

## Dysfonction placenta-cerveau et angiogenèse cérébrale : vers un diagnostic précoce des troubles causés par l'alcoolisation fœtale

| PAR BRUNO J. GONZALEZ ET STEPHANE MARRET\*

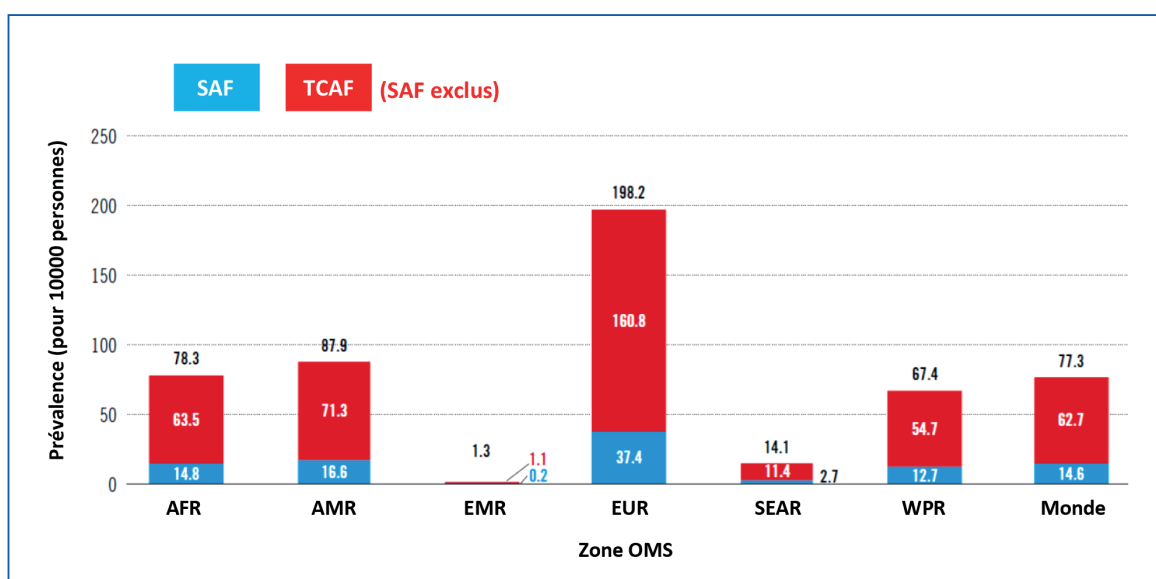
\*Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1245 and Rouen University Hospital, Department of Neonatal Paediatrics and Intensive Care, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen



### Consommation d'alcool et grossesse

L'existence d'un lien entre consommation d'alcool et grossesse est identifiée dès l'antiquité et l'ancien testament relate déjà un risque pour l'enfant à naître [ *Désormais prends bien garde ! Ne bois ni vin, ni boisson fermentée, et ne mange rien d'impur car tu vas concevoir et tu enfanteras...* ] (Bible de Jérusalem, Juges, Chapitre 13). Beaucoup plus récemment, une méta-analyse réalisée par l'Équipe de Svetlana Popova de Toronto indique que, dans le monde, 9,8 % des femmes consomment de l'alcool au cours de leur grossesse, tous modes de consommation confondus (1). Cette valeur

moyenne cache en réalité d'énormes disparités relatives à des indicateurs socio-économiques, culturels et religieux. Ainsi, les cinq pays ayant la plus forte prévalence estimée en termes de consommation d'alcool pendant la grossesse appartiennent tous à la zone Europe, une des 6 zones définies au niveau mondial par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ; 2). Cependant, l'ensemble des continents est fortement impacté faisant de la consommation d'alcool au cours de la grossesse un problème de santé publique mondial.



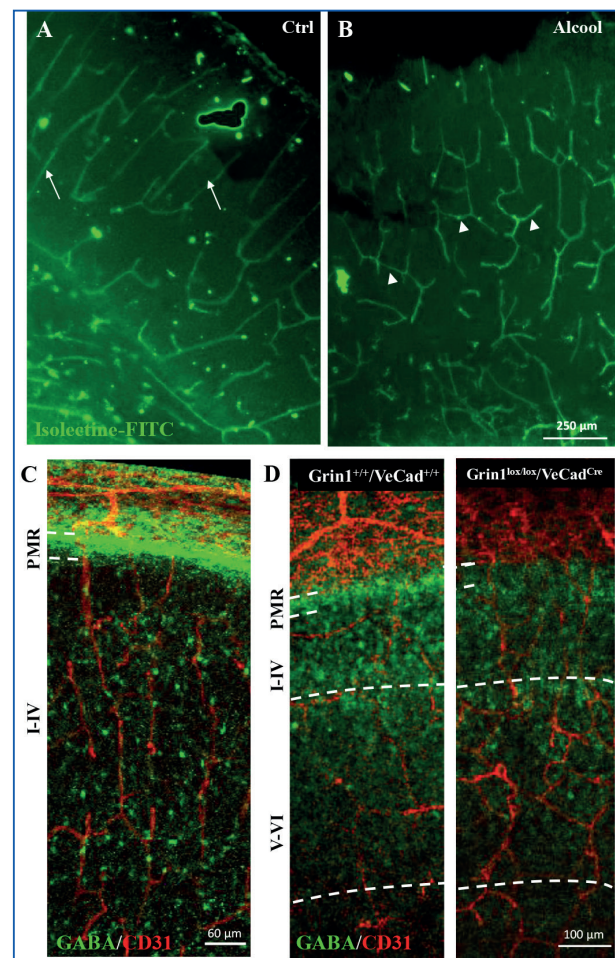
**Figure 1** - Prévalence du Syndrome d'Alcoolisation Fœtale (SAF) et des Troubles Causés par l'Alcoolisation Fœtale (TCAF) dans les différentes régions du monde telles que définies par l'OMS. AFR : Région Afrique ; AMR : Région Amériques ; EMR : Région Est-Méditerranée ; EUR : Région Europe ; SEAR : Région Asie du Sud-Est ; WPR : Région Ouest Pacifique. Source OMS, Global status report on alcohol and health, 2018.

## Diagnostic et problématique clinique

L'estimation de la prévalence du syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) à l'échelle mondiale est de 1,5 cas pour mille personnes (1). Un diagnostic clinique du SAF est possible à la naissance devant une dysmorphie cranio-faciale caractéristique pouvant être associée à un syndrome de sevrage, une microcéphalie, un retard de croissance intra-utérin, voire différentes malformations cardiaques, néphro-urologiques, osseuses ou cérébrales (agénésie du corps calleux ...) visualisées par imagerie (échographie, IRM) (3). Ces indicateurs peuvent être étayés par la constatation, par l'équipe de soin, d'une consommation avérée d'alcool et/ou par l'utilisation de biomarqueurs basés sur la détection de l'alcool et de ses métabolites ou de marqueurs d'une toxicité hépatique (4). Toutefois, le SAF ne constitue que la forme la plus sévère des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF; Figure 1) et une grande proportion des enfants exposés *in utero* à l'alcool échappe à un diagnostic précoce en raison de l'absence d'anomalies morphologiques évidentes (3). Ces enfants sont néanmoins à haut risque de séquelles neuro-développementales et comportementales qui se révéleront progressivement avec l'âge. Nombre d'entre eux vont présenter des troubles de l'attention et des apprentissages pouvant être associés à une hyperactivité, voire des comportements violents et seront souvent en situation d'échec scolaire (5). C'est d'ailleurs par leur parcours scolaire que ces enfants seront le plus souvent détectés. Le diagnostic néonatal des enfants TCAF constitue donc un défi pour les cliniciens afin de permettre une prise en charge précoce à une période (0-5 ans) où la plasticité cérébrale et le potentiel de récupération fonctionnelle sont importants.

## Angiogenèse, interface neuro-vasculaire et alcool

Alors que les effets délétères de l'alcool sur le développement du fœtus ont été relatés à plusieurs reprises au fil de l'histoire, c'est en 1968 que le pédiatre Paul Lemoine publie dans l'Ouest Médical la première étude basée sur l'analyse d'une cohorte d'enfants et associant la consommation d'alcool par les mères à des dysmorphies cranio-faciales, un retard de croissance, des troubles du comportement, voire un déficit intellectuel de l'enfant (6). En 1973, ce tableau clinique sera repris par les Docteurs Kenneth Jones et David Smith des Universités de San Diego et Washington aux États-Unis pour définir le SAF (7). Depuis, de très nombreuses études ont caractérisé les effets de l'alcool sur le développement cérébral que ce soit au niveau anatomique (par exemple atteinte du corps calleux), fonctionnel (altération de la prolifération, migration, différenciation ou encore survie cellulaire), mécanistique (interactions avec le récepteur NMDA ou encore GABA<sub>A</sub>), génique ou épigénétique (8). Toutefois, la très grande majorité des études portant sur les effets de l'alcool au cours du neurodéveloppement s'est naturellement focalisée sur les cellules nerveuses. Ce n'est seulement qu'en 2012, qu'une première étude démontrait, à la fois chez l'humain et l'animal, un impact de l'alcoolisation *in utero* sur l'angiogenèse corticale fœtale (9). En particulier,



**Figure 2.** À, B - Chez la souris, l'exposition *in utero* à l'alcool se traduit par une altération de l'angiogenèse corticale. Les flèches indiquent des microvaisseaux radiaux dans le cortex d'une souris contrôlée âgée de 2 jours (A). Les têtes de flèches montrent des microvaisseaux corticaux avec une orientation altérée chez une souris du même âge exposée à l'alcool au cours de la 3<sup>e</sup> semaine de vie fœtale. C : Visualisation par immunohistochimie de l'association préférentielle des interneurones GABA provenant de la voie de migration piale avec les microvaisseaux corticaux radiaux chez une souris âgée de 2 jours. D : L'inactivation sélective de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA endothélial (*Grin1lox/lox/VeCadCre*) se traduit par une réduction importante de la densité d'interneurones GABA présents au niveau de la route de migration piale et des couches corticales superficielles. PMR : pial migratory route; I-IV : couches corticales superficielles I-IV; V-VI : couches corticales profondes I-IV. Sources Jégou et al., 2012 et Léger et al., 2019.

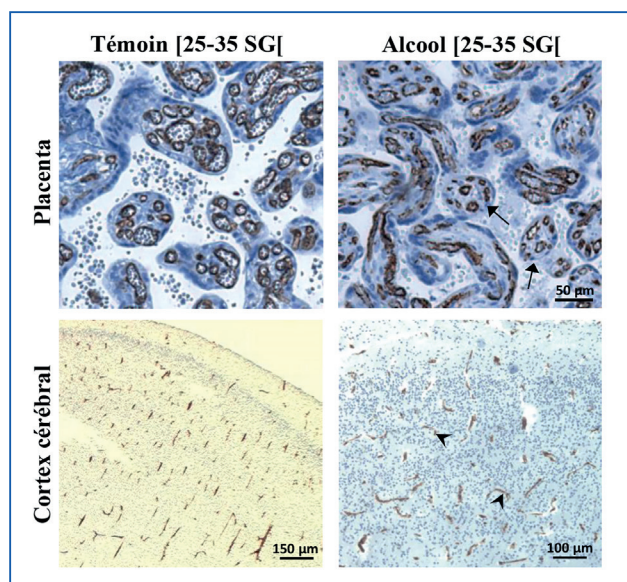
l'alcoolisation *in utero* induit une perte de l'orientation radiale des microvaisseaux corticaux (Figure 2A,B). Hormis le fait que le système vasculaire assure de multiples fonctions de natures métabolique (apports en oxygène, en nutriments, élimination de catabolites) et neuro/endocrine, plusieurs études démontrent que des populations nerveuses telles que les interneurones GABAergiques corticaux ou les oligodendrocytes (10) utilisent les microvaisseaux cérébraux comme guides pendant leur phase de migration. Il est donc plausible de concevoir qu'une désorganisation des microvaisseaux corticaux par l'alcool puisse interférer sur la migration et le

positionnement correct de ces deux populations nerveuses. En accord avec cette hypothèse, des travaux récents ont démontré que les interneurons GABAergiques en migration et provenant de la route piale utilisent les microvaisseaux radiaux pour intégrer de façon centripète les couches corticales superficielles (Figure 2C ; 11). En particulier, cet effet est dépendant du récepteur NMDA endothélial (Figure 2D) et de l'activité de métalloprotéases de la matrice d'origine endothéliale (MMP9), deux cibles de l'alcool. Ainsi l'inactivation conditionnelle de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA endothélial se traduit par une anomalie à long terme du positionnement des interneurons GABA présents dans les couches corticales II-IV et reproduit certains effets de l'alcoolisation *in utero*, plaidant à nouveau en faveur d'une contribution vasculaire dans les anomalies neurodéveloppementales induites par l'alcool (11,12).

## **Alcool et dysfonction placenta-cerveau**

C'est la caractérisation moléculaire des anomalies de l'angiogenèse cérébrale induite par l'alcoolisation *in utero* qui a conduit à envisager un lien fonctionnel « Placenta-Cerveau ». En effet, les données obtenues chez l'humain et la souris ont révélé que la désorganisation de la vascularisation cérébrale était associée à une diminution importante de l'expression du récepteur Flt-1 ainsi qu'à une dérégulation de l'expression placentaire du PLGF (12). Flt-1 est l'unique récepteur du PLGF, un membre de la famille du VEGF<sub>A</sub>. Le fait que le PLGF soit très faiblement exprimé au niveau cérébral alors qu'*a contrario* il est très exprimé par le placenta et qu'il existe également sous forme circulante, a suggéré

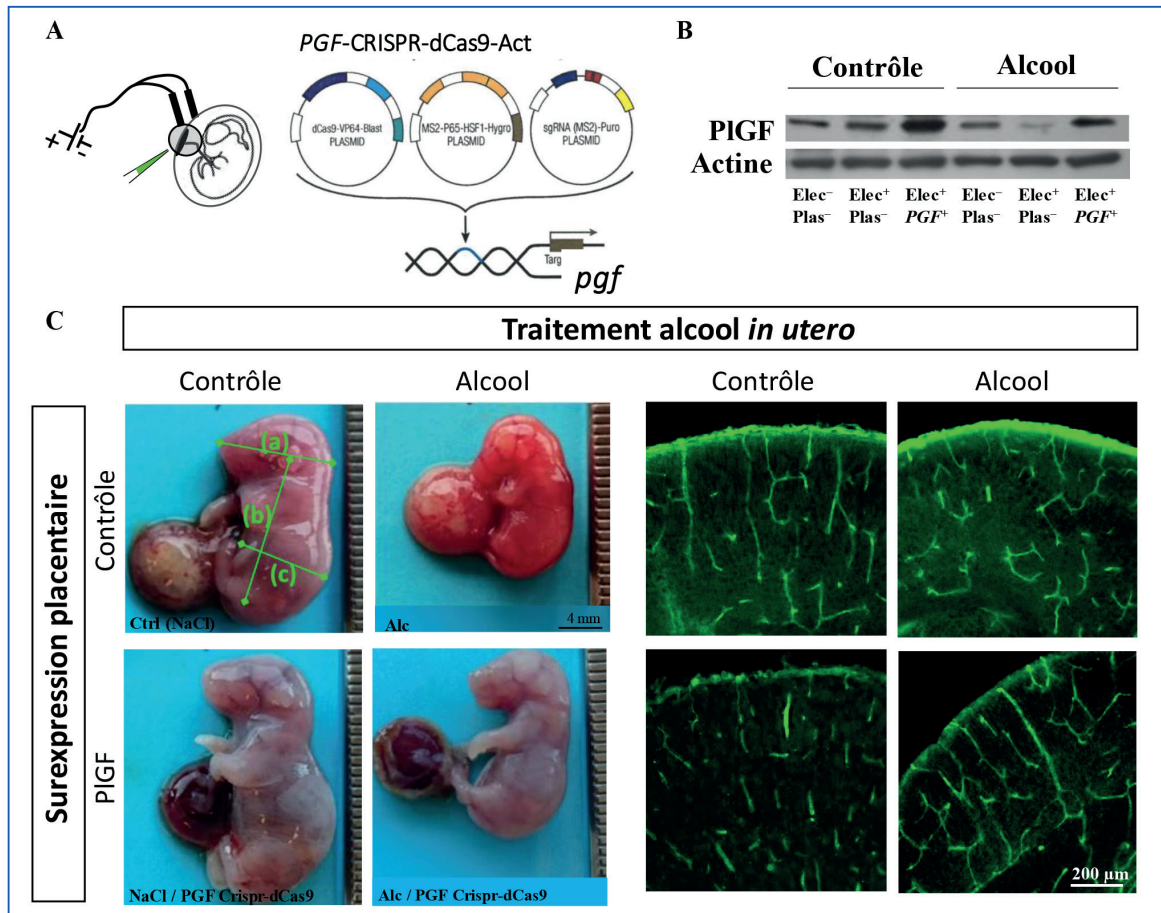
que le PLGF d'origine placentaire pourrait être impliqué dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale du fœtus et que son expression pourrait être altérée par une consommation d'alcool au cours de la grossesse. Le premier argument en faveur d'un tel axe fonctionnel « Placenta-Cerveau » a été apporté chez l'Homme par la démonstration d'une corrélation marquée entre les anomalies vasculaires placentaires et la désorganisation des microvaisseaux corticaux de fœtus exposés *in utero* à l'alcool (11). En d'autres termes, plus la vascularisation placentaire est affectée par l'alcoolisation, plus la désorganisation des vaisseaux corticaux du fœtus est importante (figure 3 ; 12). Chez le rongeur, la répression de l'expression placentaire du PLGF, par une stratégie ARN interférence couplée à l'électroporation placentaire *in utero*, entraîne une désorganisation importante des vaisseaux intracorticaux fœtaux (12). Il apparaît donc qu'une dysfonction placentaire ciblant le PLGF mime, au moins en partie, les anomalies corticales de l'angiogenèse cérébrale induites par une alcoolisation *in utero*. Réciproquement, des expériences dites de *rescue* ont mis en évidence que la surexpression du gène *pgf* au niveau placentaire par une stratégie Crispr/Cas9 SAM (*synergic activation mediator*) corrige les anomalies de l'angiogenèse corticale induites par l'alcool (Figure 4 ; 12). Enfin, en accord avec ces résultats, les travaux collaboratifs des groupes de Barbara Croy au Canada et de Peter Carmeliet en Belgique indiquent que l'inactivation non conditionnelle du gène *pgf* se traduit par une désorganisation des microvaisseaux corticaux et qu'une supplémentation néonatale en PLGF, est en mesure de modifier le phénotype comportemental de ces animaux (13).



**Figure 3** - Chez l'humain, la consommation d'alcool au cours de la grossesse se traduit par une altération de la vascularisation placentaire et une désorganisation des microvaisseaux radiaux corticaux. Ainsi, contrairement au groupe Témoin, les placentas provenant de mères ayant consommé de l'alcool au cours de la grossesse présentent des vaisseaux au sein des villosités chorionales dont la lumière est fortement réduite (flèches). De même, les cerveaux des fœtus issus de mères ayant consommé de l'alcool au cours de la grossesse présentent des microvaisseaux corticaux dont l'organisation radiale est fortement altérée (tête de flèche). SG : semaine gestationnelle. Source Lecuyer et al., 2017.

## **Facteurs angiogéniques placentaires et biomarqueurs de troubles du neurodéveloppement**

En cas de suspicion d'alcoolisation fœtale, les biomarqueurs existants (volume globulaire moyen, GammaGT, esters éthyliques d'acides gras...) peuvent être recherchés chez la femme enceinte ou chez le nouveau-né et visent donc à répondre aux questions suivantes : la mère a-t-elle consommé de l'alcool durant la grossesse ou, l'enfant a-t-il été exposé *in utero* à l'alcool ? Néanmoins, tous les enfants exposés *in utero* à l'alcool ne développeront pas nécessairement de troubles alors qu'une exposition même modérée ou ponctuelle peut entraîner une déviation de la trajectoire neurodéveloppementale normale de l'enfant. On aborde ainsi toute la complexité de la neurotoxicité de l'alcool pour laquelle il n'existe pas de dose seuil établie et dont les effets vont s'exprimer différemment en fonction du mode de consommation, du stade de développement du fœtus, du degré de maturation cérébrale et des polymorphismes génétiques. Cette notion de fenêtre de vulnérabilité va d'ailleurs au-delà de la période fœtale avec des modifications épigénétiques pouvant impacter à long terme l'activité cérébrale et le comportement de l'individu (8). Ainsi, bien que nécessaires, les biomarqueurs d'exposition ne permettent pas d'établir un diagnostic précoce des enfants TCAF. Face à la limite diagnostique de ces biomarqueurs (3), plusieurs groupes de recherche ont mis en place de nouvelles stratégies ciblant l'identification de biomarqueurs d'effets (4, 12). Compte-tenu, i) des avancées récentes sur la contribution du PLGF d'origine placentaire



**Figure 4** - Chez la souris, la surexpression placentaire du PLGF modifie la croissance fœtale et l'orientation des microvaisseaux corticaux. **A** : Stratégie associant les approches d'électroporation *in utero* placentaire et Crispr/Cas9 SAM (synergic activation mediator) pour surexprimer le PLGF au niveau placentaire. **B** : Western blot illustrant la surexpression placentaire du PLGF chez des animaux non traités (Contrôle) ou exposés *in utero* à l'alcool (Alcool). Elec<sup>-</sup>/Plas<sup>-</sup> : Pas d'électroporation/Pas de plasmide contrôle ; Elec<sup>+</sup>/Plas<sup>-</sup> : Electroporation/Plasmide contrôle ; Elec<sup>+</sup>/PGF<sup>+</sup> : Electroporation/Plasmide PGF. **C** : La surexpression du PLGF placentaire génère des fœtus macromorphes (taille de la tête (a), longueur du corps (b), largeur de l'abdomen (c) ; âge E20). À l'inverse, l'exposition *in utero* à l'alcool au cours de la dernière semaine gestationnelle induit comme chez l'humain un retard de croissance. La surexpression placentaire de PLGF corrige partiellement le retard de croissance induit par l'alcool. Au niveau cérébral, la visualisation de la vascularisation corticale (immunomarquage CD31) montre que l'alcoolisation *in utero* désorganise les microvaisseaux chez le fœtus à E20. La surexpression du PLGF au niveau placentaire corrige cette désorganisation. Source (12).

dans le contrôle de l'angiogenèse cérébrale du fœtus, *ii*) du rôle majeur des microvaisseaux dans le guidage et le positionnement de certaines populations cellulaires nerveuses, *iii*) de l'impact d'une supplémentation périnatale en PLGF, sur les phénotypes cellulaire et comportemental chez l'animal, le PLGF, se positionne comme un premier membre possible des biomarqueurs d'effets pour le diagnostic précoce d'atteintes cérébrales dans un contexte d'alcoolisation *in utero* (brevet Université-CHU-Inserm FR1555727/PCT2016; brevet Université-CHU-Inserm FR1661813/PCT2017; brevet Université-CHU-Inserm FR1854634/PCT2019).

[bruno.gonzales@univ-rouen.fr](mailto:bruno.gonzales@univ-rouen.fr)  
[stephane.marret@chu-rouen.fr](mailto:stephane.marret@chu-rouen.fr)

#### RÉFÉRENCES

- (1) Popova S, Lange S, Probst C, Gmel G, Rehm J. (2017). Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 5, e290-e299.
- (2) World Health Organization. Global status report on alcohol and health. [https://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/gsr\\_2018/en](https://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/gsr_2018/en) 2018.
- (3) Wozniak JR, Riley EP, Charness ME. (2019). Clinical presentation, diagnosis, and management of fetal alcohol spectrum disorder. *Lancet Neurol* doi: 10.1016/S1474-4422(19)30150-4.
- (4) Bakhireva LN & Savage DD. (2011). Focus on: biomarkers of fetal alcohol exposure and fetal alcohol effects. *Alcohol Res Health* 34, 56-63.
- (5) Brownell M, Enns JE, Hanlon-Dearman A, Chateau D, Phillips-Beck W, Singal D, MacWilliam L, Longstaffe S, Chudley A, Elias B, Roos N. (2018). Health, social, education, and justice outcomes of Manitoba first nations children diagnosed with fetal alcohol spectrum disorder: A population-based cohort study of linked administrative data. *Can J Psychiatry* 64 (9), 611-620. doi: 10.1177/0706743718816064.
- (6) Lemoine P, Harousseau H, Borteyru JP, Menuet JC. (1968). Les enfants de parents alcooliques. Anomalies observées. À propos de 127 cas. *Ouest-Médical* 25, 476-482.
- (7) Jones KL, Smith DW. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 302, 999-1001.
- (8) Laufer BI, Chater-Diehl EJ, Kapalanga J, Singh SM. (2017) Long-term alterations to DNA methylation as a biomarker of prenatal alcohol exposure: From mouse models to human children with fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol* 60, 67-75
- (9) Jégou S, El Ghazi F, de Lendeu PK, Marret S, Laudenbach V, Uguen A, Marcorelles P, Roy V, Laquerrière A, Gonzalez BJ. (2012). Prenatal alcohol exposure affects vasculature development in the neonatal brain. *Ann. Neurol.* 72, 952-960.
- (10) Tsai HH, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, Tien AC, Kuo CJ, Chan JR, Daneman R, Fancy SP. (2016). Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 351, 379-384.
- (11) Léger C, Dupré N, Aligny C, Bénard M, Lebon A, Henry V, Hauchecorne M, Galas L, Frebourg T, Leroux P, Vivien D, Lecointre M, Marret S, Gonzalez B J (2019). Glutamate controls vessel-associated migration of GABA interneurons from the pial migratory route via NMDA receptors and endothelial protease activation. *Cell Mol Life Sci.* doi: 10.1007/s00018-019-03248-5.
- (12) Lecuyer M, Laquerrière A, Bekri S, Lesueur C, Ramdani Y, Jégou S, Uguen A, Marcorelles P, Marret S, Gonzalez BJ. (2017) PLGF, a placental marker of fetal brain defects after *in utero* alcohol exposure. *Acta Neuropathol. Commun.* 5, 44.
- (13) Kay VR, Cahill LS, Hanif A, Sled JG, Carmeliet P, Tayade C, Croy BA (2019). Adult Pgf<sup>-/-</sup> mice behaviour and neuroanatomy are altered by neonatal treatment with recombinant placental growth factor. *Sci. Rep.* 9, 9285.