Décryptage

LES MICROBIOTES HUMAINS : VERS DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DE SURVEILLANCE BIOLOGIQUE ?

Les découvertes constantes et récentes en recherche sur la biologie des organismes montrent que l'être humain, comme tout animal, abrite une multitude d'organismes formant un écosystème, dont il est la résultante. La recherche en santé au travail doit donc investiguer le domaine des microbiotes, car elle pourra probablement y trouver des marqueurs d'exposition ou d'effets, disponibles à partir de prélèvements peu ou non invasifs.

HUMAN MICROBIOTA: POTENTIAL FOR NEW BIOLOGICAL MONITORING BIOMARKERS
The recent ongoing discoveries in organismal biology research reveal that human beings, like all animals, are in fact an ecosystem, host to a multitude of organisms. Occupational health research must therefore investigate the field of microbiota, which could represent a source of markers of exposure or effects detectable following low- or non-invasive sampling.

CHRISTIAN DARNE, LAURENT GATÉ
INRS, département Toxicologie et biométrologie

La prise en compte de l'ensemble des composantes qui constituent un être humain est une voie pour mieux le protéger en toutes circonstances et en particulier au travail. En matière de prévention, les apports scientifiques ouvrent des perspectives, parfois lointaines, pour améliorer la préservation de la santé au travail. Ces pistes, dont certaines ont été évoquées précédemment [1-2], peuvent être complétées par d'autres champs à investiguer. Parmi eux, les microbiotes*[1] humains sont de mieux en mieux décrits et étudiés.
Cet article a pour objectif de préciser (voire de repositionner) ce qu'est un organisme humain tel que la science le voit, et de fournir quelques données permettant d'ouvrir la réflexion sur l'étude des microbiotes humains comme marqueurs d'exposition ou d'effet, utiles en santé au travail.

Les microbiotes humains, l'autre partie de nous-même

L'être humain est multiple et divers dans sa composition cellulaire ; c'est un holobionte* *(Cf. Encadrés 1 et 2)*. Aussi, des pistes de réflexions s'ouvrent quand il s'agit de préserver sa santé, particulièrement au travail. Nos diverses composantes humaines et microbiennes étant toutes sensibles à l'environnement extérieur, elles réagissent à la présence de polluants, d'agents chimiques ou physiques. Cela en fait autant de sentinelles potentielles, utilisables pour la surveillance en milieu de travail, comme de potentiels indicateurs d'exposition ou d'effet.
Cette autre composante de l'humain qu'est la composante microbienne est de mieux en mieux connue, son fonctionnement mieux compris et sa nécessaire présence également.
Dans chaque organisme humain vivant, il y a plus de cellules non humaines que de cellules humaines (entre 1,5 et 10 fois plus selon les estimations) et, du fait d'une grande variété d'espèces présentes (entre 300 et 400 connues), il est estimé que 150 fois plus de gènes non humains que de gènes humains s'expriment en chacun de nous[2].
Cette symbiose est consubstantielle de l'être humain. Si sa présence avant la naissance n'est pas encore totalement déterminée, le microbiote apparaît dès la naissance *via* un transfert de micro-organismes vaginaux et intestinaux de la mère à l'enfant. Par la suite, la respiration et le contact de la peau avec l'environnement enrichissent la flore microbienne. La lactation complète le transfert mère – enfant, puis →

ENCADRÉ 1

L'HUMAIN : UN HOLOBIONTE

On peut caractériser l'humanité comme la conjonction d'un homme et d'une femme, dotés d'appareils reproducteurs leur permettant d'engendrer de nouvelles générations, comme des entités « fermées », étanches à l'environnement, construites à partir d'un ADN* humain, propre à chaque individu grâce à la fécondation et à la maternité. Les travaux de recherche scientifique montrent tout au contraire la complexité de l'être humain, sa diversité, et permettent de revenir sur cette vision réductrice et inexacte. Les travaux présentés ici permettent d'illustrer cette complexité.

• Le sexe n'est pas binaire, et chacun de nous contient des cellules qu'il est parfois difficile d'attribuer à l'un des deux sexes [1]. L'Organisation des nations unies rapporte qu'environ 1,7 % de la population mondiale nait avec des caractéristiques intersexuées.

• L'environnement nous façonne au travers de la fine régulation de nos gènes qu'il accomplit (études d'épigénétique [2]) et induit de subtiles variations dans les organismes.

• Le paradigme qui veut que chaque individu soit composé uniquement de cellules issues de la fécondation et possédant leur propre ADN, un génome unique, n'est plus valable.
Des transferts de cellules se produisent entre la mère et l'enfant, plus rarement entre embryons à vivre ou non. Ainsi, nous possédons des cellules de nos frères et sœurs plus âgés, de notre mère…, pourvues de leur génome propre. Ces cellules sont parfaitement intégrées et fonctionnelles dans notre organisme [33].

• Nous sommes et continuons d'être le fruit d'adaptations.
Les génomes des organismes vivants ont évolué, incorporant autant de séquences ADN « étrangères » qui leur étaient bénéfiques. Nombre de séquences de notre génome proviennent de l'intégration de séquences bactériennes ou virales. On estime que 8 % à 10 % des séquences ADN « humaines » sont d'origine retrovirale* [34]. Les mitochondries de nos cellules proviennent d'un ancêtre de protéobactérie intégré aux cellules eucaryotes et possèdent leur propre génome. Le développement placentaire chez les mammifères [35] est possible notamment grâce à des gènes codant pour une protéine de l'enveloppe des rétrovirus, ce qui permet ainsi l'implantation au niveau utérin.

• Enfin, si la notion de symbiose* est connue depuis longtemps pour le monde microbien et celui des plantes, elle s'applique probablement d'une façon générale à tous les êtres vivants, dont les humains, qui ne sont pas exempts de microbes, ni parfaitement étanches à l'environnement. Différents microbiotes nous constituent et nous sont indispensables, même si des barrières physiques nous séparent.
Tous ces éléments font des humains des holobiontes*, dans lesquels la composante humaine est indissociable de la composante microbienne.
On notera que cela peut questionner le paradigme « du soi et du non-soi » de l'immunologie. La notion de cohabitation avec des populations microbiennes et la présence de cellules « héritées » obligent à voir le système immunitaire, plutôt comme un « ministère de l'Intérieur » chargé d'une fonction de police, que comme un « ministère de la Défense », doté d'une armée de soldats.

viennent ensuite les apports en micro-organismes *via* la nutrition notamment. Ainsi, dès la naissance, nous sommes composés de cellules humaines, de bactéries, de champignons et de virus.
On retrouve ces organismes « non humains » dans l'estomac, l'intestin, les voies respiratoires (bouche, nez, poumon), le lait maternel, le vagin, le sperme et sur la peau [3-5]. Autant de micro-organismes qui vivent avec nous et participent à notre bon état de santé car ils présentent une grande activité métabolique, nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme.
Une exposition à des agents chimiques ou physiques peut conduire à la modification ou à un déséquilibre de ces populations (dysbiose*) et être ainsi à l'origine de pathologies.

Les microbiotes, acteurs indispensables de la transformation (métabolisation) des substances chimiques

Les réactions enzymatiques induites par les microbiotes ont été étudiées principalement au niveau du microbiote intestinal et dans le cas de traitements médicamenteux [6]. Au-delà de cet aspect pharmacologique, au niveau gastro-intestinal, le microbiote participe largement à la digestion des nutriments et produit ainsi des métabolites absorbés par l'organisme comme sources énergétiques : production de sucres, hydrolyse d'acides gras ; clivage des protéines en peptides (molécules comprenant quelques acides aminés) assimilables, et de la choline en métabolites intervenant dans la neurotransmission par exemple [7].
Cette nécessité d'un métabolisme microbien a été illustrée par les travaux de Bäckhed *et al.* en 2004. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que la transplantation de matière fécale de souris conventionnelles à des souris axéniques* restaurait le poids de ces dernières, alors qu'elles présentaient à l'origine un déficit en graisse de 42 % [8]. D'autre part, une analyse basée sur la spectrométrie de masse du sérum de souris « sans germe » et de celui de souris conventionnelles montre qu'un grand nombre d'espèces chimiques trouvées dans la circulation systémique provient du microbiote gastro-intestinal et qu'au moins 10 % de tous les métabolites sanguins détectables varient en concentrations d'au moins 50 % entre les deux lignées de souris [9].

Les microbiotes, acteurs de l'immunité

Outre son rôle dans le métabolisme de l'organisme humain, le microbiote intervient également dans le bon fonctionnement du système immunitaire. Non seulement la présence de ces micro-organismes n'engendre pas de réaction immunitaire chez un sujet sain, mais, de par leur présence, bactéries, virus et champignons participent à la défense de l'organisme [10]. Par ailleurs, des métabolites tels que les

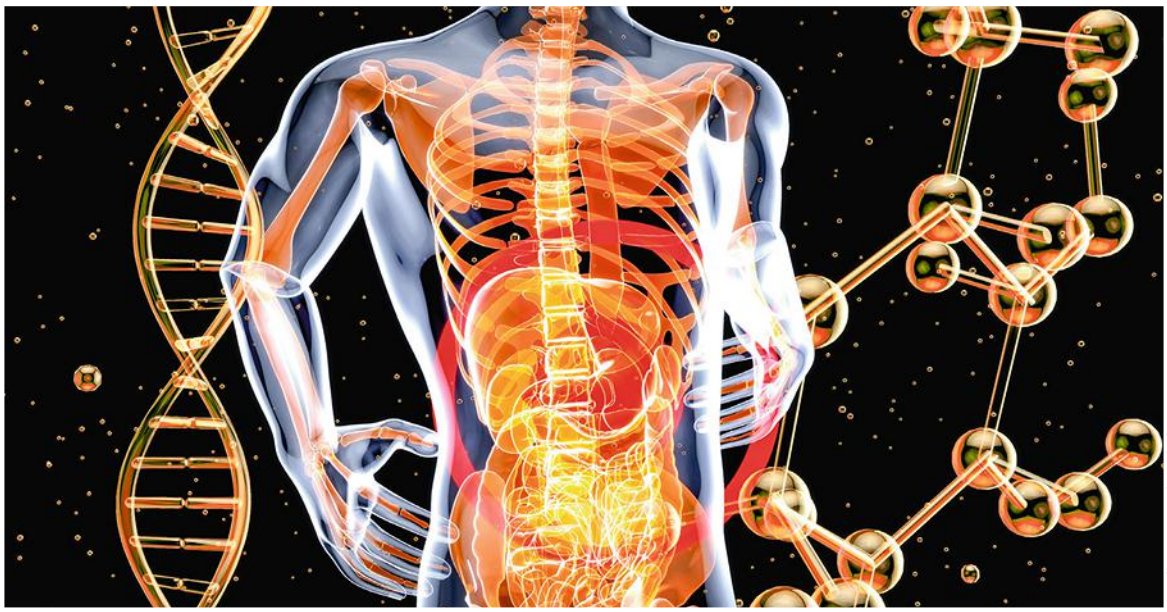
acides gras à chaîne carbonée courte, produits par le microbiote, interviennent dans la fonctionnalité des cellules du système immunitaire comme les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, les cellules dendritiques, les cellules B et T [11].
Il a été également montré que la présence du microbiote intestinal était nécessaire pour l'éducation des cellules *Natural killer*[3] et, qu'ainsi, elle aidait à prévenir les pathologies inflammatoires de l'intestin, ou encore l'asthme [12].
De ces quelques exemples, qui indiquent le rôle clé des microbiotes dans le fonctionnement de nos organismes, résulte une évidence : toute dysbiose* peut conduire à l'apparition de pathologies plus ou moins graves. Ainsi, des liens entre composition intestinale en bactéries ou virus symbiotiques et l'apparition de diabète de type II, de cancer colorectal, de cancer de la prostate, d'obésité ou de maladies neurodégénératives ont pu être établis ou suspectés [13, 14].
Parmi les facteurs pouvant conduire à une dysbiose susceptible d'avoir des répercussions physiopathologiques, on retrouve de nombreux produits chimiques présents en milieu professionnel.

Les microbiotes sous influence des expositions professionnelles

Les expositions professionnelles sont susceptibles d'impacter les microbiotes humains, avec pour conséquences d'éventuels effets délétères sur la santé. L'impact sur le microbiote intestinal des xénobiotiques* est le domaine où la connaissance est la plus avancée.
Les métaux lourds, tels que le cadmium, le chrome, l'arsenic, le plomb ou le nickel, entraînent des altérations marquées de la composition du microbiote intestinal chez la souris. Cela se traduit par la perte de bactéries commensales (symbiotiques) au profit de bactéries pathogènes, provoquant une inflammation chronique, du stress oxydant, une modification du métabolisme microbiotique qui conduisent à une inflammation hépatique, à de l'obésité et à un phénotype* de type diabétique [15].

ENCADRÉ 2
GLOSSAIRE

- **ADN :** Acide désoxyribonucléique. Macromolécule contenant l'information génétique de l'organisme.
- **ARN :** Acide ribonucléique. Macromolécule découlant de la transcription de l'ADN et « codant » pour la synthèse des protéines de l'organisme.
- **ATP :** L'adénosine triphosphate (ATP) est une molécule essentielle pour emmagasiner et transporter l'énergie nécessaire aux réactions chimiques de l'organisme.
- **Axénique :** Dépourvu de germe, de micro-organisme.
- **Dysbiose :** Déséquilibre / altération du microbiote.
- **Holobionte :** Entité vivante constituée d'un organisme supérieur et de micro-organismes associés.
- **Métabolome :** Ensemble des métabolites (produits issus de la transformation biochimique d'une substance) présents dans un organisme, un tissu ou une cellule.
- **Microbiote humain :** Ensemble des micro-organismes vivant au contact, ou dans, un organisme humain.
- **Phénotype :** Ensemble des caractéristiques observables d'un organisme.
- ***Quantum dots* :** Nanoparticules manufacturées dotées de propriétés physico-chimiques particulières.
- **Rétrovirus :** Organisme viral dont le matériel génétique est un ARN (et non de l'ADN comme dans les autres cellules).
- **Symbiose :** Association mutualiste entre plusieurs organismes, indispensable à leur survie.
- **Xénobiotique :** Substance chimique étrangère à un organisme.



© Julien Tromeur/Unsplash

Les pesticides, dont les organophosphorés, présentent des effets similaires [15]. Condette *et al.* ont montré qu'une exposition de rates aux organophosphorés pendant la gestation modifiait la composition du microbiote intestinal et celle du lait maternel. On peut supposer que les effets observés chez la mère gestante peuvent se propager sur la descendance lors de la transmission des microbiotes [16-17].

Les microplastiques s'accumulent dans l'intestin et provoquent de l'inflammation, ainsi qu'un dysfonctionnement de la barrière intestinale. Ils modifient aussi la composition de la flore intestinale, ce qui induit un changement dans le métabolisme de l'intestin et du cerveau [18]. Le bisphénol A et les particules atmosphériques provoquent de la même façon des réponses inflammatoires, une altération du microbiote et des modifications métaboliques [19-20].

Au niveau pulmonaire, l'implication du microbiote dans l'apparition de pathologies après exposition à des substances chimiques est de mieux en mieux documentée [21-22]. Par exemple, des nanoparticules d'oxyde de nickel altèrent la composition du microbiote pulmonaire et entraînent une réponse inflammatoire médiée par les neutrophiles et les lymphocytes [23]. Des *quantum dots** de carbone provoquent une dysbiose intestinale et pulmonaire liée à la réponse inflammatoire systémique et neurologique, mettant ainsi en évidence le rôle important de la perturbation du microbiote dans la neurotoxicité de ces particules [24].

Ces quelques exemples montrent que de nombreuses substances modifient les microbiotes et, à travers eux, le métabolisme et les réactions immunitaires, ce qui peut engendrer des effets délétères sur l'organisme. L'environnement et les expositions professionnelles peuvent interagir avec les microbiotes. De nombreux secteurs d'activité sont potentiellement concernés. En 2022, Mucci *et al.* ont dressé une revue des secteurs ou des profils professionnels dont les données sont les plus consolidées à ce jour : travaux au contact des animaux (agriculture), métiers du soin à la personne (personnel de santé), métiers de la métallurgie (contact avec les fluides de coupe et de lubrification), métiers exposant aux poussières (tunneliers, carrières…), aux pesticides, métiers halieutiques, travailleurs de nuit, figurent parmi les professions et situations de travail identifiées. L'analyse des modifications des microbiotes des salariés concernés pourrait constituer un biomarqueur des expositions, non invasif (recueil de selles, prélèvements buccal ou nasal, de surface de la peau…), utile en prévention et en surveillance médicale, comme le soulignent les auteurs [25]. Ces microbiotes (intestinal, buccal, dermique…) peuvent ainsi constituer un terrain pour la recherche de marqueurs d'exposition ou d'effets.

Les microbiotes : vers une recherche de marqueurs d'exposition / d'effets

Grâce aux techniques de séquençage d'ADN à haut débit et à celles dédiées à l'analyse du métabolome* [26], la composition et le fonctionnement de nos microbiotes sont de mieux en mieux connus. Les liens entre dysbiose et pathologies sont de mieux en mieux décrits et il est parfois possible de mettre en évidence une exposition grâce à l'apparition d'une dysbiose.

Zhao *et al.* ont ainsi montré que l'exposition de souris au chlorpyrifos (pesticide organophosphoré) pouvait être mise en évidence par la mesure d'altérations des métabolites urinaires associés au métabolisme des acides aminés, de l'énergie (ATP*), des acides gras à chaîne courte, des dérivés phénylés et des acides biliaires. Ces perturbations sont corrélées avec une modification significative du microbiote intestinal [27].

Zhang *et al.* indiquent que l'identification des bactéries *Clostridiales* dans le microbiote pulmonaire peut être un marqueur d'une exposition à certaines $PM_{2.5}$ – ici, des particules fines de diamètre inférieur ou égal à 2,5 µm, dont les ions solubles qu'elles contiennent sont majoritairement des nitrates ($PM_{2.5}$-NO^{3-}) [28] –, et Jeong *et al.* ont montré que l'augmentation de bactéries *Burkholderiales* est un marqueur d'une exposition aux nanoparticules d'oxyde de nickel [23].

Cependant, la connaissance des microbiotes et l'établissement des liens entre dysbiose et pathologie permettent d'aller plus loin. Par exemple, si le lien entre maladies mentales (anxiété, dépression) et altération du microbiote a été démontré [29], l'expérimentation de traitements nouveaux afin de rétablir ce microbiote (utilisation de probiotiques) indique qu'il est possible de corriger certains effets néfastes [30]. C'est, actuellement, un sujet en plein développement [31].

Conclusion

Pris dans leur ensemble, ces éléments indiquent que la recherche en santé au travail doit investiguer le domaine des microbiotes. L'être humain est la résultante d'une multitude d'organismes formant un écosystème. Chacune de ces composantes est à considérer pour y trouver des marqueurs d'exposition, si ce n'est des marqueurs d'effets, à partir de prélèvements peu ou non invasifs.

Tout ou presque reste cependant à faire pour les acteurs de la prévention (INRS, laboratoires des Carsat, services de prévention et de santé au travail : SPST…), mais les techniques sont disponibles et les pôles d'expertise existent dans la recherche académique et médicale. Les stratégies restent à élaborer : sélectionner les substances chimiques, développer les approches expérimentales, développer et valider des méthodes de prélèvements, des

méthodes d'analyse, peut-être de nouveaux outils, et identifier les éventuels biais d'analyse ou effets de facteurs confondants [32].

1. Les termes suivis d'un astérisque sont explicités dans le glossaire (p. 7).

2. Chaque cellule contient du matériel génétique (ADN ou ARN, gènes) qui s'exprime notamment par la synthèse de protéines (molécules biologiquement actives).

3. Les macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules dendritiques, B, T et Natural killer *sont des leucocytes (globules blancs fabriqués par, et circulant dans l'organisme), chacun étant spécialisé dans une ou plusieurs fonctions précises de la réponse et de la protection de l'organisme vis-à-vis d'un événement considéré comme hostile : reconnaissance, neutralisation/destruction, « appel » à d'autres cellules de défense, etc.*

BIBLIOGRAPHIE

[1] Darne C., Seidel C. *et al.* – Recherche en santé au travail : prise en compte du sexe dans les études de toxicologie. *Hygiène & sécurité du travail,* 2024, 276, pp. 5-11.

[2] Darne C., Seidel C., Gaté L. – Les modifications épigénétiques : potentiels biomarqueurs d'effet d'une exposition professionnelle ? *Hygiène & sécurité du travail,* 2024, 275, pp. 105-111.

[3] Man W.H. *et al.* – The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat Rev Microbiol,* 2017, 15 (5), pp. 259-270.

[4] Mändar R. *et al.* – Complementary seminovaginal microbiome in couples. *Res Microbiol,* 2015, 166 (5), pp. 440-447.

[5] Martínez J.E. *et al.* – Human microbiota network: unveiling potential crosstalk between the different microbiota ecosystems and their role in health and disease. *Nutrients,* 2021, 13 (9).

[6] Haiser H.J., Turnbaugh P.J. – Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacol Res,* 2013, 69 (1), pp. 21-31.

[7] Adak A., Khan M.R. – An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci,* 2019, 76 (3), pp. 473-493.

[8] Bäckhed F. *et al.* – The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA,* 2004, 101 (44), pp. 15718-23.

[9] Wikoff W.R. *et al.* – Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA,* 2009, 106 (10), pp. 3698-3703.

[10] Kim Y.G. *et al.* – Neonatal acquisition of Clostridia species protects against colonization by bacterial pathogens. *Science,* 2017, 356 (6335), pp. 315-319.

[11] Postler T.S., Ghosh S. – Understanding the holobiont: how microbial metabolites affect human health and shape the immune system. *Cell Metab,* 2017, 26 (1), pp. 110-130.

[12] Olszak T. *et al.*– Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science,* 2012, 336 (6080), pp. 489-93.

[13] El-Sayed A. *et al.* – Microbiota's role in health and diseases. *Environ Sci Pollut Res Int,* 2021, 28 (28), pp. 36967-36983.

[14] Xia B. *et al.* – The human microbiome links to prostate cancer risk and treatment (review). *Oncol Rep,* 2023, 49 (6), p. 5.

[15] Feng P. *et al.* – A review on gut remediation of selected environmental contaminants: possible roles of probiotics and gut microbiota. *Nutrients,* 2018, 11 (1).

[16] Joly-Condette C. *et al.* – Chlorpyrifos exposure during perinatal period affects intestinal microbiota associated with delay of maturation of digestive tract in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr,* 2015, 61 (1), pp. 30-40.

[17] Joly-Condette C. *et al.*– Increased gut permeability and bacterial translocation after chronic chlorpyrifos exposure in rats. *PLoS One,* 2014, 9 (7), p. e102217.

[18] Lee S.H. *et al.* – Microbiota-mediated metabolic perturbations in the gut and brain of mice after microplastic exposure. *Chemosphere,* 2024, 350, p. 141026.

[19] Hong T. *et al.* – Bisphenol A induced hepatic steatosis by disturbing bile acid metabolism and FXR/TGR5 signaling pathways via remodeling the gut microbiota in CD-1 mice. *Sci Total Environ,* 2023, 889, p. 164307.

[20] Kish L. *et al.* – Environmental particulate matter induces murine intestinal inflammatory responses and alters the gut microbiome. *PLoS One,* 2013, 8 (4), p. e62220.

[21] Utembe W., Kamng'ona A.W. – Inhalation exposure to chemicals, microbiota dysbiosis and adverse effects on humans. *Sci Total Environ,* 2024, 955, p. 176938.

[22] Li R. *et al.* – Lung microbiome: new insights into the pathogenesis of respiratory diseases. *Signal Transduct Target Ther,* 2024, 9 (1), p. 19.

[23] Jeong M.J. *et al.* – Exposure to nickel oxide nanoparticles induces acute and chronic inflammatory responses in rat lungs and perturbs the lung microbiome. *Int J Environ Res Public Health,* 2022, 19 (1).

[24] Wu T. *et al.* – Pulmonary microbiota disruption by respiratory exposure to carbon quantum dots induces neuronal damages in mice. *J Hazard Mater,* 2025, 487, p. 137255.

[25] Mucci N. *et al.* – WORKbiota: a systematic review about the effects of occupational exposure on microbiota and workers' health. *Int J Environ Res Public Health,* 2022, 19 (3).

[26] Habchi B., Remy A. – Un nouvel outil pour l'analyse des polyexpositions chimiques professionnelles : la métabolomique non ciblée. *Hygiène & sécurité du travail,* 2023, 271, pp. 5-11.

[27] Zhao Y. *et al.* – Effects of chlorpyrifos on the gut microbiome and urine metabolome in mouse *(Mus musculus). Chemosphere,* 2016, 153, pp. 287-93.

[28] Zhang J. *et al.* – Profiling microbiota from multiple sites in the respiratory tract to identify a biomarker for $PM_{(2.5)}$ nitrate exposure-induced pulmonary damages. *Environ Sci Technol,* 2023, 57 (19), pp. 7346-7357.

[29] Xiong R.G. *et al.* – The role of gut microbiota in anxiety, depression, and other mental disorders as well as the protective effects of dietary components. *Nutrients,* 2023, 15 (14).

[30] Faucher P. *et al.* – Synergistic effects of Lacticaseibacillus rhamnosus GG, glutamine, and curcumin on chronic unpredictable mild stress-induced depression in a mouse model. *Benef Microbes,* 2022, 13 (3), pp. 253-264.

[31] Inrae – *INRAE et MaaT Pharma concrétisent le succès de leur partenariat historique : entrée en essai clinique de phase 3 du candidat-médicament MaaT013.* Accessible sur: https://www.inrae.fr/dossiers/microbiote-intestinal-notre-nouvel-allie-sante/microbiote-decouvertes-decouvertes

[32] National Academy of Sciences – *Environmental chemicals, the human microbiome, and health risk: a research strategy.* Washington DC, National Academy of Sciences, 2017.

[33] Barnéoud L. – *Les cellules buissonnières : l'enfant dont la mère n'était pas née et autres folles histoires du microchimérisme.* Premier Parallèle, 2023.

[34] Gifford R., Tristem M. – The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes,* 2003, 26 (3), pp. 291-315.

[35] Dupressoir A., Lavialle C., Heidmann T. – From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta,* 2012, 33 (9), pp. 663-671.