactase, sucrase, maltase) assurent la transformation finale des disaccharides en monosaccharides, dont le glucose est la forme majoritairement absorbée [24]. Des études sur des modèles animaux, notamment chez les rongeurs et les ovins, ont montré que les changements hormonaux induits par la grossesse peuvent moduler l'absorption intestinale du glucose. Ces adaptations se traduisent par des modifications morphologiques de l'intestin grêle, telles qu'une augmentation de sa longueur, un épaississement de l'épithélium muqueux et un allongement des villosités intestinales. Ce remodelage est renforcé par l'action de la progestérone et de l'ocytocine, qui ralentissent le transit gastro-intestinal, augmentant ainsi le temps de contact entre les nutriments et la muqueuse intestinale, et par conséquent, la surface d'absorption disponible [25]. Une étude longitudinale menée auprès de 26 femmes enceintes a mis en évidence des variations significatives des niveaux de GLP-1 (glucagon-like peptide-1) au cours de la grossesse. Les réponses postprandiales en GLP-1 diminuent au deuxième et au troisième trimestre comparativement au premier, tandis que les concentrations à jeun restent relativement stables. Connue pour son rôle dans la régulation de l'appétit, la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques et la sensibilité à l'insuline, le GLP-1 pourrait également influencer indirectement l'absorption intestinale des nutriments en modulant les sensations de faim et la vidange gastrique, contribuant ainsi aux ajustements métaboliques propres à la gestation [26]. Enfin, la grossesse s'accompagne de modifications notables de la composition du microbiote intestinal maternel, caractérisées par une diminution de sa diversité, en particulier au cours du troisième trimestre. Ces modifications rappellent celles qui sont observées dans les états d'obésité ou de diabète de

type 2 et pourraient influencer les mécanismes d'absorption du glucose et contribuer aux adaptations métaboliques propres à la gestation [27]. Ces adaptations gastro-intestinales semblent favoriser l'absorption du glucose qui s'effectue grâce à des systèmes de transport actif, assuré par le transporteur SGLT1, qui fait entrer les glucides dans les entérocytes en même temps que le sodium ( $\text{Na}^+$ ), en exploitant le gradient électrochimique généré par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Cette dernière utilise l'ATP pour maintenir ce gradient en échangeant 3  $\text{Na}^+$  contre 2  $\text{K}^+$ [24]. Le mécanisme de diffusion passive concerne spécifiquement l'absorption du fructose dans l'intestin, via les transporteurs GLUT5 et, dans une moindre mesure, GLUT2 [28]. Par ailleurs, une étude menée chez le rat a mis en évidence une augmentation de l'expression des transporteurs GLUT5 et SGLT1 en fin de gestation, ce qui suggère une adaptation de l'intestin visant à optimiser l'absorption des glucides durant la grossesse [29].

Au cours de la grossesse, le métabolisme du glucose, tant basal que postprandial, évolue progressivement afin de répondre aux besoins nutritionnels de la mère et du fœtus [30]. Au début de la grossesse, la glycémie maternelle à jeun diminue, en partie en raison des effets de dilution liés à l'augmentation du volume sanguin maternel. Elle reste stable au cours du deuxième trimestre avant de diminuer davantage au troisième trimestre, pendant lequel la glycémie à jeun passe de 75 à 65 mg/dl [14, 21]. Cette baisse s'explique par une augmentation des besoins en glucose du fœtus aux alentours de la 26<sup>e</sup> semaine de gestation. Le dernier trimestre se caractérise également par une augmentation de 30 % de la production endogène basale de glucose. Plus particulièrement visible entre 34 et 36 semaines de gestation, en comparaison avec les mesures effectuées entre 12 et 14 semaines de gestation [1, 21]. Des études ont montré que simultanément à la diminution de la glycémie à jeun ainsi que l'augmentation de la production hépatique de glucose, une élévation de l'insulinémie à jeun est observée chez la femme enceinte. Bien que la production hépatique de glucose soit normalement inhibée par l'insuline, cette dernière continue néanmoins d'augmenter malgré une élévation de l'insulinémie à jeun. Cette dynamique traduit une diminution de la sensibilité hépatique maternelle à l'insuline, correspondant à l'installation progressive d'une résistance à l'insuline au niveau des tissus périphériques maternels [30].

### ***.1.3.2.1 Alteration de la sensibilité à l'insuline durant la grossesse***

La sensibilité des tissus périphériques à l'insuline est considérée comme l'un des principaux déterminants de l'homéostasie glucidique. Cette dernière évolue de manière dynamique tout au long de la grossesse. [14]. Depuis le milieu jusqu'à la fin de la gestation, l'apport alimentaire maternel ainsi que le stockage des graisses augmentent davantage. Cependant, le métabolisme maternel subit une transformation marquée par l'apparition d'une résistance à l'insuline. La sensibilité globale à l'insuline diminue alors de 45 à 70 % [31].

Le placenta joue un rôle majeur dans l'établissement des mécanismes sous-jacents à la résistance périphérique à l'insuline, caractéristique de la grossesse. En raison de sa fonction endocrine, expliquée précédemment, il sécrète des hormones qui modulent l'utilisation du glucose par les tissus périphériques. Cette régulation permet d'orienter préférentiellement le glucose issu de la circulation maternelle vers l'unité fœto-placentaire, garantissant ainsi les apports énergétiques nécessaires au fœtus en développement [32].

Les mécanismes par lesquels les hormones placentaires induisent la résistance maternelle à l'insuline impliquent plusieurs voies hormonales, principalement via l'action de l'hormone de croissance placentaire (PGH) et de l'hormone lactogène placentaire humaine (hPL). En effet, la PGH est sécrétée par le placenta au milieu de la grossesse pour remplacer l'hormone de croissance hypophysaire maternelle. La PGH agit au niveau des tissus périphériques maternels et contribue à instaurer une résistance à l'insuline de manière directe ou indirecte. Elle agit au niveau du tissu adipeux maternel en stimulant la lipolyse, augmentant ainsi la concentration des acides gras libres, qui interfèrent avec la signalisation de l'insuline au sein des tissus périphériques tels que le muscle et le foie. De plus, la PGH accroît la production hépatique de glucose, perturbant ainsi la signalisation insulinique. Au niveau cellulaire, l'hormone de croissance maternelle augmente l'expression de p85 $\alpha$ , une protéine qui inhibe l'activité de PI3K, ainsi que celle du substrat 1 de l'insuline (IRS-1). Dans le foie, cette inhibition perturbe la signalisation insulinique, réduisant la translocation de GLUT4 et, par conséquent, l'absorption du glucose par le tissu musculaire [33].

L'hormone lactogène placentaire humaine (hPL), produite par les syncytiotrophoblastes, ainsi que la prolactine sécrétée par les cellules lactotropes de l'hypophyse maternelle, contribuent à compenser la résistance à l'insuline en stimulant l'expansion des cellules  $\beta$  pancréatiques et en augmentant la sécrétion d'insuline. De plus, ces hormones induisent une

résistance centrale à la leptine, maintenant ainsi une hyperphagie maternelle et favorisant le stockage des graisses. L'hPL augmente également la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose (GSIS). Toutefois, de manière paradoxale, l'hPL contribue également à la résistance à l'insuline en altérant la sensibilité des tissus périphériques à cette hormone [34].

La progestérone, produite principalement par les syncytiotrophoblastes du placenta au cours de la grossesse, contribue également à la résistance à l'insuline en inhibant la signalisation insulinique dans le tissu adipeux et le muscle. Parallèlement, les taux circulants maternels d'adiponectine, une hormone sécrétée presque exclusivement par les adipocytes matures, diminuent, ce qui réduit davantage la sensibilité à l'insuline. De plus, l'augmentation du rapport leptine/adiponectine dans la circulation maternelle accentue ces altérations métaboliques [31].

### ***1.3.2.2 Glycogénogenèse hépatique***

Au cours de la grossesse, des adaptations métaboliques hépatiques significatives surviennent, notamment dans le métabolisme glucidique, afin de répondre aux besoins énergétiques accrus de la mère et du fœtus en développement. La production hépatique maternelle de glucose augmente progressivement du début à la fin de la grossesse, sous l'effet d'une modulation transitoire de la sensibilité hépatique à l'insuline [35]. Cette adaptation permet d'assurer un apport suffisant en glucose à l'unité fœto-placentaire, dont l'approvisionnement repose principalement sur la gluconéogenèse hépatique. Ces ajustements métaboliques résultent notamment d'une inhibition de la synthèse du glycogène hépatique, favorisant ainsi une production accrue de glucose. Ils impliquent l'action de plusieurs hormones placentaires et facteurs paracrines, tels que l'hormone de croissance placentaire (PGH), les œstrogènes, la progestérone et le glucagon, qui induisent des modifications spécifiques de l'activité des enzymes hépatiques [36]. En effet, la grossesse s'accompagne d'une augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans la gluconéogenèse, notamment la glucose-6-phosphatase (G6Pase) et la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Parallèlement, on observe une diminution de l'activité de la glycogène synthase, limitant ainsi le stockage du glucose sous forme de glycogène et renforçant la disponibilité du glucose pour le fœtus [25].

### ***1.3.2.3 Utilisation du glucose par le placenta***

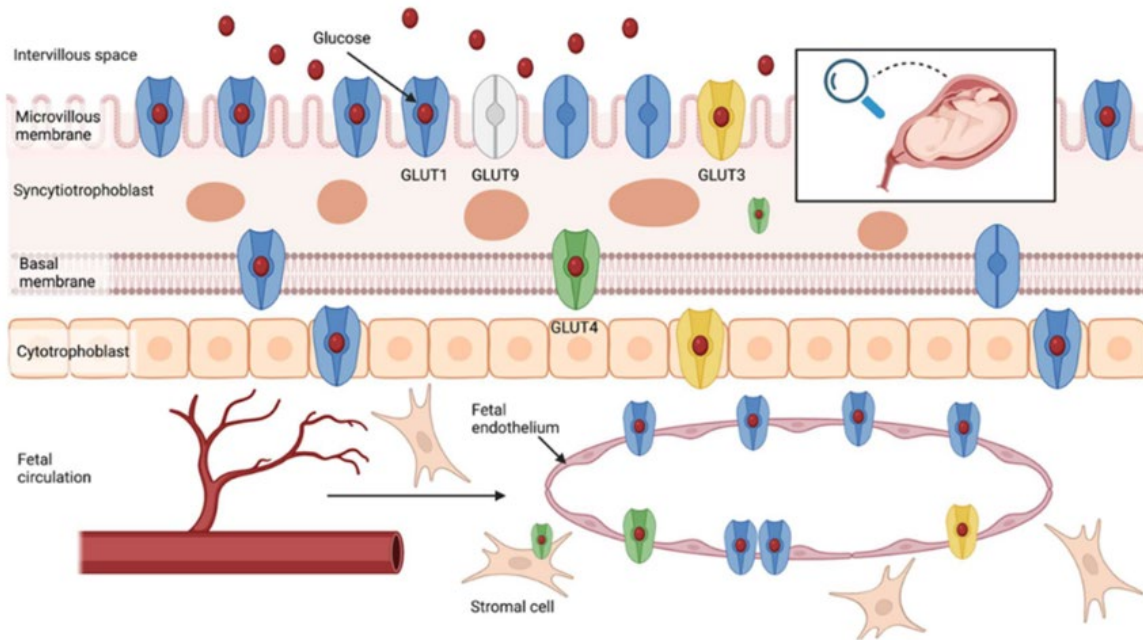
Le placenta est un organe hautement énergivore. Le glucose constitue sa principale source d'énergie, dont environ 50 % est oxydé au sein du placenta, tandis que 20 % est transféré au fœtus par des mécanismes dépendant du gradient de concentration glucidique, le reste étant métabolisé en lactate [37]. Contrairement au métabolisme hépatique maternel, le placenta adopte une stratégie inverse en accumulant du glycogène de façon précoce, avec un pic en fin de premier trimestre, avant une décroissance progressive. Cette complémentarité métabolique entre le foie maternel et le placenta garantit une disponibilité énergétique continue et adaptée aux besoins croissants du fœtus au fil de la gestation [38]. Dans le placenta humain, le glycogène est majoritairement localisé dans les cellules cytotrophoblastiques, en particulier dans les régions distales proches de la décidue. Il est également détecté au premier trimestre dans les syncytiotrophoblastes et les cellules déciduales, tandis qu'à terme, sa présence se restreint aux cellules endothéliales, aux trophoblastes extra-villeux et aux cellules déciduales basales. Les cellules de Hofbauer, bien qu'exprimant les enzymes du métabolisme glycogénique, n'accumulent pas de glycogène. Les trophoblastes extra-villeux présentent un gradient : les cellules distales sont riches en glycogène, tandis que les cellules proximales en contiennent peu, traduisant une spécialisation liée à leur localisation et à leur différenciation [39]. Cette intense activité métabolique se traduit par une production d'environ 5 mmol d'ATP par gramme de tissu et par minute, soit plus de 2,5 kg d'ATP par jour à terme. Une telle demande énergétique est essentielle pour assurer des fonctions vitales telles que le transport des nutriments et la synthèse protéique, qui représentent à elles seules plus de 50 % de la consommation totale d'ATP [37].

### ***1.3.2.4 Transport cellulaire du glucose***

Le glucose, en raison de sa taille et de sa nature polaire, ne peut traverser librement la membrane cellulaire par simple diffusion. Son passage nécessite l'intervention de protéines spécialisées appelées transporteurs de glucose. On en distingue principalement deux grandes familles : les transporteurs sodium-glucose couplés (SGLT) et les transporteurs de diffusion facilitée (GLUT) [40].

Les SGLT sont impliqués dans un transport actif secondaire, qui facilite le passage du glucose à travers les membranes cellulaires grâce à un mécanisme dépendant du cotransport du sodium. Ils utilisent comme source d'énergie le gradient de concentration du sodium maintenu par la pompe sodium-potassium ATPase. Ces transporteurs jouent un rôle essentiel dans l'absorption intestinale du glucose et dans sa réabsorption rénale après filtration glomérulaire (Tableau 2)[41]. En parallèle, les GLUT assurent un transport passif du glucose selon son gradient de concentration. Ce mécanisme, qui ne nécessite donc pas d'apport énergétique, repose sur des transporteurs spécifiques permettant au glucose de diffuser efficacement à travers la membrane cellulaire en fonction des besoins métaboliques (Tableau 3) [42].

Au niveau du placenta humain, sept isoformes de transporteurs du glucose sont exprimés : GLUT1, 3, 4, 8, 9, 10 et 12 (Fig.5). GLUT1, exprimé de manière ubiquitaire, est particulièrement abondant dans le syncytiotrophoblaste, avec une distribution asymétrique favorisant la membrane micro vilieuse en contact avec le compartiment maternel. GLUT3, également localisé sur la membrane micro vilieuse du syncytiotrophoblaste, voit son expression diminuer au cours de la gestation et facilite le transport rapide du glucose en cas de faible disponibilité. GLUT4, présent dans le cytosol du syncytiotrophoblaste au premier trimestre, est régulé par l'insuline. D'autres transporteurs, notamment GLUT8, GLUT9, GLUT10 et GLUT12, sont également détectés dans le placenta, bien que leurs rôles précis et leurs localisations restent encore peu caractérisés. L'expression et la fonction de ces transporteurs évoluent au cours de la grossesse [43].



**Figure 5 : Distribution des transporteurs de glucose (GLUT) dans le placenta humain :** localisation cellulaire et orientation transplacentaire. Le transporteur GLUT1, fortement exprimé sur les membranes apicale et basale du syncytiotrophoblaste, joue un rôle central dans le passage du glucose du sang maternel vers la circulation fœtale. GLUT3, à haute affinité, renforce ce transport, notamment à faible concentration. GLUT9, localisé au pôle apical, et GLUT4, exprimé dans le cytotrophoblaste, l'endothélium fœtal et les cellules stromales, complètent ce système. Ensemble, ces transporteurs assurent un transfert contrôlé du glucose, essentiel à la croissance du fœtus [42].

**Tableau 2 : Les différents types de transporteurs sodium-glucose couplés et leurs localisations (Tiré de [44]).**

SLGT	Localisation
SGLT1	Membrane apicale des cellules de l'intestin grêle Cellules droites (cellules S3) du tubule proximal du néphron
SGLT2	Tubule contourné proximal du néphron (Cellules S1 et S2)
SGLT3	L'intestin, les testicules, l'utérus, les poumons, le cerveau et la thyroïde
SGLT4	L'intestin, le rein, le foie, le cerveau, les poumons, l'utérus et le pancréas
SGLT5	Cortex rénal
SGLT6	Le cerveau, les reins et l'intestin

**Tableau 3 : Différents types de transporteurs de glucose par diffusion facilitée et leurs localisations. ( Tiré de [42])**

GLUT	Localisation
GLUT1	Présence ubiquitaire
GLUT2	Cellules bêta du pancréas, le foie, les reins, cellules de la bordure en brosse de l'intestin.
GLUT3	Principalement dans le cerveau
GLUT4	Le cœur, les muscles squelettiques, le tissu adipeux et le cerveau.
GLUT5	Les cellules de l'intestin grêle, des testicules et des reins.
GLUT6	Les cellules du cerveau, de la rate et dans les leucocytes périphériques.
GLUT7	Les cellules de l'intestin grêle, du côlon, des testicules et de la prostate.
GLUT8	Les cellules germinales des testicules, le cerveau
GLUT9	Le tubule proximal du rein, le foie et le placenta.
GLUT10	Les muscles squelettiques, le cœur, les poumons, le cerveau, le placenta, les reins, le foie et le pancréas.
GLUT11	Le cœur, les muscles squelettiques, les reins, le placenta, le tissu adipeux et le pancréas
GLUT12	Les cellules du tissu adipeux, de l'intestin grêle, des muscles squelettiques et du placenta
GLUT13	Le tissu adipeux et les cellules rénales, et principalement dans le cerveau

## 1.4 Métabolisme du glucose dans le trophoblaste

### 1.4.1 Catabolisme du glucose en aérobie

Le catabolisme du glucose dans les cellules trophoblastiques repose sur l'interaction de deux voies : la glycolyse cytoplasmique et la respiration mitochondriale. La glycolyse convertit le glucose en pyruvate avec un faible rendement énergétique. En présence d'oxygène, le pyruvate est transformé en acétyl-CoA, qui alimente le cycle de Krebs. Ce dernier génère des coenzymes réduites, nécessaires à la phosphorylation oxydative dans la chaîne respiratoire. En parallèle, une partie du pyruvate peut être réduite en lactate pour maintenir la glycolyse active. L'ensemble de ces processus assure une production d'énergie adaptée aux besoins du trophoblaste pendant la grossesse [37].

#### 1.4.1.1 La glycolyse

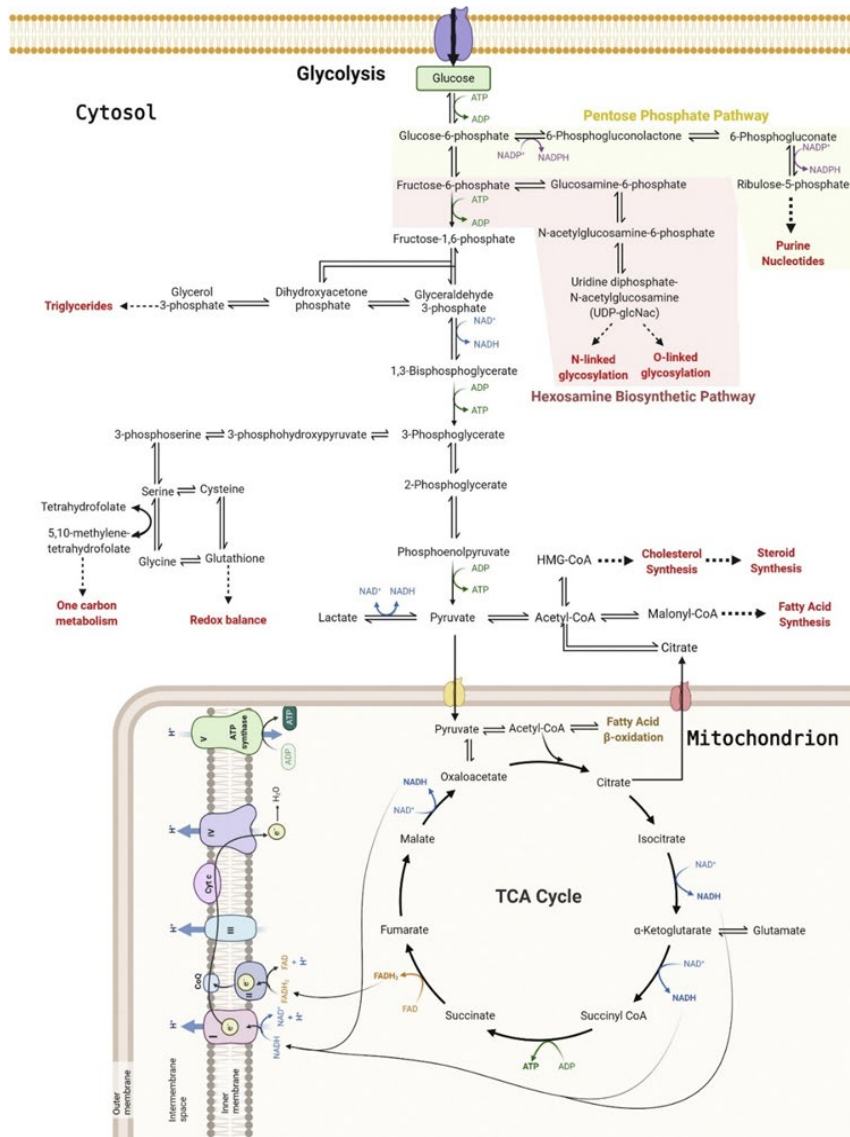
La glycolyse est l'une des voies métaboliques les plus conservées et aussi les mieux caractérisées, étant étudiée depuis les années 1950. Ce processus anaérobie, qui se déroule dans le cytoplasme, comprend dix réactions enzymatiques successives convertissant une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate. Elle produit un gain net de deux ATP, deux NADH+H<sup>+</sup> et deux molécules d'eau [45]. Ces étapes sont divisées en deux phases : la phase préparatoire, durant laquelle le glucose est scindé en deux trioses phosphates avec consommation de deux ATP, et la phase de restitution, où ces trioses sont transformés en pyruvate, générant quatre ATP et deux NADH+H<sup>+</sup>. Deux étapes clés de la phase préparatoire incluent la phosphorylation du glucose par l'hexokinase et celle du fructose-6-phosphate par la phosphofructokinase, cette dernière constituant l'étape irréversible. La phase de restitution culmine avec la conversion du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate par le pyruvate kinase, produisant deux ATP supplémentaires [46] (Fig.6).

Au cours de la grossesse, la glycolyse joue un rôle central et multifonctionnel, en soutenant à la fois le développement embryonnaire, la formation du placenta et l'équilibre métabolique à l'interface fœto-maternelle. Dès le stade préimplantatoire, l'embryon utilise principalement le pyruvate comme source d'énergie [47]. Toutefois, à mesure que le blastocyste se forme, une reprogrammation métabolique s'opère, marquée par une augmentation de l'activité glycolytique. Ce changement permet une production rapide d'ATP ainsi que la

génération d'intermédiaires essentiels à la biosynthèse des acides aminés, des nucléotides et des lipides, soutenant ainsi la prolifération cellulaire et la différenciation [47]. Dans le placenta en développement, la glycolyse est particulièrement active durant le premier trimestre, période caractérisée par un environnement physiologiquement hypoxique. Elle permet aux cellules trophoblastiques d'assurer leurs fonctions invasives, le remodelage des artères spiralées et les échanges foeto-maternel, tout en favorisant la production de lactate. Loin d'être un simple déchet métabolique, ce dernier joue un rôle clé dans la signalisation cellulaire, l'angiogenèse, la modulation immunitaire et la nutrition du fœtus [47]. Ce métabolisme glycolytique est particulièrement prononcé chez les CTB, qui présentent une activité glycolytique significativement plus élevée que les STB. Même en condition aérobie, les CTB produisent d'importantes quantités de lactate, traduisant une glycolyse intense. Cette production énergétique rapide est essentielle pour soutenir leurs fonctions prolifératives et biosynthétiques, notamment la lipogenèse et l'estérification des acides gras, nécessaires à la croissance et au maintien du placenta. En comparaison, la fusion des CTB en STB s'accompagne d'une baisse marquée de l'activité glycolytique et d'un remaniement mitochondrial, ce qui reflète une spécialisation fonctionnelle distincte [48]. Par ailleurs, la glycolyse joue un rôle crucial durant le processus de décidualisation. Ce dernier repose sur l'activation de plusieurs effecteurs glycolytiques tels que le transporteur de glucose GLUT1, l'hexokinase 2 (HK2), la pyruvate kinase M2 (PKM2) et la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (PFKFB3). Ces enzymes soutiennent les fonctions métaboliques et immunologiques des cellules utérines, notamment les cellules NK et les macrophages, et contribuent à l'instauration d'un environnement immunologiquement tolérant propice à l'implantation et à la progression de la grossesse [47].

#### ***1.4.1.2 Décarboxylation oxydative du pyruvate***

La décarboxylation oxydative du pyruvate est considérée comme la réaction charnière qui lie la glycolyse avec le cycle du citrate. C'est une réaction irréversible qui se déroule au niveau de la matrice mitochondriale ; elle est catalysée par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDH) et permet de convertir les deux molécules de pyruvate issues de la glycolyse en deux molécules d'acétyl-CoA qui vont être métabolisées dans le cycle du citrate [49] (Fig.6).



**Figure 6 : Vue d'ensemble des voies métaboliques dérivées du glucose : glycolyse, cycle de Krebs, chaîne respiratoire.** Le glucose est métabolisé dans le cytosol par la glycolyse, produisant du pyruvate, de l'ATP et du NADH. Le pyruvate est ensuite transporté dans la mitochondrie, où il subit une décarboxylation oxydative en acétyl-CoA, point d'entrée du cycle de Krebs. Ce cycle génère des coenzymes réduits (NADH, FADH<sub>2</sub>), dont les électrons alimentent la chaîne de transport mitochondrial, assurant la synthèse d'ATP par couplage chimiosmotique. Ce réseau coordonné constitue le noyau central de la production énergétique à partir du glucose chez les cellules en condition aérobie (Adapté de Aye et al., American Journal of Obstetrics and Gynecology 2022, 226(2S).)

### ***1.4.1.3 Oxydation de l'acétyl-CoA dans le cycle du citrate***

Le cycle du citrate, aussi appelé cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) ou cycle de Krebs, constitue une voie métabolique centrale impliquée dans la production d'énergie et la biosynthèse. Il assure l'oxydation de l'acétyl-CoA issu de la glycolyse, de la  $\beta$ -oxydation des acides gras et de la dégradation des acides aminés. Ses réactions se déroulent majoritairement dans la matrice mitochondriale (Fig.6). Toutefois, des études récentes ont mis en évidence la présence d'enzymes du cycle TCA dans d'autres compartiments, notamment le noyau de cellules souches embryonnaires de souris. Ces observations remettent en question la stricte compartimentation du métabolisme et suggèrent un lien fonctionnel entre activités métaboliques et régulation nucléaire [50, 51].

Le cycle du citrate débute par la condensation de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate sous l'action de la citrate synthase, formant du citrate. Celui-ci est converti successivement en isocitrate,  $\alpha$ -cétoglutarate, succinyl-CoA, succinate, fumarate, malate, puis régénère l'oxaloacétate. Ces réactions permettent la production de coenzymes réduites (NADH+H<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>), qui alimentent la chaîne respiratoire mitochondriale et contribuent à la synthèse d'ATP via la phosphorylation oxydative (Fig.6). La succinate déshydrogénase, enzyme du cycle également intégrée au complexe II de la chaîne respiratoire, permet l'interconnexion directe entre ces deux voies [50, 52].

En plus de son rôle catabolique, le cycle du citrate participe activement à l'anabolisme cellulaire. En effet, des métabolites, tels que le citrate, peuvent être exportés vers le cytosol, où ils sont convertis en acétyl-CoA et oxaloacétate. L'acétyl-CoA est utilisé dans la synthèse des lipides, tandis que l'oxaloacétate intervient dans la biosynthèse des nucléotides et la gluconéogenèse. La mobilisation de ces intermédiaires pour des fonctions biosynthétiques requiert leur reconstitution afin d'assurer la continuité du cycle. Cette anaplérose repose notamment sur la conversion du pyruvate en oxaloacétate par le pyruvate carboxylase, ainsi que sur la glutaminolyse, qui transforme la glutamine en glutamate puis en  $\alpha$ -cétoglutarate [52].

Ce lien entre métabolisme mitochondrial et fonctions biosynthétiques s'illustre particulièrement dans la différenciation trophoblastique. Une étude récente menée sur les cellules BeWo a montré que plusieurs métabolites du cycle du citrate, notamment le citrate et l' $\alpha$ -cétoglutarate, augmentent au cours de la différenciation, indiquant un remodelage métabolique associé à l'activation mitochondriale [53]. L'expression du transporteur

mitochondrial du citrate (CIC, SLC25A1) diminue également, ce qui réduit l'export du citrate vers le cytosol. Cette diminution affecte la régulation épigénétique, puisque l'inactivation du CIC entraîne des défauts d'acétylation des histones et altère la différenciation biochimique. Fait notable, ces altérations peuvent être partiellement restaurées par l'ajout d'acétate exogène, soulignant le rôle central des intermédiaires du cycle de Krebs dans la coordination entre métabolisme énergétique et régulation épigénétique au cours de la différenciation trophoblastique. La régulation du cycle du citrate repose sur plusieurs niveaux de contrôle. Sur le plan allostérique, le  $\text{NADH}+\text{H}^+$  et l'ATP exercent un effet inhibiteur sur les principales enzymes du cycle, comme la pyruvate déshydrogénase (PDH) et l'isocitrate déshydrogénase (IDH), tandis qu'un rapport élevé ADP/ATP favorise leur activation. La disponibilité des substrats influence également le flux métabolique : un excès d'acétyl-CoA inhibe la PDH mais active la pyruvate carboxylase, contribuant à l'anaplérose (le processus qui remplit le cycle de Krebs pour maintenir sa fonction énergétique). D'autres intermédiaires comme le succinyl-CoA ou l'oxaloacétate peuvent inhiber respectivement la citrate synthase et la succinate déshydrogénase, maintenant ainsi un équilibre dynamique entre production d'énergie et biosynthèse. Enfin, le lien direct entre le cycle du citrate et la chaîne de transport des électrons conditionne l'efficacité globale de la respiration mitochondriale et reflète l'intégration fine entre les états énergétiques et les besoins métaboliques de la cellule [53].

#### ***1.4.1.4 La phosphorylation oxydative***

La phosphorylation oxydative (OXPHOS) constitue l'étape finale de l'oxydation des substrats énergétiques (Fig.6). Ce processus, dépendant de l'oxygène, se déroule au sein de la membrane interne de la mitochondrie. Le fonctionnement bioénergétique mitochondrial repose sur la chaîne de transport des électrons (CTE), constituée des complexes I à IV situés dans la membrane interne. Ces complexes transfèrent les électrons permettant de générer un gradient électrochimique de protons qui est utilisé par l'ATP synthase pour produire l'ATP [54]:

- **Complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase)**

Il s'agit du plus grand complexe de la CTE. Le complexe I accepte les électrons du  $\text{NADH}+\text{H}^+$  provenant du cycle du citrate grâce à la présence du groupement de flavine mononucléotide

(FMN) qui acceptent les électrons directement du NADH+H<sup>+</sup>. Les électrons sont ensuite transférés au groupement fer-soufre (FeS) pour passer à l'ubiquinone (CoQ).

- **Complexe II (Succinate déshydrogénase)**

Le complexe II se distingue par le fait qu'il est le seul complexe impliqué à la fois dans le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. Il se lie de manière covalente au FADH<sub>2</sub>, qui lui sert de cofacteur. Les électrons liés au FADH<sub>2</sub> sont transférés de manière séquentielle : d'abord aux clusters fer-soufre (FeS) du complexe, puis à l'ubiquinone (CoQ).

- **Complexe III (Coenzyme Q : cytochrome c réductase)**

Le complexe III transfère les électrons de l'ubiquinol (CoQH<sub>2</sub>) au cytochrome C, tout en pompant quatre protons à travers la membrane interne mitochondriale.

- **Complexe IV (Cytochrome c oxydase)**

Le complexe IV, est le dernier complexe de la chaîne de transport des électrons. Il permet de catalyser la réduction de l'oxygène moléculaire en eau.

- **Complexe V (ATP synthase)**

L'ATP synthase (complexe V) convertit l'énergie du gradient de protons en ATP via un mécanisme rotatif. Ce processus final de la phosphorylation oxydative est régulé par la force proton-motrice et le rapport ATP/ADP, avec un rendement de 3 à 4 protons par ATP.

La régulation de la phosphorylation oxydative est assurée par la disponibilité en substrats, en oxygène et par la force proton-motrice ( $\Delta p$ ). Un potentiel électrique membranaire élevé favorise la production d'espèces réactive à l'oxygène (ERO), contrôlée en partie par les protéines découplantes (PDC), au détriment de l'efficacité énergétique. Les ERO, impliqués dans la signalisation cellulaire, sont régulés par le NADPH+H<sup>+</sup> et les systèmes antioxydants. Par ailleurs, la dynamique mitochondriale (fusion/fission) influence l'organisation de la chaîne respiratoire et l'efficacité de la synthèse d'ATP [55].

Selon une étude portant sur des placentas humains à terme, le cytotrophoblaste (CTB) présente une activité mitochondriale, une consommation d'oxygène et des niveaux d'ATP au

repos significativement plus élevés que le syncytiotrophoblaste (STB), suggérant que le CTB contribue davantage à la respiration mitochondriale et à la production d'énergie dans le placenta à terme [48]. Contrairement à l'idée longtemps admise selon laquelle le STB constituait le principal moteur métabolique du placenta, il apparaît que la différenciation des CTB en STB s'accompagne d'une réduction marquée de la respiration mitochondriale et d'une fragmentation du réseau mitochondrial. Les CTB se distinguent ainsi par leur flexibilité métabolique et leur capacité à soutenir une respiration oxydative élevée en fonction des besoins, soulignant leur rôle central dans le métabolisme placentaire à ce stade de la gestation [48].

## **1.4.2 Catabolisme du glucose en anaérobie**

### ***1.4.2.1 Réduction du pyruvate en lactate***

Le lactate (ou acide lactique), produit final de la glycolyse anaérobie, joue un rôle multifonctionnel crucial à l'interface fœto-maternelle, en particulier au cours du premier trimestre. Longtemps considéré comme un simple sous-produit métabolique, il est aujourd'hui reconnu comme une molécule bioactive, dotée de fonctions énergétiques, signalétiques, immunomodulatrices et épigénétiques, essentielles au bon déroulement de la grossesse [19, 56]. Plusieurs tissus contribuent activement à sa production dès les premières étapes de la grossesse. Le blastocyste en est un site majeur dès l'implantation, suivi par le placenta, qui maintient une activité glycolytique soutenue tout au long de la grossesse. Les CTB, en particulier, présentent une glycolyse fortement amplifiée en condition hypoxique, caractéristique du premier trimestre, soutenue par une expression accrue de la lactate déshydrogénase A (LDHA) [56]. Ce métabolisme glycolytique intense conduit à une production massive de lactate : on estime que plus de 90 % du glucose consommé par le blastocyste est converti en lactate, même en présence d'oxygène. Une fois exporté avec des protons ( $H^+$ ), le lactate contribue à l'acidification du microenvironnement utérin. Ce pH abaissé induit des modifications fonctionnelles dans les cellules endométriales, favorisant la réceptivité utérine et facilitant l'implantation embryonnaire [57]. Le lactate constitue une source énergétique majeure pour le fœtus et le placenta. Il est oxydé dans des tissus fœtaux à forte activité métabolique, comme le cœur, le foie et le cerveau, et contribue à environ 25 % de la production de  $CO_2$  fœtal. Son transport est assuré par les transporteurs de monocarboxylates MCT1 et MCT4, qui régulent son passage entre les compartiments maternel, placentaire et fœtal en fonction des besoins métaboliques [58]. Sur le

plan épigénétique, le lactate participe également à la régulation transcriptionnelle par le biais de la lactylation des histones, une modification post-traductionnelle qui influence l'accessibilité de l'ADN. Cette régulation épigénétique soutient notamment l'expression de gènes impliqués dans la réceptivité endométriale et la transformation déciduale [19]. Enfin, au niveau immunologique, le lactate contribue activement à l'établissement d'un climat de tolérance fœtale. Il oriente les macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire, réduit l'activité cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK, et favorise l'émergence de cellules dendritiques tolérantes sécrétrices d'IL-10. Il soutient également un profil immunitaire de type Th2, favorable à la poursuite de la grossesse [58].

### 1.4.3 Régulation cellulaire du métabolisme du glucose dans le trophoblaste

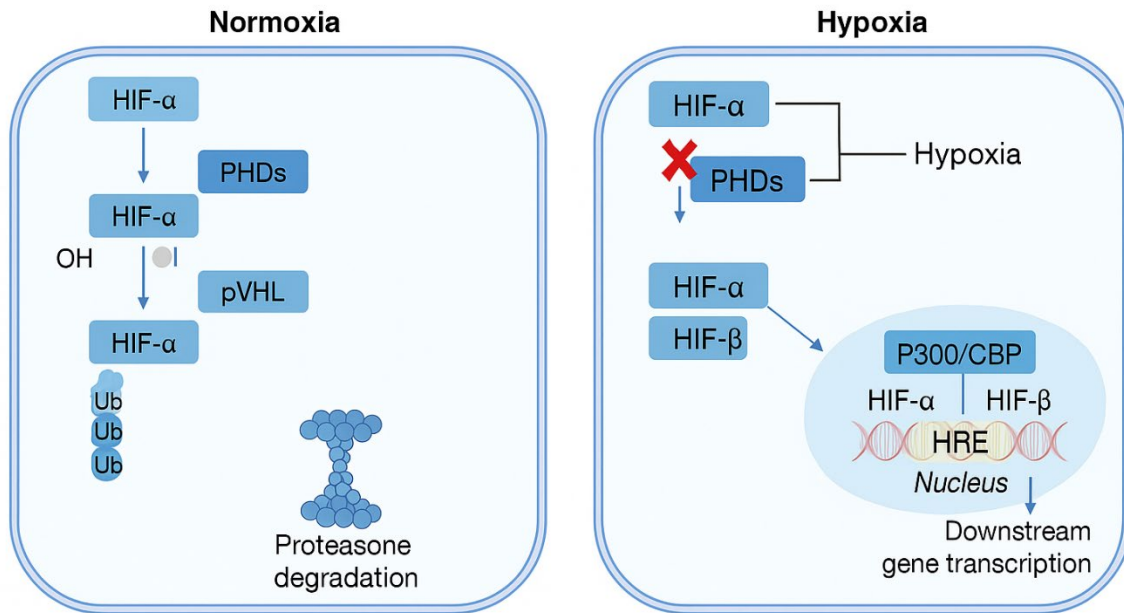
Le bon fonctionnement du métabolisme cellulaire du glucose repose sur des senseurs énergétiques. Ces senseurs agissent en synergie pour maintenir l'équilibre métabolique et ajuster la réponse aux stress énergétiques en modulant les voies anaboliques et cataboliques du placenta. Parmi les principaux régulateurs impliqués figurent le facteur induit par l'hypoxie (HIF1 $\alpha$ ), le récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR $\gamma$ ) et la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). Ces régulateurs métaboliques permettent au placenta de s'adapter aux variations de l'environnement maternel et de garantir un apport énergétique optimal pour le développement fœtal [47].

#### ➤ HIF1 $\alpha$ :

Le facteur induit par l'hypoxie  $\alpha$  fait partie du complexe hétérodimérique de liaison à l'ADN composé de deux protéines basiques hélice-boucle-hélice de la famille PAS (PER, AHR, ARNT et SIM) : HIF1 $\beta$ , qui est constitutif, et l'une des sous-unités HIF1 $\alpha$  ou HIF2 $\alpha$ , induites par l'hypoxie. En condition d'hypoxie (absence d'oxygène), l'hétérodimère  $\alpha/\beta$  se lie à une séquence penta-nucléotidique centrale (RCGTG) située dans les éléments de réponse à l'hypoxie (HREs) des gènes cibles [59].

Les sous-unités  $\beta$  constituent des protéines nucléaires insensibles à l'oxygène, tandis que les sous-unités  $\alpha$  jouent un rôle déterminant dans la signalisation du complexe, leur stabilité étant strictement régulée par la disponibilité en oxygène [60]. En conditions de normoxie, la

demi-vie de HIF-1 $\alpha$  est particulièrement brève, inférieure à 5 minutes. Cette instabilité résulte de l'hydroxylation de HIF1 $\alpha$  sur des résidus proline conservés, catalysée par les prolyl hydroxylases (PHD), des enzymes sensibles à l'oxygène. Cette modification post-traductionnelle facilite l'ubiquitination de HIF1 $\alpha$  par la ligase ubiquitine E3 von Hippel-Lindau (VHL), conduisant ainsi à sa dégradation rapide par le protéasome (Fig.7) [61].



**Figure 7 : Contrôle post-traductionnel de HIF- $\alpha$  par les PHDs et le complexe pVHL en fonction de la disponibilité en oxygène.** En conditions normoxiques, la sous-unité HIF- $\alpha$  est hydroxylée par les prolyl-hydroxylases (PHDs), ce qui permet sa reconnaissance par le complexe E3 ubiquitine ligase contenant la protéine pVHL (von Hippel–Lindau), entraînant son ubiquitination et sa dégradation protéasomale. En situation d'hypoxie, l'inhibition de l'activité des PHDs empêche l'hydroxylation de HIF- $\alpha$ , conduisant à sa stabilisation. HIF- $\alpha$  peut alors s'associer à HIF- $\beta$ , se lier aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) dans l'ADN, recruter les coactivateurs transcriptionnels p300/CBP, et induire la transcription de gènes cibles impliqués dans la réponse adaptative à l'hypoxie . (Adapté de Tong et al., *Journal of Physiology* 2025.)

En conditions hypoxiques, l'inhibition des PHDs réduit l'hydroxylation de HIF1 $\alpha$ , empêchant ainsi son marquage pour la dégradation par le protéasome. Par conséquent, HIF1 $\alpha$  s'accumule, migre vers le noyau et se lie aux éléments de réponse à l'hypoxie, initiant ainsi la transcription de gènes impliqués dans l'adaptation cellulaire au stress hypoxique (Fig.7) [62].

De plus, HIF1 $\alpha$  contrôle la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques. L'activité de HIF1 $\alpha$  est liée à divers processus métaboliques, notamment l'effet Warburg, qui favorise la glycolyse et la fermentation lactique même en présence d'oxygène dans les cellules cancéreuses. En situation de normoxie la phosphorylation oxydative dans les mitochondries produit la majorité de l'ATP cellulaire, consommant près de 90 % de l'oxygène disponible. La régulation du métabolisme par HIF1 $\alpha$  permet d'adapter la production d'ATP à la disponibilité en oxygène, garantissant ainsi la survie des cellules et des tissus en conditions hypoxiques [60].

HIF1 $\alpha$  est le principal régulateur de l'adaptation métabolique à l'hypoxie [63]. Il optimise l'utilisation du glucose, réduit la consommation d'oxygène et maintient les niveaux d'ATP en conditions de faible disponibilité en oxygène. Il module également la masse mitochondriale en stimulant la mitophagie, en limitant la biogenèse mitochondriale et en modifiant la composition de la chaîne respiratoire. Pour compenser le faible rendement de la glycolyse, HIF1 $\alpha$  augmente l'expression des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3 ainsi que de plusieurs enzymes clés de la glycolyse, notamment l'hexokinase 1 et 2 (HK1 et HK2), les isoformes L et P de la phosphofructokinase (PFKL et PFKP), la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la phosphoglycérate kinase 1 (PGK1) et la pyruvate kinase M (PKM). Il stimule également l'expression de la lactate déshydrogénase A (LDHA), favorisant la conversion du pyruvate en lactate, et du transporteur de monocarboxylates 4 (MCT4), facilitant l'export du lactate vers l'espace extracellulaire. Ainsi, HIF1 $\alpha$  coordonne la transition du métabolisme oxydatif vers un métabolisme glycolytique, impactant profondément la bioénergétique ainsi que le fonctionnement cellulaire [60].

HIF1 $\alpha$  joue un rôle clé dans la transition métabolique et fonctionnelle du placenta, assurant son adaptation aux conditions changeantes de la grossesse et à l'évolution des besoins énergétiques du fœtus [63]. Durant la grossesse, l'expression de HIF1 $\alpha$  évolue en réponse aux variations des niveaux d'oxygène au cours des différents stades de la grossesse. Au cours du premier trimestre, le placenta se développe dans un environnement hypoxique en raison de l'obstruction des artères spiralées utérines par les trophoblastes extravilloux (TEV). Cette faible pression en oxygène permet de stabiliser HIF1 $\alpha$ , favorisant ainsi l'expression de gènes impliqués dans l'invasion trophoblastique, l'angiogenèse et le remodelage vasculaire, notamment par la régulation de facteurs comme le VEGF. Aux alentours de 11-12 semaines de

grossesse, la perméabilisation des artères spiralées entraîne une augmentation significative de l'apport en oxygène qui induit la dégradation d'HIF1 $\alpha$ . La dégradation d'HIF1 $\alpha$  favorise la transition vers un métabolisme placentaire plus aérobie et module la différenciation trophoblastique. Toutefois, malgré l'augmentation de l'oxygène, HIF1 $\alpha$  reste partiellement régulé par des mécanismes indépendants de l'hypoxie, impliquant des cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), des facteurs de croissance (TGF- $\beta$ 1, IGFs) et le système rénine-angiotensine (RAS), permettant une adaptation continue du placenta aux besoins du fœtus. L'évolution de la régulation de HIF1 $\alpha$  influence plusieurs aspects de la fonction placentaire notamment la vascularisation et la production hormonale placentaire[64].

Au début de la grossesse, l'environnement hypoxique déclenche l'activation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , qui stimule l'expression de GLUT1 et d'enzymes clés de la glycolyse, tout en réprimant l'activité du cycle de Krebs. Cette adaptation métabolique favorise la conversion du glucose en lactate, un processus ajusté dynamiquement selon les variations d'oxygène [47]. Le lactate ainsi produit joue un rôle déterminant dans l'angiogenèse placentaire, en augmentant la disponibilité intracellulaire du VEGF et en stabilisant HIF-1 $\alpha$ , ce qui renforce la transcription de gènes pro-angiogéniques. L'activité glycolytique est amplifiée par l'élévation de LDHA et du transporteur MCT4, sous le contrôle coordonné de HIF-1 $\alpha$  et de c-Myc. En parallèle, les cellules stromales déciduales soutiennent cette dynamique en intensifiant leur propre production de lactate sous l'effet combiné de la progestérone et des voies de signalisation sensibles à l'hypoxie [58].

➤ **PPAR $\gamma$  :**

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) sont des facteurs de transcription ligand-dépendants appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux. Ils jouent un rôle central dans la régulation du métabolisme en modulant la sensibilité à l'insuline, la biogenèse mitochondriale ainsi que l'homéostasie glucidique et lipidique. De plus, les PPAR interviennent dans des processus biologiques essentiels tels que la différenciation et la prolifération cellulaires, l'angiogenèse, la protection vasculaire et la régulation de la pression artérielle [65].

Il existe trois isoformes dans la famille des PPAR : PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  et PPAR $\gamma$ . L'activation des PPAR nécessite leur hétérodimérisation avec le récepteur nucléaire RXR. Ce complexe PPAR/RXR, une fois activé par des ligands naturels ou synthétiques, se fixe sur l'élément de réponse aux PPAR (PPRE) situé dans les régions promotrices des gènes cibles. Cette interaction permet d'activer ou de réprimer l'expression de ces derniers, influençant ainsi divers processus métaboliques et physiologiques, notamment la régulation du métabolisme énergétique, l'inflammation et l'homéostasie vasculaire [66].

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) sont fortement exprimés dans tous les types de trophoblastes au cours de la grossesse, où ils jouent un rôle essentiel dans diverses fonctions trophoblastiques. PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta$  sont principalement exprimés dans les STB et les CTB, tandis que PPAR $\gamma$  est présent non seulement dans ces deux types cellulaires, mais également dans les cellules trophoblastiques extravillieuses (CTEV). L'activité des PPAR contribue à la régulation de multiples processus placentaires, parmi lesquels la différenciation, l'invasion trophoblastique et l'adaptation métabolique aux conditions physiologiques de la grossesse [66].

L'isoforme PPAR $\gamma$ , exprimé dans toutes les types de trophoblastes, est activé par différents ligands naturels, notamment les acides gras, les eicosanoïdes et les lipoprotéines de basse densité oxydées. Il peut également être activé par des ligands synthétiques tels que la rosiglitazone et les thiazolidinediones [67].

PPAR $\gamma$  exerce un contrôle essentiel sur les processus trophoblastiques nécessaires au bon déroulement de la grossesse et à l'adaptation placentaire. Il joue un rôle clé dans la régulation des fonctions trophoblastiques en influençant leur différenciation, maturation, sécrétion, prolifération, migration et invasion. Il stimule la différenciation du CTB en STB en induisant la sécrétion de  $\beta$ -hCG dans les trophoblastes villositaires du premier et du troisième trimestre. De plus, PPAR $\gamma$  inhibe généralement l'invasion trophoblastique. Ses effets sur la prolifération et la migration varient selon le contexte, notamment via la régulation d'ANGPTL4, un facteur impliqué dans la survie et la migration des cellules trophoblastiques [66]. En plus de son rôle dans le fonctionnement global du placenta, PPAR $\gamma$  intervient dans la régulation du métabolisme énergétique. Chez l'humain, plusieurs études métabolomiques ont montré que les niveaux circulants de certains acides gras libres et métabolites lipidiques évoluent significativement au cours d'une grossesse normale, reflétant des adaptations métaboliques

physiologiques maternelles.[68, 69]. Cette élévation suggère que PPAR $\gamma$  joue un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme maternel [70]. PPAR $\gamma$  influence non seulement le métabolisme lipidique en favorisant l'absorption des acides gras libres par le trophoblaste, mais il régule également l'expression de la protéine de transport des acides gras FATP4 (fatty acid transport protein 4) dans ces cellules. Bien que les effets de PPAR $\gamma$  sur les mitochondries du placenta humain restent peu documentés, des études sur des modèles animaux, notamment chez le rat, ont mis en évidence qu'une diminution de son expression était associée à une augmentation de l'apoptose placentaire mitochondrie-dépendante en cas de sous-nutrition maternelle pendant la grossesse [71].

➤ **AMPK :**

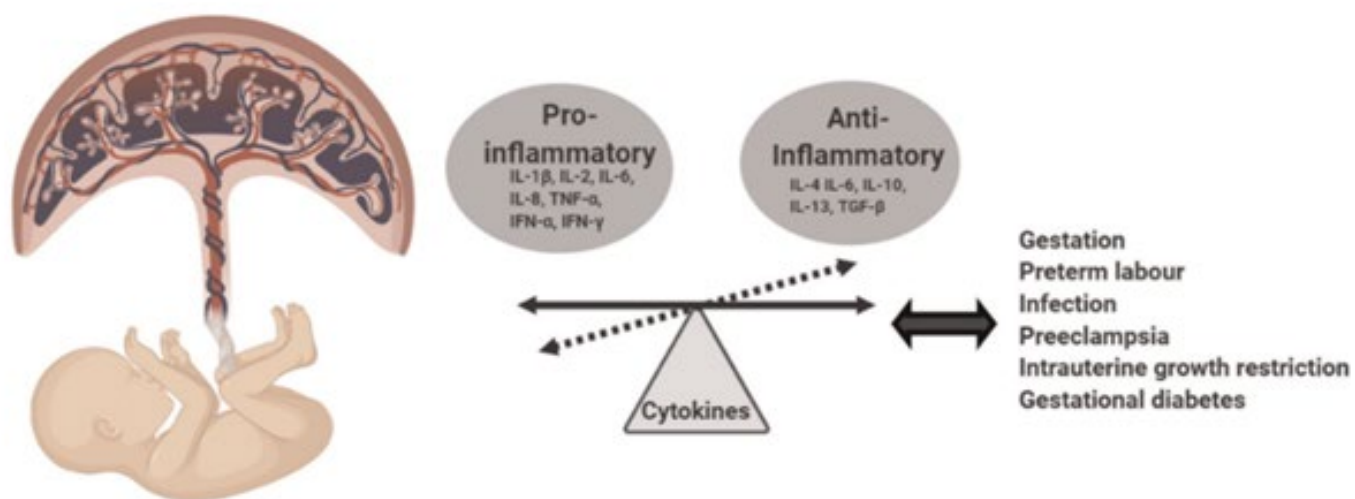
L'AMPK (protéine kinase activée par l'AMP) est un complexe hétérotrimérique composé des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , jouant un rôle essentiel en tant que capteur énergétique cellulaire [72]. La sous-unité  $\alpha$  contient un domaine kinase et un domaine auto-inhibiteur (AID) assemblés par un lien peptidique. La sous-unité  $\beta$  possède un module de liaison aux glucides (CBM) et un domaine C-terminal ( $\beta$ -CTD) qui interagit avec l' $\alpha$ -CTD et la sous-unité  $\gamma$ . Cette dernière contient quatre motifs CBS repeats, formant un disque capable de lier l'AMP (adénosine monophosphate), l'ADP (adénosine diphosphate) et l'ATP. L'AMPK est activée en réponse à une diminution du statut énergétique cellulaire, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie énergétique à l'échelle cellulaire et systémique. Son activation favorise les voies cataboliques productrices d'ATP tout en inhibant les processus anaboliques consommateurs d'ATP, permettant une adaptation métabolique face à un déficit énergétique. L'activation de l'AMPK repose sur la phosphorylation d'un résidu thréonine conservé (Thr172) dans la boucle d'activation de la sous-unité  $\alpha$ , un processus réalisé par des kinases en amont telles que LKB1 (sérine/thréonine kinase 11) et CaMKK $\beta$  (Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante kinase kinase  $\beta$ ). La fixation de l'AMP ou de l'ADP à la sous-unité  $\gamma$  facilite cette phosphorylation et inhibe sa déphosphorylation, tandis que l'AMP induit également une activation allostérique, renforçant ainsi l'activité de l'AMPK en conditions de stress énergétique [73].

L'AMPK joue un rôle essentiel dans la régulation des fonctions du trophoblaste humain, en influençant l'invasion, la viabilité cellulaire et le métabolisme du glucose, essentiels au développement placentaire. Son activation réduit l'invasion trophoblastique en inhibant les métalloprotéases MMP2 et MMP9, tout en favorisant la viabilité cellulaire par la phosphorylation d'AKT (Protéine kinase B), la réduction du rapport Bax/Bcl2 et la diminution des niveaux de caspase-3 clivée. Elle module également le métabolisme glucidique en stimulant la translocation de GLUT3 vers la membrane plasmique, en augmentant la glycolyse et en redirigeant les intermédiaires métaboliques vers la gluconéogenèse, favorisant ainsi la viabilité mais limitant l'invasion. De plus, son activation accroît les intermédiaires du cycle du citrate (TCA), et pourrait également inhiber la glycogénogenèse [74]. L'AMPK contribue au maintien du potentiel membranaire mitochondrial et à la production d'ATP. Son inhibition dans les cellules trophoblastiques BeWo entraîne une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, accompagnée d'une diminution de la production d'ATP. Cette étude suggère que cette altération résulte de la réduction de la respiration maximale, de la capacité respiratoire de réserve et de la respiration couplée à la production d'ATP [75].

## **1.5 Régulation de la grossesse par les cytokines**

Les cytokines sont des protéines solubles impliquées dans la régulation des fonctions cellulaires et la communication intercellulaire, jouant un rôle essentiel dans la différenciation et l'activité des cellules immunitaires. Dans le contexte de la grossesse, elles entrent en jeu dès l'implantation en orchestrant le dialogue entre le blastocyste et l'endomètre, facilitant ainsi la tolérance immunitaire maternelle et stimulant les propriétés invasives et prolifératives des trophoblastes, essentielles à une placentation optimale [76]. Le bon déroulement de la grossesse repose sur un équilibre entre l'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires (Fig.8). Celle-ci est marquée par différentes phases inflammatoires, propres à chaque trimestre de la gestation. Une dérégulation de cet équilibre peut participer dans diverses pathologies gestationnelles, notamment les naissances prématurées, la prééclampsie, le retard de croissance intra-utérin et le diabète gestationnel [77]. Le maintien d'un équilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires est un facteur déterminant pour le bon déroulement de la grossesse. Certaines familles de cytokines se distinguent par leur capacité à moduler à la fois la réponse

immunitaire et le métabolisme cellulaire. Parmi elles, la famille des TGF $\beta$ s occupe une place centrale en raison de son implication dans ces processus physiologiques essentiels [78].



**Figure 8 : Déséquilibre entre cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires au cours de la grossesse :** Implications dans les complications gestationnelles. Un équilibre fin entre cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est essentiel au bon déroulement de la gestation. Une perturbation de cette balance immunitaire est associée à diverses complications obstétricales, telles que la prématurité, les infections, la prééclampsie, le retard de croissance intra-utérin et le diabète gestationnel (Adapté de Tzavlaki et al., *Biomolécules* 2020, 10(3)).

## 1.5.1 La superfamille des TGF $\beta$

La superfamille des TGF $\beta$ s (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) regroupe un ensemble de facteurs polypeptidiques sécrétés impliqués dans divers processus biologiques fondamentaux. Cette famille comprend trente-trois gènes codant pour des cytokines sécrétées sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Ces protéines sont initialement synthétisées sous forme de précurseurs et subissent un traitement dans la voie de sécrétion afin de produire des ligands matures qui pourront dimériser. Au sein de cette grande famille, les TGF $\beta$ s forment un sous-groupe spécifique composé de trois isoformes principales chez l'être humain : TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3. La famille des TGF $\beta$ s comprend également plusieurs autres sous-familles de protéines, telles que les activines, les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs), les facteurs de différenciation de croissance (GDFs), la substance inhibitrice müllérienne (MIS) et le nodal [79].

### 1.5.1.1 Synthèse et activation des TGF $\beta$ 1

L'activation du TGF $\beta$  est un processus finement régulé nécessitant des conditions spécifiques pour libérer sa forme mature et bioactive [80]. Sa synthèse débute dans le réticulum endoplasmique rugueux, où il est produit sous forme de précurseur avant de subir des modifications post-traductionnelles, incluant repliement, glycosylation, dimérisation et clivage protéolytique par les protéases de la famille furine dans l'appareil de Golgi. Une fois clivé, il forme un complexe latent de grande taille (LLC) avec son peptide associé à la latence (LAP), qui est stocké dans la matrice extracellulaire (MEC) grâce aux protéines de liaison du TGF $\beta$  latent (LTBP). L'activation des TGF $\beta$ 1 repose sur deux principaux mécanismes : l'activation protéolytique, assurée par des métalloprotéases matricielles (MMPs) et BMP-1, qui clivent le LAP, ainsi que l'activation médiée par les intégrines ( $\alpha\beta$ 6,  $\alpha\beta$ 8), qui, par une force mécanique exercée via le cytosquelette d'actine, provoquent un changement de conformation du LAP, libérant ainsi le TGF $\beta$ 1 mature [79].

### ***1.5.1.3 Mécanisme d'action des TGFβ1***

L'action du TGFβ1 repose sur sa liaison à ses récepteurs membranaires, exprimés de façon ubiquitaire. Après fixation du ligand, ces récepteurs transmettent le signal soit via leur activité catalytique intrinsèque, soit en agissant comme corécepteurs modulant l'accès du ligand au récepteur actif [81]. Le TGFβ1 transmet son signal en formant un complexe hétérotétramérique constitué du récepteur de type II (TGFβRII) et du récepteur de type I, principalement TGFβRI/ALK-5. Le TGFβRII, dont l'activité kinase est constitutive, recrute et phosphoryle TGFβRI, initiant la cascade de signalisation intracellulaire. Ces complexes résultent de l'oligomérisation des cinq récepteurs de type II et des sept récepteurs de type I exprimés par les cellules humaines, la composition de ces isoformes contribuant à la spécificité du signal [79].

La liaison du TGFβ1 à son récepteur permet l'activation de deux voies de signalisation, l'une décrite comme la voie canonique tandis que l'autre est décrite comme la voie non canonique [82].

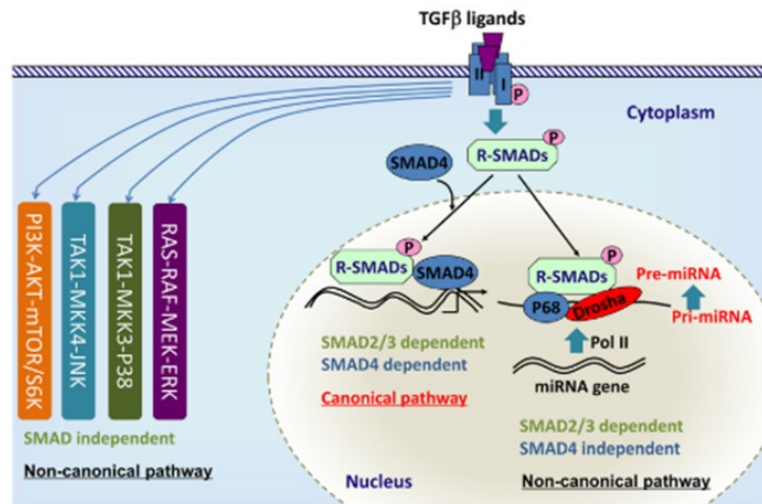
#### **➤ Voie canonique :**

Dans cette voie, la liaison du TGFβ à l'un de ses récepteurs induit la phosphorylation des SMAD régulateurs (R-SMADs). Ces derniers s'associent ensuite à SMAD4 et migrent vers le noyau, où ils modulent la transcription de gènes cibles (Fig. 9)

#### **➤ Voie non canonique :**

Cette voie, indépendante de SMAD4, active d'autres cascades de signalisation, notamment les voies PI3K-AKT (phosphoinositide 3-kinase/AKT), ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1 et 2), p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase p38) et JNK (c-Jun N-terminal kinase), influençant divers processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la survie et la réponse au stress (Fig. 9).

Une voie non canonique a été récemment décrite impliquant les R-SMADs, mais sans intervention de SMAD4. Elle joue un rôle dans la maturation des micro-ARN (miARN) en facilitant l'interaction entre les R-SMADs et le complexe DROSHA (Fig. 9) [82].

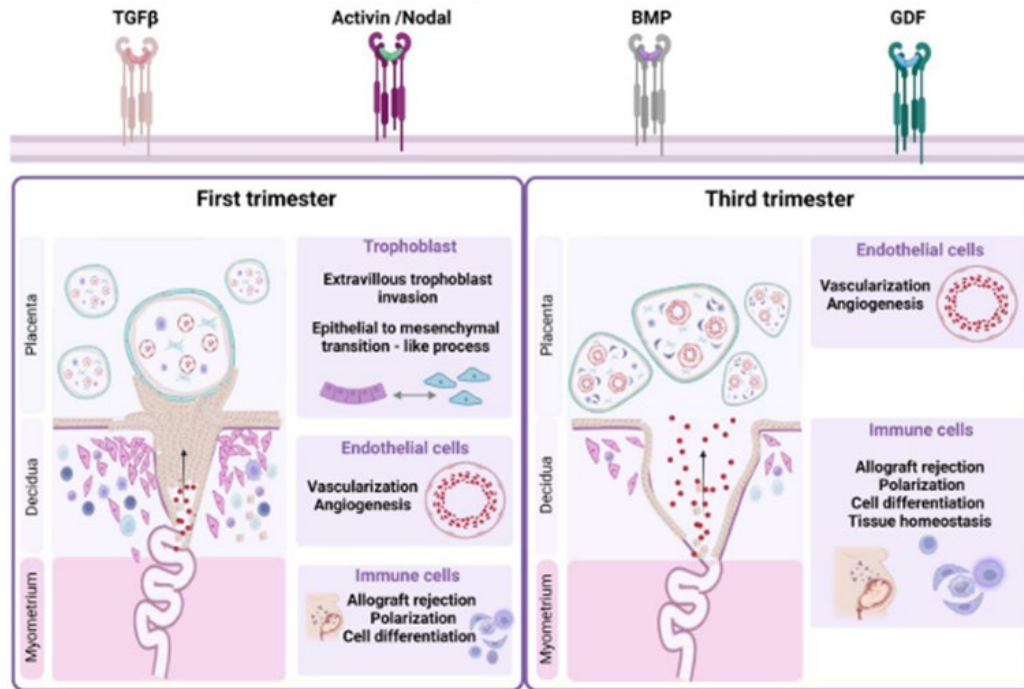


**Figure 9 : Voies de signalisation canoniques et non-canoniques de TGFβ : mécanismes SMAD-dépendants et indépendants dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.** Dans la voie canonique, les ligands TGFβ se lient aux récepteurs de type II et de type I à activité sérine/thréonine kinase, entraînant la phosphorylation des R-SMADs. Ces derniers forment alors des complexes hétéromériques avec SMAD4 et se transloquent dans le noyau afin de réguler la transcription génique. La voie non canonique fait généralement référence aux voies indépendantes des SMAD, telles que les voies PI3K-AKT, ERK1/2, p38 et JNK. Des études récentes ont mis en évidence une voie non canonique dépendante des R-SMADs mais indépendante de SMAD4, impliquée dans la régulation de la maturation des microARNs (miARNs). (Adapté de Guzeloglu-Kayisli et al., *Seminars in Reproductive Medicine* 2009, 27(1).)

### **1.5.2 Rôle de la superfamille du TGF $\beta$ dans la fonction reproductive**

La superfamille du TGF $\beta$  joue un rôle fondamental dans la reproduction féminine en régulant plusieurs processus clés notamment le développement folliculaire, l'ovulation, la compétence ovocytaire, la décidualisation, l'implantation, le maintien de la grossesse, le développement embryonnaire et utérin. Différents membres de cette superfamille, tel que les TGF $\beta$ s, GDF9, BMP15, activines et AMH, interviennent à divers niveaux. Des composants spécifiques comme les SMAD1/5, SMAD2/3/4, ALK2/3/6, et les récepteurs du TGF $\beta$  sont essentiels à la fertilité, au développement du tractus reproducteur et à la régulation hormonale. En plus de leur implication dans la fonction ovarienne et utérine, certains de ces facteurs jouent un rôle protecteur contre la tumorigènes [82].

Parmi la superfamille des TGF $\beta$ s, l'isoforme 1 joue un rôle distinctif pendant la grossesse. En effet, TGF $\beta$ 1 se révèle être un régulateur central de multiples processus biologiques clés, de la phase préimplantatoire jusqu'au terme de la grossesse, en modulant l'invasion trophoblastique, en favorisant l'immunotolérance à l'interface fœto-maternelle et en régulant le métabolisme placentaire (Fig.10) [83]. TGF $\beta$ 1 inhibe l'invasion et la migration trophoblastique du premier trimestre, processus essentiels au bon développement du placenta, augmentant l'expression de PAI-1 et des TIMPs (Inhibiteur Tissulaire Des Métalloprotéinases) qui favorisent l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire et diminuent l'activité des enzymes protéolytiques uPA et MMP9 [84]. Par ailleurs, le TGF $\beta$ 1 participe activement à la différenciation des CTEV placentaires tout en inhibant la production et la sécrétion de la  $\beta$ hCG. Pendant la phase d'implantation, TGF $\beta$ 1 renforce l'adhésion des trophoblastes. De plus, son rôle s'étend à la période périnatale, puisque les formes maternelle et fœtale du TGF $\beta$ 1 contribuent toutes deux à la survie périnatale; le TGF $\beta$ 1 maternel étant même capable de traverser le placenta pour compenser certains défauts développementaux des embryons déficients [84].



**Figure 10 : Modulation des interactions fœto-maternelles par la signalisation TGFβ dans le placenta humain au cours de la gestation.** Les voies de signalisation de la superfamille TGFβ (incluant TGFβ, Activin/Nodal, BMP et GDF) orchestrent des processus cellulaires clés tout au long de la grossesse. Au premier trimestre, elles régulent l’invasion trophoblastique, la transition épithélio-mésenchymateuse, l’angiogenèse et la tolérance immunitaire dans la décidue. Au troisième trimestre, ces voies participent au maintien de la vascularisation placentaire, de la différenciation des cellules immunitaires et de l’homéostasie tissulaire, garantissant ainsi un dialogue immunologique équilibré entre la mère et le fœtus et une issue gestationnelle optimale. (Adapté de Negmadjanov et al., *PLoS ONE* 2015, 10(4).)

### 1.5. 3 Régulation du métabolisme du glucose par TGFβ1

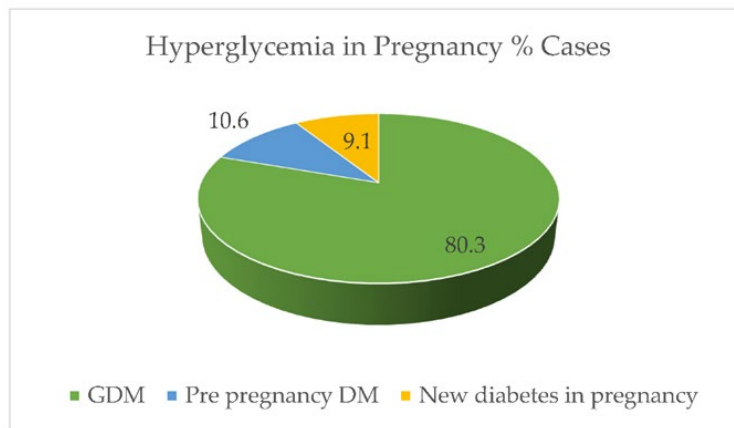
TGFβ1 exerce un effet positif sur le métabolisme du glucose, modulant à la fois son absorption et son utilisation, avec des effets qui diffèrent selon le type cellulaire. TGFβ1 augmente l'expression du transporteur GLUT1 dans certaines cellules telles que les fibroblastes murins 3T3 et les cellules mésangiales glomérulaires du rat, alors qu'il peut temporairement réduire cette expression dans d'autres types cellulaires, notamment les cellules épithéliales mammaires normales de souris (NMuMG) [85]. En outre, TGFβ1 régule différemment l'expression des enzymes clés de la glycolyse, telles que l'hexokinase 2 (HK2), dont il diminue les niveaux dans les lymphocytes T régulateurs thymiques murins, mais dont il stimule l'expression dans les chondrocytes articulaires et les fibroblastes pulmonaires. Le TGFβ1 augmente également le flux glycolytique en favorisant l'expression de PFKFB3, une enzyme essentielle à l'activation allostérique de la phosphofructokinase, phénomène observé notamment dans les cellules tumorales du glioblastome et du cancer pancréatique. TGFβ1 module l'expression de la pyruvate kinase M2 (PKM2), entraînant une augmentation ou une diminution selon le type cellulaire étudié. Enfin, chez l'embryon de poisson-zèbre, il a été démontré que TGFβ1 stimule la gluconéogenèse par l'intermédiaire de l'axe c-Jun/G6PC3 [85].

Le TGFβ1 exerce des effets particulièrement complexes et variables sur la fonction mitochondriale, en fonction du contexte cellulaire. Ces effets concernent principalement la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans certains cas, le TGFβ1 supprime la fonction mitochondriale et l'OXPHOS. Par exemple, dans les cellules T CD4+ à mémoire effectrice, le TGFβ1 réduit l'activité de l'ATP synthase et la capacité respiratoire mitochondriale [86]. De même, dans les cellules épithéliales pulmonaires de vison (Mv1Lu), le TGFβ1 diminue l'activité du complexe IV mitochondrial et augmente l'accumulation intracellulaire de ROS [87]. À l'inverse, dans d'autres contextes, TGFβ1 peut améliorer la fonction mitochondriale. Ainsi, dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 en transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), le TGFβ1 augmente l'expression des protéines associées à l'OXPHOS, notamment celles de la chaîne de transport d'électrons [87]. Dans une autre étude sur des fibroblastes NIH/3T3 traités par le TGFβ1, une augmentation du contenu mitochondrial ainsi qu'une amélioration de la respiration cellulaire ont été observées. De plus,

la respiration cellulaire a été améliorée, se traduisant par une consommation accrue d'oxygène, une augmentation du rapport lactate/pyruvate, ainsi qu'une production d'énergie plus importante [88].

## **1.6 Altération de l'adaptation métabolique lors de la grossesse**

Certaines pathologies à composante métabolique telles que l'obésité ou le diabète survenant, lorsqu'elles surviennent pendant la grossesse, peuvent engendrer des complications importantes pour la mère et le fœtus. Ces troubles augmentent notamment le risque de mortalité embryonnaire ou fœtale, ainsi que celui d'accouchement prématuré [21]. Dans les pays développés, au moins un tiers des femmes en âge de procréer présente un surpoids ou une obésité, augmentant ainsi le risque de complications durant la grossesse telles que le diabète gestationnel, la prééclampsie et les accouchements par césarienne. Selon la fédération internationale du diabète, l'hyperglycémie induite par la grossesse représente la complication médicale la plus fréquente au cours de la gestation, avec une prévalence en constante progression à l'échelle mondiale. Elle est classée en trois catégories : le diabète préexistant, le diabète diagnostiqué au cours de la grossesse et le diabète gestationnel, ce dernier constituant la forme la plus prévalente [89] ( Fig.11).



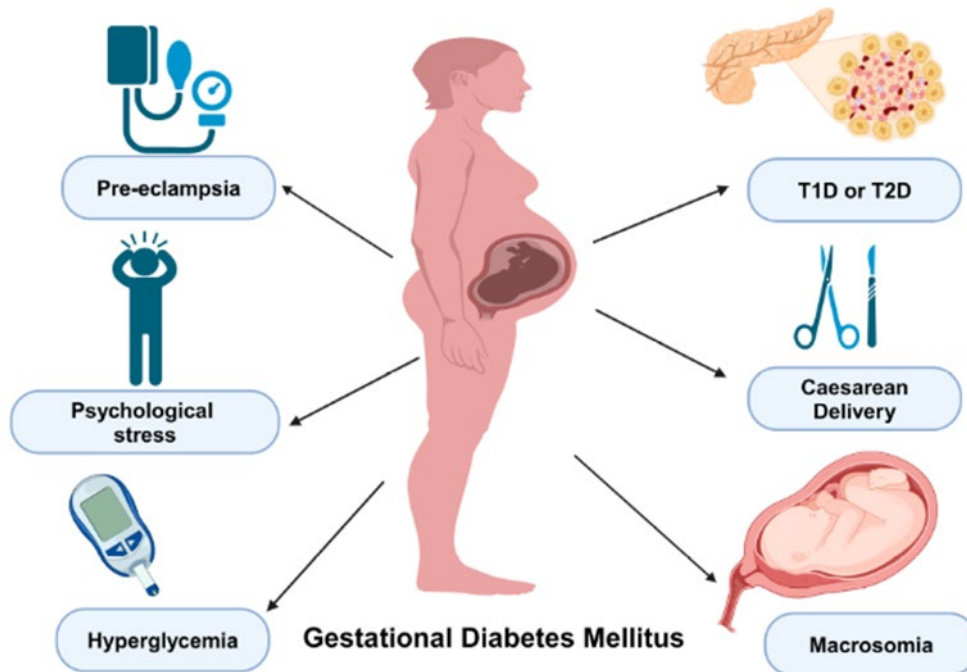
**Figure 11 : Répartition des cas d’hyperglycémie pendant la grossesse selon l’étiologie : diabète gestationnel, préexistant ou nouvellement diagnostiqué.** Parmi l’ensemble des cas d’hyperglycémie gestationnelle, 80,3 % sont dus au diabète gestationnel, 10,6 % correspondent à un diabète préexistant à la grossesse, et 9,1 % représentent des diabètes nouvellement diagnostiqués au cours de la gestation (type 1 ou type 2) [90]

L’hyperglycémie maternelle observée dans les grossesses diabétiques accroît le risque d’événements glycémiques extrêmes, d’infections génitales et urinaires récurrentes ainsi que d’accouchements traumatiques. Historiquement, des complications telles que l’acidocétose pouvaient entraîner jusqu’à 50 % de décès maternels [91]. Sur le plan fœtal, l’exposition à l’hyperglycémie in utero augmente, à court terme, les risques d’avortement spontané, de naissance prématurée et de troubles métaboliques transitoires. À plus long terme, elle favorise une croissance excessive, l’obésité et des dysfonctionnements métaboliques et vasculaires, augmentant la vulnérabilité aux maladies chroniques, notamment au diabète de type 2 [92]. Au-delà de ses effets systémiques, l’hyperglycémie maternelle impacte directement le placenta, organe central de la régulation métabolique et hormonale durant la grossesse. Elle altère l’expression de molécules placentaires clés, perturbant notamment la production hormonale de l’hormone lactogène placentaire humaine (hPL) et de l’hormone de croissance placentaire

(PGH). De plus, elle contribue à l'établissement d'un environnement placentaire pro-inflammatoire par la modulation de la sécrétion de cytokines et de chimiokines par les trophoblastes, ainsi qu'à une dysrégulation des adipokines, telles que la leptine et l'adiponectine, compromettant l'équilibre métabolique [21, 91].

### **1.6.1 Effet de l'hyperglycémie maternelle sur le fonctionnement du trophoblaste**

L'hyperglycémie, notamment en cas de diabète gestationnel, induit des dysfonctionnements majeurs au niveau de la fonction placentaire. Des études sur l'interactome des transcrits et des métabolites révèlent qu'elle perturbe profondément le métabolisme placentaire en altérant la signalisation cellulaire, le métabolisme lipidique et la production d'énergie, compromettant ainsi les fonctions essentielles des trophoblastes [93]. L'hyperglycémie perturbe les fonctions trophoblastiques à plusieurs niveaux, induisant l'altération du remodelage des artères spiralées utérines et augmentant le risque de complications obstétricales majeures (Fig.12).



**Figure 12 : Conséquences du diabète gestationnel sur la mère et le nouveau-né : issues métaboliques, obstétricales et développementales à court et long terme** Chez la mère, les effets à court terme incluent un risque accru d'accouchement par césarienne et de troubles hypertensifs de la grossesse. À long terme, le diabète gestationnel est associé à une augmentation du risque de développer un diabète de type 1 (DT1) ou de type 2 (DT2). Chez l'enfant, les conséquences à court terme comprennent un risque accru de macrosomie, d'hypoglycémie néonatale et de syndrome de détresse respiratoire. À long terme, les enfants exposés au diabète gestationnel présentent un risque plus élevé de DT1, DT2 et de syndrome métabolique à l'âge adulte (Adapté de Fang et al., *Frontiers in Endocrinology* 2024, 15.) .

L'hyperglycémie inhibe la prolifération des trophoblastes en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, ce qui entraîne une perturbation des voies de signalisation et des modifications épigénétiques essentielles à la régulation de la prolifération cellulaire. L'hyperglycémie affecte également l'invasion et la migration trophoblastiques, surtout au cours du premier trimestre de grossesse, en réduisant l'expression et l'activité des métalloprotéinases matricielles MMP2 et MMP9 ainsi que l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA). Par ailleurs, elle perturbe le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), indispensable à l'acquisition du phénotype invasif des cellules trophoblastiques. En outre, l'hyperglycémie altère l'équilibre entre les facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques produits par les trophoblastes, en diminuant l'expression des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le PlGF, tout en augmentant celle des facteurs anti-angiogéniques comme le sFlt-1 et le sEng. De plus, elle influence négativement le gradient d'oxygène placentaire, provoquant une hypoxie locale à l'interface fœto-maternelle, ce qui impacte davantage les fonctions et la différenciation des trophoblastes [94]. Des études récentes montrent que l'hyperglycémie et le diabète gestationnel réduisent l'activité métabolique placentaire, principalement en lien avec des dysfonctionnements des CTB [95]. Les CTB issus de grossesses diabétiques présentent une diminution de la consommation d'oxygène et de l'activité glycolytique, associée à une altération mitochondriale. Cette dysfonction s'accompagne d'une baisse de l'expression de gènes du métabolisme lipidique (SLC27A2, CPT1 $\alpha$ ) et d'une accumulation de gouttelettes lipidiques intracellulaires, indiquant une perturbation de la  $\beta$ -oxydation [95]. Ce déséquilibre mitochondrial est également observé dans des modèles trophoblastiques *in vitro*. Dans la lignée trophoblastique JEG-3, une exposition à une concentration élevée de glucose inhibe la prolifération cellulaire, augmente l'apoptose et accentue le stress oxydatif via une réduction de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et une élévation du malondialdéhyde (MDA) [96]. L'hyperglycémie altère aussi la fonction mitochondriale en augmentant la perméabilité membranaire, favorisant la libération de cytochrome C et SMAC (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases), et en diminuant l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire. De plus, elle inhibe la voie antioxydante Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) / HO-1 (Heme Oxygenase-1), exacerbant le stress oxydatif cellulaire [96]. À long terme, l'exposition fœtale à un environnement métabolique

altéré augmente également le risque de troubles métaboliques chez l'enfant et de diabète ou de pathologies cardiovasculaires chez la mère [97].

### **1.6.2 Prise en charge de l'hyperglycémie**

La gestion de l'hyperglycémie pendant la grossesse reste complexe, notamment en raison de l'augmentation de l'obésité maternelle et du recul de l'âge de la maternité, facteurs contribuant à la hausse mondiale de l'incidence diabète gestationnel [89]. Cette situation complique à la fois le dépistage et la mise en place de stratégies thérapeutiques efficaces.

L'absence de consensus international sur les seuils glycémiques de diagnostic génère une grande variabilité des pratiques cliniques [98]. Si de nombreux pays suivent les critères de l'association internationale des groupes d'étude sur le diabète et la grossesse (IADPSG), d'autres appliquent encore les recommandations antérieures de l'OMS. Cette hétérogénéité complique l'évaluation comparative des prévalences et freine l'élaboration de protocoles standardisés. Le suivi postnatal constitue également une faiblesse : bien que le risque de progression vers un diabète de type 2 soit reconnu, la participation aux consultations de suivi reste faible [98]. La prise en charge repose sur une approche individualisée combinant mesures hygiéno-diététiques (régime équilibré, contrôle de l'index glycémique, activité physique) et autosurveillance glycémique [89]. En cas d'échec, l'insulinothérapie est privilégiée pour son efficacité et son innocuité. Les agents hypoglycémisants oraux comme la metformine et le glibenclamide sont parfois utilisés, mais leur emploi reste limité en raison des incertitudes concernant leur passage placentaire [99]. L'efficacité du traitement nécessite une approche pluridisciplinaire, mobilisant obstétriciens, endocrinologues et diététiciens. Toutefois, l'augmentation des cas exerce une pression sur les structures de soins, amplifiée par les contraintes de personnel et les inégalités d'accès [89, 99]. Malgré les stratégies actuelles, le contrôle optimal de l'hyperglycémie reste insuffisant, exposant la mère et l'enfant à de lourdes complications. Cette situation souligne la nécessité d'approfondir la compréhension des altérations moléculaires induites par l'hyperglycémie placentaire et d'identifier de nouvelles cibles d'intervention. Restaurer l'homéostasie énergétique des trophoblastes apparaît ainsi comme un enjeu prioritaire, au regard du rôle fondamental du placenta dans le développement fœtal. Parmi les pistes explorées, le facteur de croissance transformant  $\beta 1$  présente un intérêt croissant en raison de ses effets

bénéfiques sur le métabolisme cellulaire, la réponse au stress ainsi que le fonctionnement du placenta en général et du trophoblaste en particulier.

## **2 Problématique**

La prévalence de l'hyperglycémie pendant la grossesse, notamment sous forme de diabète gestationnel, est généralement estimée entre 5 % et 15 %, avec une tendance à l'augmentation en lien avec la hausse des taux d'obésité chez les femmes en âge de procréer. Durant la grossesse, les femmes sont sujettes à des changements physiologiques et métaboliques majeurs pour soutenir le développement du fœtus et le maintien de la gestation. Ces réarrangements endocrino-métaboliques favorisent l'utilisation du glucose par le fœtus et le placenta, souvent au détriment des autres organes maternels. Dans ce contexte, un excès de glucose à l'interface fœto-maternelle peut perturber les fonctions des trophoblastes placentaires et accroître le risque de complications graves pour la mère et le fœtus. En effet, une hyperglycémie mal gérée peut entraîner des complications gestationnelles graves tel que la prééclampsie, une augmentation du risque d'accouchements par césarienne, ainsi qu'à des complications cardiovasculaires. Quant au fœtus, les conséquences incluent un risque accru de macrosomie, de malformations congénitales et de détresse néonatale, ainsi qu'une prédisposition à des troubles métaboliques à long terme, tels que le diabète de type 2 et l'obésité. Ainsi, comprendre les mécanismes régulateurs du métabolisme glucidique et explorer de nouvelles molécules susceptibles d'en moduler les effets apparaissent comme des enjeux cruciaux pour réduire le stress placentaire et fœtal, et limiter les impacts négatifs à court et long terme sur la santé des nouveau-nés issus de grossesses compliquées.

## **3 Hypothèse**

Le TGFb1 suscite intérêt croissant en raison de son rôle clé dans de nombreux processus physiologiques associés à la grossesse. Présent dès les premières étapes du développement embryonnaire, il intervient dans l'invasion, la migration et la différenciation des cellules trophoblastiques. En parallèle, des études récentes ont mis en évidence sa capacité à réguler le métabolisme cellulaire, notamment en influençant le transport du glucose ainsi que les principales voies métaboliques telles que la glycolyse et la phosphorylation oxydative. Sur la

base de ces données, nous proposons que le TGF $\beta$ 1 pourrait contribuer à atténuer les effets délétères de l'hyperglycémie sur le trophoblaste, en modulant l'expression ou l'activité de régulateurs métaboliques majeurs tels que HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  et AMPK.

## 4 Objectifs et approches expérimentales

L'objectif principal de ce projet doctoral est d'évaluer le rôle régulateur du TGF $\beta$ 1 dans le métabolisme glucidique des trophoblastes humains, en conditions normoglycémiques et hyperglycémiques. Idéalement, l'utilisation de trophoblastes primaires issus de placentas humain à terme ou de naissances prématurées aurait été privilégiée, ces modèles étant considérés comme les plus représentatifs de la physiologie *in vivo*. Cependant, des contraintes éthiques, techniques et logistiques, particulièrement marquées pour les tissus du premier trimestre, limitent leur accessibilité et leur usage expérimental [13].

Face à ces limitations, nous avons adopté une approche exploratoire, en nous appuyant sur des lignées cellulaires trophoblastiques immortalisées disponibles dans notre laboratoire. Une analyse critique de la littérature nous a permis d'évaluer les propriétés de plusieurs lignées dérivées de choriocarcinomes humains, à savoir JEG-3, BeWo et JAR. Bien que d'origine tumorale, ces modèles sont largement utilisés pour l'étude des fonctions trophoblastiques en raison de leur facilité de culture, de leur reproductibilité expérimentale, et de l'expression de marqueurs placentaires clés. La lignée BeWo est reconnue comme un modèle adapté à l'étude de la fusion syncytiale, caractéristique du syncytiotrophoblaste. La lignée JAR, quant à elle, est exploitée pour des études liées à la fusion cellulaire et au métabolisme trophoblastique, mais elle est caractérisée par une instabilité génétique plus marquée. La lignée JEG-3 se distingue par une plus grande proximité fonctionnelle avec les trophoblastes primaires. En effet, cette lignée de trophoblaste extra-villeux exprime de manière stable plusieurs marqueurs trophoblastiques fondamentaux : GATA3, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation trophoblastique, KRT7 (kératine de type II 7), une protéine de structure spécifique des cellules épithéliales trophoblastiques ainsi que TFAP2C (Transcription Factor Activator Protein-2 gamma), un facteur essentiel au maintien du phénotype épithélial trophoblastique. La co-expression de ces trois marqueurs constitue un critère robuste pour l'identification du phénotype trophoblastique dans les modèles cellulaires *in vitro*. De plus, les cellules JEG-3 présentent une organisation des jonctions serrées comparable à celle observée dans les trophoblastes primaires,

les rendant pertinentes pour des études portant sur l'intégrité de la barrière placentaire [100, 101]. Bien que les réponses métaboliques des JEG-3 à une exposition prolongée à l'hyperglycémie n'aient pas encore été caractérisées de manière approfondie. Des études ont montré que ces cellules expriment fortement les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3, témoignant d'une capacité d'absorption du glucose supérieure à celle observée dans d'autres lignées [102]. De plus, les cellules JEG-3 présentent une sensibilité marquée au TGF- $\beta$ 1, qui active la signalisation SMAD2/3 via le récepteur ALK5. Cette activation permet notamment de renforcer la capacité d'invasion des JEG-3 [103]. Ces données, associées à d'autres critères phénotypiques et fonctionnels, ont motivé le choix des JEG-3 dans notre étude. En effet, cette lignée présente un profil génétique stable, une expression reproductible de transporteurs impliqués dans le métabolisme glucidique, ainsi qu'une utilisation établie dans la littérature pour l'analyse des voies de signalisation cellulaire. En raison des limites associées aux modèles primaires de trophoblaste humain, notamment la variabilité interindividuelle, la faible accessibilité des tissus et les contraintes d'obtention, nous avons retenu les cellules JEG-3 comme modèle alternatif pertinent pour étudier les effets du TGF $\beta$ 1 sur la bioénergétique placentaire. Dans la continuité de cette approche, notre étude se décline en deux axes complémentaires :

#### **4.1 Caractériser l'impact de l'hyperglycémie sur le métabolisme glucidique des cellules trophoblastiques humaines**

Dans cette optique, des cellules de la lignée trophoblastique humaine immortalisée JEG-3 ont été exposées à des concentrations de glucose simulant des conditions normoglycémiques et hyperglycémiques. L'objectif est d'évaluer l'impact de l'hyperglycémie sur le métabolisme énergétique des trophoblastes. Nous avons ainsi analysé l'expression de plusieurs marqueurs clés du métabolisme trophoblastique, notamment les facteurs de transcription HIF1 $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3, ainsi que la protéine AMPK, impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Parallèlement, nous avons quantifié la production d'ATP et de lactate, ainsi que l'expression des protéines des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, afin d'évaluer les altérations des voies glycolytique et oxydative. Cette

approche vise de mieux comprendre les mécanismes par lesquels de fortes concentrations de glucose peut perturber la bioénergétique des cellules trophoblastiques.

#### **4.2. Déterminer l'influence du TGF $\beta$ 1 sur les altérations métaboliques des cellules JEG-3 induites par un environnement hyperglycémique :**

Dans un second temps, nous avons exploré le rôle du TGF $\beta$ 1 dans la modulation des déséquilibres métaboliques provoqués par l'hyperglycémie. Pour cela, les cellules JEG-3 ont été traitées avec du TGF $\beta$ 1 après avoir été exposées à des milieux normo- ou hyperglycémiques. L'impact de ce traitement a été examiné à travers l'analyse des mêmes marqueurs métaboliques que précédemment (HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , GLUT1, GLUT3, AMPK), complétée par des mesures de production d'ATP, de lactate, et de l'expression des complexes mitochondriaux. Cette stratégie expérimentale permet d'évaluer si le TGF $\beta$ 1 exerce une action régulatrice ou compensatrice face aux altérations métaboliques induites par des niveaux élevés de glucose, en particulier au niveau des voies énergétiques cellulaires.

## Chapitre II

### **TGFβ1 Restores Energy Homeostasis of Human Trophoblast Cells Under Hyperglycemia In Vitro by Inducing PPARγ Expression, AMPK Activation, and HIF1α Degradation**

**Nihad Khiat**<sup>1,2,3</sup>, Julie Girouard<sup>1,2,3</sup>, Emmanuelle Stella Kana Tsapi<sup>1,2,3</sup>, Cathy Vaillancourt<sup>2,3</sup>,

Cathy Vaillancourt<sup>2,3,4</sup>, Céline Van Themsche<sup>1,2,3</sup> and Carlos Reyes-Moreno<sup>1,2,3,\*</sup>

1 Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire (GRSC), Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 boulevard. 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 Institut National de la Recherche Scientifique (INRS)-Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie and Research Centre CIUSSS-Nord-de-l'île-de-Montréal, Laval, QC H7V 1B7, Canada

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

#### **Statut de l'article :**

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue Cells (MDPI). L'article a été accepté le 1er janvier 2025 et publié sous la référence suivante : Cells 2025, 14(1), 45

#### **Contribution des auteurs :**

Nihad Khiat a réalisé l'expérimentation, analysé les données et rédigé la version initiale du manuscrit. Carlos Reyes-Moreno a assuré la conceptualisation, la supervision, l'administration du projet, la révision critique du manuscrit ainsi que l'acquisition des financements. Julie Girouard a participé à l'expérimentation, à la validation des données et a contribué aux ressources nécessaires à l'étude. Emmanuelle Stella Kana Tsapi a également pris part à l'expérimentation et à la validation. Cathy Vaillancourt et Céline Van Themsche ont assuré la supervision scientifique et la révision critique du manuscrit. Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale du manuscrit.

## Résumé de l'article :

Des niveaux élevés de glucose à l'interface fœto-maternelle sont associés à un dysfonctionnement des cellules trophoblastiques placentaires et à une incidence accrue de complications pendant la grossesse. Les cellules trophoblastiques utilisent principalement le glucose comme source d'énergie, qu'elles métabolisent par la glycolyse dans le cytoplasme et la respiration oxydative dans les mitochondries pour produire de l'ATP. La voie de signalisation TGF $\beta$ 1/SMAD2 ainsi que les facteurs de transcription PPAR $\gamma$ , HIF1 $\alpha$  et AMPK sont des régulateurs clés du métabolisme cellulaire, connus pour jouer un rôle critique dans la différenciation et la fonction des cellules trophoblastiques extravillositaires. Tandis que HIF1 $\alpha$  favorise la glycolyse au détriment de la respiration mitochondriale, PPAR $\gamma$  et AMPK exercent un effet inverse. Toutefois, l'interaction entre TGF $\beta$ 1 et ces régulateurs du métabolisme énergétique dans les cellules trophoblastiques demeure mal comprise.

Cette étude visait à déterminer si, et de quelle manière, TGF $\beta$ 1 régule le métabolisme énergétique des cellules trophoblastiques exposées à des conditions normo- et hyperglycémiques. Les cellules trophoblastiques JEG-3 ont été incubées pendant 24 heures dans des milieux contenant du glucose à concentration normale (5 mM) ou élevée (25 mM), en présence ou en absence de TGF $\beta$ 1. Les niveaux d'expression des protéines phospho-SMAD2, GLUT1/3, HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , phospho-AMPK, ainsi que de certaines sous-unités des complexes mitochondriaux OXPHOS ont été évalués par immunoblot. La production d'ATP et de lactate a été mesurée à l'aide de tests bioluminescents.

L'exposition à une concentration de 25 mM de glucose a entraîné une diminution de la production d'ATP sans modification significative de la production de lactate. Ces altérations ont été accompagnées d'une baisse d'expression de GLUT1/3, des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale et de PPAR $\gamma$ , et d'une augmentation de l'expression de HIF1 $\alpha$ . À l'inverse, le traitement par TGF $\beta$ 1 en condition hyperglycémique a réduit l'expression de HIF1 $\alpha$  tout en augmentant celle de GLUT1/3, PPAR $\gamma$ , phospho-AMPK et des protéines mitochondriales, ce qui a permis de restaurer la production d'ATP.

Nos résultats montrent que des conditions hyperglycémiques perturbent le métabolisme glucidique des cellules trophoblastiques en altérant la respiration mitochondriale oxydative et

en réduisant la production d'ATP. Le traitement par TGF $\beta$ 1 semble contrecarrer ces effets, probablement en stimulant à la fois la glycolyse et le métabolisme mitochondrial, suggérant un rôle régulateur potentiel de TGF $\beta$ 1 dans le métabolisme glucidique des cellules trophoblastiques placentaires.

## **Article (Version publiée)**

### **TGF $\beta$ 1 Restores Energy Homeostasis of Human Trophoblast Cells Under Hyperglycemia In Vitro by Inducing PPAR $\gamma$ Expression, AMPK Activation, and HIF1 $\alpha$ Degradation.**

**Abstract:** Elevated glucose levels at the fetal–maternal interface are associated with placental trophoblast dysfunction and increased incidence of pregnancy complications. Trophoblast cells predominantly utilize glucose as an energy source, metabolizing it through glycolysis in the cytoplasm and oxidative respiration in the mitochondria to produce ATP. The TGF $\beta$ 1/SMAD2 signaling pathway and the transcription factors PPAR $\gamma$ , HIF1 $\alpha$ , and AMPK are key regulators of cell metabolism and are known to play critical roles in extravillous trophoblast cell differentiation and function. While HIF1 $\alpha$  promotes glycolysis over mitochondrial respiration, PPAR $\gamma$  and AMPK encourage the opposite. However, the interplay between TGF $\beta$ 1 and these energy-sensing regulators in trophoblast cell glucose metabolism remains unclear. This study aimed to investigate whether and how TGF $\beta$ 1 regulates energy metabolism in trophoblast cells exposed to normal and high glucose conditions. The trophoblast JEG-3 cells were incubated in normal (5 mM) and high (25 mM) glucose conditions for 24 h in the absence and the presence of TGF $\beta$ 1. The protein expression levels of phosphor (p)-SMAD2, GLUT1/3, HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , p-AMPK, and specific OXPHOS protein subunits were determined by western blotting, and ATP and lactate production by bioluminescent assay kits. JEG-3 cells exposed to 25 mM glucose decreased ATP production but did not affect lactate production. These changes led to a reduction in the expression levels of GLUT1/3, mitochondrial respiratory chain proteins, and PPAR $\gamma$ , coinciding with an increase in HIF1 $\alpha$  expression. Conversely, TGF $\beta$ 1 treatment at 25 mM glucose reduced HIF1 $\alpha$  expression while enhancing the expression levels of GLUT1/3, PPAR $\gamma$ , p-AMPK, and mitochondrial respiratory chain proteins, thereby rejuvenating ATP production. Our findings reveal that high glucose conditions disrupt cellular glucose metabolism in trophoblast cells by perturbing mitochondrial oxidative respiration and decreasing ATP production. Treatment with TGF $\beta$ 1 appears to counteract this trend, probably by enhancing both

glycolytic and mitochondrial metabolism, suggesting a potential regulatory role of TGF $\beta$ 1 in placental trophoblast cell glucose metabolism.

Keywords: adenosine triphosphate; diabetes; extra-villous trophoblast; glucose metabolism; glycolysis; hyper-glucose; oxidative phosphorylation; placenta; transforming growth factor beta 1

### **Introduction:**

Elevated levels of glucose have a significant impact on maternal and fetal interactions as well as on the production of essential hormones that support pregnancy [1]. Studies have shown that high glucose levels are linked to a decrease in the number of active mitochondria and reduced ATP production, which can negatively affect trophoblast function [2,3]. This may result in an increased incidence of pregnancy complications such as preeclampsia, congenital malformations, and miscarriage, posing significant health risks to both pregnant women and fetuses [4].

The placenta is a highly metabolically active organ fulfilling the bioenergetic and biosynthetic needs to support its own rapid growth and that of the fetus [5]. Placental structures consist of specialized epithelial cell types known as trophoblast cells, which are located at the maternal–fetal interface [6,7]. Human trophoblasts arise from the trophectoderm, which, after implantation, differentiates into cytotrophoblast (CT), villous syncytiotrophoblast (VST), and extravillous trophoblast (EVT) cells [6,7]. VST cells form a multinucleated layer on the placental surface and play key roles in hormone secretion, nutrient transport, gas exchange, immunotolerance, and pathogen resistance [8,9]. EVT cells migrate, invade, and embed placental villi into the maternal decidua to anchor the placenta [10,11].

Trophoblasts use glucose as the primary energy substrate. In the absence of appreciable gluconeogenesis, placental glucose transport is the only supply for the fetus [12]. In trophoblasts, glucose is metabolized through a multistep process. The first step, glycolysis, occurs in the cytoplasm and involves the conversion of one glucose molecule to two pyruvate molecules, resulting in a net gain of two ATP molecules [1]. Under anaerobic conditions, pyruvate can be reversibly converted to lactate by the enzyme lactate dehydrogenase (LDH).

Pyruvate is typically transported into the mitochondria for further degradation in the TCA cycle, where it is oxidized to acetyl-CoA [5]. This process occurs iteratively, generating one ATP molecule for each acetyl-CoA molecule produced, while also generating reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH+H<sup>+</sup>) and flavin adenine dinucleotide (FADH<sub>2</sub>). These reduced cofactors act as electron carriers to generate a proton gradient that drives ATP production through oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the electron transport chain [5].

Cellular glucose metabolism is regulated by complex signaling pathways that involve various biological factors. Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1), a multifunctional cytokine, is one of these factors [13]. It operates through the SMAD2/SMAD3 pathway to regulate the expression of genes involved in different cellular functions. According to previous research, TGFβ1 regulates the activity of essential enzymes and transporters, such as GLUT1 and the hexokinase HK2, which play crucial roles in glucose uptake and glycolysis in different cell types [13]. However, TGFβ1 is also known to induce metabolic reprogramming by promoting mitochondrial ATP production in stromal cells [14]. TGFβ1 expression is detected at the human maternal–fetal interface during early pregnancy, playing crucial roles in regulating immune cell function and maintaining immune homeostasis [15]. Moreover, TGFβ1 plays significant roles in the regulation of trophoblast function, particularly trophoblast invasion and differentiation [15].

Transcription factors, such as hypoxia-inducible factor (HIF), AMP-activated protein kinase (AMPK), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ), are considered energy sensors that play significant roles in regulating cellular metabolism [16–18]. HIFs are transcriptional heterodimer complexes, consisting of an inducible α subunit (HIF1α, HIF2α, and HIF3α) and constitutively expressed β subunits [16]. Under hypoxic conditions, the α/β heterodimer binds to the hypoxia response elements (HREs) of the target genes. Under normal oxygen levels, proline residues in HIF1α and HIF2α are hydroxylated by prolyl hydroxylase domain (PHD) proteins, allowing their recognition by a ubiquitin ligase leading to proteasomal degradation [17]. Studies have demonstrated that HIF1α is significantly expressed in the low-oxygen environment of the placenta during early gestation, where it plays a crucial role in placental development and function [18]. However, sustained HIF1α expression after 9 weeks of gestation can lead to trophoblast cells failing to differentiate from a proliferative to an

invasive phenotype, shallow invasion of trophoblasts, and insufficient myometrial spiral artery transformation, which are strongly associated with pregnancy complications [19]. On the other hand, AMPK functions as a primary regulator of energy metabolism. AMPK is activated in response to energy stress, which is characterized by increased levels of cellular AMP, ADP, or  $\text{Ca}^{2+}$  and a decline in ATP production [20]. Research has shown that AMPK plays a crucial role in maintaining the balance between trophoblast invasion and survival by controlling glucose metabolism [21]. Furthermore, elevated blood glucose levels trigger AMPK activation in the placentas of pregnant women with gestational diabetes, indicating that AMPK plays a key role in regulating glucose metabolism to maintain energy balance [22]. Finally, PPAR $\gamma$  is a crucial nuclear hormone receptor whose action is mediated through the heterodimerization of PPAR $\gamma$  with the retinoid-X-receptor (RXR) upon activation. According to previous studies, PPAR $\gamma$  is a crucial component for the proper progression of pregnancy, as it encompasses placental formation, fetal development, and labor [23]. Additionally, PPAR $\gamma$  activators, which include fatty acids and lipid metabolites, are elevated in normal pregnancies, suggesting that PPAR $\gamma$  may play a part in regulating maternal metabolism and immune functions during pregnancy [24].

Studies suggest that HIF1 $\alpha$  promotes glycolysis through regulation of the glycolytic enzymes hexokinase 2 (HK2) and pyruvate kinase M2 (PKM2), as well as the glucose transporters GLUT1 and GLUT3, facilitating cellular glucose uptake [25]. Furthermore, glycolysis and glucose uptake affect the stability and activation of HIF1 $\alpha$  in human pharyngeal carcinoma and fibrosarcoma cells and rat cardiac myocytes [25]. Conversely, AMPK activation leads to the activation of catabolic pathways that generate ATP while simultaneously inhibiting anabolic, biosynthetic pathways that consume ATP [20]. When PPAR $\gamma$  is activated, it initiates a series of events that ultimately lead to the regulation of glucose and lipid metabolisms. Specifically, PPAR $\gamma$  regulates genes associated with glucose transporters, mitochondrial biogenesis, fat storage, and fat transport [26].

The interactions between high-glucose levels and TGF $\beta$ 1 have been investigated in various cell lines, and the results have demonstrated that TGF $\beta$ 1 signaling affects glucose metabolism by increasing glucose uptake, controlling glycolytic enzymes, altering lactate production, and influencing oxidative phosphorylation [13,27]. However, there is no evidence regarding the

effect of TGF $\beta$ 1 on energy metabolism in trophoblast cells, particularly its interplay with energy-sensing regulators: HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and AMPK.

The aim of the present study was to investigate the potential regulatory function of TGF $\beta$ 1 in counteracting metabolic disruptions caused by high-glucose conditions in trophoblast cells. By examining the expression or activation levels of SMAD2, HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , AMPK, GLUT1, GLUT3, and specific mitochondrial respiratory chain protein subunits, as well as assessing the levels of ATP and lactate production, we aimed to explore the extent to which TGF $\beta$ 1 may play a role in regulating the effects of high-glucose conditions on trophoblast cells.

## **Materials and Methods**

### **2.1. Materials**

Cell culture media and reagents such as fetal bovine serum (FBS; #090-110) and Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, #311-512-CL) were obtained from Wisent (St-Bruno, QC, Canada). Cell culture plates and flasks were purchased from Corning Inc., (Corning, NY, USA). TGF $\beta$ 1 cytokine was purchased from Peprotech (Montreal, QC, Canada). Dimethyl sulfoxide (DMSO), bovine serum albumin (BSA), and monoclonal peroxidase-conjugated mouse anti- $\beta$ -actin antibody were from Sigma Chemical Company (Oakville, ON, Canada). Protease and phosphatase inhibitors cocktail EDTA-free and the Pierce<sup>TM</sup> NE-PER<sup>TM</sup> nuclear and cytoplasmic extraction reagent were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). VH 298, a cell-permeant inhibitor of von Hippel–Lindau disease tumor suppressor (VHL; #700410) was from Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA. Rabbit polyclonal antibodies (Abs) targeting PPAR $\gamma$  (#2435), HIF1 $\alpha$  (#36169), p-SMAD2 (pS465/467; #3108), SMAD2 (#5359), p-AMPK $\alpha$  (pThr172; #2531), AMPK (#2532), and Lamin B1 (#13435), as well as GLUT1 (#12939), were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail (ab110413) was sourced from Abcam (Cambridge, UK), and the mouse monoclonal GLUT3 Abs (Sc-74399) from Santa Cruz Biotechnology (Cambridge, MA, USA). Rabbit polyclonal  $\beta$ -tubulin Abs were purchased from Abcam (#Ab6046; Waltham, MA, USA). All Abs were used at a 1:1000 dilution except for GLUT1 (1:2000) and GLUT3 (1:500) in phosphate-buffered saline (PBS) solution containing 5% BSA (PBS/5% BSA). The horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG and goat anti-mouse IgG Abs (1:5000 dilution) were obtained from Bio-Rad Laboratories (Mississauga,

ON, Canada). The chemiluminescence detection kit was purchased from FroggaBio (#CCH365; Concord, ON, Canada).

## **2.2. Cell Culture**

The human placental choriocarcinoma JEG-3 cell line (ATCC #HTB-36; Rockville, MD, USA) was grown in RPMI-1640 cell culture media supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, and 50 µg/mL gentamicin. The cells were maintained at 37 °C in a moisture-saturated atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cell culture workflow, cell passaging, and cell subculturing were performed as previously described [8–10]. For further experimental needs, cells were detached using trypsin, counted, and subcultured in 24- or 96-well cell culture plates. All experiments were restricted to using JEG-3 cells from passages 8 to 15 to avoid any changes in cell behavior during the study.

## **2.3. ATP Detection**

The metabolic activity of JEG-3 cells was evaluated via quantitative measurement of total cellular ATP levels and achieved using an ATP detection assay kit (#700410; from Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Briefly, at the indicated time points, cells were lysed in ATP sample buffer and properly diluted to ensure the luminescence was within the linear range of the ATP standard curve. Cell lysates were incubated with a mixture containing D-Luciferin and Luciferase at room temperature for 20 min. The luminescence intensity was recorded at 570 nm using a microplate reader (BioTek Synergy HT; BioTek<sup>®</sup> Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). According to the manufacturer's protocol, total ATP concentration, expressed in nM, was determined using the ATP detection standard.

## **2.4. Lactate Detection**

The glycolytic activity of JEG-3 cells was determined using the Lactate-Glo Assay (#J5021, from Promega, Madison, WI, USA). In this bioluminescent assay, lactate dehydrogenase (LDH) utilizes extracellular lactate, derived from glycolysis, and NAD<sup>+</sup> to produce pyruvate and NADH. In the presence of NADH, a pro-luciferin reductase substrate is converted by the reductase to luciferin, which is then used in a luciferase reaction to produce light. The light emitted in this reaction is directly proportional to the concentration of lactate in the culture medium sample. Briefly, at the indicated time points, 10 µL of cell-free culture medium samples

were diluted first with 490  $\mu$ L HBSS. Then, 50  $\mu$ L diluted medium sample and 25  $\mu$ L lactate detection reagent were mixed in 96-well plates and incubated for 60 min at room temperature. The luminescence intensity was recorded at 570 nm using the BioTek Synergy HT microplate reader. According to the technical manual, relative light unit and lactate titration curve were used to determine lactate concentration, expressed in nM.

### **2.5. Cell Viability/Proliferation**

The relative cell viability/proliferation of JEG-3 cells was determined using the MTT assay as we previously described [8–10].

### **2.6. Subcellular Fractionation**

JEG-3 cells at a cell density of  $450 \times 10^3$  cells/2 mL/well were seeded into 6-well plates in 10% FBS-RPMI-1640 cell culture media overnight. Cells were starved without FBS overnight, and then cultured for 24 h. After the incubation period, cytoplasmic and nuclear protein extracts were prepared according to the instructions of the Pierce<sup>TM</sup> NE-PER<sup>®</sup> nuclear and cytoplasmic extraction kit (#78835) and analyzed by western blot.

### **2.7. Proteins Immunodetection**

JEG-3 cells were seeded for 24 h at two different cell densities,  $450 \times 10^3$  cells/2 mL/well into 6-well plates and  $150 \times 10^3$  cells/500  $\mu$ L/well into 24-well plates. Cells were starved in cell culture media without FBS overnight. Cells were then used in different experimental conditions. At the indicated time points, cell protein samples were resolved using SDS-PAGE under reducing conditions, and then transferred into PVDF membranes as described [8–10]. Blots were probed overnight at 4 °C with rabbit polyclonal primary Abs against total (t) or phosphorylated (p) forms of SMAD2, HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , GLUT1, and AMPK proteins, as well as a mixture of mouse polyclonal primary Abs against mitochondrial respiratory chain protein subunits and mouse monoclonal Abs against GLUT3. Membranes were then incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG Abs at 1:5000 dilution for 1 h at room temperature.  $\beta$ -actin (1:40,000 dilution) and  $\beta$ -tubulin and Lamin B1 (1:1000 dilutions) were used as loading controls. The detected proteins were visualized as described [8–10]. To ensure the validity of western blot quantification, the best Ab dilution was established to avoid

background or nonspecific reactions, and a serial dilution of protein samples was conducted to optimally yield positive signals falling within the linear detection range for each antibody.

## **2.8. Statistical Analysis**

Data collection and statistical analysis were performed using Prism software, version 3.03 (San Diego, CA, USA), as previously described [8–10]. Briefly, data from at least three independent experiments were expressed as mean  $\pm$  SD. A one-way ANOVA followed by Bonferroni post-tests was performed to assess the statistical correlation of data between groups. Tukey tests were performed to analyze the null hypothesis of no difference in means between two groups. A threshold of significance at  $p \leq 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## **3. Results**

### 3.1. The Interplay Between Glucose Concentration and Metabolic Changes in Human Trophoblast Cells

To determine the effect of glucose concentration on metabolic regulation in the human trophoblast cell line JEG-3, cells were incubated for 24 h with increasing concentrations of glucose: 5 mM (control), 10 mM, 15 mM, and 25 mM. We assessed both ATP and lactate production, as these markers are useful for evaluating energy and carbohydrate metabolism, respectively. JEG-3 cells growing in increasing glucose concentrations exhibited a significant decrease in total ATP production immediately after the glucose concentration was doubled from 5 mM to 10 mM (Figure 1A). This decline continued gradually, reaching the lowest ATP concentration after a 24 h incubation period with 25 mM glucose. Regarding lactate production (Figure 1B), no significant changes in lactate production were observed, regardless of the glucose concentration. These findings suggest that increasing glucose concentrations does not affect the glycolytic pathway but probably induces alterations in ATP production within the mitochondria of JEG-3 cells.

### 3.2. Effect of High-Glucose Concentration on Mitochondrial Respiratory Chain Protein Expression

Because high-glucose condition is known to reduce ATP synthesis and mitochondrial function in trophoblast cells [2,3], and that variation in the expression of mitochondrial respiratory chain proteins is linked to enhanced [28] or lowered [29] cellular ATP synthesis levels, we evaluated the expression of mitochondrial respiratory chain proteins via western blot analysis (Figure 2A). JEG-3 cells were incubated for 24 h with glucose at either 5 mM or 25 mM—the concentration that mimics conditions of hyperglycemia in vivo. The results showed that incubating JEG-3 cells with 25 mM glucose significantly reduced the expression of all mitochondrial respiratory chain protein subunits: CI-NDUF88 (2-fold), CII-SDHB (1.9-fold), CIII-UQCRC2 (1.6-fold), and CIV-MTCO1 (1.3-fold) (Figure 2B). This indicates that cells growing in high-glucose conditions lead to alterations in mitochondrial function.

### 3.3. Effect of High-Glucose Concentrations on the Expression of HIF1 $\alpha$ and PPAR $\gamma$

To better understand the mechanism by which high-glucose concentration alters ATP production and mitochondrial metabolism, we investigated the expression of HIF1 $\alpha$  and PPAR $\gamma$ , two key transcription factors involved in the regulation of carbohydrate metabolism. HIF1 $\alpha$ , a transcription factor induced by hypoxia, is also known to regulate glycolytic metabolism [30]. PPAR $\gamma$  is a key regulator of energy metabolism, particularly in mitochondrial biogenesis [31]. In this set of experiments, proteins from cytoplasmic and nuclear compartments were extracted from JEG-3 cells that were incubated with either normal-glucose (5 mM) or high-glucose (25 mM) concentrations for 24 h. The results (Figures 3A,B) showed that growing conditions in high-glucose concentration induced a decrease in the nuclear expression of PPAR $\gamma$  (1.7-fold decrease) compared with the normal-glucose condition. Conversely, nuclear expression of HIF1 $\alpha$  appears to be increased (1.7-fold increase) in JEG-3 cells after a 24 h incubation period with high-glucose concentration compared with 5 mM glucose (Figures 3A,B). Taken together, these results indicate that high-glucose concentration induces alterations in the regulation of energy metabolism in the human trophoblast JEG-3 cells. These alterations appear to be mediated through differential expression of the energy metabolic sensors HIF1 $\alpha$  and PPAR $\gamma$ .

### 3.4. Effect of Glucose Concentrations on the Activation of the TGF $\beta$ 1 Signaling Pathway

In human trophoblast cells, TGF $\beta$ 1 is recognized as a key pregnancy-related cytokine and regulates various aspects of trophoblast function such as differentiation and proliferation [32]. TGF $\beta$ 1 is also known to be a main regulator of metabolism in immune cells, such as macrophages, by promoting mitochondrial metabolism over glycolytic metabolism [33]. In this set of experiments, we aimed to assess the effect of TGF $\beta$ 1 on the metabolic dysregulation induced by growing conditions in high-glucose concentration. Initially, we evaluated the impact of different glucose concentrations on the phosphorylation of SMAD2, a key signal transduction molecule induced by TGF $\beta$ 1. Our preliminary data indicates that SMAD2 activation was induced as early as 5 min after TGF $\beta$ 1 stimulation, with a peak at 60 min and a continuing decline up to 120 min (data not shown). JEG-3 cells were initially incubated for 24 h with increasing concentrations of glucose (5, 10, 15, and 25 mM). Then, cells were stimulated for 30 min with culture media alone (control) or with 50 ng/mL TGF $\beta$ 1. The results shown in Figures 4A,B indicate that stimulation with TGF $\beta$ 1 during 30 min resulted in significant induction of SMAD2 phosphorylation, with greater induction observed when the cells were incubated with 20 mM glucose (4.3-fold increase) and 25 mM glucose (4.6-fold increase). Overall, these results suggest that TGF $\beta$ 1 signaling can be influenced in trophoblast JEG-3 cells when incubated in high-glucose conditions.

### 3.5. Effect of TGF $\beta$ 1 on the Process of Glucose and Energy Metabolism

Because the high-glucose condition significantly reduced ATP biosynthesis without affecting lactate production, we first examined the influence of glucose concentration and TGF $\beta$ 1 stimulation on the expression of the glucose transporters GLUT1 and GLUT3 by western blot (Figure 5A). JEG-3 cells were thus cultured for 24 h in media containing 5 mM or 25 mM glucose in the absence (control) or the presence of TGF $\beta$ 1. Our results indicate that the high-glucose condition (25 mM) decreased the expression of both glucose transporters, the relative reduction levels being evaluated at 64% for GLUT1 (Figure 5B) and 39% for GLUT3 (Figure 5C) compared to the normal-glucose condition. However, TGF $\beta$ 1 stimulation significantly increased the expression of GLUT1 and GLUT3 at high-glucose concentration, at levels similar to that in the normal-glucose condition (Figures 5B,C). Next, we investigated whether TGF $\beta$ 1 influences lactate and ATP production. As previously shown (Figure 1), our results confirm that JEG-3 cell incubation with normal- or high-glucose concentrations did not affect lactate

production (Figure 5D) but that incubation with a high-glucose concentration significantly reduced ATP biosynthesis (Figure 5E). Moreover, we found that TGF $\beta$ 1 did not affect lactate production even after a 24 h stimulation period with TGF $\beta$ 1 (Figure 5D). However, as shown in Figure 5E, treatment with TGF $\beta$ 1 for 24 h similarly enhanced ATP production when cells were incubated with either 5 mM glucose (1.3-fold increase) or 25 mM glucose (1.6-fold increase). To verify if the impact of TGF $\beta$ 1 on cell metabolism was influenced by the effect of the hyper-glucose condition on JEG-3 cell proliferation, we evaluated the relative number of viable, metabolically active cells at 5 mM vs. 25 mM using an MTT assay. Our data indicated that neither high glucose concentrations nor the treatments with TGF $\beta$ 1 affected JEG-3 cell proliferation. Taken together, these results indicate that TGF $\beta$ 1 appears to influence energy metabolism by targeting mitochondrial function rather than lactate production in the glycolytic pathway.

### 3.6. Effect of TGF $\beta$ 1 on Mitochondrial Respiratory Chain Protein Expression

To better understand the effect of TGF $\beta$ 1 on the regulation of energy metabolism in JEG-3 cells, we decided to assess the expression of mitochondrial respiratory chain proteins under normal-glucose (5 mM) or high-glucose (25 mM) concentrations in the absence (control) or presence of TGF $\beta$ 1 at 50 ng/mL during 24 h. The results shown in Figure 6A confirm that exposing JEG-3 cells to high glucose concentrations decreased the expression of mitochondrial respiratory chain protein subunits CI-NDUF88, CII-SDHB, CIII-UQCRC2, and CIV-MTCO1 but resulted in significant induction of p-SMAD2. Examining Figure 6B more closely, when JEG-3 cells were incubated with 5 mM glucose, treatment with TGF $\beta$ 1 significantly increased the expression of OXPHOS protein subunits CI-NDUF88 (1.15-fold), CII-SDHB (1.3-fold), and CIII-UQCRC2 (1.2-fold), with a more pronounced increase in CIV-MTCO1 (1.5-fold). As shown in Figure 6C, when the cells were incubated with a high-glucose concentration (25 mM), TGF $\beta$ 1 treatment enhanced the expression of OXPHOS protein subunits, with a more pronounced effect on CI-NDUF88 (2.5-fold) and CIII-UQCRC2 (2.6-fold). To better define the influence of TGF $\beta$ 1 on OXPHOS protein expression at normal- and high-glucose concentrations, we evaluated the mean of total fold induction for each condition and found that TGF $\beta$ 1 treatment enhanced the expression of these proteins by 1.7-fold when the cells were incubated in media containing 25 mM glucose compared to media containing 5 mM glucose (Figure 6D). Taken together, these

results indicate that TGF $\beta$ 1 treatment not only enhances the mitochondrial respiratory chain under control conditions but also mitigates the damage induced by high-glucose concentration.

### 3.7. Effect of TGF $\beta$ 1 on the Expression of PPAR $\gamma$

To enhance our understanding of how TGF $\beta$ 1 affects energy metabolism in human trophoblast cells, we determined the effect of TGF $\beta$ 1 on PPAR $\gamma$  expression. JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing 5 mM or 25 mM glucose in the absence or presence of TGF $\beta$ 1. Then, PPAR $\gamma$  expression was assessed using western blotting (Figure 7A). Our results demonstrated that cell incubation in high-glucose conditions decreased PPAR $\gamma$  expression (relative expression =  $1.05 \pm 0.08$  vs.  $0.67 \pm 0.03$ ; Figure 7B) but enhanced TGF $\beta$ 1-induced SMAD2 phosphorylation (Figure 7C), with greater induction at 25 mM glucose (relative expression =  $0.83 \pm 0.09$ ) compared with 5 mM glucose (relative expression =  $0.59 \pm 0.09$ ). In normal-glucose conditions, treatment with TGF $\beta$ 1 did not affect PPAR $\gamma$ , as reflected by similar intensity in both normal- and high-glucose concentrations (Figure 7B). However, TGF $\beta$ 1 treatment significantly increased PPAR $\gamma$  expression under high-glucose conditions (relative expression =  $1.41 \pm 0.09$  vs.  $0.67 \pm 0.09$  at 5 mM). These results suggest that PPAR $\gamma$  may play a key role in mediating the function of TGF $\beta$ 1 on energy homeostasis in JEG-3 cells under high-glucose stress conditions.

### 3.8. Effect of TGF $\beta$ 1 on the Expression of HIF1 $\alpha$ and the Activation of AMPK

To further elucidate the mechanisms of TGF $\beta$ 1 in the maintenance of ATP balance under normal-glucose and high-glucose stress conditions, we investigated the regulatory role of TGF $\beta$ 1 on HIF1 $\alpha$  expression and AMPK activation. In this set of experiments, JEG-3 cells were cultured for 24 h in normal-glucose (5 mM) or high-glucose conditions (25 mM), and then activated in the absence (control) or presence of TGF $\beta$ 1 at 50 ng/mL for 15, 30, or 60 min (Figure 8A). As expected, treatment with TGF $\beta$ 1 induced p-SMAD2 with greater phosphorylation levels at 25 mM glucose (relative expression, control =  $0.066 \pm 0.007$  vs. TGF $\beta$ 1 =  $0.57 \pm 0.08$  at  $t = 30$  min; Figure 8B) compared with 5 mM glucose (relative expression, control =  $0.075 \pm 0.008$  vs. TGF $\beta$ 1 =  $1.062 \pm 0.074$  at  $t = 30$  min; Figure 8B). Notably, JEG-3 cells basally expressed higher levels of HIF1 $\alpha$  protein in both normal- and high-glucose conditions (Figure 8A,C). However, basal levels of HIF1 $\alpha$  expression increased in high-glucose condition (relative expression,  $1.07 \pm 0.11$  vs.  $0.31 \pm 0.02$  in 5 mM glucose at  $t = 30$  min; Figure 8C), while AMPK activation was

unaffected in both normal- and high-glucose conditions (Figure 8D). In contrast, TGF $\beta$ 1 treatment induced HIF1 $\alpha$  degradation, an effect observed beginning at  $t = 15$  min and continuing until the end of the experiment; this effect appears to be dependent on glucose concentration in the media, with greater degradation levels with 25 mM glucose (relative expression, control =  $1.17 \pm 0.11$  vs. TGF $\beta$ 1 =  $0.29 \pm 0.04$  at  $t = 60$  min; Figure 8C) compared with 5 mM glucose (relative expression, control =  $0.58 \pm 0.06$  vs. TGF $\beta$ 1 =  $0.23 \pm 0.02$  at  $t = 60$  min; Figure 8C). The degradation of HIF1 $\alpha$  was mirrored by the induction of p-AMPK via TGF $\beta$ 1, and again, with greater phosphorylation levels at 25 mM glucose (relative expression, control =  $0.74 \pm 0.05$  vs. TGF $\beta$ 1 =  $2.25 \pm 0.13$  at  $t = 60$  min; Figure 8D) compared with 5 mM glucose (relative expression, control =  $0.34 \pm 0.03$  vs. TGF $\beta$ 1 =  $1.34 \pm 0.13$  at  $t = 60$  min; Figure 8D). Taken together, these results indicate that TGF $\beta$ 1 restores the energy homeostasis of JEG-3 cells under high-glucose stress conditions by inducing AMPK activation and HIF1 $\alpha$  degradation.

### 3.9. The Von Hippel–Lindau Protein Antagonist VH298 Blocks TGF $\beta$ 1-Induced HIF1 $\alpha$ Degradation

Under normoxia, HIF1 $\alpha$  is maintained at very low levels via proline-hydroxylation by PHD proteins, allowing their recognition and polyubiquitination by the Von Hippel–Lindau (VHL) Cullin RING E3 ubiquitin ligase complex and subsequent proteasomal degradation [17]. To elucidate the mechanisms by which TGF $\beta$ 1 induces HIF1 $\alpha$  degradation, JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing glucose at 5 mM or 25 mM and then activated for 60 min with TGF $\beta$ 1 in the absence or presence of VH298, a potent and specific VHL inhibitor that stabilizes HIF1 $\alpha$  by blockade of the VHL:HIF protein–protein interaction downstream of HIF1 $\alpha$  hydroxylation by PHD enzymes. As established above (Figure 8), the basal expression levels of HIF1 $\alpha$  significantly decreased in both normal- and high-glucose conditions after TGF $\beta$ 1 stimulation (Figure 9A,B), an effect that was mirrored by enhanced levels of TGF $\beta$ 1-induced SMAD2 phosphorylation (Figure 8A,C). However, treatment with VH298 molecules induced HIF1 $\alpha$  stabilization, with greater expression levels at 25 mM glucose compared with 5 mM glucose (Figure 9A,B). Importantly, the protein expression levels of HIF1 $\alpha$  remained stable and unchanged even in the presence of TGF $\beta$ 1 (Figure 9B). Moreover, the presence of VH298 did not affect the levels of TGF $\beta$ 1-induced SMAD2 phosphorylation, which were significantly increased in both normal- and high-glucose conditions after TGF $\beta$ 1 stimulation (Figure 9C).

These results suggest that HIF1 $\alpha$  protein stabilisation is not caused by a blockade of SMAD2 phosphorylation by VH298 molecules and that TGF $\beta$ 1 might induce HIF1 $\alpha$  proteasomal degradation via enhanced VHL or PHD enzyme activities.

#### **4. Discussion**

The process of placental transport and metabolism of nutrients essential for fetal development is metabolically expensive and requires abundant oxygen consumption and ATP production, primarily synthesized through glycolysis and oxidative phosphorylation [34]. Glucose is principally the energy source for the placenta and fetus, and all the glucose supplied to the placenta-fetal unit originates from the maternal glucose pool, which is produced by maternal gluconeogenesis or ingested through the pregnant woman's diet [35]. However, elevated glucose levels at the fetal-maternal interface have been linked to poor maternal and perinatal outcomes. In fact, hyperglycemia is the most common medical condition affecting pregnancy, and its occurrence is rising globally in tandem with the dual epidemics of obesity and diabetes [36]. The potential outcomes of hyperglycemia in pregnancies with diabetes mellitus (DM) and gestational diabetes mellitus (GDM) include preterm birth, preeclampsia, and stillbirth. However, fetal overgrowth and macrosomia are the most common adverse effects [37]. Lipid metabolism is also altered in placentas from DM and GDM women. Thus, it is proposed that maternal hyperglycemia is a contributing factor to fetal macrosomia by enhancing substrate availability to the fetus and stimulating adipose tissue formation and excessive growth [38].

Hyperglycemia can impair spiral artery remodeling, increasing the risk of pregnancy complications, such as miscarriage, cardiac and renal malformations, and rare neural conditions, such as sacral agenesis [2]. It negatively affects EVT cell function in uterine spiral artery remodeling by disrupting trophoblast proliferation, migration, invasion, hormone and angiogenic factor release, and communication between trophoblasts and immune cells [2].

In this study, we showed that high-glucose concentrations induce alterations in the regulation of energy metabolism in human trophoblast JEG-3 cells, a model of placental EVT cells. Notably, these in vitro hyperglycemic conditions reduce ATP synthesis and mitochondrial function without affecting lactate production via the glycolytic pathway. Previous research on trophoblast cells from normal and GDM placentas has shown that a high glucose concentration (25 mM) significantly reduces the glycolytic capacity and ATP production of cytotrophoblasts,

particularly EVT cells [3]. EVT cells are noted for higher oxygen consumption and glycolysis compared to fusogenic VST cells. Additionally, the mitochondrial respiratory capacity of VST cells from both normal and GDM placentas remains unaffected by glucose level variations. However, VST cells from GDM placentas exhibit significantly lower levels of  $\beta$ -hCG and other syncytialization markers, including GCM1 and syncytin-1, compared to those from normal placentas [3]. According to the results of the microarray transcriptome analysis, DM is associated with alterations in gene expression at critical stages of placental energy metabolism, with 67% of the changes affecting lipid pathways and 9% affecting glucose pathways [39]. Furthermore, pregnant women with GDM show preferential activation of lipid genes [39]. Human trophoblast BeWo cells, a model of placental VST cells, were cultured in 5 or 25 mM glucose to identify the functional biochemical pathways perturbed by high glucose levels [40]. Among the pathway networks affected by high-glucose conditions, this study highlighted the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) cascade, glucose metabolism, peroxisomal lipid metabolism, phospholipid metabolism, bone morphogenetic protein (BMP)/SMAD2 cascade, regulation of lipid metabolism by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), and cellular response to stress [40].

Although the precise mechanism by which high glucose concentrations in EVT suppress metabolic activity and mitochondrial oxidative phosphorylation remains largely unknown, our results suggest that these changes may be mediated by reduced expression levels of mitochondrial respiratory chain proteins and PPAR $\gamma$ , coinciding with increased HIF1 $\alpha$  expression.

Given the critical role that TGF $\beta$ 1 plays in multiple aspects of cell metabolism [13], we hypothesized that this cytokine regulates energy metabolism in trophoblast cells by influencing the expression of key energy metabolic sensors, such as HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and AMPK, under high-glucose conditions. Our results showed that TGF $\beta$ 1 stimulation led to increased levels of SMAD2 phosphorylation when the cells were incubated in high-glucose conditions (15 mM and 25 mM). This outcome aligns with prior research demonstrating that prolonged exposure to high glucose levels triggers a range of physiological and pathophysiological changes, activating various signaling pathways that often disrupt the function of cells, tissues, and organ systems [41]. Hyperglycemia can activate protein kinase C (PKC) in malignant cells, leading to the

activation of various pathways including Akt, TGF $\beta$ /SMADs, and NF $\kappa$ B. These pathways work together to control cancer cell metabolism and behavior, such as proliferation, migration, invasion, and recurrence [42]. As research suggests, elevated glucose levels have been found to boost the cell membrane concentrations of T $\beta$ RI and T $\beta$ RII and to promote the activation of latent TGF $\beta$  by matrix metalloproteinases [13]. This, in turn, triggers the Akt-mTOR pathway and leads to enlargement of fibroblasts and epithelial cells. Furthermore, TGF $\beta$  signaling plays a role in regulating other components of the glycolytic pathway [13].

Our findings indicated that TGF $\beta$ 1 restores the energy homeostasis of JEG-3 cells under high-glucose stress conditions. Specifically, TGF $\beta$ 1 treatment enhances ATP production and mitochondrial respiratory chain protein expression under high-glucose concentrations. While high-glucose stress condition does not affect lactate production, even after TGF $\beta$ 1 stimulation, we found that TGF $\beta$ 1 restores the expression levels of GLUT1 and GLUT3 to levels similar to those observed in normal-glucose conditions. These results are consistent with previous research showing that TGF $\beta$ 1 improves the activity/expression of GLUT1 and HK2 in different cell types, thus favoring glucose capture and energy production [13]. Moreover, it was established that TGF $\beta$ 1 is responsible for significant metabolic reprogramming in normal and cancerous cells by promoting mitochondrial ATP production [14] and increasing mitochondrial activity, as evidenced by the higher mitochondrial DNA copy number and ROS levels [43]. Furthermore, TGF $\beta$ 1 activates the AMPK pathway, which promotes fatty acid oxidation and inhibits anabolic pathways [44]. It is proposed that this effect on mitochondrial metabolism can help normal and cancer cells maintain their energy requirements and metabolic adaptations under metabolic stress conditions.

The impact of TGF $\beta$ 1 on trophoblast metabolism is not extensively investigated. Here, we demonstrated that TGF $\beta$ 1 treatment of trophoblast JEG-3 cells resulted in the degradation of HIF1 $\alpha$  under normal- and high-glucose concentrations. Although prior studies have demonstrated that TGF $\beta$ 1 induces HIF1 $\alpha$  stability under hypoxic and normoxic conditions by inhibiting the prolyl hydroxylase domain protein PHD2, an oxygen sensor that typically promotes HIF1 $\alpha$  degradation [45], notably, the stability and function of HIF1 $\alpha$  are also regulated by hyperglycemia through interference with the degradation of HIF1 $\alpha$  triggered by PHD enzymes [46]. The findings suggest the presence of dual effects of TGF $\beta$ 1 on HIF1 $\alpha$  stability

and degradation in different physiological and pathological contexts. In this study, we demonstrated that TGF $\beta$ 1-induced HIF1 $\alpha$  degradation is blocked in the presence of VH298, a potent and specific VHL inhibitor that disrupts VHL:HIF protein–protein interaction and subsequent HIF1 $\alpha$  proteasomal degradation, suggesting that TGF $\beta$ 1 might induce HIF1 $\alpha$  proteasomal degradation via enhanced VHL or PHD enzyme activities. Nonetheless, additional research is necessary to understand the precise mechanism by which TGF $\beta$ 1 causes HIF1 $\alpha$  degradation in JEG-3 cells.

The impact of TGF $\beta$ 1 on HIF1 $\alpha$  in JEG-3 cells was accompanied by the activation of AMPK, regardless of glucose concentration. This outcome aligns with research suggesting that TGF $\beta$ 1 can indirectly activate AMPK through various signaling pathways [47]. Particularly, IGF-I and IGFBP-2 have been shown to stimulate AMPK activation while assisting in its modulation. AMPK activity plays a vital role in maintaining energy balance and metabolic regulation [47].

Conversely, our findings demonstrated that glucose concentration affected the effect of TGF $\beta$ 1 on PPAR $\gamma$ . Specifically, we found that TGF $\beta$ 1 did not affect PPAR $\gamma$  expression under normal glucose levels. These results indicate a potential interaction between PPAR $\gamma$  and AMPK in relation to the effect of TGF $\beta$ 1 on ATP production. AMPK activation enhances the expression of genes related to fatty acid oxidation (FAO) through interaction with PPAR $\gamma$ , thereby improving mitochondrial function and ATP production. Independent research indicates that combined activation of AMPK and PPAR $\gamma$  synergistically upregulates FAO genes, boosting ATP levels in macrophages [48,49]. The AMPK-PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) pathway is crucial for mitochondrial biogenesis and function, as it enhances PPAR $\gamma$  activity, thereby increasing the expression of mitochondrial genes and promoting ATP production. This pathway is vital for maintaining energy homeostasis in macrophages under metabolic stress [48,49].

Our results indicate that TGF $\beta$ 1 restores PPAR $\gamma$  expression under high glucose concentrations, suggesting that PPAR $\gamma$  is involved in enhancing ATP production in JEG-3 cells under high glucose stress. Although earlier investigations have revealed that the activation of PPAR $\gamma$  by agonists in  $\beta$ -cells can promote mitochondrial energy metabolism and improve ATP production, this regulation helps manage glucose-stimulated insulin secretion under lipotoxic conditions [50,51]. Investigations have revealed that activation of PPAR $\gamma$  in prostate cancer cells increased

mitochondrial biogenesis and ATP levels by upregulating AKT3, which enhanced the nuclear localization of PGC1 $\alpha$  [50,51].

## **5. Conclusions**

Elevated blood glucose levels at the fetal–maternal interface are associated with problems in placental trophoblasts and an increased risk of pregnancy-related complications. Our study suggests that TGF $\beta$ 1 may play a protective role against the negative effects of high-glucose concentrations on trophoblast JEG-3 cells. Our results showed that high-glucose treatments disrupted energy and mitochondrial metabolism, which was indicated by a decrease in ATP production without affecting lactate production. At the molecular level, this was demonstrated by an increase in HIF1 $\alpha$  expression and nuclear localization, a decrease in PPAR $\gamma$  expression and nuclear localization, and a decrease in the expression of GLUT1, GLUT3, and respiratory chain proteins. Our study is the first to demonstrate that TGF $\beta$ 1 can have a protective effect by restoring ATP production under high-glucose stress conditions by inducing HIF1 $\alpha$  degradation, AMPK activation, and restoring PPAR $\gamma$  and respiratory chain protein expression 6. Limitations of the Study

The trophoblast JEG-3 cell is a choriocarcinoma cell line, which presents a limitation in the study design that impacts the ability to interpret and generalize from our research results. In fact, due to ethical restrictions and the limited availability of human tissues, trophoblast cell lines are generally used to investigate many aspects of trophoblast biology and metabolism. According to a study by Lee et al. (2016), JEG-3 cells share some expression characteristics with primary human trophoblast cells, particularly the expression of C19MC miRNAs [57]. Additionally, KRT7, GATA3, and TFAP2C are emphasized as reliable markers for identifying primary trophoblasts, supporting the characterization of JEG-3 cells. Additionally, a study by Weiss et al. (2001) showed that compared to other immortalized cell lines, JEG-3 cells showed exhibit higher expression of glucose transporters GLUT1 and GLUT3, suggesting a greater capacity for glucose uptake [58].

Future in vitro investigations using human trophoblast stem cells or placental explants will further provide us insights into fundamental biological effects and the regulatory role of TGF $\beta$ 1 in different metabolic conditions. We also plan to confirm whether these TGF $\beta$ 1 mechanisms operate in an in vivo model. Moreover, the complex and sometimes contradictory

effects of TGF $\beta$  on pregnancy also underscore the need to confirm our results under more physiologically relevant experimental conditions, particularly by better mimicking the maternal–fetal interface.

Supplementary Materials:

Author Contributions: Conceptualization, C.R.M.; methodology, C.R.M. and N.K.N.; validation, N.K. K.N. and J.G.; formal analysis, C.R.M. and N.K.K.N.; investigation, N.K.K.N., J.G., and E.S.K.T.; resources, J.G.; writing—original draft preparation, N.K. K.N. and C.R.M.; writing—review and editing, C.R.M.; supervision, C.R.M., C.V., and C.V.T.; project administration, C.R.M.; funding acquisition, C.R.M., C.V., and C.V.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.; number RGPIN-386602-2011 toundergraduate and graduate scholarships from the NSERC and the RQR-CREATE scholarships programs, respectively.

**Institutional Review Board Statement:** The human placental choriocarcinoma JEG-3 cell line (#HTB-36) was obtained from ATCC (Rockville, MD, USA).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author(s).

**Acknowledgments:** We would like to thank the Réseau Québécois en Reproduction (RQR) and the club avenir foundation for their financial support that helped realize this project. We thank Marion Ravelojaona for her help in producing the graphical abstract.

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

## References

1. Stern, C.; Schwarz, S.; Moser, G.; Cvitic, S.; Jantscher-Krenn, E.; Gauster, M.; Hiden, U. Placental Endocrine Activity: Adaptation and Disruption of Maternal Glucose Metabolism in Pregnancy and the Influence of Fetal Sex. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12722.
2. Zhu, Y.; Liu, X.; Xu, Y.; Lin, Y. Hyperglycemia disturbs trophoblast functions and subsequently leads to failure of uterine spiral artery remodeling. *Front. Endocrinol.* **2023**, *14*, 1060253.
3. Valent, A.M.; Choi, H.; Kolahi, K.S.; Thornburg, K.L. Hyperglycemia and gestational diabetes suppress placental glycolysis and mitochondrial function and alter lipid processing. *FASEB J.* **2021**, *35*, e21423.
4. Farrar, D. Hyperglycemia in pregnancy: Prevalence, impact, and management challenges. *Int. J. Womens Health* **2016**, *8*, 519–527.
5. Aye, I.; Aiken, C.E.; Charnock-Jones, D.S.; Smith, G.C.S. Placental energy metabolism in health and disease—significance of development and implications for preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2022**, *226*, S928–S944.
6. Knöfler, 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.
7. Makrigiannakis, A.; Karamouti, M.; Drakakis, P.; Loutradis, D.; Antsaklis, A. Fetomaternal immunotolerance. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2008**, *60*, 482–496.
8. Ravelojaona, M.; Girouard, J.; Kana Tsapi, E.S.; Chambers, M.; Vaillancourt, C.; Van Themsche, C.; Thornton, C.A.; Reyes-Moreno, C. Oncostatin M and STAT3 Signaling Pathways Support Human Trophoblast Differentiation by Inhibiting Inflammatory Stress in Response to IFN $\gamma$  and GM-CSF. *Cells* **2024**, *13*, 229.
9. 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.

10. 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.
11. Carrasco-Wong, I.; Moller, A.; Giachini, F.R.; Lima, V.V.; Toledo, F.; Stojanova, J.; Sobrevia, L.; San Martín, S. Placental structure in gestational diabetes mellitus. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Mol. Basis Dis.* **2020**, *1866*, 165535.
12. Parrettini, S.; Caroli, A.; Torlone, E. Nutrition and Metabolic Adaptations in Physiological and Complicated Pregnancy: Focus on Obesity and Gestational Diabetes. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 611929.
13. Liu, H.; Chen, Y.G. The Interplay Between TGF- $\beta$  Signaling and Cell Metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 846723.
14. Li, S.; Huang, Q.; Mao, J.; Li, Q. TGF $\beta$ -dependent mitochondrial biogenesis is activated during definitive endoderm differentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* **2020**, *56*, 378–385.
15. Wen, B.; Liao, H.; Lin, W.; Li, Z.; Ma, X.; Xu, Q.; Yu, F. The Role of TGF- $\beta$  during Pregnancy and Pregnancy Complications. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 16882. <https://doi.org/10.3390/ijms242316882>.
16. Graham, A.M.; Presnell, J.S. Hypoxia Inducible Factor (HIF) transcription factor family expansion, diversification, divergence and selection in eukaryotes. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179545.
17. Weidemann, A.; Johnson, R.S. Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 621–627.
18. Tal, R.; Shaish, A.; Barshack, I.; Polak-Charcon, S.; Afek, A.; Volkov, A.; Feldman, B.; Avivi, C.; Harats, D. Effects of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  overexpression in pregnant mice: Possible implications for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am. J. Pathol.* **2010**, *177*, 2950–2962.

19. Chen, F.; Cen, H.; Mao, D.; Feng, R. Placental homing peptide guides HIF1 $\alpha$ -silenced exosomes conjugates for targeted enhancement of invasion of trophoblast cells. *Mol. Med. Rep.* **2023**, *28*, 135.
20. Hardie, D.G.; Ross, F.A.; Hawley, S.A. AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 251–262.
21. Duca, F.A.; Côté, C.D.; Rasmussen, B.A.; Zadeh-Tahmasebi, M.; Rutter, G.A.; Filippi, B.M.; Lam, T.K. Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 506–511.
22. Zhang, L.; Yu, X.; Wu, Y.; Fu, H.; Xu, P.; Zheng, Y.; Wen, L.; Yang, X.; Zhang, F.; Hu, M.; et al. Gestational Diabetes Mellitus-Associated Hyperglycemia Impairs Glucose Transporter 3 Trafficking in Trophoblasts Through the Downregulation of AMP-Activated Protein Kinase. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 722024.
23. McCarthy, F.P.; Delany, A.C.; Kenny, L.C.; Walsh, S.K. PPAR-gamma -- a possible drug target for complicated pregnancies. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *168*, 1074–1085.
24. Díaz, M.; Bassols, J.; López-Bermejo, A.; Gómez-Roig, M.D.; de Zegher, F.; Ibáñez, L. Placental Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ): Relation to Placental and Fetal Growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, E1468–E1472.
25. Xiao, H.; Gu, Z.; Wang, G.; Zhao, T. The Possible Mechanisms Underlying the Impairment of HIF-1 $\alpha$  Pathway Signaling in Hyperglycemia and the Beneficial Effects of Certain Therapies. *Int. J. Med. Sci.* **2013**, *10*, 1412–1421.
26. Gokina, N.I.; Chan, S.L.; Chapman, A.C.; Oppenheimer, K.; Jetton, T.L.; Cipolla, M.J. Inhibition of PPARgamma during rat pregnancy causes intrauterine growth restriction and attenuation of uterine vasodilation. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, 184.
27. McIlvenna, L.C.; Patten, R.K.; McAinch, A.J.; Rodgers, R.J.; Stepto, N.K.; Moreno-Asso, A. Transforming Growth Factor Beta 1 Alters Glucose Uptake but Not Insulin Signalling in Human Primary Myotubes From Women With and Without Polycystic Ovary Syndrome. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 732338.

28. Takahashi, K.; Kitaoka, Y.; Hatta, H. Effects of endurance training under calorie restriction on energy substrate metabolism in mouse skeletal muscle and liver. *J. Physiol. Sci.* **2024**, *74*, 32.
29. Chang, E.I.; Stremming, J.; Knaub, L.A.; Wesolowski, S.R.; Rozance, P.J.; Sucharov, C.C.; Reusch, J.E.B.; Brown, L.D. Mitochondrial respiration is lower in the intrauterine growth-restricted fetal sheep heart. *J. Physiol.* **2024**, *602*, 2697–2715.
30. Corcoran, S.E.; O’Neill, L.A. HIF1 $\alpha$  and metabolic reprogramming in inflammation. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 3699–3707.
31. Corona, J.C.; Duchen, M.R. PPAR $\gamma$  as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free. Radic. Biol. Med.* **2016**, *100*, 153–163.
32. Yang, D.; Dai, F.; Yuan, M.; Zheng, Y.; Liu, S.; Deng, Z.; Tan, W.; Chen, L.; Zhang, Q.; Zhao, X.; et al. Role of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Regulating Fetal-Maternal Immune Tolerance in Normal and Pathological Pregnancy. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 689181.
33. Slattery, K.; Gardiner, C.M. NK Cell Metabolism and TGF $\beta$ –Implications for Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2915.
34. Meng, X.; Chen, C.; Qian, J.; Cui, L.; Wang, S. Energy metabolism and maternal-fetal tolerance working in decidualization. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1203719.
35. Hay, W.W. *Glucose Metabolism in the Fetal-Placental Unit*, in *Principles of Perinatal-Neonatal Metabolism*; Cowett, R.M., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 1991; pp. 250–275.
36. McIntyre, H.D.; Fuglsang, J.; Kampmann, U.; Knorr, S.; Ovesen, P. Hyperglycemia in Pregnancy and Women’s Health in the 21st Century. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 16827.
37. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: Associations with neonatal anthropometrics. *Diabetes* **2009**, *58*, 453–459.
38. Visiedo, F.; Bugatto, F.; Sánchez, V.; Cózar-Castellano, I.; Bartha, J.L.; Perdomo, G. High glucose levels reduce fatty acid oxidation and increase triglyceride accumulation in human placenta. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **2013**, *305*, E205–E212.

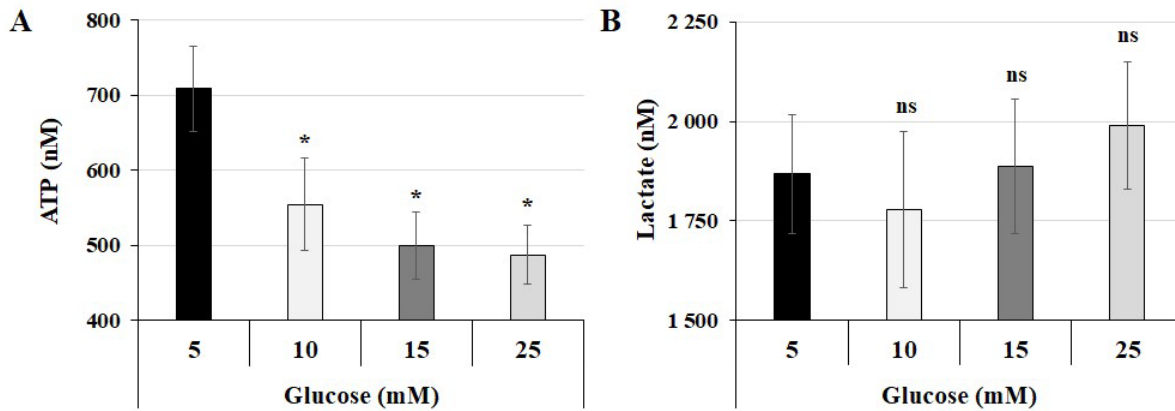
39. Radaelli, T.; Lepercq, J.; Varastehpour, A.; Basu, S.; Catalano, P.M.; Hauguel-De Mouzon, S. Differential regulation of genes for fetoplacental lipid pathways in pregnancy with gestational and type 1 diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2009**, *201*, e1–e209.
40. Hulme, C.H.; Stevens, A.; Dunn, W.; Heazell, A.E.P.; Hollywood, K.; Begley, P.; Westwood, M.; Myers, J.E. Identification of the functional pathways altered by placental cell exposure to high glucose: Lessons from the transcript and metabolite interactome. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5270.
41. Giri, B.; Dey, S.; Das, T.; Sarkar, M.; Banerjee, J.; Dash, S.K. Chronic hyperglycemia mediated physiological alteration and metabolic distortion leads to organ dysfunction, infection, cancer progression and other pathophysiological consequences: An update on glucose toxicity. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *107*, 306–328.
42. Szablewski, L. Diabetes mellitus: Influences on cancer risk. *Diabetes/Metab. Res. Rev.* **2014**, *30*, 543–553.
43. Liu, Q.Q.; Huo, H.Y.; Ao, S.; Liu, T.; Yang, L.; Fei, Z.Y.; Zhang, Z.Q.; Ding, L.; Cui, Q.H.; Lin, J.; et al. TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition increases fatty acid oxidation and OXPHOS activity via the p-AMPK pathway in breast cancer cells. *Oncol. Rep.* **2020**, *44*, 1206–1215.
44. Shi, X.; Yang, J.; Deng, S.; Xu, H.; Wu, D.; Zeng, Q.; Wang, S.; Hu, T.; Wu, F.; Zhou, H. TGF- $\beta$  signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies. *J. Hematol. Oncol.* **2022**, *15*, 135.
45. Devraj, G.; Beerlage, C.; Brüne, B.; Kempf, V.A.J. Hypoxia and HIF-1 activation in bacterial infections. *Microbes Infect.* **2017**, *19*, 144–156.
46. Ryu, T.Y.; Park, J.; Scherer, P.E. Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression. *Diabetes Metab. J.* **2014**, *38*, 330–336.
47. Thakur, S.; Viswanadhapalli, S.; Kopp, J.B.; Shi, Q.; Barnes, J.L.; Block, K.; Gorin, Y.; Abboud, H.E. Activation of AMP-activated protein kinase prevents TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition and myofibroblast activation. *Am. J. Pathol.* **2015**, *185*, 2168–2180.

48. Yang, C.-S.; Kim, J.-J.; Lee, H.-M.; Jin, H.S.; Lee, S.-H.; Park, J.-H.; Kim, S.J.; Kim, J.-M.; Han, Y.-M.; Lee, M.-S.; et al. The AMPK-PPARGC1A pathway is required for antimicrobial host defense through activation of autophagy. *Autophagy* **2014**, *10*, 785–802.
49. Kemmerer, M.; Finkernagel, F.; Cavalcante, M.F.; Abdalla, D.S.P.; Müller, R.; Brüne, B.; Namgaladze, D. AMP-Activated Protein Kinase Interacts with the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Delta to Induce Genes Affecting Fatty Acid Oxidation in Human Macrophages. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130893.
50. Montaigne, D.; Butruille, L.; Staels, B. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. *Nat. Rev. Cardiol.* **2021**, *18*, 809–823.
51. Galbraith, L.C.A.; Mui, E.; Nixon, C.; Hedley, A.; Strachan, D.; MacKay, G.; Sumpton, D.; Sansom, O.J.; Leung, H.Y.; Ahmad, I. PPAR-gamma induced AKT3 expression increases levels of mitochondrial biogenesis driving prostate cancer. *Oncogene* **2021**, *40*, 2355–2366.
52. Parhizkar, F.; Kiani, A.; Darzi, S.; Motavalli, R.; Noori Dolama, F.; Yousefzadeh, Y.; Aghebati-Maleki, L.; Pia, H.; Abdollahi-Fard, S.; Mardi, A.; et al. The evaluation of CD39, CD73, and HIF-1  $\alpha$  expression besides their related miRNAs in PBMCs of women with recurrent pregnancy loss. *J. Reprod. Immunol.* **2023**, *156*, 103820.
53. Zhu, J.; Song, G.; Zhou, X.; Han, T.-L.; Yu, X.; Chen, H.; Mansell, T.; Novakovic, B.; Baker, P.N.; Cannon, R.D.; et al. CD39/CD73 Dysregulation of Adenosine Metabolism Increases Decidual Natural Killer Cell Cytotoxicity: Implications in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 813218.
54. Tagoma, A.; Haller-Kikkatalo, K.; Oras, A.; Roos, K.; Kirss, A.; Uibo, R. Plasma cytokines during pregnancy provide insight into the risk of diabetes in the gestational diabetes risk group. *J. Diabetes Investig.* **2022**, *13*, 1596–1606.
55. Ding, Z.; Cao, L.; Jin, R.; Li, R. Exploration of the Shared Genes and Molecular Pathways between Pre-Eclampsia and Type 2 Diabetes Mellitus via Co-Expression Networks Analysis. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* **2023**, *50*, 73.

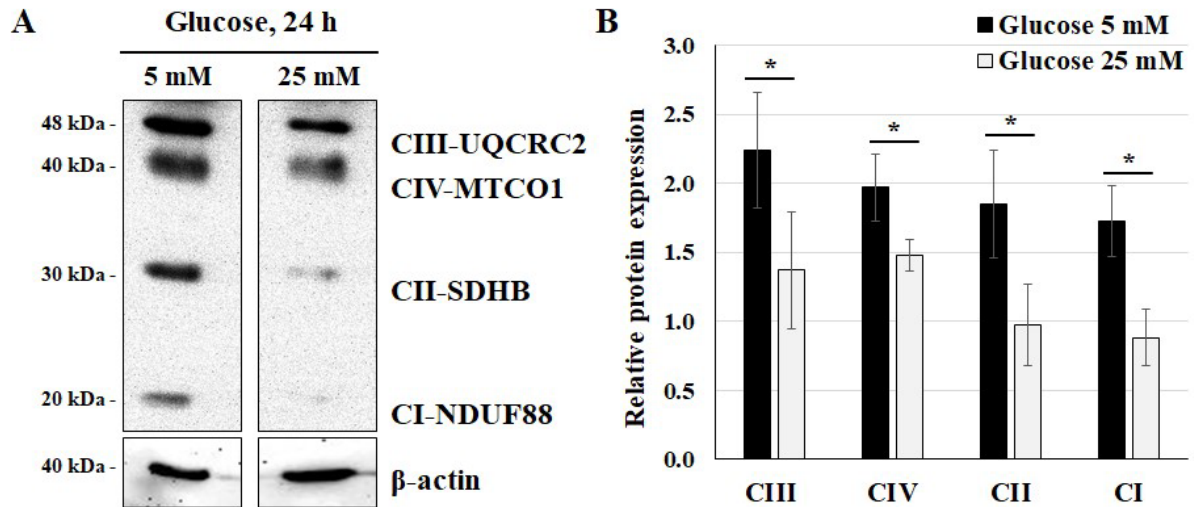
56. Prossler, J.; Chen, Q.; Chamley, L.; James, J.L. The relationship between TGF $\beta$ , low oxygen and the outgrowth of extravillous trophoblasts from anchoring villi during the first trimester of pregnancy. *Cytokine* **2014**, *68*, 9–15.
57. Lee, C.Q.; Gardner, L.; Turco, M.; Zhao, N.; Murray, M.J.; Coleman, N.; Rossant, J.; Hemberger, M.; Moffett, A. What Is Trophoblast? A Combination of Criteria Define Human First-Trimester Trophoblast. *Stem Cell Rep.* **2016**, *6*, 257–272.
58. Weiss, U.; Cervar, M.; Puerstner, P.; Schmut, O.; Haas, J.; Mauschitz, R.; Arikan, G.; Desoye, G. Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. *Diabetologia* **2001**, *44*, 209–219.

**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.

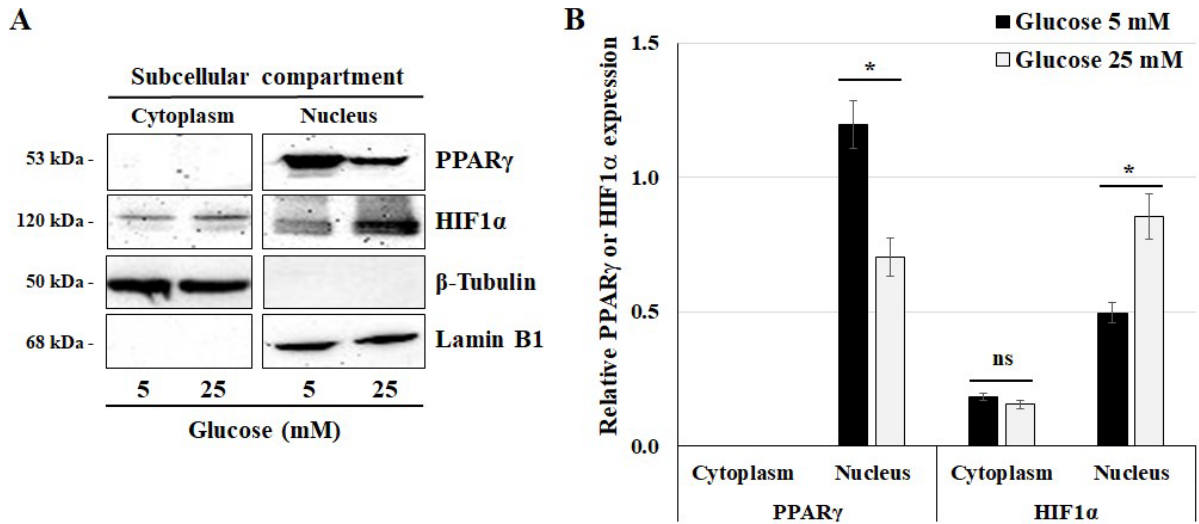
**Figures and Legends:**



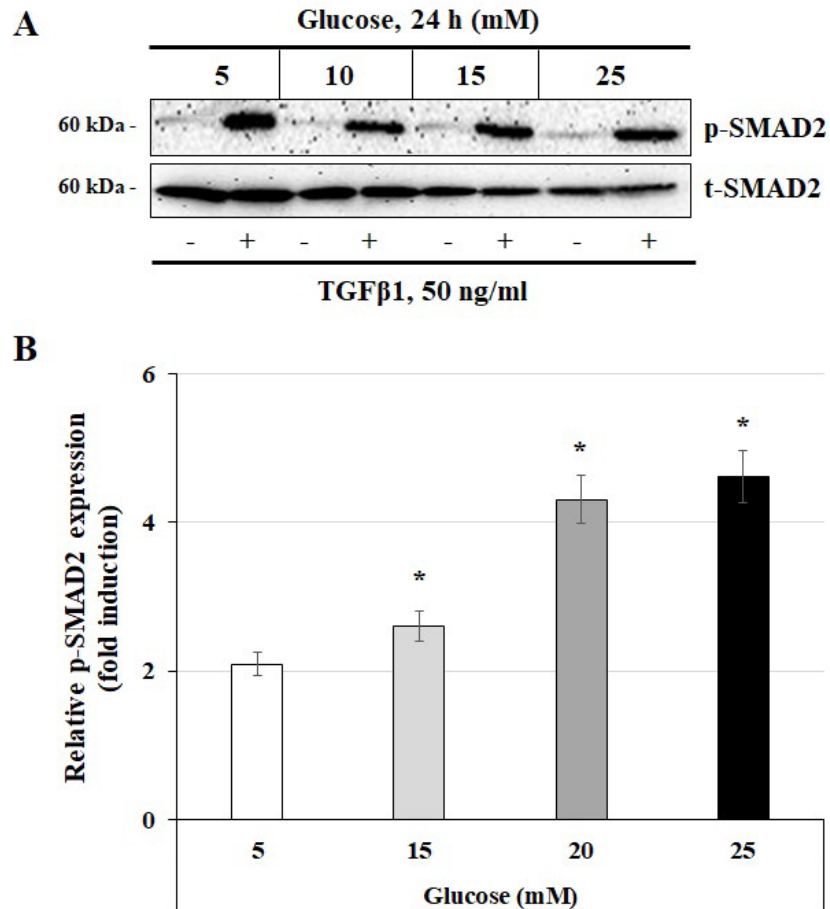
**Figure 1. High-glucose concentration decreases total ATP production without affecting lactate production: (A,B)** JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing normal-glucose (5 mM) or high-glucose (10, 15, and 25 mM) concentrations. (A) Quantitation of ATP production (n = 3) was assessed using the ATP luminescence detection assay kit. (B) Quantitation of lactate production (n = 3) was assessed using the Lactate-Glo™ assay kit. Data are expressed as nM of ATP and lactate. \* p < 0.05 indicates a significant difference compared to the 5 mM glucose group, and ns = nonsignificant difference.



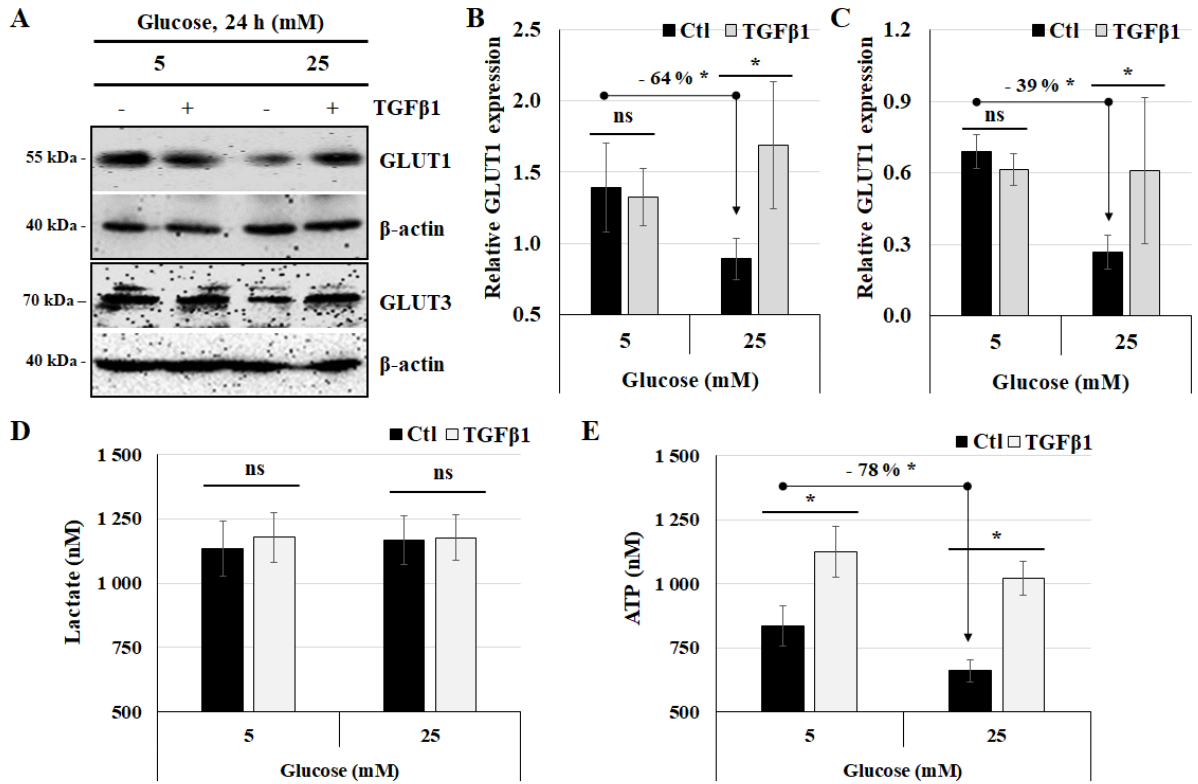
**Figure 2. High-glucose concentration decreases the expression of mitochondrial respiratory chain proteins:** (A, B) JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing normal-glucose (5 mM) or high-glucose (25 mM) concentrations. (A) Representative images of OXPHOS complexes protein subunits detection and  $\beta$ -actin, as assessed by western blot. (B) Graphical analysis showing the expression of different mitochondrial complex protein subunits relative to  $\beta$ -actin at 5 mM and 25 mM glucose (n = 3). \* p < 0.05 denotes a significant difference between the cell groups.



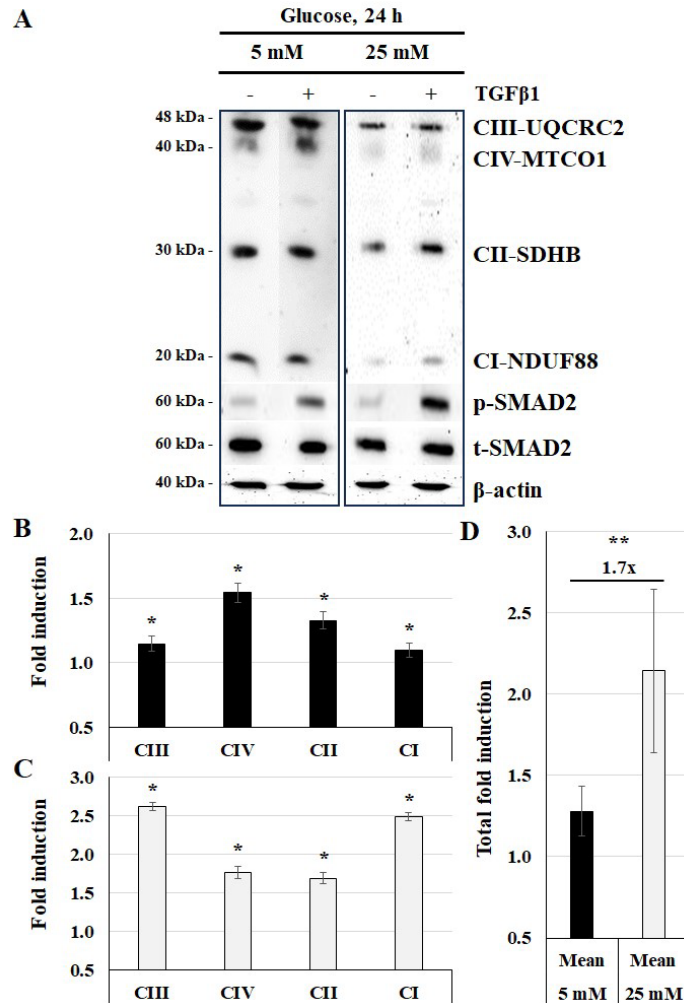
**Figure 3. High-glucose concentration differentially regulates the nuclear expression of PPAR $\gamma$  and HIF1 $\alpha$ :** (A,B) JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing normal-glucose (5 mM) or high-glucose (25 mM) concentrations. (A) Representative images of PPAR $\gamma$ , HIF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin, and Lamin B1 in the cytoplasmic and nuclear compartments of JEG-3 cells, as assessed by western blot. (B) Graphical analysis showing the relative expression of HIF1 $\alpha$  and PPAR $\gamma$  in the cytoplasm and the nucleus at 5 mM and 25 mM glucose (n = 3). \* p < 0.05 denotes a significant difference between the cell groups, and ns = nonsignificant difference.



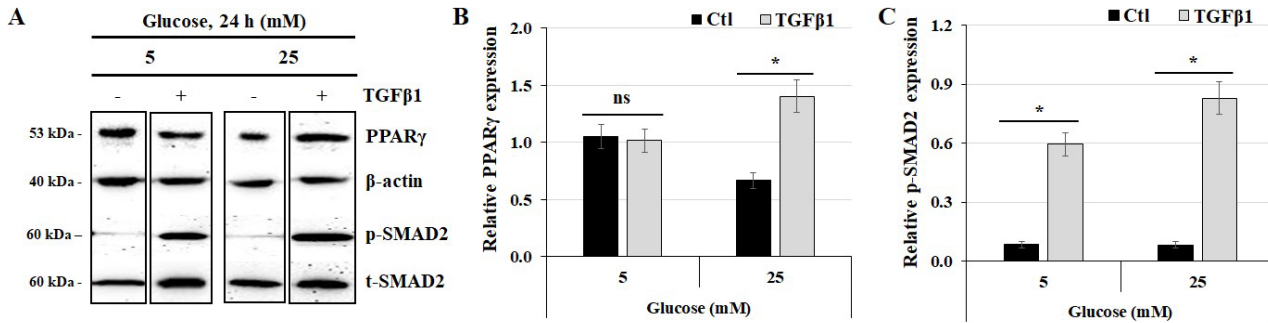
**Figure 4. Glucose concentration regulates TGFβ1-induced SMAD2 phosphorylation :** (A,B) JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing normal-glucose (5 mM) or high-glucose (10, 15, and 25 mM) concentrations, and then stimulated for 30 min with culture media alone (control) or with 50 ng/mL TGFβ1. (A) Representative images showing the expression of phosphorylated SMAD2 (p-SMAD2) and total SMAD2 (t-SMAD2), as evaluated by western blot. (B) Graphical analysis showing the expression levels of p-SMAD2 relative to t-SMAD2 for each glucose concentration (n = 3). \* p < 0.05 denotes a significant difference compared to control.



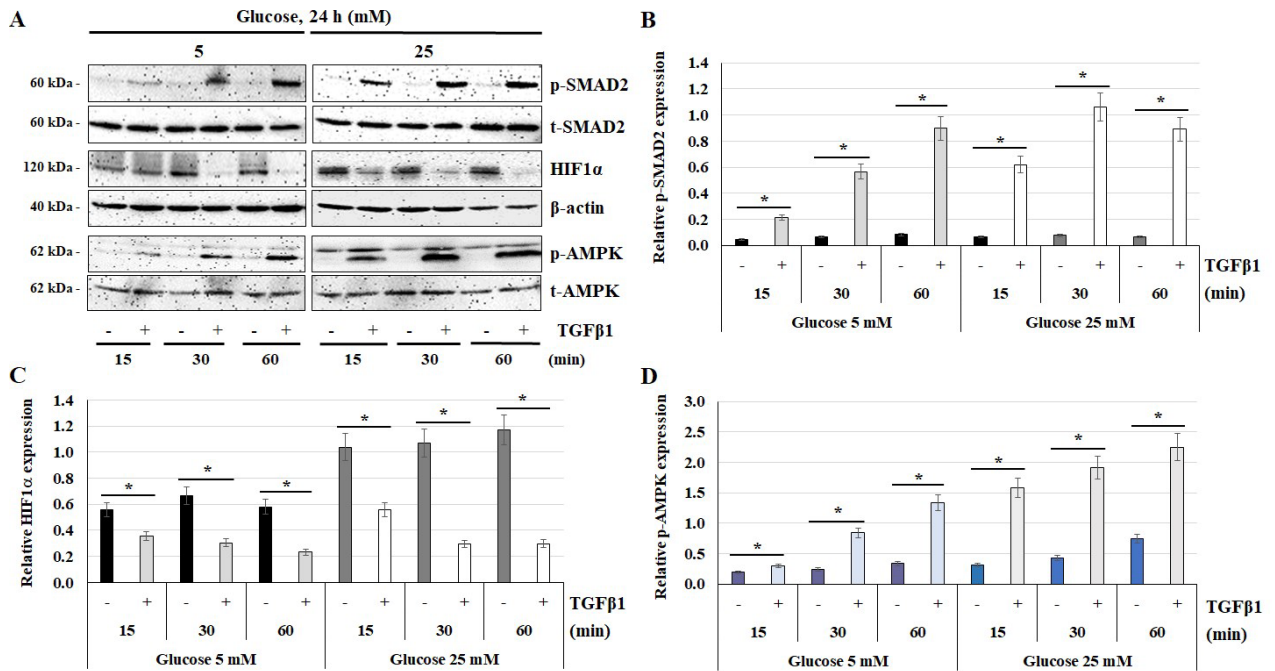
**Figure 5. TGFβ1 differentially regulates glucose transporters expression, lactate, and ATP production :** (A-E) JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing normal-glucose (5 mM) or high-glucose (25 mM) concentrations in the absence or presence of TGFβ1 at 50 ng/mL. (A) Representative images of GLUT1, GLUT3, and b-actin protein detection, as assessed by western blot. Graphical analysis showing the relative expression of GLUT1 (B) and GLUT3 (C) at 5 mM and 25 mM glucose. (D) Quantitation of lactate production was assessed using the Lactate-Glom assay kit. (E) Quantitation of ATP production was assessed using the ATP luminescence detection assay kit. Data are expressed as nM of ATP and lactate (n = 3). Each bar represents the mean ± SD from at least two independent experiments. \* p < 0.05 indicates a significant difference between the cell groups, and ns = nonsignificant difference.



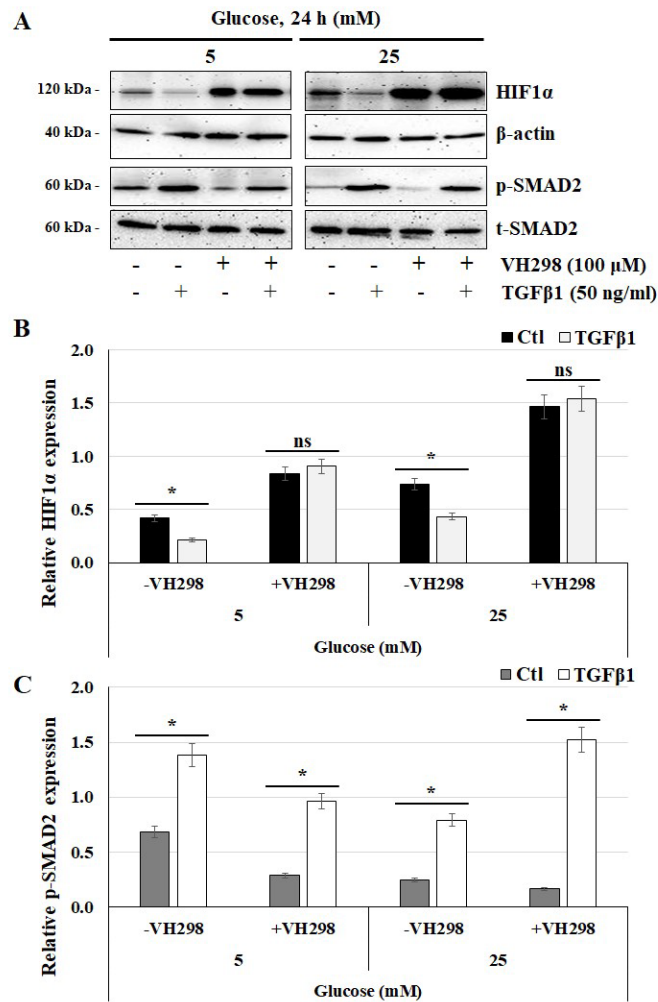
**Figure 6. TGFβ1 enhances the expression of the mitochondrial respiratory chain proteins at normal-glucose and high-glucose concentrations:** (A–D) JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing normal-glucose (5 mM) or high-glucose (25 mM) concentrations in the absence or presence of TGFβ1 at 50 ng/mL. (A) Representative images of OXPHOS complexes protein subunits detection, SMAD2 (p-SMAD2 and t-SMAD2), and β-actin, as assessed by western blot. Graphical analysis showing the expression of different mitochondrial complex protein subunits relative to β-actin at 5 mM (B) and 25 mM (C) glucose, and the summary of the total fold induction from all OXPHOS protein subunits in TGFβ1-stimulated cells relative to the control group (D). (B,C) \*  $p < 0.05$  indicates a significant difference compared to the control ( $n = 3$ ). (D) \*\*  $p < 0.05$  denotes a significant difference between 5 mM and 25 mM glucose concentrations, and ns = nonsignificant difference.



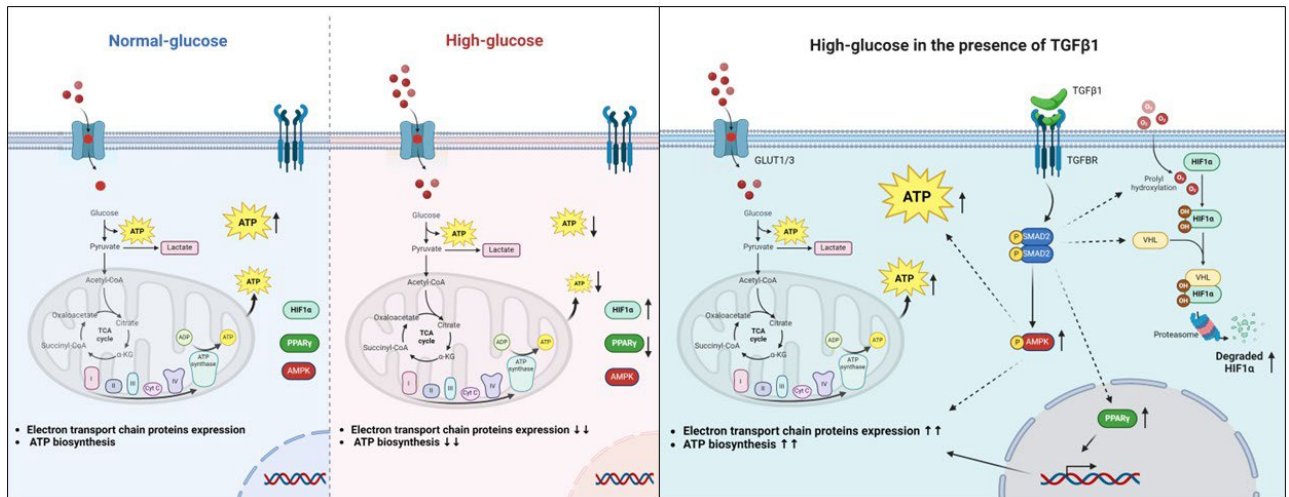
**Figure 7. TGF $\beta$ 1 increases the expression of PPAR $\gamma$  at high-glucose concentrations: (A–C) JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing normal-glucose (5 mM) or high-glucose (25 mM) concentrations in the absence or presence of TGF $\beta$ 1 at 50 ng/mL. (A) Representative images of PPAR $\gamma$ ,  $\beta$ -actin, and SMAD2 (p-SMAD2 and t-SMAD2), as assessed by western blot. Graphical analysis showing the relative expression of PPAR $\gamma$  (B) and p-SMAD2 (C) at 5 mM and 25 mM glucose (n = 3). \* p < 0.05 indicates a significant difference between control and TGF $\beta$ 1 treatments, and ns = nonsignificant difference.**



**Figure 8. TGFβ1 decreases HIF1α expression but enhances AMPK activation at normal-glucose and high-glucose concentrations:** (A–D) JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing normal-glucose (5 mM) or high-glucose (25 mM) concentrations, and then activated in the absence or presence of TGFβ1 at 50 ng/mL for 15, 30, or 60 min. (A) Representative images of SMAD2 (p-SMAD2 and t-SMAD2), HIF1α, b-actin, and AMPK (p-AMPK and t-AMPK), as assessed by western blot. Graphical analysis showing the relative expression of p-SMAD2 (B), HIF1α (C), and p-AMPK (D), at 5 mM and 25 mM glucose (n = 3). \* p < 0.05 indicates a significant difference between the cell groups.



**Figure 9. TGF $\beta$ 1-induced HIF1 $\alpha$  degradation is blocked in the presence of VH298, a specific inhibitor of ubiquitylation and proteasomal degradation of HIF1 $\alpha$ :** (A–C) JEG-3 cells were cultured for 24 h in media containing normal-glucose (5 mM) or high-glucose (25 mM) concentrations and then activated for 60 min with TGF $\beta$ 1 in the absence or presence of VH298. (A) Representative images of HIF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -actin, and SMAD2 (p-SMAD2 and t-SMAD2), as assessed by western blot. Graphical analysis showing the relative expression of HIF1 $\alpha$  (B) and p-SMAD2 (C) at 5 mM and 25 mM glucose (n = 3). \* p < 0.05 indicates a significant difference between the cell groups, and ns = nonsignificant difference.



**Figure 10. Graphical representation suggesting a protective effect of TGF $\beta$ 1/SMAD signaling pathways in trophoblast cells under high-glucose stress conditions by restoring ATP production via the induction of HIF1 $\alpha$  degradation, AMPK activation, and restoring PPAR $\gamma$ , GLUT1/3, and electron transport chain protein expression.  $\uparrow$  means increase and  $\downarrow$  means decrease.**

## **Chapitre III : Discussion :**

### **5 Effet de l'hyperglycémie sur la plasticité métabolique des trophoblastes humains**

La grossesse humaine représente un état physiologique particulièrement énergivore, nécessitant une coordination étroite entre les besoins métaboliques de la mère et ceux du fœtus en développement. Cette synchronisation est assurée par le placenta, organe central de la gestation. Véritable interface materno-fœtale, il permet l'échanges de gaz et de nutriments, régule la température, soutient la tolérance immunitaire, favorise l'angiogenèse et assure la production d'hormones et de facteurs de croissance indispensables au maintien de la grossesse et au développement harmonieux du fœtus [104]. Le glucose constitue la principale source d'énergie du placenta et du fœtus, ce dernier dépendant étroitement du transfert materno-placentaire en raison de sa faible capacité néoglucogénique. Ce transfert est assuré par l'activité métabolique du placenta et par les transporteurs GLUT1 et GLUT3. Le métabolisme glucidique placentaire mobilise des voies anaboliques (synthèse de glycogène et de lipides) et cataboliques (glycolyse et phosphorylation oxydative). Par ailleurs, le placenta convertit le pyruvate en lactate via la glycolyse aérobie, fournissant ainsi une source énergétique supplémentaire pour le fœtus. [105]. Le placenta joue un rôle central dans la régulation métabolique materno-fœtale grâce à son activité endocrine. En sécrétant des hormones telles que le hPL et la PGH, il modifie progressivement le métabolisme maternel en augmentant la lipolyse, la néoglucogénèse et la résistance à l'insuline, afin de privilégier l'apport en glucose au fœtus. Cette régulation hormonale s'accompagne d'une transition métabolique maternelle : un état anabolique durant les premiers trimestres permettant le stockage énergétique, suivi d'un état catabolique au troisième trimestre pour répondre aux besoins croissants du fœtus.[106] [107]. L'hyperglycémie gestationnelle, dont la prévalence mondiale ne cesse d'augmenter, touche 10 à 14 % des grossesses, avec des taux plus élevés dans certaines régions. Cette altération du métabolisme glucidique entraîne d'importantes complications materno-fœtales. Elle augmente notamment le risque de macrosomie, d'hypoglycémie néonatale, de détresse respiratoire et de prédisposition ultérieure à l'obésité ou au diabète de type 2 chez l'enfant. Pour la mère, elle accroît la probabilité de prééclampsie, de prématurité et de césarienne, et s'accompagne d'un risque durable de diabète de type 2, d'hypertension et de maladies cardiovasculaires. [89] [92].

L'objectif principal de notre étude est d'analyser les altérations métaboliques et fonctionnelles induites par l'hyperglycémie au sein des cellules trophoblastiques placentaires humaines, afin d'identifier et d'évaluer le potentiel protecteur d'un modulateur endogène susceptible de rétablir leur homéostasie énergétique, essentielle au maintien d'une fonction placentaire optimale. Dans cette perspective, notre étude s'articule autour de plusieurs axes complémentaires. Le premier consiste à caractériser l'impact de l'hyperglycémie sur le métabolisme glucidique des cellules trophoblastiques humaines JEG-3, une lignée immortalisée de trophoblastes extra-villeux dérivée d'un choriocarcinome. Pour cela, nous avons exposé ces cellules à des concentrations croissantes de glucose dans leur milieu de culture. Nos résultats révèlent une diminution progressive de la production d'ATP par les cellules JEG-3 en réponse à l'augmentation des concentrations de glucose, indiquant ainsi une perturbation notable de leur dynamique énergétique. Toutefois, la production de lactate par la glycolyse reste inchangée, suggérant que cette voie métabolique n'est pas affectée par le stress hyperglycémique. Ces observations sont en accord avec des études menées sur des cultures primaires des cytotrophoblastes (CTB) dans lesquelles l'exposition à une concentration de glucose élevée (25 mM) entraîne une réduction significative de la production d'ATP, de l'ordre de 39 % par rapport aux CTB issus de grossesses normales. Cette diminution s'accompagne d'une altération marquée du métabolisme énergétique, avec une suppression de la glycolyse estimée entre 55 et 60 %, une réduction de 44 % de la consommation d'oxygène, ainsi qu'une baisse notable de l'activité et de la capacité respiratoire mitochondriale [95]. À l'inverse, les syncytiotrophoblastes semblent moins affectés par ces conditions hyperglycémiques, ne présentant pas de variation significative de leur activité métabolique ou glycolytique selon le contexte glycémique [95]. D'autres travaux renforcent nos observations en montrant que l'hyperglycémie induit une reprogrammation globale du métabolisme trophoblastique. Dans les lignées BeWo ou HTR-8/SVneo, L'exposition prolongée à des concentrations élevées de glucose entraîne une accumulation intracellulaire de glycogène et de triglycérides, une hausse de métabolites tels que le lactate et le malonate, une activation précoce de la fission mitochondriale ainsi qu'un déséquilibre du métabolisme oxydatif. Ces altérations résultent notamment d'une activation de la glycogénogenèse et d'une stimulation de la lipogenèse, deux voies métaboliques favorisées en conditions d'hyperglycémie. Ces effets sont liés à une inhibition d'AMPK et à une baisse de la phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC),

un régulateur clé de l'équilibre énergétique. Il en résulte une réduction de la consommation d'oxygène, de la translocation de GLUT3 à la membrane plasmique, et de la production d'ATP, compromettant l'homéostasie cellulaire et la survie trophoblastique [108, 109]. En plus de ces altérations métaboliques, l'hyperglycémie induit également des perturbations majeures des fonctions trophoblastiques. Elle inhibe la prolifération, la différenciation et la migration des cellules, via la modulation des voies de signalisation PI3K/AKT, mTOR (Mécanistic target of rapamycin) et AMPK, régulées par des microARN comme miR-137 et miR-362-5p [12, 110]. Elle compromet aussi la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), en réduisant l'expression de MMP2, MMP9, VEGF et PlGF, nécessaires à l'invasion trophoblastique. Dans le contexte du diabète gestationnel (GDM), il a été démontré que l'exposition chronique à une forte concentration de glucose favorise la sénescence prématurée des cellules trophoblastiques placentaires, en particulier des CTEVs, dont la capacité d'invasion se trouve altérée. La sénescence cellulaire correspond à un état d'arrêt irréversible du cycle cellulaire en réponse à divers stress tels que les dommages à l'ADN, le stress oxydatif, les dysfonctionnements mitochondriaux ou l'activation d'oncogènes [111]. Ce processus se manifeste notamment par une augmentation de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ -gal), ainsi que par la surexpression des inhibiteurs du cycle cellulaire P16NK4a et P21CIP1, ce dernier étant codé par le gène CDKN1A (Inhibiteur 1A des kinases dépendantes des cyclines) [112]. Des études ont montré qu'en condition hyperglycémique, les cellules trophoblastiques présentent un profil transcriptomique et fonctionnel compatible avec un état sénescence, caractérisé par une forte expression de la protéine ARID1A (Protéine 1A contenant un domaine interagissant avec des régions riches en AT), un composant du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Switch/sucrose non-fermenting). ARID1A facilite l'accessibilité de la chromatine et recrute le facteur de transcription GATA2 (GATA binding protein 2), qui coopère à l'activation de CDKN1A. Ce mécanisme conduit à une surexpression de P21, un blocage du cycle cellulaire en phase G1/S, et l'installation d'un programme de sénescence cellulaire, contribuant ainsi à une altération des fonctions trophoblastiques sous hyperglycémie [113]. Ces altérations globales compromettent la fonction placentaire et exposent le fœtus à des risques accrus de perturbations du développement.

## **6 Dysfonction mitochondriale des cellules trophoblastiques JEG-3 en réponse au stress hyperglycémique**

Les besoins énergétiques du placenta dépendent principalement de l'activité des enzymes mitochondriales impliquées dans la phosphorylation oxydative en conditions aérobiques. Ces enzymes catalysent l'oxydation des métabolites issus du catabolisme du glucose, des acides gras et des acides aminés, générant des cofacteurs réduits (NADH+H<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>) qui alimentent la chaîne respiratoire pour produire l'ATP nécessaire aux fonctions cellulaires placentaires [114]. Les mitochondries jouent ainsi un rôle central dans l'adaptation métabolique du placenta, leur nombre, leur structure et leur activité évoluant dynamiquement pour répondre aux besoins énergétiques croissants du fœtus et aux variations de l'environnement utérin [115]. Au premier trimestre, dans un environnement physiologiquement hypoxique, les mitochondries sont peu nombreuses mais de grande taille, assurant une respiration stable. Une baisse transitoire de l'activité respiratoire survient au moment de l'établissement de la circulation maternelle, suivie d'une reprise marquée liée à l'augmentation de l'oxygénation. À terme, le contenu mitochondrial et l'activité respiratoire sont significativement accrus. Lors de l'accouchement, la respiration mitochondriale augmente également, traduisant une adaptation aux cycles d'ischémie-reperfusion survenant lors de l'accouchement [116].

Cette capacité d'adaptation des mitochondries est essentielle car elle soutient non seulement la production d'ATP, mais également la gestion du stress oxydatif ainsi que la régulation hormonale. Par ailleurs, des profils mitochondriaux distincts sont observés selon les sous-types trophoblastiques : les CTB présentent des mitochondries à forte activité respiratoire, les STB possèdent des mitochondries plus petites orientées vers la stéroïdogénèse, et les CTEV se distinguent par une respiration intensive, essentielle au remodelage vasculaire utérin [115]. Ainsi, les adaptations mitochondriales du placenta apparaissent comme un déterminant clé du maintien d'une grossesse saine et du développement fœtal optimal. Dans cette perspective, et compte tenu du rôle central des mitochondries dans l'homéostasie placentaire, nous avons étudié l'impact d'un environnement hyperglycémique sur la fonction mitochondriale des cellules trophoblastiques humaines. Nos résultats ont montré que l'exposition de la lignée trophoblastique JEG-3 à une concentration élevée de glucose (25 mM) induit une diminution de l'expression de plusieurs sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, en particulier CI-NDUF88 (Complexe I, NADH:ubiquinone oxydoréductase subunit NDUF88),

CII-SDHB (Complexe II, succinate déshydrogénase subunit B), CIII-UQCRC2 (Complexe III, ubiquinol-cytochrome c réductase core protein 2) et CIV-MTCO1 (Complexe IV, cytochrome c oxydase subunit 1) (Fig. 2) ( Chapitre II ). En revanche, cette exposition n'a pas modifié l'expression de certains marqueurs mitochondriaux structurels ou enzymatiques, tels que VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), TOMM20 (Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20) et la citrate synthase (CS) (Annexe 1). Ces trois marqueurs sont couramment utilisés pour évaluer la masse et l'intégrité mitochondriale : VDAC, situé dans la membrane externe, assure le transport des métabolites et des ions ; TOMM20, également localisé dans la membrane externe, est impliqué dans l'import des protéines nucléaires codées ; et la citrate synthase, enzyme de la matrice mitochondriale, joue un rôle central dans le cycle du citrate et reflète l'activité enzymatique globale. La stabilité de leur expression suggère que l'hyperglycémie n'altère pas significativement le nombre ou l'intégrité des mitochondries. Ces résultats indiquent que le glucose en excès affecte principalement la fonction bioénergétique mitochondriale, en réduisant l'expression des complexes respiratoires (Fig. 2) et en entraînant une baisse de la production d'ATP (Figure 1), sans impact apparent sur la masse mitochondriale (Annexe 1). Dans le prolongement de ces travaux, une revue parue en 2021 a évalué l'impact de l'hyperglycémie sur les trophoblastes et montré que les CTB et les STBs, isolés de placentas de patientes atteintes de diabète gestationnel, représentent près d'un quart du volume villositaire et jouent un rôle déterminant dans le métabolisme énergétique placentaire. Cette synthèse souligne la vulnérabilité particulière des STBs : leurs mitochondries, plus petites et à matrice dense, subissent sous excès de glucose l'activation de l'aldose réductase, une augmentation du ratio NADH/NAD<sup>+</sup>, une altération de la chaîne respiratoire et une surproduction des ERO, accompagnées d'un gonflement, d'une désorganisation des cristae et d'une fragmentation des organites, compromettant ainsi le transport des nutriments, la synthèse hormonale et la croissance villositaire [117]. Les travaux réalisés sur la lignée BeWo, un modèle in vitro de trophoblastes villositaires, complètent cette analyse en introduisant la dimension lipidique. L'exposition simultanée à des concentrations élevées en glucose (25 mM) et en lipides, par l'ajout de concentré lipidique chimiquement défini (CLCD) à 1 %, accroît l'expression des marqueurs mitochondriaux TOM20 et VDAC, témoignant d'une adaptation quantitative du réseau mitochondrial. Toutefois, cette condition réduit de moitié la respiration maximale et abolit presque totalement la capacité respiratoire de réserve, révélant un blocage profond de la

chaîne de transport d'électrons. Malgré une production d'ATP globalement préservée, la flexibilité glycolytique diminue et l'apoptose augmente, indiquant une compensation énergétique coûteuse et une vulnérabilité cellulaire accrue [118]. Nos résultats, mis en perspective avec les données issues d'autres modèles trophoblastiques, révèlent une diversité des réponses mitochondriales à l'hyperglycémie selon le sous-type cellulaire. Dans les cellules BeWo, l'augmentation de l'expression de certains marqueurs mitochondriaux s'accompagne d'une réduction marquée de la respiration maximale et de la réserve respiratoire, traduisant une adaptation quantitative mais fonctionnellement limitée [118]. Les syncytiotrophoblastes primaires montrent des altérations morphologiques, telles qu'un gonflement mitochondrial et une désorganisation des cristae, suggérant une atteinte structurelle associée à une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène [117]. Enfin, dans les cellules JEG-3, l'exposition au glucose élevé entraîne une diminution de l'expression des complexes I à IV, sans modification apparente des marqueurs de masse mitochondriale, ce qui suggère une inhibition fonctionnelle.

## **7 Perturbation du flux glucidique du trophoblaste par l'hyperglycémique**

La résistance à l'insuline caractéristique de la grossesse entraîne une augmentation de la glycémie maternelle dans le but de soutenir les besoins énergétiques fœtaux, le placenta dépendant largement du glucose maternel pour son métabolisme et son transfert vers le fœtus [42, 117]. Bien que plusieurs familles de transporteurs existent chez l'humain, le placenta n'exprime que les transporteurs facilités GLUT, tandis que les SGLT et les SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters) en sont absents ; sept isoformes de GLUT y sont présentes et régulées selon le type cellulaire et le stade gestationnel [119]. GLUT1 est le transporteur principal, augmentant au cours de la gestation et constituant à terme le facteur limitant majeur du transfert, tout en jouant un rôle dans l'implantation via les CTEV [42]. GLUT3, prédomine au premier trimestre dans les STB, la MMV et les CTEV, son expression sensible à l'hypoxie soutient l'approvisionnement énergétique précoce [120] [74]. GLUT4, régulé par l'insuline est présent en début de grossesse dans les STB [121]. GLUT8 est largement distribué mais encore mal caractérisé, tandis que GLUT9 participe surtout à l'élimination de l'urate. [119, 122].

Cette régulation fine rend les GLUT particulièrement vulnérables aux perturbations maternelles, notamment à l'hyperglycémie [109]. Dans cette perspective, nos travaux ont visé à analyser les effets de l'hyperglycémie sur l'expression des GLUTs dans les cellules trophoblastiques humaines. Pour cela, nous avons exposé les cellules trophoblastiques humaines JEG-3 à une concentration élevée de glucose (25 mM) pendant 24 heures, afin de reproduire un environnement hyperglycémique comparable à celui observé dans le diabète gestationnel. Nous avons observé une baisse marquée de l'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT3 (Chap. 2, Figures 5A, 5B et 5C). Cette diminution suggère que l'hyperglycémie pourrait réduire la capacité des cellules à capter le glucose, ce qui risquerait de déséquilibrer leur fonctionnement énergétique. Ces résultats appuient l'idée d'un mécanisme de régulation négative du transport de glucose en situation de stress métabolique. Nos observations s'inscrivent dans la littérature qui montre que l'hyperglycémie influence les transporteurs de glucose placentaires de façon subtile et souvent spécifique au compartiment cellulaire dans lequel ils sont localisés. En effet, des études effectuées sur des placenta à terme provenant de grossesses diabétiques, on note une hausse sélective de GLUT1 dans la membrane basale fœtale, tandis que le versant micro villositaire maternel reste stable. Cette surexpression basale s'accompagne d'une augmentation

du flux de glucose vers le fœtus, adaptation qui persiste même lorsque la glycémie maternelle est bien contrôlée en fin de grossesse [123]. Les effets varient toutefois selon le modèle expérimental. Dans les cellules BeWo, modèle représentatif du syncytiotrophoblaste, l'exposition à une concentration de glucose de 25 mM augmente nettement l'expression de GLUT1 et GLUT3, tandis que dans les lignées HTR-8/SVneo et JAR, modèles représentatifs de trophoblastes extra-villeux, celle-ci fait chuter l'expression de GLUT1, de GLUT3 et de GLUT4. Les explants villositaires, quant à eux, expriment davantage GLUT1 et GLUT4 sous l'effet de concentration de glucose élevée. Cette plasticité est en partie orchestrée par METTL3 (Méthyltransférase like 3), dont l'expression augmente en condition hyperglycémique ; en se liant à la 3'-UTR de GLUT1 et via l'activation de mTOR, METTL3 module la régulation coordonnée des transporteurs [124]. Une étude menée sur 53 placentas à terme (témoins, diabète gestationnel sous régime ou insuline, et diabète pré gestationnel) renforce cette idée. Le régime nutritionnel reposait sur une réduction des sucres rapides, un contrôle des glucides complexes répartis sur la journée, et un apport équilibré en protéines et lipides sains. Un régime nutritionnel seul ne modifie pas l'expression de GLUT1, de GLUT4 et de GLUT9, tandis que l'insulinothérapie induit une forte surexpression de GLUT4 et de GLUT9 [125]. Ce profil insulino dépendant s'accompagne d'une incidence élevée de macrosomie malgré un contrôle glycémique satisfaisant, suggérant que l'insuline, davantage que l'hyperglycémie résiduelle, peut amplifier le flux glucidique fœtal. Des études chez la souris suggèrent que la diète maternelle illustre aussi cette souplesse. En effet, un régime riche en graisses augmente uniquement GLUT1, tandis qu'un apport combiné graisses et sucres élève l'expression de GLUT1 et de GLUT3. Des modèles de souris GLUT3<sup>+/-</sup> présentant une délétion partielle du gène *slc2a3*, et exprimant une seule copie fonctionnelle du transporteur GLUT3. Compensent même un excès lipidique par une hausse simultanée des deux transporteurs [123]. Nos propres données sur les cellules JEG-3, un modèle de trophoblaste extra villeux complètent ce tableau en montrant qu'une exposition de 24 h à 25 mM de glucose abaisse à la fois GLUT1 et GLUT3. Un tel frein pourrait protéger ces cellules invasives de la surcharge métabolique et du stress oxydant, en phase avec des travaux montrant qu'un excès en ERO ou l'inhibition d'AMPK bloque la translocation de GLUT3 dans les trophoblastes extra villeux [126].

## **8 Hyperglycémie et dérèglement du métabolisme du glucose dans le trophoblaste : implications des voies HIF-1 $\alpha$ et PPAR $\gamma$**

La régulation du métabolisme glucidique dans le placenta repose sur un réseau étroit de voies de signalisation sensibles aux stimuli intra et extracellulaires, notamment à la disponibilité d'oxygène, d'ATP et de nutriments [127]. Dans notre modèle d'hyperglycémie, nous avons observé une chute marquée de la production d'ATP, associée à une diminution des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi qu'à une baisse parallèle des transporteurs GLUT1 et GLUT3, sans altération de la glycolyse. Ces données démontrent que l'excès de glucose perturbe la bioénergétique cellulaire à la fois au niveau mitochondrial et au niveau du transport membranaire, tout en préservant la voie glycolytique. Nous avons donc poursuivi nos travaux en explorant les mécanismes cellulaires sous-jacents en nous intéressant plus particulièrement aux capteurs métaboliques HIF-1 $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , dont l'action est cruciale pour préserver l'équilibre énergétique et le fonctionnement optimal du placenta [119, 128]. Afin d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques pour atténuer les complications associées au diabète gestationnel, nous avons cultivé les cellules JEG-3 dans des milieux contenant 5 mM ou 25 mM de glucose, simulant des conditions normo et hyperglycémiques pendant 24 h. Exposées à une forte concentration de glucose (25 mM), les cellules JEG-3 montrent une nette diminution de l'accumulation nucléaire de PPAR $\gamma$ , accompagnée d'une augmentation simultanée de celle de HIF1 $\alpha$ . Ces observations suggèrent qu'après 24 h d'exposition à 25 mM de glucose, les trophoblastes extravilleux JEG-3 entrent dans un état de pseudo-hypoxie, plutôt que de subir une simple surcharge énergétique. Une revue publiée en 2024, explorant la formation de niches hypoxiques et l'activation de HIF1 $\alpha$  durant le diabète, définit la pseudo-hypoxie comme la stabilisation de HIF1 $\alpha$  en présence d'oxygène normal [129]. Ce phénomène, fréquemment observé dans le contexte du diabète, est déclenché par une production excessive d'espèces réactives à l'oxygène, qui perturbe la chaîne respiratoire mitochondriale. En parallèle, l'hyperglycémie entraîne une augmentation du ratio NADH/NAD<sup>+</sup> en induisant l'activation de l'aldose réductase, ainsi qu'une augmentation de la consommation de NAD<sup>+</sup> via l'activation des enzymes poly (ADP-ribose) polyméras (PARP). Ce déséquilibre redox favorise l'accumulation de succinate, un inhibiteur des prolyl-hydroxylases (PHD) responsables de la dégradation de HIF1 $\alpha$ , permettant ainsi à HIF1 $\alpha$  de s'accumuler dans la cellule et d'activer une réponse hypoxique aberrante malgré une oxygénation normale [129].

L'accumulation de HIF1 $\alpha$  observée sous hyperglycémie s'accompagne d'un catabolisme du glucose inchangé, comme le montre l'absence de variation de la production de lactate entre les conditions normo- et hyperglycémiques. Cette stabilité reflète le fait que les cellules trophoblastiques présentent déjà un profil fortement glycolytique, caractéristique bien décrite dans la littérature [130]. En effet, elles dépendent majoritairement de la glycolyse pour produire de l'énergie, même en présence d'oxygène. Cette activité soutenue permet non seulement de couvrir les besoins énergétiques, mais aussi de fournir les précurseurs nécessaires à la synthèse des lipides, des protéines et des nucléotides. Ce métabolisme soutient la prolifération rapide et l'invasion des tissus maternels par les trophoblastes extra villoeux constituant une adaptation fonctionnelle du placenta aux exigences du développement fœtal [47].

Dans ce contexte, HIF1 $\alpha$  apparaît comme un régulateur clé du métabolisme mitochondrial trophoblastique. Dans un modèle primaire physiologiquement pertinent, basé sur des cellules trophoblastiques extra-villoeuses, isolées de placentas de premier trimestre (< 12 semaines), la stabilisation de HIF1 $\alpha$  induite par une hypoxie simulée au chlorure de cobalt déclenche une cascade métabolique délétère. Cette activation s'accompagne d'une surexpression de miR-210, un microARN régulé par HIF1 $\alpha$ , qui cible des gènes mitochondriaux essentiels tels que ndufa4 (NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A4) , sdhd (Succinate dehydrogenase complex subunit D) et iscu( Iron-sulfur cluster assembly enzyme), perturbant ainsi la chaîne respiratoire. Il en résulte une réduction significative de la respiration mitochondriale maximale et de l'activité des complexes enzymatiques, notamment du complexe II, entraînant une augmentation du stress oxydatif, une production accrue des ERO et une diminution de la capacité invasive des CTEVs. Cette dysfonction mitochondriale, induite en amont par HIF1 $\alpha$ , est fortement associée à des complications gestationnelles précoces telles que la prééclampsie ou le retard de croissance intra-utérin. L'utilisation de ce modèle primaire, plus représentatif que les lignées transformées, renforce la pertinence physiopathologique de ces observations et souligne l'impact central de HIF1 $\alpha$  dans la régulation du métabolisme placentaire en début de grossesse [131].

Nous avons observé une diminution de l'accumulation nucléaire de PPAR $\gamma$  parallèlement à une augmentation de celle de HIF1 $\alpha$ . Cette dynamique inverse, combinée à la baisse de la production d'ATP, à l'absence de variation de la glycolyse et à la réduction des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, suggère l'installation d'une boucle de

régulation métabolique. Dans ce contexte, l'élévation de HIF1 $\alpha$  pourrait inhiber les programmes mitochondriaux et contribuer à la suppression de PPAR $\gamma$ , renforçant ainsi le basculement vers un métabolisme glycolytique peu efficient dont la conséquence est une baisse de la production d'ATP. Cette interaction pourrait jouer un rôle central dans la reprogrammation métabolique induite par l'hyperglycémie dans les trophoblastes.

Plusieurs travaux se sont intéressés à la régulation de PPAR $\gamma$  par l'hyperglycémie dans les trophoblastes, dont certaines ont mis en évidence des dynamiques qui semblent dépendre du modèle cellulaire étudié [132]. Dans notre étude, nous avons observé une diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  en réponse à une exposition à une concentration élevée de glucose (25 mM). Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus sur la lignée HTR-8/SVneo, où l'exposition à un excès de glucose (25 mM), en particulier lorsqu'elle est combinée à des lipides (acide palmitique), entraîne une réduction marquée de PPAR $\gamma$ . Cette baisse s'accompagne d'une diminution de la viabilité cellulaire, d'une réduction des capacités de migration et d'invasion, ainsi que d'une activation de la réponse inflammatoire [133]. Cette diminution de PPAR $\gamma$  observée dans les cellules HTR-8/SVneo s'explique par plusieurs mécanismes directs induits par l'hyperglycémie, en grande partie similaires à ceux observés dans notre modèle. Elle résulte notamment d'une perturbation du métabolisme énergétique, marquée par une réduction de l'absorption du glucose et de la production d'ATP, d'un stress oxydatif associé à une dysfonction mitochondriale, ainsi que d'une activation de la réponse inflammatoire. À cela s'ajoutent des altérations des voies de signalisation de l'insuline (IRS1, IRS2) et GLUTs, qui accentuent le déséquilibre métabolique. Une boucle de rétroaction impliquant IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) pourrait également entretenir la suppression de PPAR $\gamma$ . Ensemble, ces mécanismes contribueraient aux dysfonctions trophoblastiques caractéristiques du diabète gestationnel [134]. Cependant, une étude utilisant la lignée SW71, un modèle de cytotrophoblastes humains extravilleux dérivés de tissus villos chorioniques du premier trimestre, rapporte au contraire une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  en condition hyperglycémique ( $\geq 150$  mg/dL, soit  $\geq 8.33$  mM). Cet effet est bloqué par l'inhibition de la voie p38 MAPK, suggérant que cette voie joue un rôle dans l'activation de PPAR $\gamma$  en réponse à l'hyperglycémie [135].

Ces divergences soulignent l'importance du choix du modèle expérimental. Certaines lignées, comme SW71 ou HTR-8/SVneo, semblent refléter plus fidèlement la réponse physiologique des trophoblastes extravilleux primaires, notamment en ce qui concerne la

migration, l'invasion et la régulation métabolique. À l'inverse, d'autres lignées telles que JEG-3, d'origine tumorale, peuvent réagir différemment au stress métabolique. Néanmoins, notre observation d'une baisse de l'expression de PPAR $\gamma$  s'inscrit dans un cadre cohérent avec un profil de dysfonctionnement mitochondrial et métabolique, tel que décrit dans les placentas issus de grossesses compliquées par un diabète gestationnel où des anomalies de l'expression de PPAR $\gamma$  sont associées à des altérations de gènes cibles clés du métabolisme placentaire, tels que ceux codant pour GLUT4, PI3K, PEPCK et l'adiponectine, perturbant ainsi la régulation du glucose et des lipides [71].

Nos résultats montrent que l'exposition des cellules JEG-3 à une concentration élevée de glucose (25 mM) perturbe leur métabolisme énergétique. Cette condition entraîne une baisse de la production d'ATP, une diminution des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi qu'une réduction de l'accumulation nucléaire de PPAR $\gamma$ , sans activation compensatoire de la glycolyse. Parallèlement, l'augmentation de HIF1 $\alpha$  suggère un basculement vers un métabolisme moins différencié et moins oxydatif. Cette régulation opposée de HIF1 $\alpha$  et PPAR $\gamma$  pourrait refléter une boucle de rétrocontrôle participant à cette reprogrammation. Ainsi, l'excès de glucose semble altérer l'homéostasie énergétique des trophoblastes, ce qui pourrait contribuer aux dysfonctionnements placentaires observés dans certaines grossesses. L'identification conjointe de HIF1 $\alpha$  et PPAR $\gamma$  comme cibles modulées ouvre des perspectives pour évaluer la réversibilité de ces altérations et restaurer l'équilibre métabolique.

## **9 TGF $\beta$ 1 : Une cytokine clé à l'interface fœto-maternelle**

Le TGF $\beta$ 1 est un régulateur pléiotrope qui orchestre, du début de la gestation jusqu'à la naissance, les grands axes du dialogue fœto-maternel. Au premier trimestre, il prépare l'endomètre en équilibrant prolifération et apoptose des cellules déciduales, tout en dirigeant la différenciation des cytotrophoblastes vers les trophoblastes extra-villeux et leur transition épithélio-mésenchymateuse, processus indispensables à l'invasion et à l'implantation précoces [136]. À ce stade, dans les cellules trophoblastiques, notamment les cellules JEG-3, il augmente l'expression des gélatinases MMP-2 et MMP-9, tout en limitant l'activité via l'induction de TIMP-1, établissant ainsi un mécanisme qui restreint l'invasion trophoblastique.[103]. Cette modulation s'accompagne d'une induction de la cyclooxygénase 2 (COX2), qui constitue un « signal d'arrêt » limitant l'invasion trophoblastique, l'atténuation de cette voie favorise une

invasion excessive, prédisposant à des placentations anormales de type placenta accreta, qui reste limité à la partie superficielle du myomètre, ou de type placenta percreta qui franchit la séreuse et s'étend en dehors de l'utérus, pouvant envahir les organes voisins [137].

Sur le plan immunitaire, le TGF $\beta$ 1 participe à l'instauration de la tolérance fœto-maternelle : il amplifie la population des cellules T régulatrices, oriente la maturation des NK déciduales vers le phénotype protecteur CD56bright CD16 $^{-}$  et polarise les macrophages en M2 anti-inflammatoires, créant ainsi un micro-environnement tolérogène qui protège le fœtus sans abolir la vigilance maternelle [83]. Au-delà du placenta, cette cytokine guide l'organogenèse embryonnaire, pilotant la mise en place des systèmes nerveux, respiratoire et cardiovasculaire, tout en modulant les adaptations métaboliques de la mère pour garantir l'apport nutritif de l'embryon [138].

Au-delà de ses fonctions dans l'invasion et la tolérance immunitaire, il est essentiel d'aborder l'implication du TGF $\beta$ 1 dans la modulation du métabolisme placentaire, une dimension souvent sous-estimée mais tout aussi déterminante pour la viabilité placentaire. Des études ont notamment documenté son rôle dans la régulation du métabolisme des sphingolipides, où il exerce un double effet : diminution de l'expression de la sphingosine kinase 1 (SPHK1) et augmentation de celle de l'ASAH1 (N-acylsphingosine amidohydrolase 1) une enzyme responsable de l'hydrolyse de la céramide en sphingosine [139]. Cette conversion favorise l'accumulation de sphingosine, un phénomène caractéristique des placentas dysfonctionnels. Cette altération compromet la structure membranaire et le transport des nutriments, affectant la fonction placentaire et le développement fœtal, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle pour les grossesses à risque [85].

La régulation du métabolisme glucidique constitue également un axe d'intérêt majeur. Le TGF $\beta$ 1 ajuste finement les voies de la glycolyse et de la phosphorylation du glucose selon le type cellulaire et le contexte micro-environnemental. Ainsi, dans les cellules stellaires hépatiques, il stimule la glycolyse aérobie via l'induction de GLUT1, favorisant migration, fibrogénèse et prolifération [140]. Chez les macrophages, le TGF $\beta$ 1 augmente l'expression de PFKL (Phosphofruktokinase de type hépatique) une enzyme clé qui catalyse la conversion du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-bisphosphate dans la glycolyse et la captation du glucose via l'axe mTOR-cMyc, tout en réprimant la production de cytokines pro-inflammatoires par activation de SMAD3, permettant un découplage entre métabolisme énergétique et réponse

immunitaire [141]. À l'inverse, dans les lymphocytes T régulateurs, il inhibe fortement la glycolyse via PP2A (Protéine Phosphatase 2A), une enzyme clé de la déphosphorylation des résidus sérine/thréonine, impliquée dans la régulation fine du cycle cellulaire, de la croissance, de la différenciation et des voies de signalisation intracellulaires. L'activation de PP2A conduit à une diminution de l'expression des transporteurs et enzymes glycolytiques tels que GLUT1 et HK2, ainsi que de nombreux gènes associés à la glycolyse, tout en favorisant la stabilité du phénotype immunosuppresseur des T régulateurs via les facteurs de transcription STAT5 et Foxp3 [142].

En parallèle, le TGF $\beta$ 1 module aussi la phosphorylation oxydative (OXPHOS) de manière hautement spécifique selon le type cellulaire. Chez les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoire effectrice, il inhibe l'activité de l'ATP synthase et la respiration mitochondriale, tandis que chez les cellules NK, TGF $\beta$ 1 supprime globalement le métabolisme énergétique, inhibant la production d'IFN $\gamma$ . Cependant, dans les cellules MCF7 du cancer du sein, il augmente l'expression de COX1 et des facteurs de transcription mitochondriaux durant la transition épithélio-mésenchymateuse. Chez les fibroblastes, TGF $\beta$ 1 interfère avec le complexe pyruvate déshydrogénase et abaisse l'acétyl-CoA libre, limitant l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs. Dans les cellules épithéliales Mv1Lu, TGF $\beta$ 1 inhibe le complexe IV mitochondrial, induit une accumulation des ERO et déclenche la sénescence. Cette régulation différentielle de l'OXPHOS souligne la capacité du TGF $\beta$ 1 à adapter le métabolisme énergétique selon les besoins spécifiques du type cellulaire, en contexte physiologique comme pathologique [85].

Les interactions entre hyperglycémie et signalisation TGF $\beta$ 1 révèlent également une forte spécificité tissulaire. Dans les cellules mésangiales rénales, le glucose en concentration élevée initie une boucle autocrine accompagnée par la surexpression de GLUT1, exacerbant la néphropathie diabétique. Dans les fibroblastes et certains épithéliums, il induit une activation de la voie Akt-mTOR et l'hypertrophie cellulaire. Par ailleurs, les cellules tubulaires rénales HK-2 augmentent la production de TGF $\beta$ 1 en présence de corps cétoniques. Dans la lignée mammaire NMuMG, la réponse est biphasique avec une restauration tardive de GLUT1 [85].

Cette mosaïque de réponses métaboliques témoigne d'une remarquable plasticité du TGF $\beta$ 1 vis-à-vis du métabolisme glucidique. Or, compte tenu de la forte dépendance du placenta au glucose pour assurer ses fonctions essentielles au bon déroulement de la grossesse, la contribution précise du TGF $\beta$ 1 à la régulation du métabolisme glucidique reste encore largement

méconnue. Il apparaît donc nécessaire d'examiner de manière approfondie comment cette cytokine influence le métabolisme du glucose dans les cellules trophoblastiques, afin de mieux cerner son rôle dans les processus de placentation et dans le soutien d'une gestation normale.

## **10 Interrelation entre l'hyperglycémie et le TGFβ1**

En raison du caractère pléiotrope de la cytokine TGFβ1, qui exerce de multiples effets sur le fonctionnement et la différenciation des trophoblastes ainsi que sur la régulation immunitaire à l'interface fœto-maternelle, et compte tenu de son implication dans la régulation du métabolisme glucidique, tant glycolytique qu'oxydatif, décrite dans plusieurs modèles cellulaires, nous avons décidé d'étudier son effet sur les altérations métaboliques induites par une forte concentration de glucose dans les cellules JEG-3. Cette étude a pour objectif d'évaluer dans quelle mesure TGFβ1 est capable de moduler ou corriger les altérations métaboliques observées dans les cellules JEG-3 exposées à une forte concentration de glucose, en particulier la diminution de la production d'ATP, la réduction de l'expression des protéines de la chaîne mitochondriale, ainsi que le déséquilibre entre PPARγ et HIF1α.

Dans un premier temps, nous avons examiné l'effet de l'augmentation progressive des concentrations de glucose sur l'intensité du signal induit par le TGFβ1, plus précisément sur la phosphorylation de SMAD2. Pour ce faire, les cellules JEG-3 ont été incubées pendant 24 heures avec des concentrations croissantes de glucose (5 à 25 mM), puis stimulées pendant 30 minutes soit avec le milieu seul (contrôle), soit avec du TGFβ1 à 50 ng/mL. Les résultats montrent que la stimulation par TGFβ1 induit une phosphorylation de SMAD2, dont l'intensité augmente en condition de glucose élevé. Ces données suggèrent que la signalisation du TGFβ1 peut être modulée par la concentration en glucose dans les cellules trophoblastiques JEG-3.

Nos observations expérimentales s'inscrivent dans la continuité de plusieurs études cliniques ayant rapporté des modifications du taux de TGFβ1 chez les patientes atteintes de diabète gestationnel. En effet, une élévation significative de TGFβ1 a été observée dans le sérum de femmes enceintes atteintes du diabète gestationnel, ainsi qu'au niveau de l'expression de son ARNm dans les placentas. Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle un environnement glucidique élevé pourrait moduler la signalisation TGFβ1 dans les tissus placentaires. Bien que son élévation soit fréquemment observée dans le diabète gestationnel, ses effets restent ambigus et méritent d'être mieux caractérisés, car il pourrait exercer à la fois des actions délétères et protectrices selon le contexte [78]. L'augmentation du signal SMAD2 observée en condition de

glucose élevé pourrait traduire un mécanisme adaptatif destiné à atténuer les effets délétères liés à la surcharge métabolique. Un phénomène comparable a été décrit dans la rétinopathie diabétique, où une élévation modérée de la signalisation TGF- $\beta$  dans les vaisseaux rétiniens, via l'activation sélective de la voie ALK5/SMAD2/3, exerce un rôle protecteur. Son inhibition entraîne une aggravation des altérations vasculaires et transcriptionnelles, rendant les tissus dépendants de cette activation pour maintenir leur intégrité. Par analogie, dans notre modèle trophoblastique, le renforcement du signal TGF $\beta$ 1 en présence de glucose élevé pourrait refléter une réponse compensatoire visant à préserver l'homéostasie cellulaire [143].

## **11 Effet restaurateur du TGF $\beta$ 1 sur la fonction énergétique mitochondriale**

Afin de mieux comprendre l'effet du TGF $\beta$ 1 sur la régulation du métabolisme énergétique dans les cellules trophoblastiques JEG-3, nous avons examiné l'expression des sous-unités des complexes mitochondriaux CI à CIV en conditions de glucose normal (5 mM) et élevé (25 mM), avec ou sans TGF $\beta$ 1. Cette analyse fait suite à nos observations montrant qu'une concentration élevée en glucose réduit significativement la production d'ATP, sans effet parallèle sur la glycolyse, comme en témoigne une production de lactate inchangée. Ce constat suggère une altération spécifique de la respiration mitochondriale. Conformément à cette hypothèse, nous avons observé une diminution marquée de l'expression des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, notamment : NDUF88 (NADH:ubiquinone oxydoréductase subunit, complexe I), SDHB (Succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B, complexe II), UQCRC2 (Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2, complexe III) et MTCO1 (Mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I, complexe IV) en condition hyperglycémique, tandis que les marqueurs de la masse mitochondriale (VDAC, TOMM20 et citrate synthase) restent stables, excluant un effet sur le nombre de mitochondries. Notamment, le traitement par TGF $\beta$ 1 restaure significativement l'expression de ces sous-unités, en particulier pour CI et CIII, et cette restauration est plus prononcée en condition de glucose élevé. En parallèle, TGF $\beta$ 1 accroît la production d'ATP sans modifier la viabilité cellulaire, ce qui suggère une amélioration ciblée de la fonction mitochondriale plutôt qu'un effet indirect via la prolifération. Ainsi, ces résultats indiquent que TGF $\beta$ 1 agit principalement en restaurant la

qualité fonctionnelle des complexes respiratoires mitochondriaux, contribuant au maintien de l'homéostasie énergétique en condition de stress hyperglycémique.

Nos résultats s'inscrivent dans une mosaïque de travaux réalisés dans de nombreux modèles cellulaires, qui mettent en évidence une fonction conservée du TGF $\beta$ 1 dans l'adaptation métabolique, en particulier en contexte de stress ou de reprogrammation. Par exemple dans une étude réalisée sur les podocytes de souris, TGF $\beta$ 1 stimule de manière dose et temps dépendante la phosphorylation oxydative mitochondriale, avec une augmentation du taux de consommation d'oxygène de la production d'ATP et des ERO, via une activation partielle de la voie mTOR, suggérant une activation fonctionnelle de la chaîne respiratoire dans des cellules exposées à un stress métabolique comme l'hyperglycémie [144]. De façon similaire, une étude portant sur la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) avec les cellules MCF-7 , a montré que l'exposition prolongée au TGF $\beta$ 1 induit une reprogrammation métabolique profonde, avec une surexpression de protéines des complexes I et IV (NDUFB8, COXI), une augmentation de l'ADN mitochondrial, une production accrue d'ATP et des ERO, ainsi qu'une régulation coordonnée entre glycolyse et phosphorylation oxydative, reflet d'une adaptation métabolique orientée vers une efficacité énergétique renforcée. Par ailleurs, dans le contexte du développement embryonnaire, il a été démontré que le signal TGF $\beta$ 1 est indispensable à la biogenèse mitochondriale et à la transition métabolique de la glycolyse vers la phosphorylation oxydative lors de la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines en endoderme définitif. L'inhibition de cette voie bloque l'expansion du réseau mitochondrial, réduit l'abondance en ADN mitochondrial, la production d'ATP et des ERO, et perturbe l'expression des gènes OXPHOS, illustrant le rôle direct du TGF $\beta$ 1 dans l'orchestration de la maturation bioénergétique [145].

Ces observations concordantes issues de différents modèles cellulaires renforcent l'idée que le TGF $\beta$ 1 intervient comme un régulateur central de la plasticité métabolique, en activant spécifiquement la respiration mitochondriale dans des contextes biologiques où la cellule est soumise à un remaniement métabolique ou structurel. Nos données s'intègrent à ce paradigme en illustrant, dans un modèle trophoblastique exposé à l'hyperglycémie, une réponse adaptative directement liée aux altérations métaboliques observées en contexte gestationnel pathologique.

## 12 TGFβ1 restaure le transport du glucose dans les cellules JEG-3

Compte tenu de la diminution marquée de l'expression des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3 observée en condition d'hyperglycémie, nous avons cherché à déterminer si le TGFβ1 pouvait restaurer leur expression. Pour cela, les cellules JEG-3 ont été incubées en présence de TGFβ1, sous concentrations normales (5 mM) et élevées (25 mM) de glucose. Nos résultats montrent que le traitement par TGFβ1 en condition hyperglycémique permet de rétablir significativement l'expression de GLUT1 et de GLUT3, atteignant des niveaux comparables à ceux observés en condition normales en glucose. Cette restauration suggère que le TGFβ1 pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'approvisionnement intracellulaire en glucose en contexte de surcharge glucidique, participant ainsi à la préservation de l'équilibre énergétique des trophoblastes. Nos observations rejoignent celles d'autres travaux qui attribuent au TGFβ1 un rôle majeur dans la modulation du métabolisme glucidique, notamment à travers la régulation transcriptionnelle et fonctionnelle des transporteurs de glucose GLUT, dans des contextes physiopathologiques variés. En effet, des travaux dans les cellules de glioblastome, le TGFβ1 augmente l'expression de GLUT1 via l'activation conjointe des voies SMAD2/3, p38 MAPK et PI3K/Akt, conduisant à une absorption accrue du glucose, une intensification du flux glycolytique, ainsi qu'une production de lactate élevée caractéristique de l'effet Warburg [146]. Ce type de régulation a également été observé dans le cancer colorectal, où la voie TGFβ/JNK/ATF2 induit l'expression de GLUT3, renforçant les propriétés invasives des cellules cancéreuses en favorisant la TEM (Transition épithelio-mésenchymateuse) [147]. De manière intéressante, une étude menée sur des cellules mammaires a mis en évidence une régulation biphasique de GLUT1 par le TGFβ1 : en premier lieu, GLUT1 est réprimé, entraînant une inhibition de la prolifération et de l'absorption du glucose ; par la suite, son expression est restaurée, accompagnée d'une reprise des fonctions métaboliques et d'un phénotype TEM plus stable, après exposition prolongée, corrélée à un phénotype TEM stabilisé et prolifératif [148].

Nos observations dans les trophoblastes suggèrent un mécanisme similaire d'adaptation, où le TGFβ1 corrige l'effet délétère de l'hyperglycémie sur l'expression de GLUT1 et GLUT3. Cette régulation prend tout son sens dans le contexte du diabète gestationnel, une pathologie caractérisée par une altération du transport du glucose à travers le placenta. En particulier, GLUT3, un transporteur à haute affinité exprimé de manière spécifique dans les trophoblastes,

voit ses niveaux totaux au sein du placenta souvent inchangés durant le diabète gestationnel, mais sa localisation est significativement modifiée, notamment au niveau membranaire où son expression diminue, tandis que les niveaux cytoplasmiques restent constants. Ce déséquilibre compromet la captation efficace du glucose par le placenta et peut nuire au développement fœtal [126].

À la lumière de ces résultats, notre étude met en évidence le potentiel du TGF $\beta$ 1 à atténuer les effets métaboliques délétères de l'hyperglycémie dans les cellules trophoblastiques. La restauration de l'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT3 constitue un mécanisme adaptatif clé au maintien de l'homéostasie énergétique placentaire en contexte pathologique. Leur augmentation suggère par ailleurs une amélioration du captage du glucose, ces transporteurs en représentant l'étape limitante. Replacées dans le cadre plus global de l'hyperglycémie associé au diabète gestationnel, ces données suggèrent que le ciblage de la signalisation TGF $\beta$ 1 et de ses interactions avec des senseurs métaboliques tels que l'AMPK pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques prometteuses visant à préserver la fonction placentaire et à améliorer les issues périnatales dans les grossesses exposées à un déséquilibre glucidique.

### **13 Régulation du métabolisme glucidique par le TGF $\beta$ 1 dans les trophoblastes en condition hyperglycémique : implication de HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ et AMPK**

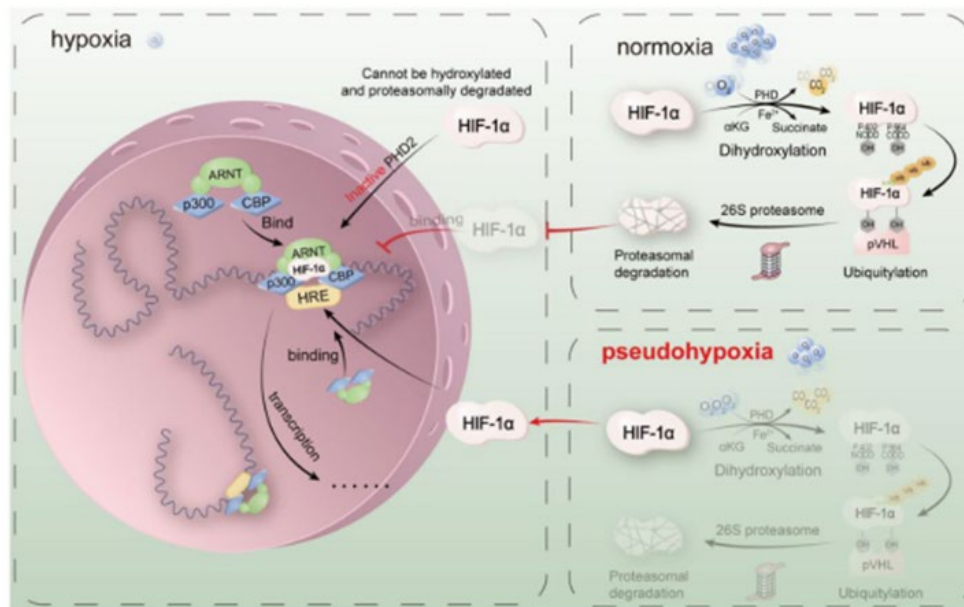
Nos résultats montrent que le TGF $\beta$ 1 est capable de restaurer la production totale d'ATP dans les cellules trophoblastiques JEG-3, aussi bien en condition de glucose normal qu'élevé. En parallèle, nous avons observé une réexpression des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, ainsi que des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3. Cette régulation s'effectue toutefois sans modification apparente du flux glycolytique, ce qui suggère que l'effet du TGF $\beta$ 1 cible prioritairement la fonction mitochondriale plutôt que la glycolyse. L'ensemble de ces données indique que le TGF $\beta$ 1 contribue à rééquilibrer le métabolisme glucidique des cellules trophoblastiques en condition de stress métabolique.

Dans cette perspective, il serait pertinent d'approfondir l'analyse des voies de signalisation activées par le TGF $\beta$ 1, et en particulier ses interactions avec les principaux senseurs métaboliques que sont AMPK, HIF1 $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . Une meilleure compréhension de ces

mécanismes permettrait de mieux cerner le rôle du TGF $\beta$ 1 dans la régulation énergétique du trophoblaste, notamment en contexte d'hyperglycémie. De telles investigations offrirait des perspectives précieuses pour mieux appréhender les altérations métaboliques associées au diabète gestationnel, et pourraient positionner le TGF $\beta$ 1 comme une cible potentielle dans le développement de stratégies visant à préserver la fonction placentaire et les issues fœtales dans les grossesses à risque.

Dans le but d'explorer les mécanismes par lesquels le TGF $\beta$ 1 module le métabolisme cellulaire, nous avons prétraité les cellules trophoblastiques JEG-3 pendant 24 heures avec deux concentrations de glucose reproduisant des conditions de normoglycémie (5 mM) et d'hyperglycémie (25 mM). Les cellules ont ensuite été incubées avec du TGF $\beta$ 1 pendant des durées allant de 5 à 120 minutes. Nos résultats révèlent que le traitement par TGF $\beta$ 1 induit une dégradation rapide du facteur de transcription HIF1 $\alpha$ , observable dès 15 minutes après stimulation. Cette diminution est concomitante d'une activation d'AMPK, mise en évidence par une augmentation de sa forme phosphorylée (p-AMPK), suggérant une coordination entre les voies métaboliques impliquées dans la réponse au stress énergétique.

Afin de mieux comprendre la dégradation de HIF1 $\alpha$  induite par le TGF $\beta$ 1, nous avons utilisé le composé VH298, un inhibiteur spécifique de l'ubiquitine ligase VHL (von Hippel-Lindau), enzyme indispensable à la reconnaissance et à la dégradation de HIF1 $\alpha$  par le protéasome [149]. En effet, dans des conditions normales d'oxygénation, HIF1 $\alpha$  est hydroxylé sur des résidus proline par les enzymes prolyl hydroxylases (PHD1, PHD2, PHD3), ce qui permet sa reconnaissance par VHL, menant à son ubiquitination puis à sa dégradation via le protéasome 26S ( Fig 13 ) [150]. L'inhibition de VHL par VH298 empêche cette interaction, ce qui entraîne une accumulation marquée de HIF1 $\alpha$  dans les cellules JEG-3, même en présence de TGF $\beta$ 1. Ces observations suggèrent que le TGF $\beta$ 1 favorise la dégradation de HIF1 $\alpha$  par la voie VHL-dépendante, probablement en modulant directement ou indirectement l'activité des enzymes PHD ou de VHL elle-même.



**Figure 13 : Mécanismes de régulation post-traductionnelle de HIF-1 $\alpha$  en fonction du statut en oxygène : normoxie, hypoxie et pseudo-hypoxie (Reproduite à partir de [151] .**

Sous condition de normoxie, HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé par PHD2, ce qui favorise son ubiquitination par le complexe pVHL et sa dégradation via le protéasome 26S. Ce processus empêche HIF-1 $\alpha$  d’initier la transcription des gènes cibles. En hypoxie, l’hydroxylation par PHD2 est inhibé en raison du manque d’oxygène, ce qui stabilise HIF-1 $\alpha$ . Ce dernier peut alors s’associer avec HIF-1 $\beta$  (ARNT) et les coactivateurs (p300, CBP) pour activer la transcription des gènes de réponse à l’hypoxie. En condition de pseudo hypoxie (stabilité aberrante de HIF-1 $\alpha$  malgré la présence d’oxygène), HIF-1 $\alpha$  échappe à la dégradation, reste actif, et continue à induire l’expression des gènes hypoxie-dépendants [151].

Par ailleurs, nos résultats indiquent que le TGF $\beta$ 1 exerce également un effet conditionnel sur l’expression de PPAR $\gamma$ . Lorsque les cellules JEG-3 sont incubées en condition de glucose élevé, la présence de TGF $\beta$ 1 permet de restaurer l’expression de PPAR $\gamma$ , alors qu’aucune modulation n’est observée en condition de glucose normal. Cette restauration pourrait s’inscrire dans un mécanisme compensatoire visant à renforcer la fonction mitochondriale et la production d’ATP via l’activation coordonnée des voies AMPK et PPAR $\gamma$ .

Dans l'ensemble, ces données suggèrent que le TGF $\beta$ 1 régule le métabolisme trophoblastique en agissant sur un axe métabolique impliquant HIF1 $\alpha$ , AMPK et PPAR $\gamma$ . Ce mécanisme pourrait participer à la réorganisation bioénergétique des cellules trophoblastiques en réponse à un stress glucidique tel que celui observé dans le diabète gestationnel. Bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour identifier précisément les enzymes et cofacteurs impliqués dans la dégradation de HIF1 $\alpha$ , notamment le rôle respectif des isoformes PHD1-3, ainsi que les régulateurs de l'activité du complexe VHL, nos résultats font écho aux données précédentes de la littérature décrivant l'implication du TGF $\beta$ 1 dans la modulation du métabolisme cellulaire via ces voies intégrées. En effet, l'accumulation de fumarate et de succinate, observée lors d'une perte de fonction de la succinate-déshydrogénase ou de la fumarate-hydratase, inhibe de manière compétitive les prolyl-hydroxylases PHD1 à 3. Cette inhibition empêche l'hydroxylation de HIF1 $\alpha$ , bloque sa reconnaissance par le complexe de von Hippel-Lindau et conduit à sa stabilisation malgré une oxygénation adéquate, établissant un état de pseudohypoxie associé à l'activation de programmes pro-angiogéniques et glycolytiques [50]. Par ailleurs, le TGF $\beta$ 1 agit directement sur le métabolisme du fumarate en induisant la phosphorylation du fumarase sur la thréonine 90 par la voie p38-MAPK. Cette modification post-traductionnelle n'altère pas son activité catalytique dans le cycle du citrate, mais déclenche sa translocation vers le noyau, où le fumarase génère localement du fumarate. Ce fumarate inhibe des dioxygénases dépendantes de l' $\alpha$ -cétoglutarate, notamment les histone déméthylases, entraînant une reconfiguration de la chromatine qui favorise l'expression de p21 et contribue ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire. En parallèle, le TGF $\beta$ 1 module la phosphorylation oxydative mitochondriale, ajustant le flux du cycle TCA et, par conséquent, les concentrations de fumarate et de succinate. Ce double contrôle réduit le pool de métabolites susceptibles de stabiliser HIF1 $\alpha$  tout en conférant à la fumarase une fonction transcriptionnelle, soulignant l'intégration étroite des signaux métaboliques et prolifératifs dans le placenta exposé à l'hyperglycémie [85].

Même si nos observations suggèrent que la dégradation de HIF1 $\alpha$  pourrait emprunter la voie du protéasome VHL-dépendante, il paraît indispensable d'envisager des circuits complémentaires. À cet égard, la ligase E3 SMURF2 ( SMAD ubiquitination regulatory factor 2) dont l'expression est fortement amplifiée par le TGF $\beta$ 1 dans le cadre d'un rétrocontrôle du récepteur T $\beta$ RI, retient toute notre attention, puisque des travaux conduits dans les lignées colorectales HCT116 et SW480, ainsi que dans la lignée de carcinome rénal RCC4 ont montré

qu'elle peut cibler directement HIF1 $\alpha$  pour ubiquitination et l'acheminer vers le protéasome indépendamment de son état d'hydroxylation [152, 153]. Dans notre modèle JEG-3, la mise en place d'approches combinant invalidation ou surexpression de SMURF2 à l'utilisation de mutants non hydroxylables de HIF1 $\alpha$  permettra de quantifier l'importance relative de cette voie parallèle.

Il serait particulièrement intéressant, dans la continuité de nos travaux, d'examiner l'interaction du TGF $\beta$ 1 non seulement avec HIF1 $\alpha$ , au centre de notre modèle de pseudohypoxie induite par l'hyperglycémie, mais également avec son isoforme HIF2 $\alpha$ , car chacune d'elles semble régulée par des mécanismes post-traductionnels distincts que la cytokine peut orchestrer simultanément. En effet, alors que le TGF $\beta$ 1 est déjà connu pour induire la ligase E3 SMURF2 et accélérer ainsi l'ubiquitination directe de HIF1 $\alpha$  indépendamment de l'hydroxylation PHD/VHL [152, 153], il a également été montré, en conditions d'hypoxie, qu'il stimule la déubiquitinase USP9X (Ubiquitin specific peptidase 9 X-linked), laquelle retire les chaînes de poly-ubiquitine de HIF2 $\alpha$  et prolonge sa demi-vie [154]. Dans le contexte particulier de la pseudohypoxie hyperglycémique, où HIF1 $\alpha$  s'accumule déjà à cause de l'inhibition des PHD par le fumarate et le succinate, cette double régulation conférerait au TGF $\beta$ 1 un rôle ambivalent : d'un côté, SMURF2 pourrait limiter la dérive glycolytique en favorisant la dégradation de HIF1 $\alpha$ . De l'autre, USP9X maintiendrait un niveau élevé de HIF2 $\alpha$ , susceptible de soutenir une angiogenèse durable et la survie de cellules trophoblastiques en situation de stress mixte oxydatif et hypoxique.

En définitive, la balance entre l'accumulation métabolique de fumarate/succinate, l'activité de SMURF2 sur HIF1 $\alpha$  et la stabilisation de HIF2 $\alpha$  par USP9X pourrait représenter un nœud décisionnel majeur dans l'adaptation ou la dérive pathologique du placenta exposé à l'hyperglycémie. Éclaircir la dynamique précise de ces trois axes offrira un cadre plus complet pour cibler sélectivement les voies délétères sans compromettre les réponses compensatoires indispensables au bon déroulement de la grossesse. Comprendre finement l'articulation de ces mécanismes permettrait ainsi de développer des interventions capables de neutraliser les effets nocifs de l'hyperglycémie tout en préservant les adaptations essentielles au maintien d'une grossesse saine.

Dans ce paysage métabolique sous haute contrainte énergétique, nos données désignent la kinase AMPK comme un levier réparateur. En effet, dès que la surcharge glycolytique abaisse

la charge énergétique, l'AMPK s'active, élève le rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  accroît la disponibilité d' $\alpha$ -cétoglutarate (cosubstrat indispensable des PHD) et relance la ré-hydroxylation de HIF1 $\alpha$ , accélérant ainsi son élimination [155, 156]. L'AMPK est un régulateur clé de la mitophagie. La mitophagie correspond à un ensemble de mécanismes de contrôle qualité qui assurent l'élimination des mitochondries endommagées par des voies Parkin-dépendantes, telles que PINK1/Parkin, ou par des voies Parkin-indépendantes impliquant notamment FUNDC1, BNIP3, NIX ou OPTN. Elle fonctionne en étroite coordination avec la biogenèse mitochondriale, orchestrée par des régulateurs tels que PGC-1 $\alpha$ , NRF1/2 et TFAM, permettant à la cellule d'ajuster simultanément la qualité et la quantité de son réseau mitochondrial en fonction de ses besoins énergétiques [157]. L'activation d'AMPK par TGF $\beta$ 1 pourrait stimuler une mitophagie qualitative via l'activation coordonnée des voies Parkin et FUNDC1. Parkin, en tant que ligase E3 ubiquitine, marque les mitochondries dépolarisées pour leur élimination, tandis que FUNDC1, situé à la membrane externe mitochondriale, agit comme récepteur de mitophagie en recrutant directement LC3 pour initier la formation de l'autophagosome [158]. Ce type de mécanisme a également été observé dans des trophoblastes humains exposés à l'hyperglycémie, où l'AMPK régule la mitophagie et la production mitochondriale d'ATP [159].

Dans notre étude, PPAR $\gamma$  semble être activé en réponse au traitement par TGF $\beta$ 1, suggérant que cette voie transcriptionnelle pourrait contribuer à restaurer l'homéostasie énergétique dans un contexte de stress métabolique. Un mécanisme similaire a été décrit dans les cellules de cancer de la prostate, où l'activation de PPAR $\gamma$  induit l'expression d'AKT3 et empêche l'export nucléaire de PGC-1 $\alpha$  en inhibant le transport dépendant de l'exportine CRM1. Le maintien de PGC-1 $\alpha$  dans le noyau favorise alors la biogenèse mitochondriale et l'augmentation de la phosphorylation oxydative, soutenant ainsi la production d'ATP et l'équilibre énergétique cellulaire [160]. Parallèlement, l'AMPK phosphoryle et stabilise PGC-1 $\alpha$  [161], consolide un ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  favorable et alimente en continu la production d' $\alpha$ -cétoglutarate, créant une boucle de rétro-activation qui renforce l'activité des prolyl-hydroxylases et précipite la clairance de HIF1 $\alpha$ . L'expression accrue d'enzymes de  $\beta$ -oxydation et de transporteurs mitochondriaux fournit alors une source énergétique alternative lorsque la glycolyse atteint ses limites.

Sur la base de ces éléments, nous proposons un modèle dans lequel TGF $\beta$ 1 module HIF1 $\alpha$  via l'axe AMPK-PPAR $\gamma$  pour rétablir l'équilibre énergétique du trophoblaste soumis à

l'hyperglycémie. La validation complète de ce schéma nécessitera des études plus approfondies afin de clarifier l'ensemble des acteurs impliqués dans le mécanisme décrit.

Notre étude met en évidence, la capacité du TGF $\beta$ 1 à restaurer l'homéostasie énergétique des cellules trophoblastiques (Jeg-3) exposées à un stress hyperglycémique, notamment via la dégradation de HIF1 $\alpha$ , l'activation d'AMPK et l'augmentation coordonnée de l'expression de PPAR $\gamma$  et des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'intégration simultanée de ces différents niveaux de régulation apporte un éclairage mécanistique nouveau sur la manière dont les trophoblastes s'adaptent aux perturbations métaboliques induites par un excès de glucose.

Les résultats obtenus confirment également les objectifs de recherche formulés au début du projet de recherche, d'une part, ils permettent de proposer que le TGF $\beta$ 1 exerce un rôle régulateur majeur sur le métabolisme énergétique trophoblastique en condition hyperglycémique, et d'autre part de préciser les voies impliquées dans cet effet. De plus, l'analyse combinée des transporteurs GLUT1/3, des voies SMAD2, AMPK et PPAR $\gamma$ , ainsi que des complexes OXPHOS, répond de manière cohérente à l'hypothèse initiale selon laquelle le TGF $\beta$ 1 pourrait compenser les altérations métaboliques induites par un excès de glucose. L'ensemble des données contribue à clarifier de manière substantielle le rôle de TGF $\beta$ 1 dans la régulation du métabolisme trophoblastique.

#### **14. Limitations de l'étude :**

Cette étude apporte une contribution essentielle à la compréhension du rôle de TGF- $\beta$ 1 dans la régulation du métabolisme énergétique des cellules trophoblastiques en condition d'hyperglycémie. Néanmoins, cette dernière présente plusieurs limitations notables qui doivent être prises en compte dans l'élaboration des conclusions. Les résultats obtenus permettent en effet de tracer un modèle dans lequel TGF $\beta$ 1 agirait comme un facteur protecteur métabolique en stimulant l'expression de PPAR $\gamma$ , l'activation de l'AMPK et la dégradation de HIF1 $\alpha$ , rétablissant ainsi l'homéostasie énergétique dans les trophoblastes exposés à un excès de glucose. Ce modèle a le mérite de proposer une intégration cohérente entre signalisation SMAD, régulation transcriptionnelle et dynamique mitochondriale. Toutefois, au-delà de cette avancée, plusieurs éléments méthodologiques et biologiques en restreignent la portée interprétative et

justifient la nécessité d'investigations complémentaires, notamment pour affiner l'applicabilité *in vivo* de ces observations.

Tout d'abord, le manque de diversité du modèle expérimental constitue une première limite importante. En effet, l'approche repose exclusivement sur la lignée JEG-3, une lignée tumorale issue du choriocarcinome couramment utilisé pour étudier certaines fonctions trophoblastiques. Bien que cette lignée exprime plusieurs marqueurs clés des trophoblastes primaires tels que KRT7, GATA3 ou TFAP2C [100, 101], ce modèle présente également certaines caractéristiques atypiques, notamment une prolifération accrue et une flexibilité métabolique qui, bien qu'utiles pour étudier les adaptations énergétiques, peuvent différer des profils observés *in vivo* dans les trophoblastes primaires. Ces spécificités doivent donc être prises en compte dans l'interprétation des résultats. Il serait ainsi judicieux d'envisager une validation croisée dans d'autres modèles trophoblastiques plus physiologiquement pertinents, comme les lignées HTR-8/SVneo (modèle non tumoral de trophoblaste extravilleux) ou BeWo (modèle de cytotrophoblastes fusionnants), ainsi que dans des explants placentaires issus du premier trimestre. Une telle démarche permettrait non seulement de renforcer la robustesse des données, mais aussi de vérifier la reproductibilité des effets observés sur l'axe AMPK–PPAR $\gamma$ –HIF1 $\alpha$  dans des contextes cellulaires distincts.

Ensuite, les contraintes de la culture *in vitro* méritent également d'être prises en compte, car elles peuvent altérer significativement la physiologie mitochondriale, même en présence de témoins appropriés. Dans cette étude, l'utilisation de groupes contrôles (concentration normale de glucose et sans ajout de TGF $\beta$ 1) permet certes de comparer les effets spécifiques de l'hyperglycémie et du traitement, et constitue une base solide pour les analyses différentielles. Toutefois, plusieurs travaux ont montré que la simple exposition prolongée à des conditions de culture, au-delà de 12 à 24 heures, peut induire des perturbations métaboliques notables dans les cellules placentaires, y compris dans les groupes non traités. Ces altérations incluent une réduction du potentiel membranaire mitochondrial, une diminution de la biogenèse, une augmentation de l'apoptose et une altération progressive de la respiration mitochondriale [116]. Ces effets sont particulièrement marqués dans les tissus à terme, mais peuvent également survenir dans les modèles du premier trimestre après un certain délai. Ainsi, bien que les comparaisons internes restent valides, l'interprétation des effets absolus sur la fonction

mitochondriale doit être envisagée avec prudence. Une validation complémentaire sur tissu frais ou dans des systèmes de culture plus courts ou plus proche de l'architecture tissulaire naturelle permettrait de mieux dissocier les effets spécifiques du stress métabolique de ceux induits par le contexte *in vitro*.

Un autre aspect à considérer concerne l'attention exclusive sur l'isoforme TGF $\beta$ 1, qui constitue une limite à part entière. Bien que cette isoforme joue un rôle central dans la signalisation placentaire, elle n'est pas la seule impliquée dans la régulation des fonctions trophoblastiques. En particulier, TGF $\beta$ 3 présente un profil d'expression distinct, voire opposé, à celui de TGF $\beta$ 1 au cours du premier trimestre de grossesse. Son expression décroît fortement entre 10 et 12 semaines d'aménorrhée, une période critique pour l'invasion trophoblastique et l'angiogenèse, processus au cours desquels la régulation de HIF1 $\alpha$  est également fortement modulée [136]. Ce découplage entre isoformes souligne l'importance d'envisager les TGF $\beta$  comme un réseau intégré aux effets parfois antagonistes. L'absence d'analyse de TGF $\beta$ 3 dans ce contexte limite donc la compréhension globale des interactions régulatrices qui s'exercent sur l'axe HIF1 $\alpha$ -glucose. Par ailleurs, des éléments de variabilité interindividuelle, tels que certains polymorphismes du gène TGF $\beta$ 1 (par exemple le variant 869T>C), sont connus pour moduler la production de la cytokine et pourraient influencer les réponses cellulaires à l'hyperglycémie [162]. Intégrer ces facteurs dans de futures approches expérimentales permettrait de mieux appréhender la diversité des réponses placentaires observées *in vivo*.

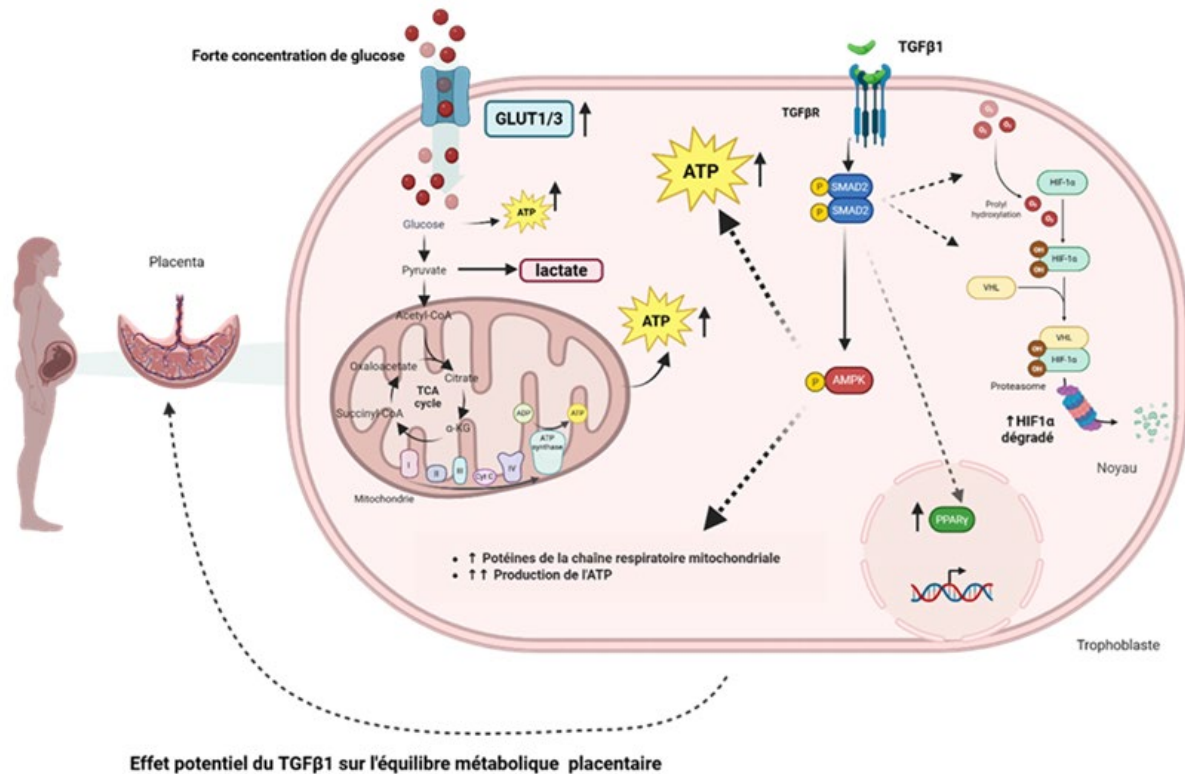
Dans le prolongement de ces considérations, la caractérisation du métabolisme énergétique demeure partielle, centrée sur un ensemble restreint de marqueurs tels que les transporteurs GLUT1 et GLUT3, les niveaux d'ATP, la production de lactate, ainsi que l'expression des complexes de la chaîne respiratoire OXPHOS et de trois régulateurs clés que sont PPAR $\gamma$ , AMPK et HIF1 $\alpha$ . Ces indicateurs sont cohérents avec les mécanismes explorés mais ils ne permettent toutefois pas de couvrir l'ensemble des voies métaboliques susceptibles d'être affectées, notamment les dérivés anaboliques de la glycolyse comme la voie des pentoses phosphates ou la synthèse des acides gras, la  $\beta$ -oxydation des lipides, ou encore les systèmes redox impliquant les cofacteurs NADH et NAD $^+$ . Une approche intégrative, fondée sur une analyse métabolomique ou transcriptomique à large échelle, permettrait d'obtenir une vision plus complète de la reprogrammation métabolique potentiellement induite par le TGF $\beta$ 1.

Il convient également de noter que les conditions expérimentales standardisées utilisées dans cette étude, bien qu'adaptées à l'exploration mécanistique, ne reflètent pas fidèlement la complexité de l'environnement fœto-maternel *in vivo*. En effet, plusieurs signaux physiologiques majeurs susceptibles d'interagir avec le glucose pour moduler la fonction trophoblastique ne sont pas représentés. Parmi ceux-ci, l'hypoxie physiologique du premier trimestre, les cytokines immun régulatrices telles que l'IL10 et l'IFN $\gamma$ , les hormones stéroïdiennes ou encore les contraintes mécaniques exercées par l'utérus sont autant de stimuli absents du modèle cellulaire utilisé. Or, ces éléments forment un réseau intégré de signaux qui façonnent l'activité trophoblastique et la réponse métabolique de manière concertée. Dans ce contexte, TGF $\beta$ 1 n'agit pas isolément mais dans un système d'interactions complexes et dynamiques, difficilement capturable dans des conditions de culture simplifiées. Ainsi, bien que les résultats obtenus apportent des éléments intéressants, leur transposabilité aux conditions physiopathologiques réelles reste partielle. Il serait pertinent, dans de futurs travaux, de recourir à des modèles plus physiologiquement représentatifs, tels que des explants placentaires cultivés en environnement contrôlé ou des cocultures multicellulaires mimant le microenvironnement utérin. De telles approches permettraient de mieux cerner la contribution du TGF $\beta$ 1 au sein d'un contexte cellulaire et tissulaire complexe, plus proche de la réalité *in vivo*.

## **15. Conclusion générale :**

Notre étude apporte de nouveaux éléments déterminants dans la compréhension des altérations métaboliques des cellules du placenta en contexte d'hyperglycémie gestationnelle. En démontrant que l'exposition des cellules trophoblastiques JEG-3 à un excès de glucose perturbe profondément la respiration mitochondriale sans toutefois affecter la fonction glycolytique, nos résultats soulignent un déséquilibre énergétique spécifique, caractérisé par une chute de la production d'ATP, une surexpression de HIF1 $\alpha$  et une inhibition de PPAR $\gamma$  ainsi que des transporteurs GLUT1 et GLUT3 (Fig 14). Ces altérations moléculaires suggèrent que l'hyperglycémie peut entraîner la dysfonction du placenta non seulement comme transporteur des nutriments, mais également comme organe métabolique. Ces altérations sont susceptibles

d'induire des effets délétères sur la croissance fœtale et le bon déroulement de la grossesse.



**Figure 14 : Rôle régulateur du TGFβ1 dans la restauration de l'homéostasie métabolique trophoblastique en condition d'hyperglycémie gestationnelle (Créé avec BioRender.com).**

Schéma illustrant les effets de l'hyperglycémie sur le métabolisme des cellules trophoblastiques et l'impact potentiel du TGFβ1 sur la restauration de leur homéostasie. Une forte concentration en glucose perturbe le fonctionnement mitochondrial, en diminuant la synthèse d'ATP et en altérant l'expression de protéines clés telles que PPARγ, AMPK et HIF1α. L'activation du récepteur TGFβR induit la phosphorylation de SMAD2 et d'AMPK, entraînant la dégradation de HIF1α, la réactivation de PPARγ et l'augmentation de l'expression des complexes mitochondriaux. Ces événements concourent à une amélioration de la production d'ATP et suggèrent un rôle du TGFβ1 dans l'adaptation métabolique du placenta soumis à un stress glucidique.

Dans ce contexte, la mise en évidence du rôle correcteur de TGF $\beta$ 1 pourrait constituer une avancée significative. En effet, par son action articulée sur plusieurs niveaux notamment en entraînant la dégradation de HIF1 $\alpha$ , l'induction de p-AMPK et la restauration de l'expression PPAR $\gamma$  et des complexes respiratoires mitochondriaux. TGF $\beta$ 1 apparaît comme un acteur central dans la réhabilitation de la fonction énergétique des trophoblastes soumis à un stress glucidique. Au-delà des mécanismes cellulaires explorés, cette étude offre une nouvelle perspective sur les complications liées au diabète gestationnel. En suggérant qu'un déséquilibre entre HIF1 $\alpha$ , AMPK et PPAR $\gamma$  pourrait jouer un rôle central dans les troubles métaboliques observés au niveau du placenta dans ce contexte. Cela impliquerait que l'hyperglycémie chronique ne perturberait pas seulement les voies hormonales ou vasculaires, mais affecterait directement la capacité du placenta à produire l'énergie nécessaire à son bon fonctionnement. Dans cet optique, TGF $\beta$ 1 pourrait agir comme un facteur protecteur, qui permettrait au placenta à s'adapter au stress métabolique avant même l'apparition des signes cliniques.

Toutefois, l'interprétation de ces résultats doit rester prudente. Le recours à une lignée trophoblastique dérivée d'un choriocarcinome (JEG-3) limite la transposabilité directe des observations à l'organisme humain. De plus, l'absence de validation dans un modèle *ex vivo* ou *in vivo* restreint notre capacité à évaluer les répercussions fonctionnelles à l'échelle tissulaire ou systémique. Ces limites ne remettent pas en question la validité des résultats, mais soulignent la nécessité de les consolider par des études complémentaires.

## 16 Perspectives

Bien que cette étude présente certaines limites, notamment liées à l'utilisation d'un modèle cellulaire *in vitro*, elle fournit des résultats intéressants qui ouvrent de nouvelles pistes de réflexion. Nos observations suggèrent que TGF $\beta$ 1 pourrait jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme placentaire en situation d'hyperglycémie. Ces résultats méritent d'être approfondis par des études complémentaires, afin de confirmer les mécanismes impliqués et de mieux comprendre le rôle de TGF $\beta$ 1 dans un contexte pathologique. À terme, ces travaux pourraient contribuer à améliorer notre compréhension du diabète gestationnel et favoriser une

prise en charge plus ciblée et plus efficace de cette complication de la grossesse. Parmi les pistes à explorer :

➤ **Approfondir les mécanismes moléculaires de la régulation métabolique par TGFβ1 :**

Il serait intéressant d'approfondir l'étude des interactions entre TGFβ1, HIF1α, AMPK et PPARγ, afin de mieux saisir leur coordination dans la réponse métabolique placentaire. Pour cela, des approches complémentaires, telles que l'analyse transcriptomique (RNA-seq) et le profilage métabolique (Seahorse, fluxomics), pourraient aider à déterminer plus précisément l'enchaînement des événements et les relations fonctionnelles entre ces régulateurs. Une attention particulière devrait être portée au rôle du système PHD/VHL dans la régulation de HIF1α, qui pourrait être exploré par des stratégies ciblées de modulation de son activité.

➤ **Comparer l'effet des différentes isoformes de TGFβ :**

L'étude des rôles respectifs de TGFβ2 et TGFβ3 dans la régulation du métabolisme placentaire apparaît comme une étape clé pour affiner notre compréhension des isoformes de TGFβ. Alors que TGFβ1 semble favoriser le maintien de l'équilibre énergétique, TGFβ3 a été associée à une limitation de la croissance trophoblastique [163]. Des travaux comparatifs, réalisés sur les mêmes modèles cellulaires et dans des conditions glycémiques équivalentes, permettront de mieux cerner les fonctions spécifiques de chaque isoforme, en lien avec les altérations observées dans le diabète gestationnel et la prééclampsie.

➤ **Élargir l'étude à des modèles expérimentaux physiologiquement pertinents :**

Pour confirmer la pertinence des résultats obtenus, il serait intéressant d'utiliser des modèles plus proches du placenta humain. Parmi eux, les explants de villosités choriales, les cocultures associant trophoblastes et cellules immunitaires, ou encore les trophoblastes dérivés de cellules souches pluripotentes offrent des alternatives intéressantes. Ces modèles permettront de mieux prendre en compte les interactions hormonales, immunitaires et mécaniques absentes des cultures classiques en monocouche, et d'évaluer plus fidèlement l'effet du TGFβ1 dans un environnement multicellulaire similaire à celui du placenta in vivo.

➤ **Étudier les retombées cliniques en vue d'applications thérapeutiques :**

Sur le long terme, ces résultats pourraient constituer une base pour développer des stratégies thérapeutiques ciblant les voies TGF $\beta$ 1, AMPK, PPAR $\gamma$  et HIF1 $\alpha$ , dans le but de préserver ou restaurer le métabolisme placentaire chez les femmes atteintes de diabète gestationnel. Une approche pharmacologique indirecte, reposant par exemple sur l'utilisation d'agonistes de PPAR $\gamma$ , d'activateurs d'AMPK ou d'inhibiteurs de HIF1 $\alpha$ , pourrait être testée *ex vivo* sur des tissus placentaires humains, afin d'évaluer leur efficacité à réactiver la respiration mitochondriale sans induire d'effets secondaires indésirables, notamment fibrogéniques ou inflammatoires.

Dans l'ensemble, cette étude propose une nouvelle vision du rôle du TGF $\beta$ 1, qui au-delà de ses fonctions connues dans l'immuno-modulation et la régulation cellulaire, se positionne comme un régulateur important du métabolisme énergétique des trophoblastes en situation de stress glucidique. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives intéressantes et justifient la poursuite des recherches à l'aide de modèles plus représentatifs et d'outils plus avancés. À terme, ces travaux pourraient contribuer au développement de stratégies ciblées, visant à prévenir ou corriger les altérations placentaires liées au diabète gestationnel et à en éliminant les conséquences néfastes pour la mère et l'enfant.

## Références

1. Armistead B, Johnson E, VanderKamp R, Kula-Eversole E, Kadam L, Drewlo S, et al. Placental Regulation of Energy Homeostasis During Human Pregnancy. *Endocrinology*. 2020;161(7).
2. Jukic AM, Baird DD, Weinberg CR, McConaughy DR, Wilcox AJ. Length of human pregnancy and contributors to its natural variation. *Hum Reprod*. 2013;28(10):2848-55.
3. Mancilla R, Pava-Mejia D, van Polanen N, de Wit V, Bergman M, Grevendonk L, et al. Invasive and noninvasive markers of human skeletal muscle mitochondrial function. *Physiol Rep*. 2023;11(12):e15734.
4. Kojima ML, Hoppe C, Giraldez AJ. The maternal-to-zygotic transition: reprogramming of the cytoplasm and nucleus. *Nature Reviews Genetics*. 2025;26(4):245-67.
5. Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013;34(5):939-80.
6. Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reprod Med Biol*. 2018;17(3):220-7.
7. Chuva de Sousa Lopes SM, Alexdottir MS, Valdimarsdottir G. The TGF $\beta$  Family in Human Placental Development at the Fetal-Maternal Interface. *Biomolecules*. 2020;10(3):453.
8. Weinberg DH. Real-time Assessment of the Development and Function of the Placenta Across Gestation to Support Therapeutics in Pregnancy. *Clinical Therapeutics*. 2021;43(2):279-86.
9. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;114(6):744-54.
10. Knöfler 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(18):3479-96.
11. Pollheimer J, Vondra S, Baltayeva J, Beristain AG, Knöfler M. Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment. *Frontiers in Immunology*. 2018;Volume 9 - 2018.

12. Zhu Y, Liu X, Xu Y, Lin Y. Hyperglycemia disturbs trophoblast functions and subsequently leads to failure of uterine spiral artery remodeling. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14.
13. Li X, Li Z-H, Wang Y-X, Liu T-H. A comprehensive review of human trophoblast fusion models: recent developments and challenges. *Cell Death Discovery*. 2023;9(1):372.
14. Angueira AR, Ludvik AE, Reddy TE, Wicksteed B, Lowe WL, Jr., Layden BT. New insights into gestational glucose metabolism: lessons learned from 21st century approaches. *Diabetes*. 2015;64(2):327-34.
15. Soma-Pillay P, Nelson-Piercy C, Tolppanen H, Mebazaa A. Physiological changes in pregnancy : review articles. *Cardiovascular Journal of Africa*. 2016;27(2):89-94.
16. Pascual ZN LM. Physiology, Pregnancy. 2023. In: StatPearls [Internet] [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448145/>.
17. Hadden DR, McLaughlin C. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2009;14(2):66-71.
18. Liu H, Wang S, Wang J, Guo X, Song Y, Fu K, et al. Energy metabolism in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2025;10(1):69.
19. Kierans SJ, Taylor CT. Glycolysis: A multifaceted metabolic pathway and signaling hub. *Journal of Biological Chemistry*. 2024;300(11):107906.
20. Delgadillo-Velázquez JA, Nambo-Venegas R, Patiño N, Meraz-Cruz N, Razo-Azamar M, Guevara-Cruz M, et al. Metabolic flexibility during normal pregnancy allows appropriate adaptation during gestation independently of BMI. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2021;44:254-62.
21. Parrettini S, Caroli A, Torlone E. Nutrition and Metabolic Adaptations in Physiological and Complicated Pregnancy: Focus on Obesity and Gestational Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:611929.
22. Napso T, Yong HEJ, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Front Physiol*. 2018;9:1091.
23. Kramer AC, Jansson T, Bale TL, Powell TL. Maternal-fetal cross-talk via the placenta: influence on offspring development and metabolism. *Development*. 2023;150(20).

24. Dashty M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clinical Biochemistry*. 2013;46(15):1339-52.
25. Yeo E, Brubaker PL, Sloboda DM. The intestine and the microbiota in maternal glucose homeostasis during pregnancy. *Journal of Endocrinology*. 2022;253(1):R1-R19.
26. Mangliar I, Plante AS, Chabot M, Savard C, Lemieux S, Michaud A, et al. GLP-1 response during pregnancy: variations between trimesters and associations with appetite sensations and usual energy intake. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2024;49(4):428-36.
27. Dias S, Pheiffer C, Adam S. The Maternal Microbiome and Gestational Diabetes Mellitus: Cause and Effect. *Microorganisms*. 2023;11(9).
28. Gonçalves AS, Andrade N, Martel F. Intestinal fructose absorption: Modulation and relation to human diseases. *PharmaNutrition*. 2020;14:100235.
29. Teerapornpuntakit J, Klanchui A, Karoonuthaisiri N, Wongdee K, Charoenphandhu N. Expression of transcripts related to intestinal ion and nutrient absorption in pregnant and lactating rats as determined by custom-designed cDNA microarray. *Mol Cell Biochem*. 2014;391(1-2):103-16.
30. LAIN KY, CATALANO PM. Metabolic Changes in Pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2007;50(4):938-48.
31. Newbern D, Freemark M. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011;18(6):409-16.
32. Hivert M-F, White F, Allard C, James K, Majid S, Aguet F, et al. Placental IGFBP1 levels during early pregnancy and the risk of insulin resistance and gestational diabetes. *Nature Medicine*. 2024;30(6):1689-95.
33. Mittal R, Prasad K, Lemos JRN, Arevalo G, Hirani K. Unveiling Gestational Diabetes: An Overview of Pathophysiology and Management. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025;26(5):2320.
34. Hill DJ, Hill TG. Maternal diet during pregnancy and adaptive changes in the maternal and fetal pancreas have implications for future metabolic health. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024;15:1456629.
35. Fang H, Li Q, Wang H, Ren Y, Zhang L, Yang L. Maternal nutrient metabolism in the liver during pregnancy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024;15:1295677.

36. Stern C, Schwarz S, Moser G, Cvitic S, Jantscher-Krenn E, Gauster M, et al. Placental Endocrine Activity: Adaptation and Disruption of Maternal Glucose Metabolism in Pregnancy and the Influence of Fetal Sex. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23):12722.
37. Aye I, Aiken CE, Charnock-Jones DS, Smith GCS. Placental energy metabolism in health and disease-significance of development and implications for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2022;226(2s):S928-s44.
38. Tunster SJ, Watson ED, Fowden AL, Burton GJ. Placental glycogen stores and fetal growth: insights from genetic mouse models. *Reproduction*. 2020;159(6):R213-R35.
39. Akison LK, Nitert MD, Clifton VL, Moritz KM, Simmons DG. Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. *Placenta*. 2017;54:52-8.
40. Albaik M, Sheikh Saleh D, Kauther D, Mohammed H, Alfarra S, Alghamdi A, et al. Bridging the gap: glucose transporters, Alzheimer's, and future therapeutic prospects. *Front Cell Dev Biol*. 2024;12:1344039.
41. Navale AM, Paranjape AN. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys Rev*. 2016;8(1):5-9.
42. Sibiak R, Ozegowska K, Wender-Ozegowska E, Gutaj P, Mozdziak P, Kempisty B. Fetomaternal Expression of Glucose Transporters (GLUTs)—Biochemical, Cellular and Clinical Aspects. *Nutrients*. 2022;14(10):2025.
43. Illsley NP, Baumann MU. Human placental glucose transport in fetoplacental growth and metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(2):165359.
44. Harada N, Inagaki N. Role of sodium-glucose transporters in glucose uptake of the intestine and kidney. *J Diabetes Investig*. 2012;3(4):352-3.
45. Locasale JW. New concepts in feedback regulation of glucose metabolism. *Current Opinion in Systems Biology*. 2018;8:32-8.
46. Patil N, Howe O, Cahill P, Byrne HJ. Monitoring and modelling the dynamics of the cellular glycolysis pathway: A review and future perspectives. *Molecular Metabolism*. 2022;66:101635.
47. Gou R, Zhang X. Glycolysis: A fork in the path of normal and pathological pregnancy. *The FASEB Journal*. 2023;37(12):e23263.

48. Kolahi KS, Valent AM, Thornburg KL. Cytotrophoblast, Not Syncytiotrophoblast, Dominates Glycolysis and Oxidative Phosphorylation in Human Term Placenta. *Scientific Reports*. 2017;7(1):42941.
49. Wang C, Ma C, Xu Y, Chang S, Wu H, Yan C, et al. Dynamics of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex revealed by in-situ structural analysis. *Nature Communications*. 2025;16(1):917.
50. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*. 2020;11(1):102.
51. Kafkia E, Andres-Pons A, Ganter K, Seiler M, Smith TS, Andrejeva A, et al. Operation of a TCA cycle subnetwork in the mammalian nucleus. *Science Advances*. 2022;8(35):eabq5206.
52. Prochownik EV, Wang H. The Metabolic Fates of Pyruvate in Normal and Neoplastic Cells. *Cells*. 2021;10(4):762.
53. Mahr RM, Jena S, Nashif SK, Nelson AB, Rauckhorst AJ, Rome FI, et al. Mitochondrial citrate metabolism and efflux regulate BeWo differentiation. *Sci Rep*. 2023;13(1):7387.
54. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*. 2020;37:101674.
55. Ježek J, Cooper KF, Strich R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants*. 2018;7(1):13.
56. Gurner KH, Gardner DK. Blastocyst-Derived Lactate as a Key Facilitator of Implantation. *Biomolecules*. 2025;15(1):100.
57. Gardner DK. Lactate production by the mammalian blastocyst: manipulating the microenvironment for uterine implantation and invasion? *Bioessays*. 2015;37(4):364-71.
58. Ma L-N, Huang X-B, Muyayalo KP, Mor G, Liao A-H. Lactic Acid: A Novel Signaling Molecule in Early Pregnancy? *Frontiers in Immunology*. 2020;Volume 11 - 2020.
59. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death & Differentiation*. 2008;15(4):621-7.
60. Taylor CT, Scholz CC. The effect of HIF on metabolism and immunity. *Nature Reviews Nephrology*. 2022;18(9):573-87.

61. Qannita RA, Alalami AI, Harb AA, Aleidi SM, Taneera J, Abu-Gharbieh E, et al. Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) in Cancer: Emerging Therapeutic Strategies and Pathway Regulation. *Pharmaceuticals*. 2024;17(2):195.
62. Corcoran SE, O'Neill LA. HIF1 $\alpha$  and metabolic reprogramming in inflammation. *J Clin Invest*. 2016;126(10):3699-707.
63. Tong W, Allison BJ, Brain KL, Patey OV, Niu Y, Botting KJ, et al. Placental mitochondrial metabolic adaptation maintains cellular energy balance in pregnancy complicated by gestational hypoxia. *J Physiol*. 2025.
64. Patel J, Landers K, Mortimer RH, Richard K. Regulation of Hypoxia Inducible Factors (HIF) in Hypoxia and Normoxia During Placental Development. *Placenta*. 2010;31(11):951-7.
65. Corona JC, Duchen MR. PPAR $\gamma$  as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;100:153-63.
66. Peng L, Yang H, Ye Y, Ma Z, Kuhn C, Rahmeh M, et al. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Trophoblast Functions. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1).
67. Qin Y, Bily D, Aguirre M, Zhang K, Xie L. Understanding PPAR $\gamma$  and Its Agonists on Trophoblast Differentiation and Invasion: Potential Therapeutic Targets for Gestational Diabetes Mellitus and Preeclampsia. *Nutrients*. 2023;15(11).
68. Perichart-Perera O, González-Ludlow I, Piña-Ramírez O, Tolentino-Dolores M, Estrada-Gutierrez G, Parra-Hernández SB, et al. Longitudinal Trajectory of Free Fatty Acids in Pregnancy According to First-Trimester Maternal Metabolic Status and the Presence of Gestational Diabetes. *Metabolites*. 2025;15(5):320.
69. Zhang T, Jiang W-R, Xia Y-Y, Mansell T, Saffery R, Cannon RD, et al. Complex patterns of circulating fatty acid levels in gestational diabetes mellitus subclasses across pregnancy. *Clinical Nutrition*. 2021;40(6):4140-8.
70. McCarthy FP, Delany AC, Kenny LC, Walsh SK. PPAR-gamma -- a possible drug target for complicated pregnancies. *Br J Pharmacol*. 2013;168(5):1074-85.
71. Díaz M, Bassols J, López-Bermejo A, Gómez-Roig MD, de Zegher F, Ibáñez L. Placental Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ): Relation to Placental and Fetal Growth. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012;97(8):E1468-E72.

72. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012;13(4):251-62.
73. Aslam M, Ladilov Y. Emerging Role of cAMP/AMPK Signaling. *Cells*. 2022;11(2).
74. Xu P, Zheng Y, Liao J, Hu M, Yang Y, Zhang B, et al. AMPK regulates homeostasis of invasion and viability in trophoblasts by redirecting glucose metabolism: Implications for pre-eclampsia. *Cell Prolif*. 2023;56(2):e13358.
75. Wu B, Chen Y, Clarke R, Akala E, Yang P, He B, et al. AMPK Signaling Regulates Mitophagy and Mitochondrial ATP Production in Human Trophoblast Cell Line BeWo. *FBL*. 2022;27(4).
76. Piekarska K, Dratwa M, Radwan P, Radwan M, Bogunia-Kubik K, Nowak I. Pro- and anti-inflammatory cytokines and growth factors in patients undergoing in vitro fertilization procedure treated with prednisone. *Front Immunol*. 2023;14:1250488.
77. Munro SK, Balakrishnan B, Lissaman AC, Gujral P, Ponnampalam AP. Cytokines and pregnancy: Potential regulation by histone deacetylases. *Molecular Reproduction and Development*. 2021;88(5):321-37.
78. Wen B, Liao H, Lin W, Li Z, Ma X, Xu Q, et al. The Role of TGF- $\beta$  during Pregnancy and Pregnancy Complications. *International Journal of Molecular Sciences [Internet]*. 2023; 24(23).
79. Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules*. 2020;10(3).
80. Hinck AP, Mueller TD, Springer TA. Structural Biology and Evolution of the TGF- $\beta$  Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(12).
81. Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(8).
82. Li Q. Transforming growth factor  $\beta$  signaling in uterine development and function. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2014;5(1):52.
83. Yang D, Dai F, Yuan M, Zheng Y, Liu S, Deng Z, et al. Role of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Regulating Fetal-Maternal Immune Tolerance in Normal and Pathological Pregnancy. *Front Immunol*. 2021;12:689181.
84. Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions. *Semin Reprod Med*. 2009;27(1):62-79.

85. Liu H, Chen YG. The Interplay Between TGF- $\beta$  Signaling and Cell Metabolism. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:846723.
86. Dimeloe S, Gubser P, Loeliger J, Frick C, Develioglu L, Fischer M, et al. Tumor-derived TGF- $\beta$ ; inhibits mitochondrial respiration to suppress IFN- $\gamma$  production by human CD4<sup>+</sup> T cells. *Science Signaling.* 2019;12(599):eaav3334.
87. Yoon Y-S, Lee J-H, Hwang S-C, Choi KS, Yoon G. TGF  $\beta$ 1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells. *Oncogene.* 2005;24(11):1895-903.
88. Negmadjanov U, Godic Z, Rizvi F, Emelyanova L, Ross G, Richards J, et al. TGF- $\beta$ 1-mediated differentiation of fibroblasts is associated with increased mitochondrial content and cellular respiration. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123046.
89. McIntyre HD, Fuglsang J, Kampmann U, Knorr S, Ovesen P. Hyperglycemia in Pregnancy and Women's Health in the 21st Century. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2022;19(24):16827.
90. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, Nielsen LB, Wibrand F, Stride N, et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol.* 2012;590(14):3349-60.
91. Hod M, Simeoni U. Maternal, Fetal and Neonatal complications of diabetic pregnancy-delivering optimal care while awaiting for cure. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.* 2009;14(2):63-5.
92. Choudhury AA, Devi Rajeswari V. Gestational diabetes mellitus - A metabolic and reproductive disorder. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021;143:112183.
93. Hulme CH, Stevens A, Dunn W, Heazell AEP, Hollywood K, Begley P, et al. Identification of the functional pathways altered by placental cell exposure to high glucose: lessons from the transcript and metabolite interactome. *Scientific Reports.* 2018;8(1):5270.
94. Guadix P, Corrales I, Vilariño-García T, Rodríguez-Chacón C, Sánchez-Jiménez F, Jiménez-Cortegana C, et al. Expression of nutrient transporters in placentas affected by gestational diabetes: role of leptin. *Frontiers in Endocrinology.* 2023;Volume 14 - 2023.
95. Valent AM, Choi H, Kolahi KS, Thornburg KL. Hyperglycemia and gestational diabetes suppress placental glycolysis and mitochondrial function and alter lipid processing. *The FASEB Journal.* 2021;35(3):e21423.

96. Duan Y, Sun F, Li Y, Yang S. High glucose and high lipid induced mitochondrial dysfunction in JEG-3 cells through oxidative stress. *Open Life Sciences*. 2023;18(1).
97. Ye W, Luo C, Huang J, Li C, Liu Z, Liu F. Gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2022;377:e067946.
98. Farrar D. Hyperglycemia in pregnancy: prevalence, impact, and management challenges. *Int J Womens Health*. 2016;8:519-27.
99. Committee ADAPP. 15. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Care in Diabetes—2024. *Diabetes Care*. 2023;47(Supplement\_1):S282-S94.
100. Rothbauer M, Patel N, Gondola H, Siwetz M, Huppertz B, Ertl P. A comparative study of five physiological key parameters between four different human trophoblast-derived cell lines. *Scientific Reports*. 2017;7(1):5892.
101. Lee Cheryl QE, Gardner L, Turco M, Zhao N, Murray Matthew J, Coleman N, et al. What Is Trophoblast? A Combination of Criteria Define Human First-Trimester Trophoblast. *Stem Cell Reports*. 2016;6(2):257-72.
102. Weiss U, Cervar M, Puerstner P, Schmut O, Haas J, Mauschitz R, et al. Hyperglycaemia in vitro alters the proliferation and mitochondrial activity of the choriocarcinoma cell lines BeWo, JAR and JEG-3 as models for human first-trimester trophoblast. *Diabetologia*. 2001;44(2):209-19.
103. Huang Z, Li S, Fan W, Ma Q. Transforming growth factor  $\beta$ 1 promotes invasion of human JEG-3 trophoblast cells via TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(20):33560-70.
104. Ortega MA, Fraile-Martínez O, García-Montero C, Sáez MA, Álvarez-Mon MA, Torres-Carranza D, et al. The Pivotal Role of the Placenta in Normal and Pathological Pregnancies: A Focus on Preeclampsia, Fetal Growth Restriction, and Maternal Chronic Venous Disease. *Cells*. 2022;11(3).
105. Brombach C, Tong W, Giussani DA. Maternal obesity: new placental paradigms unfolded. *Trends in Molecular Medicine*. 2022;28(10):823-35.
106. Napso T, Yong HEJ, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. The Role of Placental Hormones in Mediating Maternal Adaptations to Support Pregnancy and Lactation. *Frontiers in Physiology*. 2018;Volume 9 - 2018.

107. Jankovic-Karasoulos T, Smith MD, Leemaqz S, Williamson J, McCullough D, Arthurs AL, et al. Elevated Maternal Folate Status and Changes in Maternal Prolactin, Placental Lactogen and Placental Growth Hormone Following Folic Acid Food Fortification: Evidence from Two Prospective Pregnancy Cohorts. *Nutrients*. 2023;15(7):1553.
108. Easton ZJW, Luo X, Li L, Regnault TRH. The impact of hyperglycemia upon BeWo trophoblast cell metabolic function: A multi-OMICS and functional metabolic analysis. *PLOS ONE*. 2023;18(3):e0283118.
109. Zhang L, Yu X, Wu Y, Fu H, Xu P, Zheng Y, et al. Gestational Diabetes Mellitus-Associated Hyperglycemia Impairs Glucose Transporter 3 Trafficking in Trophoblasts Through the Downregulation of AMP-Activated Protein Kinase. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;Volume 9 - 2021.
110. Majali-Martinez A, Weiss-Fuchs U, Miedl H, Forstner D, Bandres-Meriz J, Hoch D, et al. Type 1 Diabetes Mellitus and the First Trimester Placenta: Hyperglycemia-Induced Effects on Trophoblast Proliferation, Cell Cycle Regulators, and Invasion. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(20):10989.
111. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1047-78.
112. Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*. 2020;34(23-24):1565-76.
113. Huang Y, Yang X, Wang Y, Nai Y, Ji L, Zhu H, et al. ARID1A recruits GATA2 to regulate the senescence of trophoblast cells under high-glucose condition. *Placenta*. 2024;158:156-64.
114. Hebert JF, Myatt L. Placental mitochondrial dysfunction with metabolic diseases: Therapeutic approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2021;1867(1):165967.
115. Jahan F, Vasam G, Green AE, Bainbridge SA, Menzies KJ. Placental Mitochondrial Function and Dysfunction in Preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 2023;24(4).
116. Holland OJ, Hickey AJR, Alvsaker A, Moran S, Hedges C, Chamley LW, et al. Changes in mitochondrial respiration in the human placenta over gestation. *Placenta*. 2017;57:102-12.
117. Hebert JF, Myatt L. Placental mitochondrial dysfunction with metabolic diseases: Therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021;1867(1):165967.

118. Siemers KM, Joss-Moore LA, Baack ML. Gestational Diabetes-like Fuels Impair Mitochondrial Function and Long-Chain Fatty Acid Uptake in Human Trophoblasts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(21):11534.
119. Hu M, Li J, Baker PN, Tong C. Revisiting preeclampsia: a metabolic disorder of the placenta. *The FEBS Journal*. 2022;289(2):336-54.
120. Brown K, Heller DS, Zamudio S, Illsley NP. Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation. *Placenta*. 2011;32(12):1041-9.
121. James-Allan LB, Arbet J, Teal SB, Powell TL, Jansson T. Insulin Stimulates GLUT4 Trafficking to the Syncytiotrophoblast Basal Plasma Membrane in the Human Placenta. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(9):4225-38.
122. Stanirowski PJ, Szukiewicz D, Majewska A, Wątroba M, Pyzlak M, Bomba-Opoń D, et al. Placental expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-3, GLUT-8 and GLUT-12 in pregnancies complicated by gestational and type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation*. 2022;13(3):560-70.
123. Lüscher BP, Marini C, Joerger-Messerli MS, Huang X, Hediger MA, Albrecht C, et al. Placental glucose transporter (GLUT)-1 is down-regulated in preeclampsia. *Placenta*. 2017;55:94-9.
124. Ning J, Huai J, Wang S, Yan J, Su R, Zhang M, et al. METTL3 regulates glucose transporter expression in placenta exposed to hyperglycemia through the mTOR signaling pathway. *Chin Med J (Engl)*. 2024;137(13):1563-75.
125. Stanirowski PJ, Szukiewicz D, Pyzlak M, Abdalla N, Sawicki W, Cendrowski K. Impact of pre-gestational and gestational diabetes mellitus on the expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 in human term placenta. *Endocrine*. 2017;55(3):799-808.
126. Xiao Z, Liu X, Luan X, Duan R, Peng W, Tong C, et al. Glucose uptake in trophoblasts of GDM mice is regulated by the AMPK-CLUT3 signaling pathway. *Scientific Reports*. 2024;14(1):12051.
127. Jansson T, Aye IL, Goberdhan DC. The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing. *Placenta*. 2012;33 Suppl 2(Suppl 2):e23-9.
128. Qin Y, Bily D, Aguirre M, Zhang K, Xie L. Understanding PPAR $\gamma$  and Its Agonists on Trophoblast Differentiation and Invasion: Potential Therapeutic Targets for Gestational Diabetes Mellitus and Preeclampsia. *Nutrients*. 2023;15(11):2459.

129. Bi J, Zhou W, Tang Z. Pathogenesis of diabetic complications: Exploring hypoxic niche formation and HIF-1 $\alpha$  activation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024;172:116202.
130. Aye ILMH, Aiken CE, Charnock-Jones DS, Smith GCS. Placental energy metabolism in health and disease—significance of development and implications for preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2022;226(2, Supplement):S928-S44.
131. Anton L, DeVine A, Polyak E, Olarerin-George A, Brown AG, Falk MJ, et al. HIF-1 $\alpha$  Stabilization Increases miR-210 Eliciting First Trimester Extravillous Trophoblast Mitochondrial Dysfunction. *Frontiers in Physiology*. 2019;Volume 10 - 2019.
132. Suwaki N, Masuyama H, Masumoto A, Takamoto N, Hiramatsu Y. Expression and potential role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the placenta of diabetic pregnancy. *Placenta*. 2007;28(4):315-23.
133. Knabl J, Hüttenbrenner R, Hutter S, Günthner-Biller M, Vrekoussis T, Karl K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) is down regulated in trophoblast cells of gestational diabetes mellitus (GDM) and in trophoblast tumour cells BeWo in vitro after stimulation with PPAR $\gamma$  agonists. *J Perinat Med*. 2014;42(2):179-87.
134. Li H, Chen Q, Yang W, Deng Y, Zhao L, Zeng Z. PPAR $\gamma$  alleviates damage to chorionic trophoblast cells induced by high glucose and high lipids through regulation of IGF-1. *Adv Clin Exp Med*. 2024.
135. Cawyer C, Afroze SH, Drever N, Allen S, Jones R, Zawieja DC, et al. Attenuation of hyperglycemia-induced apoptotic signaling and anti-angiogenic milieu in cultured cytotrophoblast cells. *Hypertens Pregnancy*. 2016;35(2):159-69.
136. Horvat Mercnik M, Schlieffsteiner C, Sanchez-Duffhues G, Wadsack C. TGF $\beta$  signalling: a nexus between inflammation, placental health and preeclampsia throughout pregnancy. *Human Reproduction Update*. 2024;30(4):442-71.
137. Yi Y, Cheng JC, Klausen C, Leung PCK. TGF- $\beta$ 1 inhibits human trophoblast cell invasion by upregulating cyclooxygenase-2. *Placenta*. 2018;68:44-51.
138. Wen B, Liao H, Lin W, Li Z, Ma X, Xu Q, et al. The Role of TGF- $\beta$  during Pregnancy and Pregnancy Complications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(23):16882.
139. Johnstone ED, Westwood M, Dilworth M, Wray JR, Kendall AC, Nicolaou A, et al. Plasma S1P and Sphingosine are not Different Prior to Pre-Eclampsia in Women at High Risk of Developing the Disease. *J Lipid Res*. 2023;64(1):100312.

140. Zhou MY, Cheng ML, Huang T, Hu RH, Zou GL, Li H, et al. Transforming growth factor beta-1 upregulates glucose transporter 1 and glycolysis through canonical and noncanonical pathways in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol*. 2021;27(40):6908-26.
141. Gauthier T, Yao C, Dowdy T, Jin W, Lim YJ, Patiño LC, et al. TGF- $\beta$  uncouples glycolysis and inflammation in macrophages and controls survival during sepsis. *Sci Signal*. 2023;16(797):eade0385.
142. Chen X, Feng L, Li S, Long D, Shan J, Li Y. TGF- $\beta$ 1 maintains Foxp3 expression and inhibits glycolysis in natural regulatory T cells via PP2A-mediated suppression of mTOR signaling. *Immunol Lett*. 2020;226:31-7.
143. Dagher Z, Gerhardinger C, Vaz J, Goodridge M, Tecilazich F, Lorenzi M. The Increased Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Induced by Diabetes Protects Retinal Vessels. *The American Journal of Pathology*. 2017;187(3):627-38.
144. Abe Y, Sakairi T, Beeson C, Kopp JB. TGF- $\beta$ 1 stimulates mitochondrial oxidative phosphorylation and generation of reactive oxygen species in cultured mouse podocytes, mediated in part by the mTOR pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(10):F1477-90.
145. Li S, Huang Q, Mao J, Li Q. TGF $\beta$ -dependent mitochondrial biogenesis is activated during definitive endoderm differentiation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 2020;56(5):378-85.
146. Rodríguez-García A, Samsó P, Fontova P, Simon-Molas H, Manzano A, Castaño E, et al. TGF- $\beta$ 1 targets Smad, p38 MAPK, and PI3K/Akt signaling pathways to induce PFKFB3 gene expression and glycolysis in glioblastoma cells. *Febs j*. 2017;284(20):3437-54.
147. Song MY, Lee DY, Yun SM, Kim EH. GLUT3 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition via TGF- $\beta$ /JNK/ATF2 Signaling Pathway in Colorectal Cancer Cells. *Biomedicines*. 2022;10(8).
148. Nilchian A, Giotopoulou N, Sun W, Fuxe J. Different Regulation of Glut1 Expression and Glucose Uptake during the Induction and Chronic Stages of TGF $\beta$ 1-Induced EMT in Breast Cancer Cells. *Biomolecules*. 2020;10(12):1621.
149. Frost J, Galdeano C, Soares P, Gadd MS, Grzes KM, Ellis L, et al. Potent and selective chemical probe of hypoxic signalling downstream of HIF- $\alpha$  hydroxylation via VHL inhibition. *Nat Commun*. 2016;7:13312.

150. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 $\alpha$ . *Cell Death Differ.* 2008;15(4):621-7.
151. Zhang J, Yao M, Xia S, Zeng F, Liu Q. Systematic and comprehensive insights into HIF-1 stabilization under normoxic conditions: implications for cellular adaptation and therapeutic strategies in cancer. *Cell Mol Biol Lett.* 2025;30(1):2.
152. Zhao S, El-Deiry WS. Identification of Smurf2 as a HIF-1 $\alpha$  degrading E3 ubiquitin ligase. *Oncotarget.* 2021;12(20):1970-9.
153. Ohashi N, Yamamoto T, Uchida C, Togawa A, Fukasawa H, Fujigaki Y, et al. Transcriptional induction of Smurf2 ubiquitin ligase by TGF- $\beta$ . *FEBS Letters.* 2005;579(12):2557-63.
154. Bandopadhyay S, Patranabis S. Mechanisms of HIF-driven immunosuppression in tumour microenvironment. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute.* 2023;35(1):27.
155. Wong SJ, Ringel AE, Yuan W, Paulo JA, Yoon H, Currie MA, et al. Development of a colorimetric  $\alpha$ -ketoglutarate detection assay for prolyl hydroxylase domain (PHD) proteins. *J Biol Chem.* 2021;296:100397.
156. Burtscher J, Denti V, Gostner JM, Weiss AKH, Strasser B, Hüfner K, et al. The interplay of NAD and hypoxic stress and its relevance for ageing. *Ageing Research Reviews.* 2025;104:102646.
157. Leduc-Gaudet JP, Hussain SNA, Barreiro E, Gouspillou G. Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Skeletal Muscle Health and Aging. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15).
158. Li G, Li J, Shao R, Zhao J, Chen M. FUNDC1: A Promising Mitophagy Regulator at the Mitochondria-Associated Membrane for Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2021;Volume 9 - 2021.
159. Smith EVL, Dyson RM, Vanderboor CMG, Sarr O, Anderson J, Berry MJ, et al. Maternal Fructose Intake Causes Developmental Reprogramming of Hepatic Mitochondrial Catalytic Activity and Lipid Metabolism in Weanling and Young Adult Offspring. *Int J Mol Sci.* 2022;23(2).
160. Galbraith LCA, Mui E, Nixon C, Hedley A, Strachan D, MacKay G, et al. PPAR- $\gamma$  induced AKT3 expression increases levels of mitochondrial biogenesis driving prostate cancer. *Oncogene.* 2021;40(13):2355-66.

161. Yang C-S, Kim J-J, Lee H-M, Jin HS, Lee S-H, Park J-H, et al. The AMPK-PPARGC1A pathway is required for antimicrobial host defense through activation of autophagy. *Autophagy*. 2014;10(5):785-802.
162. Li X, Shen L, Tan H. Polymorphisms and Plasma Level of Transforming Growth Factor-Beta 1 and Risk for Preeclampsia: A Systematic Review. *PLOS ONE*. 2014;9(5):e97230.
163. Lash GE, Otun HA, Innes BA, Bulmer JN, Searle RF, Robson SC. Inhibition of Trophoblast Cell Invasion by TGFB1, 2, and 3 Is Associated with a Decrease in Active Proteases1. *Biology of Reproduction*. 2005;73(2):374-81.

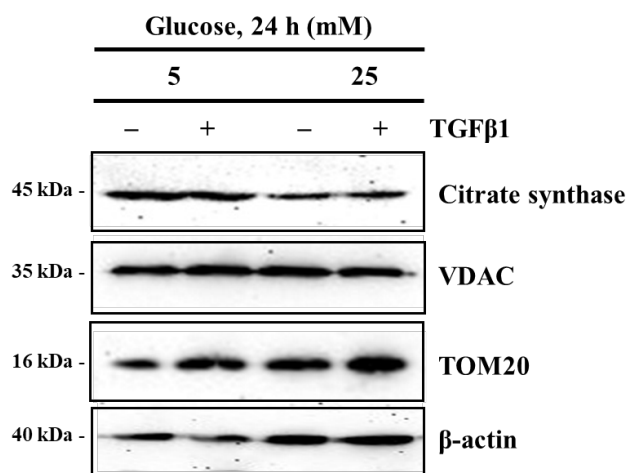
## ANNEXE A

### **Effets du TGF $\beta$ 1 sur l'expression des protéines mitochondriales en réponse à différentes concentrations de glucose**

Afin de mieux comprendre les altérations mitochondriales observées dans notre modèle expérimental, nous avons analysé l'impact de différentes concentrations de glucose, avec ou sans traitement au TGF $\beta$ 1, sur l'expression de marqueurs mitochondriaux. L'exposition des cellules trophoblastiques JEG-3 à une concentration élevée de glucose (25 mM) induit une diminution marquée de l'expression de plusieurs sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, en particulier complexe I, complexe II, complexe III et complexe IV. Le traitement par TGF $\beta$ 1 permet de restaurer significativement l'expression de ces sous-unités, notamment celles des complexes I et III, avec un effet plus prononcé en condition hyperglycémique. Ces modifications sont accompagnées d'une diminution de la production totale d'ATP en condition de glucose élevé, suivie d'une restauration de cette production après traitement par TGF $\beta$ 1. Afin de déterminer si ces variations traduisent uniquement une modulation de l'activité mitochondriale ou si elles reflètent également une altération de la masse mitochondriale, nous avons évalué l'expression de trois marqueurs mitochondriaux supplémentaires : VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), protéine de la membrane externe impliquée dans le transport des métabolites et des ions ; TOMM20 (Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20), également localisée dans la membrane externe et impliquée dans l'import des protéines codées par le noyau ; et la citrate synthase (CS), enzyme de la matrice mitochondriale jouant un rôle central dans le cycle de Krebs et reflétant l'activité enzymatique mitochondriale globale [90]. Cette approche vise à déterminer si les altérations observées relèvent d'une perte fonctionnelle des mitochondries, d'une réduction de leur masse, ou d'une combinaison des deux.

Dans cette optique, les cellules trophoblastiques JEG-3 ont été incubées pendant 24 heures dans des milieux contenant des concentrations de glucose reproduisant des conditions normo glycémiques (5 mM) ou hyperglycémiques (25 mM), en présence ou en absence de TGF $\beta$ 1 (50 ng/mL). L'analyse de l'expression de marqueurs mitochondriaux structurels et enzymatiques, tels que VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), TOMM20 (Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20) et la citrate synthase (CS), n'a révélé aucune variation

significative entre les différentes conditions expérimentales (figure 1-A). Ces observations indiquent que l'exposition à une concentration élevée de glucose n'altère pas la masse mitochondriale apparente, mais semble affecté la fonction bioénergétique, comme en témoigne la réduction de l'expression des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chap 2, Fig 2) et la diminution corrélative de la production d'ATP.



**Figure A1 : Effet du TGFβ1 sur l'expression de marqueurs mitochondriaux en conditions normo glycémiques et hyperglycémiques.** Les cellules JEG-3 ( $4 \times 10^5$  cellules/puits) ont été incubées pendant 24 heures dans des milieux contenant 5 mM (normoglycémie) ou 25 mM (hyperglycémie) de glucose, en présence ou en absence de TGFβ1 (50 ng/mL). À l'issue du traitement, les cellules ont été lysées et les extraits protéiques analysés par western blot afin d'évaluer l'expression de trois marqueurs mitochondriaux : VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), TOMM20 (Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20) et la citrate synthase (CS) (n = 3)