



HAL
open science

**Etude de la vascularisation utéro-placentaire par
angiographie Doppler énergie tridimensionnelle :
évaluations fondamentales de la technique sur modèles
expérimentaux de brebis et lapines gestantes, et
évaluations cliniques préliminaires chez la femme
enceinte**

Olivier Morel

► **To cite this version:**

Olivier Morel. Etude de la vascularisation utéro-placentaire par angiographie Doppler énergie tridimensionnelle : évaluations fondamentales de la technique sur modèles expérimentaux de brebis et lapines gestantes, et évaluations cliniques préliminaires chez la femme enceinte. Biologie du développement. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T004 . tel-00713921

HAL Id: tel-00713921

<https://theses.hal.science/tel-00713921>

Submitted on 3 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris XI

Ecole Doctorale 149 - Signalisation et Réseaux intégratifs en Biologie

Année 2010-2011

Thèse

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Sciences de la Vie, Biologie, Santé – Reproduction et Développement

Présentée et soutenue par

Olivier Morel

Le 18 janvier 2012

Titre :

Etude de la vascularisation utéro-placentaire par angiographie Doppler énergie tridimensionnelle

Evaluations fondamentales de la technique sur modèles expérimentaux de brebis et lapines gestantes, et évaluations cliniques préliminaires chez la femme enceinte.

Directeurs de Thèse :

Madame le Docteur Pascale Chavatte-Palmer – Monsieur le Professeur Vassilis Tsatsaris

Jury

Madame le Docteur Danièle Evain-Brion, Présidente

Madame le Professeur Véronique Houfflin-Debarge, Rapporteur

Monsieur le Professeur Jean-François Beckers, Rapporteur

Madame le Docteur Marie-Aline Charles, Examineur

Madame le Docteur Pascale Chavatte-Palmer, Directrice

Monsieur le Professeur Vassilis Tsatsaris, Directeur

Remerciements

A Mme le Docteur Pascale Chavatte-Palmer

Vous nous avez fait l'honneur de diriger ce travail.

*Nous vous remercions pour votre accueil au sein de votre équipe,
votre enthousiasme et votre dynamisme.*

*Nous vous remercions pour vos nombreux apprentissages, votre
esprit critique et votre rigueur scientifique.*

*Nous espérons être toujours à la hauteur de la confiance que vous
nous avez accordée, et que l'avenir nous permettra de poursuivre
nos collaborations.*

*Que cette thèse soit le reflet de notre profond respect et de notre
gratitude.*

Avec toute notre amitié.

A M. le Professeur Vassilis Tsatsaris

Vous nous avez fait l'honneur de diriger ce travail.

*Nous vous remercions pour votre bienveillance, votre enthousiasme
et votre dynamisme.*

*Nous vous remercions pour vos nombreux apprentissages, votre
esprit critique et votre rigueur scientifique.*

*Nous espérons être toujours à la hauteur de la confiance que vous
nous avez accordée, et que l'avenir nous permettra de poursuivre
nos collaborations.*

*Que cette thèse soit le reflet de notre profond respect et de notre
gratitude.*

Avec toute notre amitié.

A Mme le Docteur Danièle Evain-Brion

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de présider notre Jury.

*Nous vous remercions pour votre bienveillance et votre soutien
permanents.*

*Nous espérons être toujours à la hauteur de la confiance que vous
nous avez accordée.*

*Que ce travail soit le témoignage de notre profond respect et de
notre gratitude.*

A Mme le Professeur Véronique Houfflin-Debarge

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger notre thèse.

*Nous vous remercions pour votre bienveillance et l'intérêt que vous
avez toujours porté à notre travail.*

*Que ce travail soit le témoignage de notre profond respect et de
notre gratitude.*

A M. le Professeur Jean-François Beckers

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger notre thèse.

*Nous vous remercions pour votre bienveillance, votre accueil et
l'intérêt que vous avez porté à ce travail.*

*Que ce travail soit le témoignage de notre profond respect et de
notre gratitude.*

A Mme le Docteur Marie-Aline Charles

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger notre thèse.

*Nous vous remercions pour l'intérêt que vous avez bien voulu
porter à notre travail.*

*Que ce travail soit le témoignage de notre profond respect et de
notre gratitude.*

A toute l'équipe de Biologie du Développement et de la Reproduction de l'INRA de Jouy-en-Josas

A toute l'équipe du Centre de Recherche en Imagerie Interventionnelle de l'INRA de Jouy-en-Josas, à M. Michel Bonneau

A l'équipe de la Maternité Port-Royal, à M. le Professeur Dominique Cabrol, à M. le Professeur François Goffinet, à M. le Docteur Gilles Grangé

Aux équipes des Hôpitaux de Lariboisière, Bichat, et La Pitié-Salpêtrière, à M. le Professeur Emmanuel Barranger, à Mme le Professeur Dominique Mahieu-Caputo, à M. le Docteur Jacky Nizard

A M. le Docteur Etienne Gayat

Aux étudiants qui m'ont fait confiance et que j'ai eu le plaisir et l'honneur d'encadrer, à M. Frédéric Pachy, à Mlle Lucie Guilbaud, à M. Edouard Lecarpentier, à Mlle Jie Duan, à Mlle Estelle Perdriolle-Gallet

A Cécile,

A Alexis, Léopold, Gustave et Elisabeth,

A mes parents,

A mes grands-parents,

A Benoît,

Table des matières

Liste des abréviations	17
Tableaux et Figures	23
1 Introduction générale.....	29
1.1 La vascularisation utéro-placentaire.....	29
1.1.1 La placentation humaine.....	29
1.1.2 La vascularisation utéro-placentaire	37
1.2 Défauts de vascularisation utéro-placentaire chez la femme :.....	47
Prééclampsie et restriction de croissance <i>in-utero</i> d'origine vasculaire placentaire.....	47
1.2.1 Définitions cliniques.....	48
1.2.2 Prééclampsie : Données épidémiologiques.....	51
1.2.3 Physiopathologie de la prééclampsie.....	58
1.2.4 Facteurs de risque et physiopathologie : aspects spécifiques relatifs au RCIU	64
1.2.5 Physiopathologie de la prééclampsie et du RCIU : points communs et différences	68
1.2.6 Problématique actuelle	70
1.3 Angiographie Doppler énergie tridimensionnelle (<i>PDA</i>) : intérêt potentiel pour l'étude de la vascularisation utéro-placentaire	78
1.3.1 Principes et limites du Doppler 2D.....	78
1.3.2 Intérêts potentiels de l'imagerie Doppler 3D pour l'étude de la vascularisation utéro-placentaire	82
1.3.3 Concept d'Angiographie Doppler énergie tridimensionnelle (<i>PDA</i>).....	84
1.3.4 Intérêt de l'angiographie Doppler 3D quantifiée pour l'étude de la vascularisation utéro-placentaire.....	88
1.3.5 Limites techniques – Questionnements	89
2 Objectifs de la thèse	92
3 Méthodologie générale.....	97
3.1 Acquisitions Doppler tridimensionnelles	97

3.2	Analyse des volumes	98
3.3	Choix des modèles animaux	98
3.3.1	Modèles disponibles pour la recherche en imagerie échographique périnatale	98
3.3.2	Modèles animaux de restriction de croissance <i>in utero</i>	100
3.3.3	Article publié dans la revue <i>Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France</i> : « Modèles animaux de retard de croissance intra-utérin d'origine vasculaire »	110
3.3.4	Article publié dans le cadre du Symposium ERIN – 2010 – Cracovie : « Intérêt des ruminants domestiques pour la recherche biomédicale en médecine périnatale ». En cours de soumission à la revue <i>Theriogenology</i>	117
4	Résultats acquis	129
4.1	Résultats 1 – Corrélation entre indices Doppler énergie 3D et le flux réel de perfusion utéro-placentaire : évaluation sur modèle de brebis gestante	129
4.1.1	Résumé de la méthodologie	130
4.1.2	Article publié dans la revue « <i>Ultrasound in Obstetrics and Gynecology</i> » (2010) : « <i>Correlation between uteroplacental three-dimensional power Doppler indices and true uterine blood flow: evaluation in a pregnant sheep model</i> »	137
4.2	Résultats 2 – Impact des paramètres de réglage de la machine (2D, Doppler et 3D) sur la valeur des indices utéro-placentaires à débit constant : évaluation sur modèle expérimental de brebis gestante	144
4.2.1	Introduction	145
4.2.2	Matériels et Méthode	147
4.2.3	Résultats	148
4.2.4	Discussion	157
4.3	Résultats 3 – Quantification de la vascularisation utéro-placentaire par angiographie Doppler 3D chez un modèle expérimental de retard de croissance intra-utérin chez le lapin	159
4.3.1	Résumé de la méthodologie	160
4.3.2	Article soumis à la revue <i>Radiology</i> (2011) : « <i>Quantification of utero-placental vascularization in a rabbit model of IUGR with three-dimensional power Doppler angiography</i> »	170
4.4	Résultats 4 : Quantification de la vascularisation utéro-placentaire chez la femme en cas de Prééclampsie/RCIU par <i>PDA</i> : données préliminaires.	188

4.4.1	Résumé de la méthodologie.....	189
4.4.2	Article publié dans la revue <i>The Journal of Maternal-fetal and Neonatal Medicine</i> (2010) « <i>Vascularization of the placenta and the sub-placental myometrium: feasibility and reproducibility of a three-dimensional power Doppler ultrasound quantification technique. A pilot study</i> »	193
4.5	Résultats 5 – étude de cohorte humaine prospective multi-centrique.....	201
4.5.1	Introduction	201
4.5.2	Matériel et méthode.....	202
4.5.3	Résultats	209
4.5.4	Discussion	229
5	Discussion générale.....	234
5.1	Aspects techniques fondamentaux : corrélation aux flux, impact des paramètres.....	234
5.2	Apport du Doppler dans la compréhension des modèles (RCIU).....	237
5.3	Doppler 3D : progrès acquis, quel impact pour la lecture des études cliniques ?.....	239
5.4	Courrier publié dans la revue <i>Ultrasound in Obstetrics and Gynecology</i> : « Réponse à A. Welsh concernant les aspects techniques du Doppler 3D ».....	241
5.5	Courrier publié dans la revue <i>The American Journal of Obstetrics and Gynecology</i> : « Intérêt de l'analyse d'un plus grand volume placentaire »	245
6	Perspectives.....	248
6.1	Chez l'animal	248
6.1.1	Application de la technique chez des modèles de RCIU de brebis.....	248
6.1.2	Perspectives sur modèle de RCIU chez le lapin	250
6.1.3	Apport du Doppler 3D dans l'évaluation de la fonction placentaire sur modèle de perturbation endocrinienne chez la brebis gestante (collaboration université du Michigan).....	251
6.1.4	Application du PDA pour l'étude du placenta de clone chez la vache	252
6.2	En clinique	254
6.2.1	Etude prospective de cohorte : résultats attendus chez une cohorte de patientes à haut risque	254
6.2.2	Etude Doppler 3D et morphométrie placentaire (Début des inclusions à Nancy : mai 2012)	255

6.2.3	Etude physiologique de la perfusion de la chambre intervilleuse au 1 ^{er} trimestre avec apport de produits de contraste échographiques (Début des inclusions à Nancy : septembre 2012).	256
7	Conclusion.....	259
8	Références.....	261
9	Récapitulatif des publications et communications	280
10	Soutiens financiers, partenariats industriels	282

Liste des abréviations

Liste des abréviations

3D : Tridimensionnel

3D PD : Angiographie Doppler 3D

ACOG : American College of Obstetricians and Gynecologists

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AG : Age gestationnel

ARN : Acide Ribonucléique

AUC : Area Under the Curve (courbes ROC)

AUDIPOG : Association des Utilisateurs de Dossiers Informatisés en Pédiatrie, Obstétrique et Gynécologie

BMI : Body Mass Index

CCTTIRS : Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé

CEERB : Comité de l'évaluation de l'Ethique des projets de Recherche Biomédicale

CMLV : Cellule Musculaire Lisse Vasculaire

CNIL : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés

CTEV : Cytotrophoblaste Extravilleux

CO : Monoxyde de Carbone

dB : Décibel

eNOS : NO Synthase

ERIN : European Ruminant Infrastructure Network

FI : Flow Index

GE : General Electrics

HBPM : Héparine de Bas Poids Moléculaire

hCG : Human Chorionic Gonadotrophin

HELLP : Hemolysis Elevated Liver enzymes and Low Platelets

HLA : Human Leucocyte Antigen

hPL : Human Placental Lactogen

HTA : HyperTension Artérielle

HTAg : HTA gravidique

HTG : Hypertension Artérielle Gravidique

IMC : Indice de Masse Corporelle

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ISSHP : The international Society for the Study of Hypertension in Pregnancy

LCC : Longueur Cranio Caudale

LH : Luteinizing Hormone

L-NAME : Nw-nitro-L-arginine chlorhydrate d'ester méthylique

LR : Likelihood Ratio = rapport de vraisemblance

MFI : Myometrial FI

MG : Mean Grey

Min : Minute

ml : Millilitre

MMG : Myometrial Mean Grey

mmHg : Millimètres De Mercure

MQ : Quotient myometrial

MVFI : Myometrial VFI

MVI : Myometrial VI

NHBPEP : National High Blood Pressure Education Program

NHI : National Health Institute

NO : Oxyde Nitrique / Monoxyde d'Azote

PA : Pression Artérielle

PAD : Pression Artérielle Diastolique

PAM : Pression Artérielle Moyenne

PAS : Pression Artérielle Systolique

PAPP-A : Pregnancy Associated Plasma Protein-A

PDA : Power Doppler Angiography / Angiographie Doppler Energie Tridimensionnelle

PE : Prééclampsie

PFI : Placental FI

PGH : hormone de croissance placentaire

PIGF : Placental Growth Factor

PMG : Placenta MG

PQ : Quotient Placentaire

PRF : Pulse Repetition Frequency

PV : Volume placentaire

PVFI : Placental VFI

PVI : Placental VI

PVP : Pathologie Vasculaire Placentaire

Qual 3D : Qualité 3D

RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin

ROC : Receiver Operating Characteristics

ROI : Region Of Interest

RR : Risque Relatif

SA : Semaines d'Aménorrhée

Se : Sensibilité

sFLT : Soluble fms-like tyrosine kinase-1

SOPK : Syndrome des Ovaires Polykystiques

Sp : Spécificité

TNF : Tumor Necrosis Factor

VFI : Vascularization Flow Index

VI : Vascularization Index

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VOCALTM : Virtual Organ Computer-aided AnaLysis

VOI : Volume Of Interest

Wmf : Wall Motion Filter

Tableaux et Figures

Tableaux et Figures

- Tableau 1 : paramètres de réglage pour lesquels une différence significative était observée pour au moins un des indices par rapport au réglage basal
- Tableau 2 : caractéristiques maternelles et Longueur Cranio Caudale (LCC) au moment de la réalisation de l'acquisition pour les 67 patientes à bas risques incluses
- Tableau 3 : caractéristiques des enfants
- Tableau 4 : valeurs placentaires dans les grossesses normales (n=61) au premier trimestre de la grossesse
- Tableau 5 : valeurs myométriales dans les grossesses normales (n=61) au premier trimestre de la grossesse
- Tableau 6 : situation placentaire (n et (%)) et répartition en fonction du BMI
- Tableau 7 : comparaison des valeurs placentaires (grossesses normales/ PVP)
- Tableau 8 : comparaison des valeurs myométriales (grossesses normales/ PVP)
- Figure 1: Représentation schématique des principales étapes du développement placentaire humain
- Figure 2. Structure des villosités flottantes
- Figure 3. Cytotrophoblastes extravilleux de la villosité crampon
- Figure 4. Trajets hypothétiques des trophoblastes extravilleux endovasculaires
- Figure 5. Schéma de la vascularisation artérielle de l'utérus humain non gravide

- Figure 6. Schéma de la vascularisation utéroplacentaire selon Ramsey
- Figure 7 : Shunt vasculaire myométrial sous-placentaire selon Schaaps et Tsatsaris
- Figure 8 : Utérus et placenta en échographie Doppler couleur 3D (premier trimestre)
- Figure 9 : Utérus et placenta en échographie Doppler couleur 3D (2ème moitié de grossesse)
- Figure 10 : Schéma physiopathologique classique de la prééclampsie selon Tsatsaris
- Figure 11: Schéma physiologique actuel de la prééclampsie
- Figure 12. Comparaison qualitative de la vascularisation utéro-placentaire en Doppler 3D pour une grossesse normale et dans le cadre d'une prééclampsie
- Figure 13 : Organisation des données 3D selon une répartition cartésienne
- Figure 14 : Exemple d'images obtenues grâce au mode de rendu de surface en imagerie 3D
- Figure 15 : Exemple de modes disponibles avec le logiciel VOCAL™
- Figure 16 : Tracé manuel (ici placentome de brebis) et rendu automatique des données échographiques quantifiées sous forme d'histogramme
- Figure 17 : Schéma des compartiments expérimentaux, ou concept des poupées russes
- Figure 18 : Anatomie comparée placentaire, principaux aspects macroscopiques
- Figure 19 : Ultrastructures comparées des placentas épithéliochorial et syndesmochorial
- Figure 20 : ultrastructures comparées des placentas endothéliochorial et hémochorial

- Figure 21 : impact du paramètre de réglage « gain 2D » sur la valeur des indices mesurés à débit de perfusion constant
- Figure 22 : impact du paramètre de réglage « Wmf (Wall Motion Filter) » sur la valeur des indices mesurés à débit de perfusion constant
- Figure 23 : impact du paramètre de réglage « Brillance (Rise) » sur la valeur des indices mesurés à débit de perfusion constant
- Figure 24 : impact du paramètre de réglage « PRF (Pulse Repetition Frequency) » sur la valeur des indices mesurés à débit de perfusion constant
- Figure 25 : impact du paramètre de réglage « gain Doppler (Power) » sur la valeur des indices mesurés à débit de perfusion constant
- Figure 26 : impact du paramètre de réglage « qualité 3D (Qual 3D) » sur la valeur des indices mesurés à débit de perfusion constant
- Figure 27 : circulation placentaire à contre courant chez le lapin
- Figure 28 : Synthèse et effets du NO, dialogue entre cellule endothéliale et cellule musculaire lisse
- Figure 29 : Reconstruction 3D du volume d'intérêt (ici volume placentaire)
- Figure 30 : courbe ROC du volume placentaire (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire)
- Figure 31 : courbe ROC du MG (*Mean Grey*) placentaire (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire).

- Figure 32 : courbe ROC du VI (*Vascularization Index*) placentaire (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire).
- Figure 33 : courbe ROC du FI (*Flow Index*) placentaire (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire).
- Figure 34 : courbe ROC du VFI (*Vascularization Flow Index*) placentaire (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire)
- Figure 35 : courbe ROC du volume myométrial (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire)
- Figure 36 : courbe ROC du MG (*Mean Gray*) myométrial (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire)
- Figure 37 : courbe ROC du VI (*Vascularization Index*) myométrial (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire)
- Figure 38 : courbe ROC du FI (*Flow Index*) myométrial (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire)
- Figure 39 : courbe ROC du VFI (*Vascularization Flow Index*) myométrial (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire)

Introduction générale

1 Introduction générale

1.1 La vascularisation utéro-placentaire

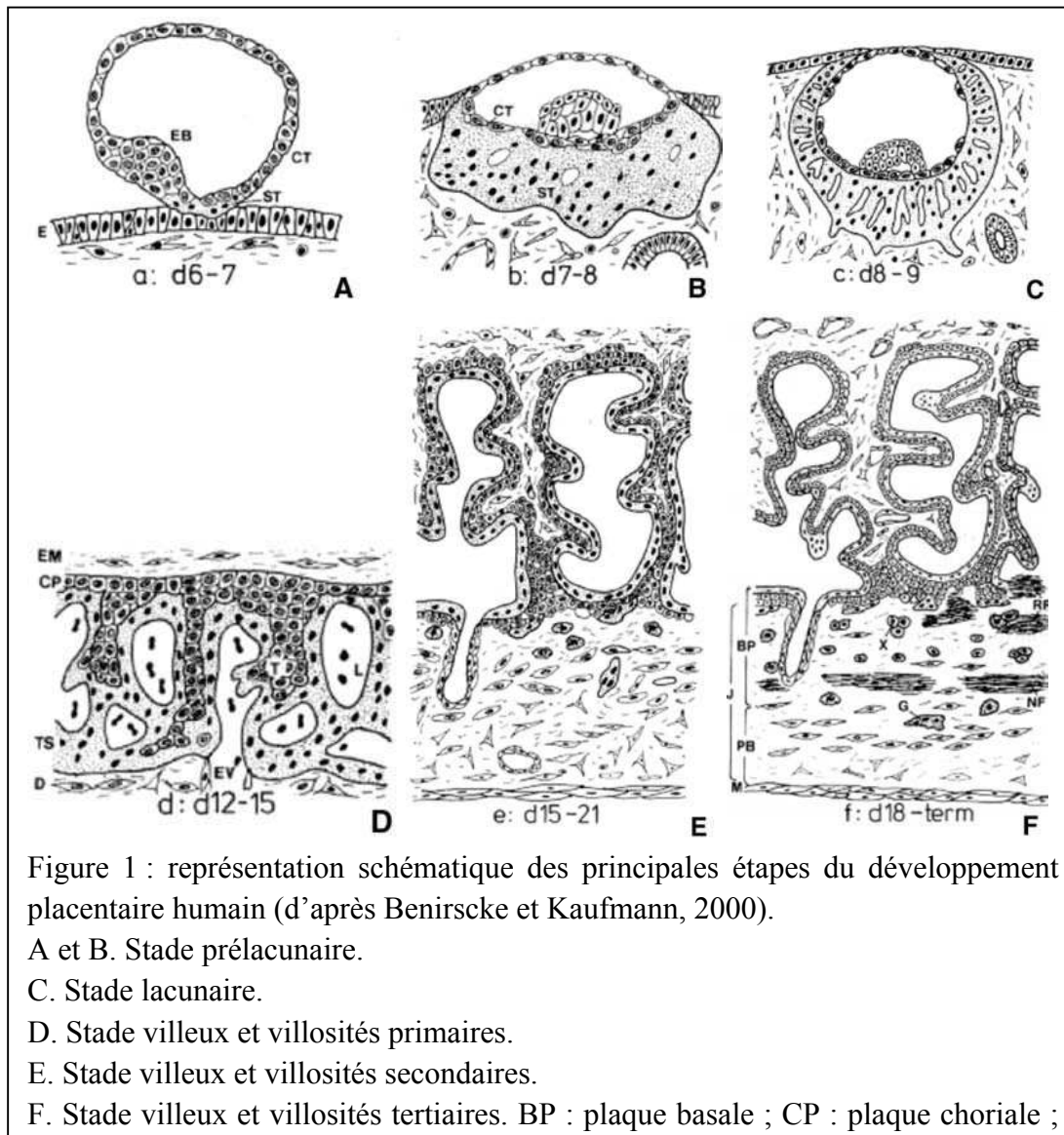
Le placenta humain est un organe autonome et transitoire qui permet le développement du fœtus. La placentation humaine présente la particularité d'être hémochoriale avec un phénomène d'invasion majeure du trophoblaste dans la décidue et le myomètre en première partie de grossesse. Ce phénomène d'invasion va permettre l'établissement d'un contact direct entre trophoblaste et sang maternel. Un système transitoire de shunt vasculaire myométrial s'établit. Le déroulement de la grossesse est directement dépendant de la qualité de la vascularisation utéro-placentaire.

1.1.1 La placentation humaine

Le développement du placenta peut être divisé en trois stades : prélacunaire, lacunaire et vilieux (Tsatsaris V. 2006).

Stade prélacunaire

Six jours après la fécondation, le blastocyste limité par une assise cellulaire, le trophoctoderme, s'accole à l'épithélium utérin. Puis, à partir du trophoctoderme, se différencient une assise cellulaire interne, constituée de cytotrophoblastes, et une assise cellulaire externe, le syncytiotrophoblaste (Figure 1A, B). Ce dernier pénètre l'épithélium utérin et envahit l'endomètre, grâce à son activité protéolytique. Le résultat de ce phénomène est la nidation du blastocyste au sein de la muqueuse utérine.



Stade lacunaire

Vers le 8e jour qui suit la fécondation, des vacuoles apparaissent dans cette masse syncytiale. Ces vacuoles vont progressivement former des lacunes entre les travées syncytiales. Ces lacunes forment un espace qui deviendra la chambre intervillieuse (Fig. 1C).

Stade villex

Au 13e jour, les cytotrophoblastes, qui étaient encore limités à une assise interne, vont envahir les travées de syncytium, formant ainsi les villosités choriales primaires (Fig. 1D).

Après deux semaines, ces villosités primaires sont envahies par le mésenchyme embryonnaire et constituent les villosités secondaires (Fig. 1E). Enfin, les capillaires fœtaux apparaissent dans l'axe mésenchymateux, cette vascularisation caractérise la formation de la villosité tertiaire (Fig. 1F). En parallèle, le réseau vasculaire fœtal de l'allantoïde atteint la plaque chorale et se connecte aux vaisseaux des troncs villositaires. La villosité chorale apparaît dans sa constitution définitive vers la 3^e semaine après la fécondation. À terme, le placenta est un disque d'environ 20cm de diamètre et de 3cm d'épaisseur qui pèse approximativement 500g. La face fœtale est appelée plaque chorale alors que la face maternelle est appelée plaque basale. Entre ces deux plaques, les villosités chorales flottent dans la chambre intervillieuse dans laquelle circule le sang maternel. L'arbre villositaire est également constitué de villosités crampons, situées à la plaque basale et ancrées dans l'endomètre.

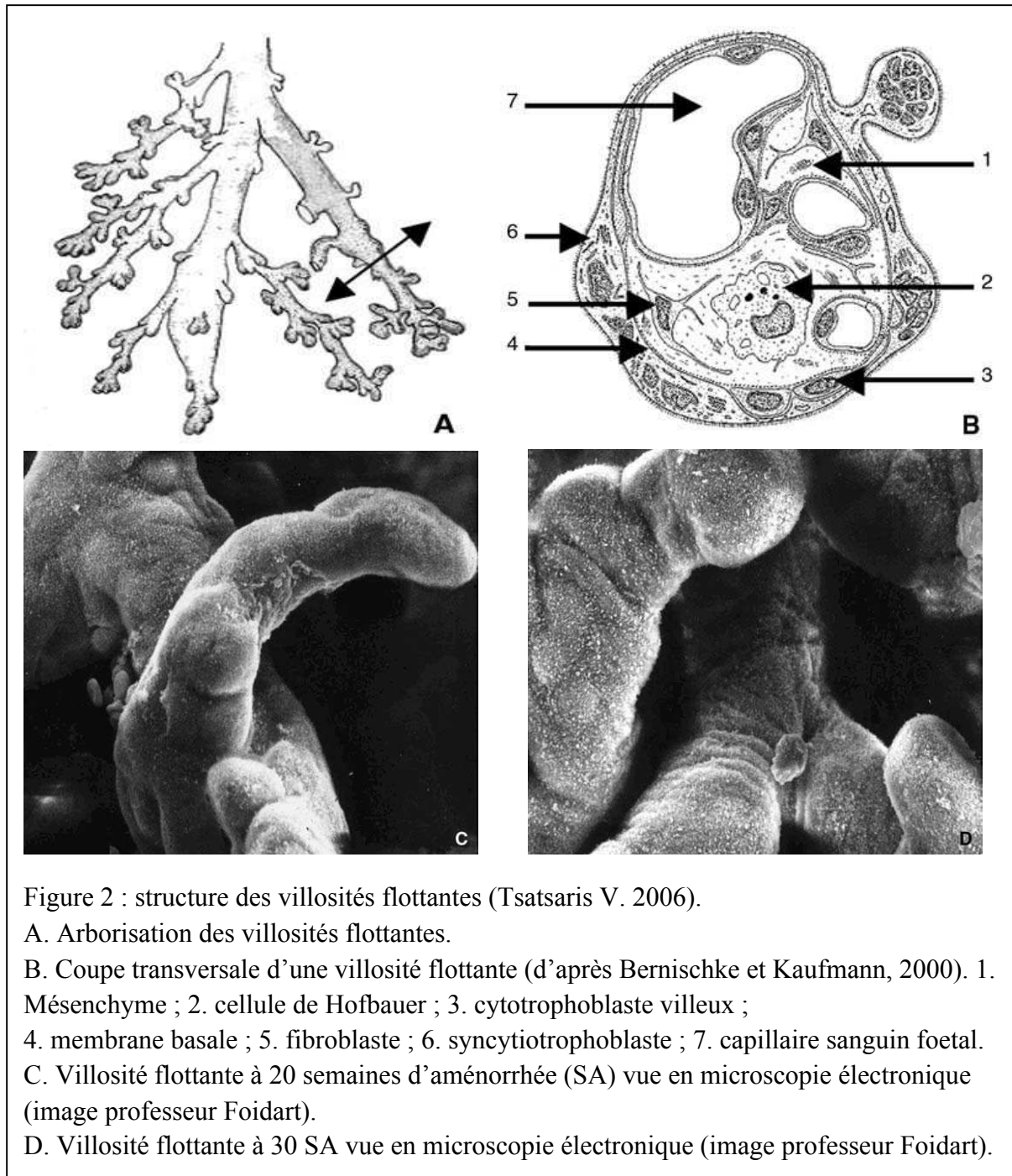
Différenciation trophoblastique

La cellule trophoblastique est la cellule essentielle du placenta. Elle se différencie d'une part en trophoblastes villex qui assurent les échanges fœto-maternels et les fonctions endocrines du placenta, et d'autre part en cytotrophoblastes extravillieux invasifs, indispensables à l'implantation et au remodelage des vaisseaux utérins. Les cellules du cytotrophoblaste villex fusionnent et forment le syncytiotrophoblaste. Le cytotrophoblaste extravillieux (CTEV) prolifère puis devient invasif et migre dans la décidue et le myomètre (CTEV interstitiel). Il colonise les vaisseaux maternels (CTEV vasculaire) ou se différencie en cellules géantes plurinucléées dont le rôle est actuellement mal connu.

Trophoblaste villex

L'unité structurale et fonctionnelle du placenta humain est la villosité chorale. Les villosités sont de deux types : villosités flottantes (Figure 2) ou villosités crampons (Figure 3). Les

premières baignent librement dans la chambre intervillieuse alors que les secondes sont ancrées dans l'endomètre maternel.



Elles sont délimitées par une double assise de cellules épithéliales, le cytotrophoblaste vilieux, mononucléé, et le syncytiotrophoblaste multinucléé, entourant un axe

mésenchymateux, contenant des vaisseaux fœtaux et des cellules immunitaires (macrophages: cellules de Hofbauer). Le syncytiotrophoblaste naît de la fusion des cellules du cytotrophoblaste villositaire. Il borde la chambre intervillieuse et se retrouve en contact direct avec le sang maternel dès la fin du premier trimestre de la gestation. Il constitue la première couche de la barrière placentaire séparant la circulation maternelle et la circulation fœtale. Il remplit des fonctions métaboliques, sécrétrices, endocrines, d'échange et d'hémostase. En effet, c'est l'unité endocrine du placenta, sécrétant de nombreuses hormones polypeptidiques et stéroïdiennes : human chorionic gonadotrophin (hCG), hormone lactogène placentaire (human placental lactogen [hPL]), hormone de croissance placentaire (PGH), leptine, progestérone, estrogènes, ainsi qu'une grande variété de facteurs de croissance, cytokines et autres peptides impliqués dans la physiologie de la gestation (Evain-Brion 1999; Ashworth, Hoggard et al. 2000; Symonds, Mostyn et al. 2001). Il développe les fonctions d'échange et exprime les protéines vectrices permettant le transport actif des acides aminés, les molécules porteuses autorisant la diffusion facilitée du glucose. En contact direct avec le sang maternel, le syncytiotrophoblaste exprime des facteurs impliqués dans la régulation de l'hémostase tels que la thrombomoduline et l'annexine V (Rand, Wu et al. 1997; Fazel, Vincenot et al. 1998; Rand 2000; Isermann, Sood et al. 2003; Lanir, Aharon et al. 2003).

De plus, le syncytiotrophoblaste n'exprime pas les antigènes *human leucocyte antigen* (HLA) classiques (A, B et C) (Loke and King 2000). Ce statut immunitaire particulier joue un rôle majeur dans la tolérance maternelle au placenta.

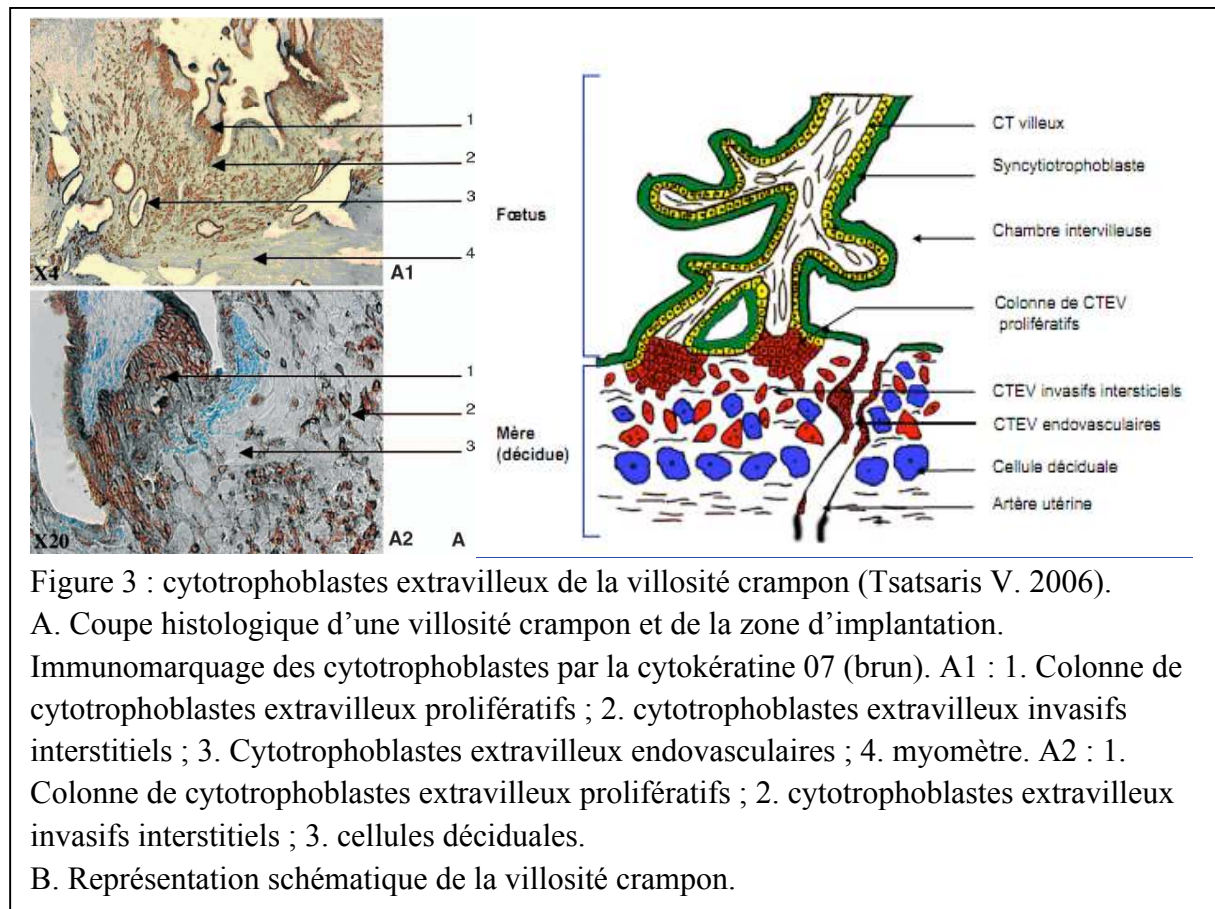


Figure 3 : cytotrophoblastes extravilleux de la villosité crampon (Tsatsaris V. 2006).

A. Coupe histologique d'une villosité crampon et de la zone d'implantation.

Immunomarquage des cytotrophoblastes par la cytokératine 07 (brun). A1 : 1. Colonne de cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs ; 2. cytotrophoblastes extravilleux invasifs interstitiels ; 3. Cytotrophoblastes extravilleux endovasculaires ; 4. myomètre. A2 : 1. Colonne de cytotrophoblastes extravilleux prolifératifs ; 2. cytotrophoblastes extravilleux invasifs interstitiels ; 3. cellules déciduales.

B. Représentation schématique de la villosité crampon.

Une fois formé, ce syncytiotrophoblaste évolue vers une mort cellulaire par apoptose. Cela aboutit à la formation de débris syncytiaux polynucléés libérés dans la circulation maternelle (*syncytial knots* des Anglo-Saxons). De fait, le renouvellement du syncytiotrophoblaste à partir du cytotrophoblaste est un phénomène continu tout au long de la grossesse. Ces débris syncytiaux sont plus importants lors de nombreuses pathologies d'origine placentaire (prééclampsie, trisomie 21, etc.) (Pidoux, Gerbaud et al. 2011). Ils sont en grande partie à l'origine de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN) foetal circulant dans le sang maternel.

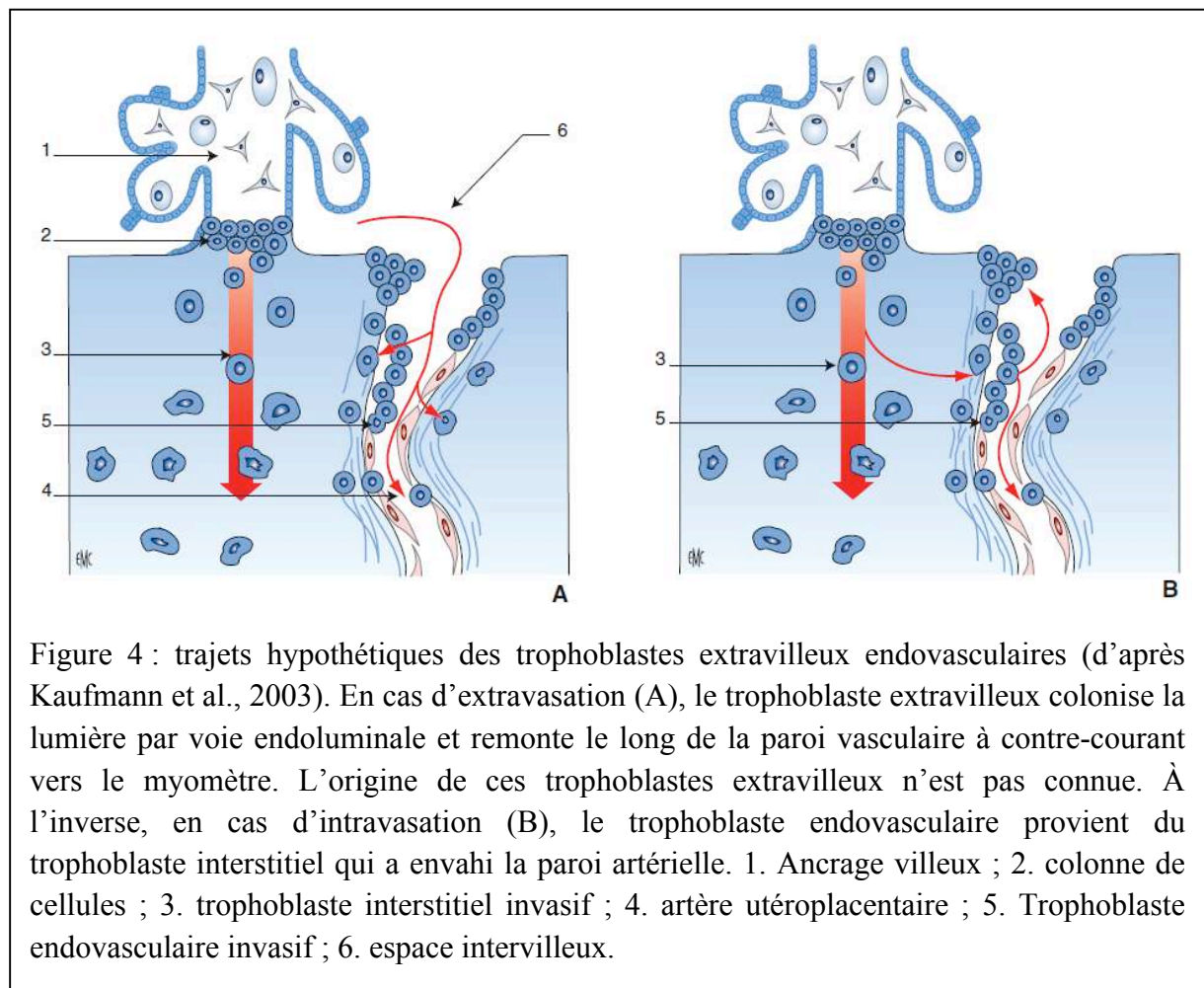
Trophoblaste extravilleux

Au cours du premier trimestre, le placenta humain est caractérisé par une invasion profonde de l'endomètre utérin par les CTEV (Kaufmann P 1997; Aplin, Haigh et al. 2000; Fournier, Handschuh et al. 2008).

Les CTEV, situés à la base de la villosité crampon (Figure 3), apparaissent comme des colonnes de cellules polarisées, agrégées les unes aux autres, reposant sur une lame basale. Elles sont initialement prolifératives puis elles perdent leur caractère prolifératif et se différencient en cytotrophoblastes invasifs, à la partie distale de la colonne. Ces cellules, extrêmement invasives, colonisent l'endomètre et le myomètre superficiel. Cette invasion, définie comme interstitielle, se termine en profondeur par la formation de cellules géantes multinucléées. De plus, les trophoblastes invasifs colonisent les artères spiralées maternelles.

Durant le premier trimestre, des bouchons de cellules trophoblastiques obstruent la lumière de ces artères spiralées. De ce fait, les éléments figurés maternels (notamment les hématies) ne sont pas observés dans la chambre intervillieuse durant les huit premières semaines de gestation. Il en résulte un environnement placentaire pauvre en oxygène (pO₂ à 20 mmHg à 8 semaines d'aménorrhée [SA]). Ces bouchons disparaissent progressivement à partir de 10 SA, ce qui permet l'entrée progressive du sang maternel artériel dans la chambre intervillieuse (pO₂ à 55 mmHg à 12 SA). L'origine du cytotrophoblaste extravilleux vasculaire est actuellement débattue. Il proviendrait soit des cytotrophoblastes extravilleux invasifs interstitiels ayant envahi la paroi artérielle (phénomène d'intravasation), soit des amas trophoblastiques endovasculaires (« *trophoblastic plug* ») qui obturent les artères spiralées lors du premier trimestre de la grossesse (phénomène d'extravasation) (Figure 4). Une combinaison de ces deux mécanismes est suggérée par l'équipe de Loke (Jaffe, Jauniaux et al. 1997; Kam, Gardner et al. 1999; Kaufmann, Black et al. 2003).

L'invasion de la paroi artérielle par la cellule trophoblastique extravillieuse conduit à une disparition totale de la tunique musculaire lisse artérielle et des cellules endothéliales maternelles qui sont remplacées par le trophoblaste extravillieux. La tunique de l'artère devient atone, insensible aux éléments vasoactifs. Les cellules trophoblastiques extravillieuses endovasculaires sont au contact du sang maternel.



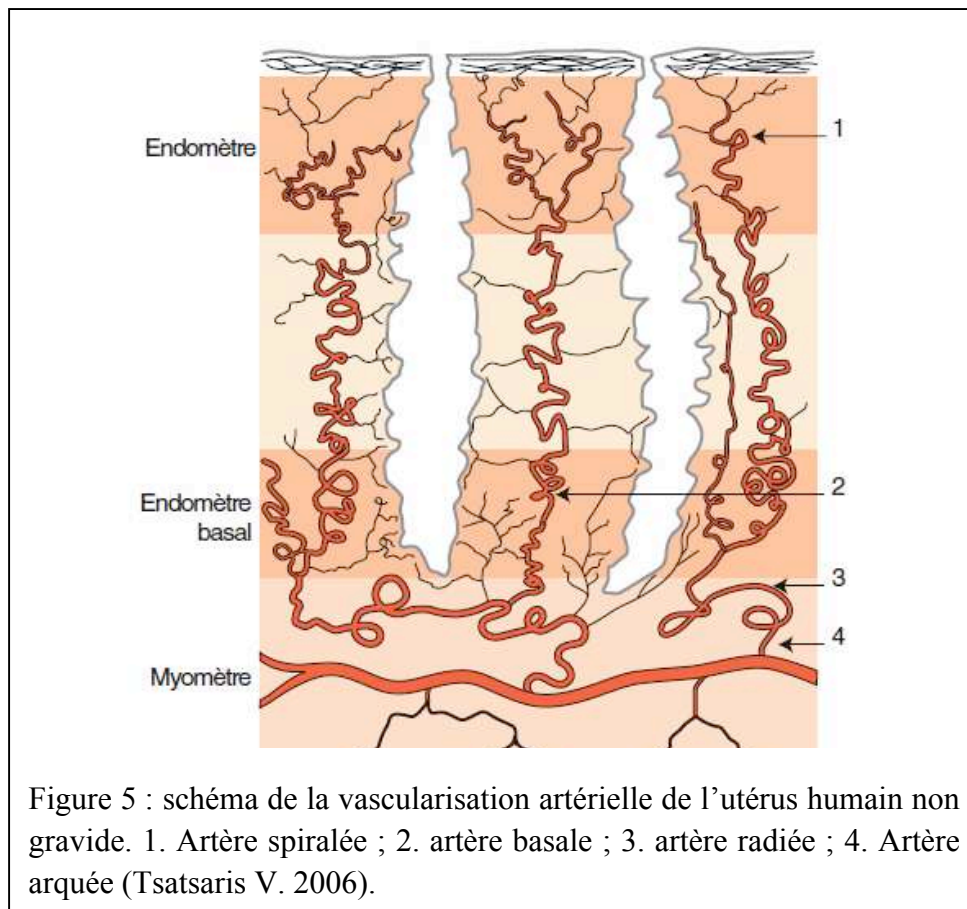
Il faut souligner que ce trophoblaste invasif interstitiel, endo- et périvasculaire, est en contact direct avec les cellules immunocompétentes maternelles notamment de la décidue. Il exprime des molécules HLA spécifiques notamment l'HLA G non reconnue par le système immunitaire maternel (Le Bouteiller 2000; Blaschitz, Hutter et al. 2001). De plus, par la

sécrétion de diverses cytokines, c'est un acteur majeur du non rejet de l'unité fœtoplacentaire par la mère (Chaouat, Assal Meliani et al. 1995; Mowbray, Jalali et al. 1997; Chaouat 1999; Chaouat, Zourbas et al. 2002).

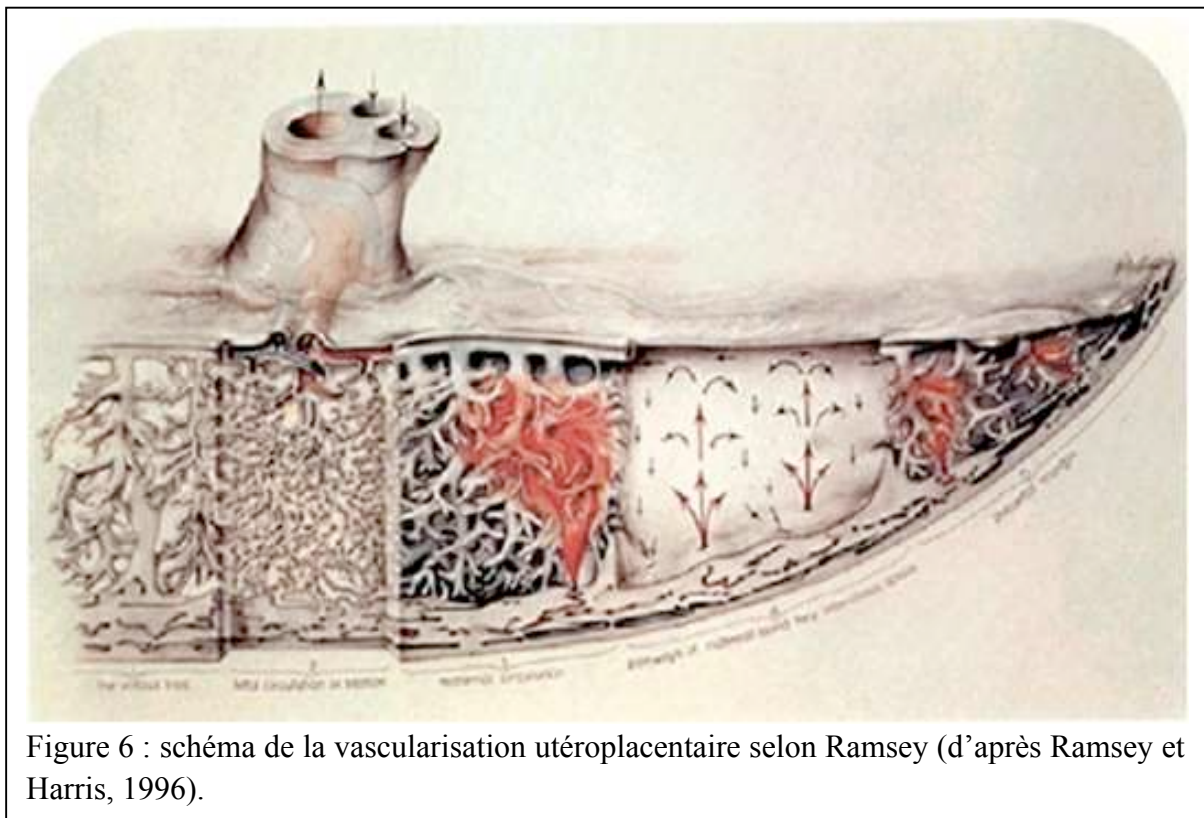
1.1.2 La vascularisation utéro-placentaire

Historique

Le schéma anatomique actuel de la vascularisation utéroplacentaire est connu depuis le début du XXe siècle. Les artères utérines se divisent pour donner des artères arquées, qui vont secondairement donner les artères radiaires qui traversent le myomètre avant de se transformer en artères spiralées au niveau de l'endomètre. Des artères radiaires naissent également des artères basales qui vascularisent l'endomètre profond (Figure 5) (Tsatsaris V. 2006).



Le sang maternel traverse le myomètre via les artères utéroplacentaires, remodelées par les cellules trophoblastiques et entre dans la chambre intervillieuse sous forme d'un jet produit par la pression artérielle maternelle. Le sang maternel circule ensuite autour des villosités placentaires permettant les échanges entre la mère et le fœtus. Le drainage vers la circulation maternelle systémique se fait via des plexus veineux myométriaux organisés en un système anastomotique. Cette circulation est schématisée dans la Figure 6.



La confirmation que les cellules envahissant les artères spiralées sont bien d'origine trophoblastique date des travaux de Kaufmann et Stark en 1971 (Benirschke K 2000). Quelques années plus tard, Brosens et al. confirmaient le rôle du trophoblaste extravillieux dans le remodelage de la vascularisation utéroplacentaire et démontraient, qu'en cas de prééclampsie, ce remodelage vasculaire est déficient aussi bien en étendue qu'en profondeur (Brosens, Robertson et al. 1970). Ce sont les premiers travaux émettant l'hypothèse d'un

défaut de remodelage des artères spiralées par les cytotrophoblastes extravilloux dans la physiopathologie de la prééclampsie. Quelques années plus tard, Hustin et Schaaps suggéraient qu'au premier trimestre de la grossesse les cellules trophoblastiques endovasculaires forment des bouchons trophoblastiques (« *plugs* » trophoblastiques) empêchant le passage d'hématies fœtales dans la chambre intervillieuse (Hustin and Schaaps 1987).

Ainsi, durant le premier trimestre de la grossesse, la chambre intervillieuse est perfusée par un ultrafiltrat plasmatique. Cette théorie a été vivement critiquée, mais les récents travaux de Jauniaux et Burton ont confirmé l'hypothèse initiale de Schaaps et Hustin (Burton, Jauniaux et al. 1999; Jauniaux, Watson et al. 2000). En effet, au premier trimestre de la grossesse, la cellule trophoblastique se développe en conditions d'hypoxie (Burton and Jauniaux 2001; Jauniaux, Watson et al. 2001). D'après Jauniaux et Burton, cette hypoxie est nécessaire à la survie de la cellule trophoblastique qui possède initialement peu de défenses antioxydantes (catalase, glutathion peroxydase, superoxyde dismutase). Cette hypoxie est rendue possible grâce aux bouchons trophoblastiques obstruant la lumière de la partie terminale des artères spiralées. Ces bouchons disparaissent progressivement vers 9-10 SA, ce qui permet une perfusion progressive de la chambre intervillieuse et une augmentation progressive de la pression partielle en oxygène. Parallèlement, on observe une augmentation progressive des défenses antioxydantes. Jauniaux et Burton ont également démontré qu'une entrée prématurée de sang maternel dans la chambre intervillieuse pouvait être responsable d'une interruption de la grossesse du fait de lésions oxydatives trophoblastiques (Greenwold, Jauniaux et al. 2003; Hempstock, Jauniaux et al. 2003).

Physiologie de la circulation utéroplacentaire

Le sang maternel entre dans l'utérus via les artères utérines et les artères ovariennes (Blackburn 2003). La proportion du débit cardiaque maternel qui va perfuser l'utérus et la chambre intervillieuse augmente progressivement pouvant atteindre, en fin de grossesse, 20 à 25 % du débit cardiaque maternel. La croissance fœtale est directement dépendante de la perfusion de la chambre intervillieuse par du sang maternel.

Le débit utérin est estimé à 50 ml min⁻¹ vers 10 SA. Au fur et à mesure que la grossesse évolue, les besoins nutritionnels du fœtus augmentent. Le rendement fonctionnel du placenta augmente puisque le rapport du volume fœtal sur le volume placentaire passe à 6 : 1 en fin de grossesse. Le débit utérin est alors estimé à 600 ml min⁻¹ (Blackburn 2003). Cette augmentation considérable du débit utéroplacentaire est en partie liée à l'augmentation du débit cardiaque maternel global, mais surtout au remodelage de la paroi des artères utéroplacentaires. En effet, d'après la loi de Poiseuille, le débit d'un fluide dans un cylindre est proportionnel au rayon à la puissance 4. Toute variation de calibre des artères a donc des conséquences majeures sur la perfusion de la chambre intervillieuse. En fin de grossesse, la chambre intervillieuse contient environ 150 ml de sang maternel, volume qui est totalement renouvelé trois à quatre fois par minute. Il faut noter que, lors des contractions utérines, le débit utéroplacentaire diminue, mais le volume total de placenta reste constant, ce qui suggère que le volume total de sang maternel reste stable (le sang maternel n'est pas chassé hors de la chambre intervillieuse lors des contractions utérines).

De ce fait, les transferts en oxygène de la mère au fœtus sont maintenus. Les modes circulatoires du sang maternel au sein de la chambre intervillieuse sont très mal connus. Le sang maternel entre dans la chambre intervillieuse sous forme d'un jet produit par la pression artérielle maternelle. Le sang maternel circule ensuite autour des villosités placentaires,

permettant les échanges entre la mère et le fœtus. Le drainage vers la circulation maternelle systémique se fait via des plexus veineux myométriaux organisés en un système anastomotique. Cependant, la répartition des flux au sein de la chambre intervillieuse et les mécanismes responsables du brassage du sang maternel ne sont pas connus. Ces phénomènes jouent cependant un rôle capital dans les échanges entre la mère et le fœtus.

Remodelage vasculaire utérin

Le remodelage des vaisseaux utérins est un processus physiologique crucial pour le bon développement et la bonne croissance du fœtus. À la lueur des travaux actuels, les modifications de la vascularisation de l'utérus gravide peuvent être schématiquement divisées en trois étapes :

- le remodelage vasculaire myométrial indépendant de l'invasion trophoblastique ;
- le remodelage vasculaire induit par des facteurs diffusibles issus du trophoblaste extravillieux interstitiel ;
- le remodelage induit par une interaction directe entre le trophoblaste extravillieux et les composants de la paroi artérielle.

Remodelage indépendant de l'invasion trophoblastique

Il semblerait qu'une partie des modifications vasculaires des artères spiralées au cours de la grossesse soit totalement indépendante des effets trophoblastiques. Les modifications initiales des artères utéroplacentaires comportent une désorganisation généralisée de ces artères avec une vacuolisation endothéliale, une désorganisation des cellules musculaires lisses et une dilatation luminale (Craven, Morgan et al. 1998; Kaufmann, Black et al. 2003). Ces modifications structurelles surviennent très précocement dès 5 SA avant le processus d'invasion trophoblastique et surviennent aussi bien dans la zone d'implantation que dans la portion déciduale non concernée par la placentation. Par ailleurs, ces modifications sont

également retrouvées en cas d'implantation extra-utérine. Elles seraient dues à une activation du système rénine-angiotensine décidal ou à des facteurs hormonaux circulants maternels (Craven, Morgan et al. 1998; Kaufmann, Black et al. 2003).

Par ailleurs, une partie du remodelage vasculaire semble être induit par des facteurs diffusibles issus du CTEV, notamment des facteurs angiogéniques tels que le VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor), le VEGF-C, ou le PlGF (Placental Growth Factor) et l'angiogénine. Enfin, l'hCG produit par les CTEV pourrait également jouer un rôle angiogénique utérin (Zygmunt, Herr et al. 2002; Zhou, Bellingard et al. 2003).

Remodelage vasculaire induit par des facteurs diffusibles issus du trophoblaste extravilleux interstitiel

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la dilatation artérielle commence chez la femme avant l'invasion des artères par les trophoblastes (Craven, Morgan et al. 1998; Pijnenborg, Vercruysse et al. 1998). Ce remodelage associe un amincissement de la média et des dépôts fibrinoïdes au sein de la paroi artérielle (Kaufmann, Black et al. 2003). Ainsi, certaines études ont suggéré la synthèse et la sécrétion de vasodilatateurs tels que l'oxyde nitrique (NO) et le monoxyde de carbone (CO) par les cellules avoisinant les artères utérines. Par ailleurs, le cytotrophoblaste extravilleux sécrète des facteurs angiogéniques qui pourraient être impliqués dans le remodelage vasculaire. Le plus connu parmi eux est le *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) (Ferrara and Davis-Smyth 1997; Carmeliet and Collen 1999; Carmeliet 2000). Le VEGF-A est sécrété par les cellules trophoblastiques de la villosité, ainsi que par les cytotrophoblastes extravilleux tout au long de sa voie de différenciation dans l'utérus (Clark, Smith et al. 1998). Il pourrait donc être responsable de l'angiogenèse utéroplacentaire soit par un mode paracrine (VEGF sécrété par le trophoblaste extravilleux), soit par un mode endocrine (VEGF sécrété par les trophoblastes de la villosité).

La cellule trophoblastique sécrète également du *placental growth factor* (PlGF), du VEGF-C, facteurs stimulant la survie endothéliale et le remodelage vasculaire. L'angiogénine est un autre facteur de croissance angiogénique produit par le trophoblaste extravilleux (Clark, Smith et al. 1998; Zhou, Bellingard et al. 2003).

Enfin, il a récemment été montré que l'hCG produite par les cytotrophoblastes villosités et extravilleux possède des propriétés angiogéniques similaires à celles du VEGF et que le récepteur de l'hCG (récepteur hCG/*luteinizing hormone* [LH]) est présent à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux utérins (Zygmunt, Hahn et al. 1998; Zygmunt, Herr et al. 2002). Tous ces éléments suggèrent que des facteurs trophoblastiques sont directement impliqués dans des processus d'angiogenèse utérine et de remodelage des vaisseaux utérins indépendamment de l'invasion de la paroi des vaisseaux par les cellules trophoblastiques (Tsatsaris V. 2006).

Remodelage induit par une interaction directe entre le trophoblaste extravilleux et les composants de la paroi artérielle

Le remodelage vasculaire par le trophoblaste (d'origine endovasculaire ou interstitielle) induit une interaction directe entre le cytotrophoblaste extravilleux et les composants de la paroi artérielle (cellules musculaires lisses et cellules endothéliales) comme l'ont bien démontré de nombreuses études histologiques (Brosens, Robertson et al. 1967; Pijnenborg, Dixon et al. 1980; Pijnenborg, Bland et al. 1983). Il en résulte une destruction de la paroi musculaire lisse de ces vaisseaux qui est remplacée par une substance acellulaire éosinophile.

Existence d'un shunt vasculaire

Décrite pour la première fois en 2005 par Schaaps – Tsatsaris et al. (Schaaps, Tsatsaris et al. 2005), l'existence d'un shunt vasculaire placentaire localisé au niveau du myomètre a permis de remettre en cause le classique système en série artères spiralées – chambre intervillieuse, et doit nous amener à considérer différemment l'étude de la perfusion du myomètre en cours de grossesse (Figure 7).

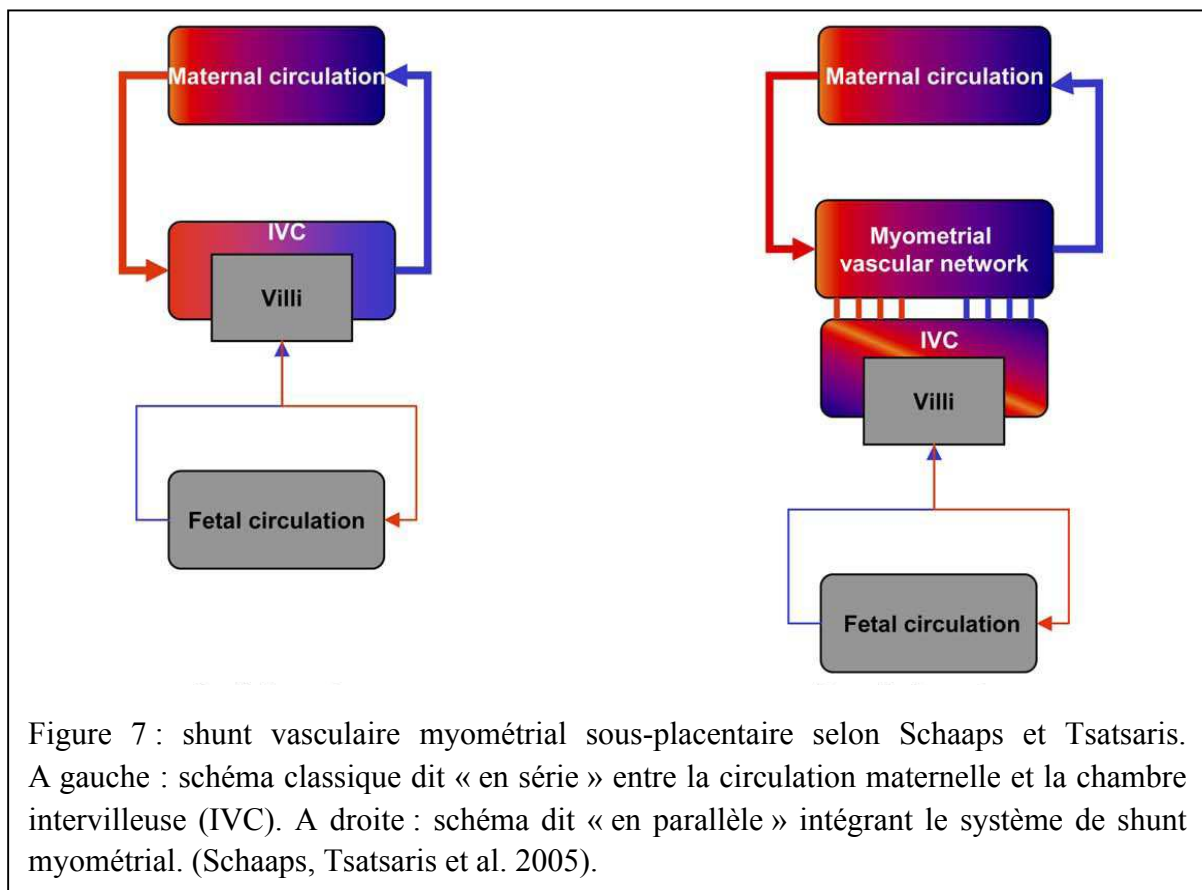
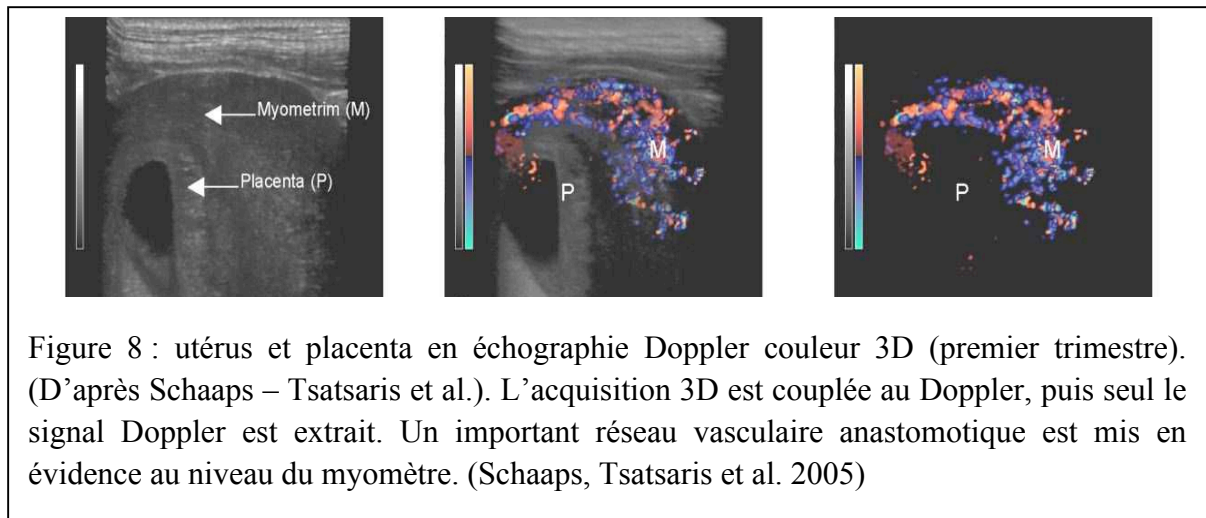


Figure 7 : shunt vasculaire myométrial sous-placentaire selon Schaaps et Tsatsaris. A gauche : schéma classique dit « en série » entre la circulation maternelle et la chambre intervillieuse (IVC). A droite : schéma dit « en parallèle » intégrant le système de shunt myométrial. (Schaaps, Tsatsaris et al. 2005).

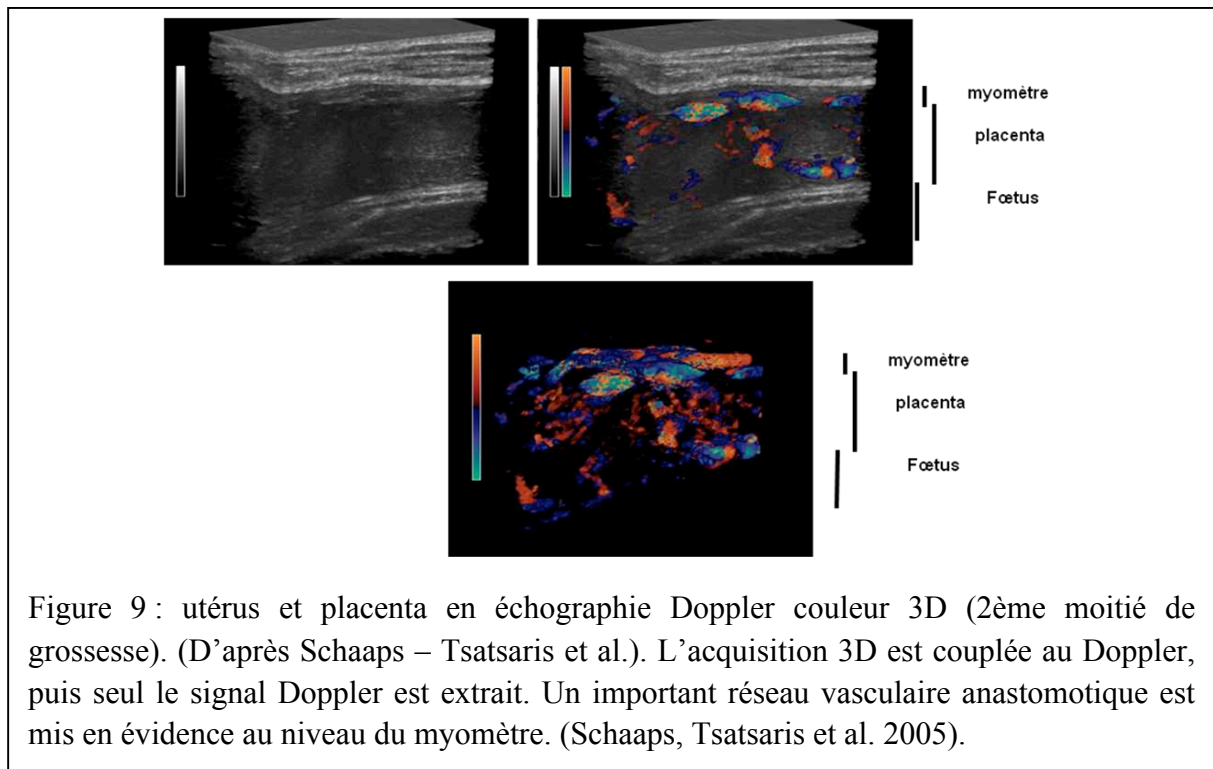
L'existence d'anastomoses artérioveineuses myométriales a été montrée dès 1956 par des techniques de moulage vasculaire (Heckel and Tobin 1956). L'existence d'un shunt est également nécessaire dès lors que la théorie des plugs vasculaires est admise : le réseau

vasculaire qui se développe précocement dans le myomètre constitue obligatoirement un shunt dès lors que la chambre intervillieuse n'est pas perfusée par du sang.

L'étude de la perfusion myométriale in vivo par techniques Doppler 3D a permis à Schaaps et al. de mettre en évidence un riche réseau vasculaire myométrial, situé dans la région sous placentaire et persistant tout au long de la grossesse (Figures 8 et 9).



Ces constatations ont été confirmées par d'autres approches : un moulage d'un utérus obtenu suite à une hystérectomie réalisée dans le post-partum immédiat a permis de montrer clairement l'existence d'une structure vasculaire type shunt. Il a été également montré par cathétérisme que le sang veineux utérin était moins désaturé en oxygène que le sang de la chambre intervillieuse, ce qui confirme l'existence d'un shunt artérioveineux sous placentaire (dans un système en série le sang veineux utérin serait le plus désaturé étant le plus en aval).



La placentation humaine, hémochoriale, est caractérisée par une invasion majeure du trophoblaste dans la décidue et le myomètre, le conduisant au contact du sang maternel. La mise en place de la vascularisation utéro-placentaire est un phénomène complexe, et primordial pour le développement fœtal et le déroulement de la grossesse. Le développement des techniques d'étude des cellules trophoblastiques *in vitro* a permis l'obtention d'avancées majeures dans la compréhension des phénomènes d'invasion trophoblastique et de remodelage vasculaire utéro-placentaire.

La mise en place de l'interface materno-fœtale reste incomplètement comprise. L'existence des *plugs* vasculaires, la mise en évidence récente de l'existence d'un shunt myométrial sous-placentaire doivent encore faire l'objet d'évaluations *in vivo* de ce système vasculaire utéro-placentaire.

1.2 Défauts de vascularisation utéro-placentaire chez la femme :

Prééclampsie et restriction de croissance *in-utero* d'origine vasculaire placentaire

Les défauts de perfusion placentaire compliquent environ 4 à 7% des grossesses. Ils peuvent entraîner un retard de croissance intra-utérin (RCIU) et/ou une prééclampsie (PE), deux complications responsables de 20 à 30% de la morbidité et de la mortalité pré et périnatale (Sibai, Dekker et al. 2005).

Ces deux pathologies, pouvant être ou non cliniquement associées, ont pour point commun majeur un défaut de vascularisation placentaire. Elles présentent cependant des différences importantes sur les plans épidémiologiques, des facteurs de risques et de la physiopathologie dans leurs formes isolées (Ness and Sibai 2006). La PE est une pathologie spécifique à l'espèce humaine. Le RCIU, en revanche, existe à l'état naturel chez de nombreuses espèces animales. Ainsi, des défauts de croissance sont habituels en fonction de la position du fœtus chez certaines espèces polytoques telles que le lapin ou la truie (Bauer, Walter et al. 2003; Beaudoin, Barbet et al. 2003).

La recherche tant fondamentale que clinique dans le domaine des pathologies avec défaut de vascularisation utéro-placentaire s'est heurtée jusqu'ici à l'écueil majeur de l'impossibilité d'évaluer *in vivo* la perfusion directement au sein de l'unité utéro-placentaire. En effet, les techniques jusqu'ici disponibles imposaient l'injection de produits de contraste iodés ou radioactifs contre-indiqués en cours de grossesse. La seule approche couramment évaluée est l'analyse du spectre Doppler des artères utérines, dont nous discuterons plus avant les limites importantes pour l'évaluation de la vascularisation utéro-placentaire.

1.2.1 Définitions cliniques

La prééclampsie

La prééclampsie est classiquement définie par l'association d'une hypertension artérielle gravidique (HTG) et d'une protéinurie (Sibai, Dekker et al. 2005). L'hypertension artérielle gravidique doit être observée au-delà de 20 semaines d'aménorrhée (20 SA) et jusque six semaines dans le post-partum, avec des valeurs de pression artérielle systolique (PAS) supérieures à 140 mmHg et/ou des valeurs de pression artérielle diastolique (PAD) supérieures à 90 mmHg (ACOG 1996).

Cependant, la définition de l'HTG souffre d'une absence de consensus. En effet, elle peut reposer sur la valeur de la pression artérielle moyenne (PAM) ou sur l'augmentation des PAS et/ou PAD, entre 15 et 30 mmHg, par rapport à leur valeur avant 20 SA (American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG, National High Blood Pressure Education Program, NHBPEP) (Redman and Jefferies 1988; 1990; Perry and Beevers 1994; Garcia-Pascual, Costa et al. 1996). La définition simplifiée de l'ACOG est la plus utilisée à l'heure actuelle.

Le seuil de positivité de la protéinurie le plus couramment utilisé est 0,3g/24h. Cette mesure doit, pour un maximum de fiabilité, être effectuée sur une période de 24h. Cependant, comme pour l'HTG, la définition de la protéinurie ne fait pas consensus et certains auteurs utilisent des seuils de 0,5g/24h, ou de 0,3g à 0,5g/l. Le NHBPEP et l'ISSHP (The international Society for the Study of Hypertension in Pregnancy) proposent également de se baser sur la simple positivité à la bandelette urinaire (1990; Garcia-Pascual, Costa et al. 1996; Sibai 2005).

Enfin, Redman et Jefferies ont proposé une définition de la prééclampsie uniquement basée sur la pression artérielle (PA), la PE étant définie par une PAD > 90 mmHg ou une augmentation de 25 mmHg de la PAD (Redman and Jefferies 1988).

Malgré ces problèmes d'homogénéité de définition, il convient de retenir à ce jour l'association d'une HTG sur les critères d'une PAD > 90 mmHg et/ou PAS > 140 mmHg et d'une protéinurie > 0,3 g/24h.

Prééclampsie sévère

Plusieurs définitions sont également utilisées pour définir la PE sévère. Les mises au point les plus récentes regroupent sous le concept de prééclampsie sévère les situations suivantes : association d'une HTA sévère (PAS > 160 mmHg et/ou PAD > 110 mmHg) et d'une protéinurie, association d'une HTA à une oligurie (<500 ml/j), à une protéinurie sévère (>3,5 g/j), à un HELLP syndrome (voir définition dans le sous-chapitre suivant), à des troubles neurologiques, à une éclampsie ou à une atteinte fœtale (Weinstein 1982; Sibai, Kustermann et al. 1994).

HELLP syndrome

Représentant l'une des complications majeures au décours de l'évolution naturelle d'une prééclampsie, il associe une hémolyse, une élévation des taux d'enzymes hépatiques et une thrombopénie (Weinstein 1982; Sibai, Kustermann et al. 1994; MacKay, Berg et al. 2001).

Eclampsie

Autre complication majeure, la crise d'éclampsie est la survenue de convulsions tonico-cloniques dans un contexte de PE (équivalent à une crise d'épilepsie), en l'absence de toute autre cause neurologique (MacKay, Berg et al. 2001). Ces manifestations seraient dues à

une perturbation de l'autorégulation du débit sanguin cérébral en fin de grossesse, conduisant à une moindre tolérance des phénomènes hypertensifs aigus. En IRM (Imagerie par résonance magnétique) standard et de diffusion, les images sont le plus souvent évocatrices d'œdème (de type vasogénique) de la région occipitale. Les patientes de moins de 20 ans, primigestes, avec un mauvais suivi obstétrical sont les plus à risque.

Le taux de survenue et le pronostic fœto-maternel (de 0 à 35% de décès maternels selon les études) sont très variables en fonction niveau du système de santé du pays concerné (reflet de la qualité du suivi et de la prise en charge des grossesses).

Restriction de croissance in-utero d'origine vasculaire

Un RCIU survient lorsque, à l'échelon individuel, le fœtus ne peut réaliser son potentiel génétique de croissance, soit parce que des anomalies de la grossesse telles qu'un défaut de vascularisation utéro-placentaire l'empêchent de réaliser ce potentiel (il y a alors une restriction à la croissance), soit parce que des phénomènes extérieurs, tels que des infections ou expositions à des agents tératogènes, modifient ce potentiel (Mamelle, Cochet et al. 2001; Mamelle, Boniol et al. 2006). Les causes vasculaires placentaires représentent classiquement un tiers à 50% des RCIU.

Ces maladies se caractérisent par une réduction de l'apport sanguin maternel au placenta, par une diminution du débit utero placentaire et une perturbation qualitative ou quantitative des échanges materno-fœtaux. La mortalité et la morbidité périnatales des nouveaux nés de poids inférieur au cinquième percentile pour leur âge gestationnel (RCIU sévères) sont significativement plus élevées en comparaison aux enfants dits eutrophes (Claris, Besnier et al. 1996). Les RCIU sont également responsables d'une morbidité à plus long terme. Il existe par ailleurs de nombreuses données dans la littérature scientifique

prouvant que le RCIU prédispose au développement de pathologies métaboliques et cardiovasculaires à l'âge adulte (Barker 1990; Claris, Beltrand et al. 2010).

1.2.2 Prééclampsie : Données épidémiologiques

Epidémiologie générale

L'incidence de la prééclampsie est estimée en France entre 1 et 3% pour les nullipares et entre 0.5 et 1,5% pour les multipares (Goffinet, Aboulker et al. 2001). L'incidence de survenue des RCIU dépend du seuil fixé, en termes de percentiles le plus souvent. Le seuil le plus couramment utilisé est le 10^{ème} percentile. Au total, les pathologies vasculaires placentaires concerneraient 4 à 7% des grossesses. L'estimation précise du taux de survenue de ces pathologies est rendue difficile du fait de la variabilité existant dans les publications quant à la définition même de la PE et du RCIU, tel qu'évoqué plus haut, et en raison de l'absence d'étude épidémiologique descriptive récente en population générale. En effet, la majorité des données épidémiologiques disponibles proviennent d'études essentiellement anglo-saxonnes réalisées dans le cadre d'évaluation de la prévention par l'aspirine (Sibai, Dekker et al. 2005). Par ailleurs, l'HTG surviendrait dans environ 10% des grossesses, l'hématome rétro-placentaire dans 3 à 10/1000 grossesses, l'éclampsie dans 1 à 5% des PE et le HELLP syndrome dans 10 à 15% des PE (Saudan, Brown et al. 1998).

Facteurs de risque

Facteurs liés à la grossesse

Trois facteurs de risques principaux liés à la grossesse sont identifiés : les grossesses multiples, les anomalies congénitales / chromosomiques / môles hydatiformes et les infections urinaires.

En cas de grossesse multiple, le risque de survenue d'une PE est multiplié par trois, tout comme le risque de développer une éclampsie. Plusieurs rapports ont également permis de mettre en évidence un risque modérément augmenté (RR 1,34) en cas de malformation fœtale, de trisomie 13, triploïdie ou de môle hydatiforme (Schieve, Handler et al. 1994; Zhang, Zeisler et al. 1997; Ros, Cnattingius et al. 1998; Saudan, Brown et al. 1998; Villar, Carroli et al. 2006; Anastasiadis, Tsikouras et al. 2007). Enfin, plusieurs auteurs ont mis en évidence une augmentation du risque en cas d'infection urinaire, sans qu'une hypothèse physiopathologique ne puisse être avancée (Schieve, Handler et al. 1994; Villar, Carroli et al. 2006).

Pathologies maternelles

- Hypertension chronique et maladie rénale

L'association d'un surpoids maternel, d'une HTA chronique et d'une augmentation du risque de prééclampsie est décrite de longue date. Il en est de même pour les maladies rénales. Une large cohorte a récemment permis de confirmer ces données (Villar, Carroli et al. 2006).

- Obésité, insulino-résistance et diabète

Bien que la plus forte prévalence de l'HTA chronique en cas d'obésité puisse expliquer en partie l'élévation du risque de prééclampsie chez ces patientes, plusieurs études observationnelles avec analyse multivariée ont permis de confirmer l'association obésité – risque de PE avec un niveau de preuve élevé (Tilton, Hodgson et al. 1989; Bodnar, Ness et al. 2005). Le risque relatif observé serait de 3,5 en cas d'indice de masse corporelle (IMC) > 32,3 dans l'étude de Thadhani et al., et de 2,1 en cas d'IMC > 30 dans une cohorte de 15000 grossesses suivies à Boston (Thadhani, Stampfer et al. 1999). De plus, une étude de registre

portant sur 330000 grossesses menées dans l'état de New-York a montré une élévation du risque de prééclampsie en cas d'obésité, de prise de poids importante et de diabète, d'autres études ayant confirmé ces données avec des relations de type dose-effet (Rosenberg, Garbers et al. 2005).

L'augmentation du risque de PE et d'HTA chez ces patientes pourrait être une conséquence de l'augmentation de la réabsorption hydrosodée et de l'effet sympathomimétique du à l'hyperinsulinémie. L'existence de phénomènes inflammatoires ainsi que des taux élevés de triglycérides pourraient également jouer un rôle (Bodnar, Ness et al. 2005).

- Thrombophilies

Il existe une augmentation du risque de survenue de PE chez les patientes présentant une thrombophilie. Cette augmentation est cependant faible avec des OR de 1.5 à 4 par rapport à la population générale. Le risque relatif (RR) de survenue de PE modérée est faible en cas de thrombophilie héréditaire ou acquise mais devient significatif pour les PE sévères et précoces (l'existence d'une thrombophilie serait à l'origine d'une accélération du processus pathologique). Le risque de récurrence de PE semble plus élevé, ainsi que le risque de survenue d'un HELLP syndrome (surtout pour les patientes porteuses d'une mutation du Facteur V Leiden). Le fait de rechercher des anomalies de la coagulation chez toutes les patientes ayant fait une prééclampsie reste controversé et serait à réserver aux patientes aux antécédents de PE et/ou RCIU sévères.

De même aucune preuve formelle n'a été apportée quant à l'intérêt du traitement antiagrégant plaquettaire ou anticoagulant pour diminuer le risque de PE chez les femmes avec thrombophilie (de Maat and de Groot ; Heyl, Heintz et al. 2005).

L'association thrombophilie – PE augmenterait par ailleurs la fréquence des lésions anatomiques placentaires sévères, comme les thromboses vasculaires, dépôts de fibrine en excès, thromboses intervilluses et sous-choriales (Stone, Lockwood et al. 1994; Sibai 2005; Best, Dorsam et al. 2009; de Vries, Kist et al. 2009; Facchinetti, Marozio et al. 2009; Kahn, Platt et al. 2009).

Facteurs de risque familiaux

Dans des études antérieures à 2000, le risque de PE était multiplié par un facteur 2 à 5 chez les filles, petites filles, sœurs et mères de femmes ayant présenté une PE, par rapport aux groupes témoins de femmes n'ayant aucun cas indexé dans leur famille (Zhang, Zeisler et al. 1997). Cependant, une part de ce risque était certainement attribuable à un terrain familial d'HTA chronique. Cette élévation du risque en cas de PE chez une des femmes de la famille a été confirmée dans des études plus récentes, avec un niveau de risque ajusté à l'âge, l'ethnie, l'obésité et le tabagisme, estimé plutôt aux alentours de 2 (OR de 1,7 à 2,3) (Carr, Epplein et al. 2005). Une étude a également rapporté une augmentation du risque de survenue de PE en cas d'existence de cas de PE dans la famille du père de l'enfant à naître. Ces résultats vont dans le sens de l'existence d'un terrain génétique tendant à favoriser la survenue d'une PE (Esplin, Fausett et al. 2001).

Ces observations ont été le socle de très nombreux travaux concernant l'étude des origines génétiques de la PE. Diverses associations entre PE et certains gènes, haplotypes et polymorphismes ont été décrites, avec des niveaux de preuves restant faibles ; les résultats vont par ailleurs dans le sens de mécanismes multi-géniques. En revanche, aucune étude à ce jour n'a permis d'évaluer la valeur prédictive potentielle de ces éventuels marqueurs

génétiques (Morgan and Ward 1999; Bernard and Giguere 2003; Oudejans, van Dijk et al. 2007).

Facteurs immunologiques

L'effet protecteur de l'exposition au sperme (risque de PE multiplié par 2,4 chez les primipares lorsque le couple utilisait des préservatifs en pré-conceptionnel), ainsi que de la multiparité, et *a contrario* l'augmentation du risque de PE en cas de nulliparité (RR 4 à 5 par rapport aux multipares), de changement de partenaire (risque équivalent à la nulliparité) ou d'insémination par donneur, ont permis d'étayer l'hypothèse d'une part immunologique dans l'étiologie de survenue de la PE (Eskenazi, Fenster et al. 1991; Abi-Said, Annegers et al. 1997).

L'exposition au sperme paternel semble jouer un rôle central, avec élévation d'autant plus élevée du risque de PE que la période préconceptionnelle d'exposition a été courte. Robillard et al. ont ainsi mis en évidence un risque, par rapport à un groupe témoin avec exposition de plus de 12 mois, multiplié par 11,6 lorsque l'exposition au sperme était inférieure à 4 mois, 5,9 entre 5 et 8 mois et 4,2 entre 9 et 12 mois, avec ainsi un facteur « dose-dépendant ». L'exposition au sperme permettrait donc le développement d'une forme de tolérance immunologique maternelle aux antigènes paternels (Robillard, Dekker et al. 1999; Dekker, Robillard et al. 2011).

L'exposition maternelle à des villosités d'origine fœtale comportant donc du matériel antigénique d'origine paternelle serait à l'origine de cette inadaptation immunologique entrant dans le cadre des PE. L'effet protecteur des antécédents de fausse-couche ou d'interruption de grossesse permettent également de soutenir cette hypothèse. Par ailleurs, il a été démontré qu'un père ayant déjà engendré une grossesse avec PE avait 1,8 fois plus de risque

d'engendrer une autre grossesse avec PE chez une autre femme, par rapport à un père n'ayant jamais engendré de PE (Lie, Rasmussen et al. 1998).

Facteurs nutritionnels

La prévalence de la PE est très variable d'un pays ou d'une région à l'autre. Elle est par exemple très faible dans les pays scandinaves. Plusieurs études de cohorte ont permis de confirmer le rôle de facteurs nutritionnels tels que la consommation de poisson ou de folates sur la survenue des pathologies vasculaires gravidiques dans leur ensemble, bien que ces effets n'aient pas été spécifiquement confirmés pour la PE (Alexander 2002; Hernandez-Diaz, Werler et al. 2002; Olsen and Secher 2002).

Facteurs physiologiques

Le risque de PE est multiplié par 2 à 4 selon les études **après 35 ans**. Malgré l'augmentation du taux d'HTA chronique au-delà de 35 ans, l'âge reste dans plusieurs études un facteur de risque indépendant en analyse multivariée (Hansen 1986; Seidman, Samueloff et al. 1990; Villar, Carroli et al. 2006).

Le **terme précoce (<34 SA)** et le **faible poids de naissance (<2500g)** de la mère sont également deux facteurs de risque importants de survenue de PE (OR = 3,62 et 5,16 respectivement) (Innes, Marshall et al. 1999).

L'origine ethnique, concernant essentiellement les femmes d'origine noire africaine, est régulièrement évoquée comme sur risque de PE, mais les résultats des différentes études sont contradictoires (Irwin, Savitz et al. 1994; Zhang, Zeisler et al. 1997; Knuist, Bonsel et al. 1998).

Facteurs environnementaux

Le risque de PE apparaît paradoxalement diminué en cas **d'exposition au tabac** chez la femme enceinte, alors que de nombreux autres risques sont alors augmentés. Il a même été démontré un effet protecteur dose-dépendant de l'exposition tabagique, d'autant plus marqué que l'exposition est maintenue au deuxième trimestre de la grossesse. L'odds ratio de survenue de PE chez les fumeuses par rapport aux non-fumeuses était de 0,4 dans une très large étude de cohorte suédoise en analyse multivariée. En revanche, le tabac est à l'origine d'une augmentation significative du risque de survenue de restriction de croissance intra-utérine d'origine placentaire (Marcoux, Brisson et al. 1989; Ros, Cnattingius et al. 1998; Lindqvist and Marsal 1999; Sibai, Dekker et al. 2005; Stone, Diallo et al. 2007).

Le fait de **vivre en altitude** semble augmenter le risque de survenue de PE, avec un « effet dose » également. Une étude menée dans le Colorado a mis en évidence un niveau de risque de 2,9 au-delà de 1600m, 4,3 au-delà de 2410m. Le risque de survenue de PE est de 12% au-delà de 3100m. Les auteurs s'appuient sur ces observations pour conforter l'hypothèse de l'hypoxie placentaire dans la pathogénèse de la PE (Moore, Hershey et al. 1982).

Plusieurs études ont mis en évidence une relation entre **niveau de stress** et survenue d'une PE, avec des facteurs de risque relatif pouvant aller jusque 3,1. Ces données ont par ailleurs été confirmées sur modèles de souris gravides, avec développement de phénotypes PE like (Marcoux, Brisson et al. 1989; Landsbergis and Hatch 1996; Hernandez-Diaz, Werler et al. 2002; Haelterman, Marcoux et al. 2007).

1.2.3 Physiopathologie de la prééclampsie

La physiopathologie de la PE n'est pas encore totalement comprise. Son origine est placentaire : cette pathologie survient uniquement pendant la grossesse et le péri-partum, elle disparaît en quelques jours après l'ablation du placenta, elle peut survenir en l'absence d'embryon (grossesses molaire) et en cas de grossesse abdominale.

Les données actuelles vont dans le sens d'un schéma physiopathologique incluant plusieurs étapes (Figure 10) : (i) un défaut de remodelage vasculaire utérin avec défaut d'invasion trophoblastique, responsable *in fine* d'un défaut de perfusion de la chambre intervillieuse ; (ii) une hypoxie placentaire avec dysfonctionnement du syncytiotrophoblaste ; (iii) un dysfonctionnement de l'endothélium maternel lié à diverses substances libérées dans la circulation maternelle par le placenta (Tsatsaris, Goffin et al. 2004; Tsatsaris, Fournier et al. 2008).

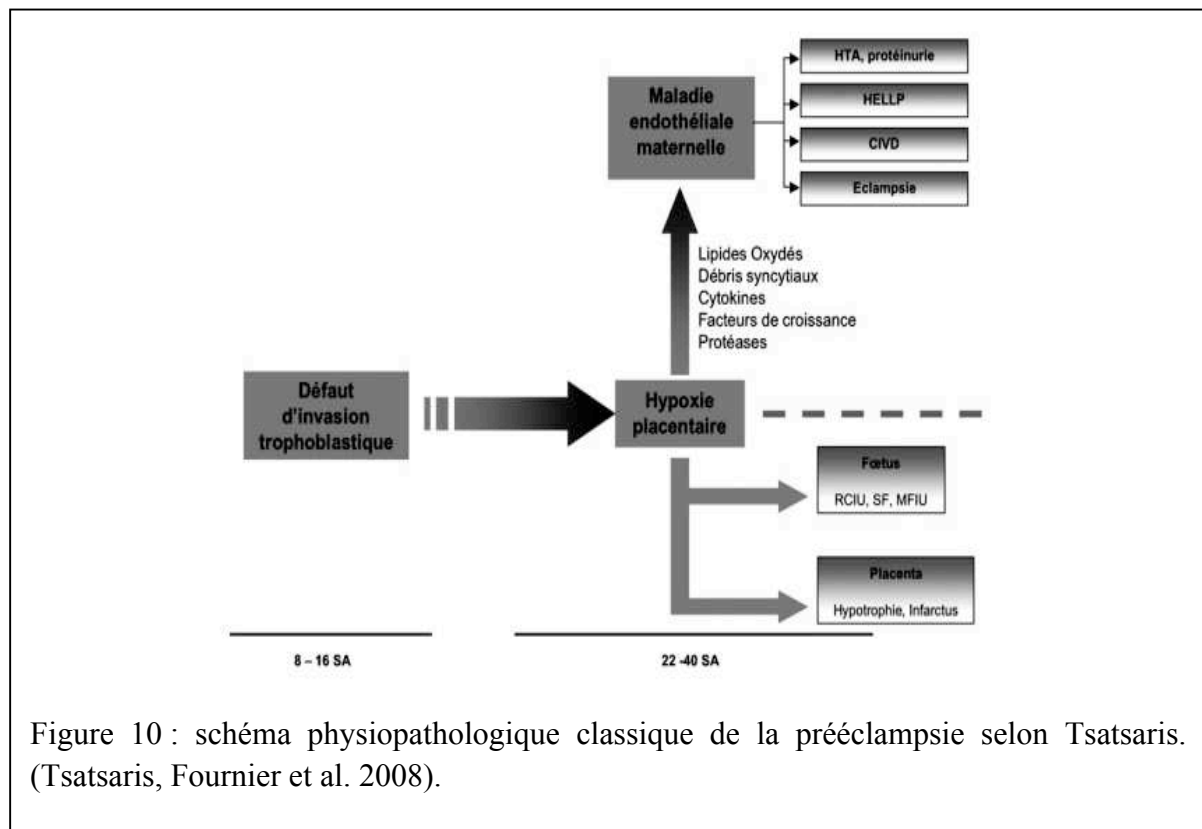


Figure 10 : schéma physiopathologique classique de la prééclampsie selon Tsatsaris. (Tsatsaris, Fournier et al. 2008).

Défaut de remodelage vasculaire utérin

Défaut d'invasion trophoblastique

Dans l'espèce humaine, il existe un phénomène d'invasion de la partie superficielle de l'utérus par le cytotrophoblaste extra-villeux (CTEV). Il va en résulter une invasion de la paroi des artères spiralées de l'utérus, qui conduit à la disparition complète de la tunique musculaire lisse artérielle et des cellules endothéliales maternelles, qui sont remplacées par les cellules du CTEV. Les artères spiralées sont alors atones et insensibles aux éléments vasoactifs, avec perfusion facilitée de la chambre intervillieuse.

L'invasion trophoblastique apparaît altérée en cas de PE, avec une atteinte plus marquée de l'invasion endo- et péri-vasculaire des artères spiralées. En cas de PE sévère, l'invasion des artères déciduales par le CTEV peut être diminuée de 56% par rapport aux grossesses témoins, et celle des artères myométriales passer de 76 à 18% (Redman 1991; Meekins, Pijnenborg et al. 1994). Les cellules endothéliales ne sont pas remplacées par le CTEV et la musculaire n'est pas remaniée : il existe donc également un défaut de remodelage. Les artères ont un diamètre plus petit et conservent une capacité de vasoconstriction.

La PE n'étant diagnostiquée qu'après la période d'invasion trophoblastique, il est difficile d'étudier les facteurs responsables de ce défaut d'invasion, les anomalies observées ne pouvant être définies comme causes ou conséquences de la maladie.

Plusieurs facteurs apparaissent malgré tout altérés en cas de PE. Ainsi, en cas de PE, il existe une *altération du profil des protéinases* plasmatiques et placentaires. De nombreuses protéinases sont sécrétées par les cellules trophoblastiques invasives. Ces enzymes jouent un rôle central dans les phénomènes de dégradation de la membrane basale et de la matrice

extracellulaire, ainsi que pour le remodelage des vaisseaux utérins. Elles joueraient également un rôle dans le maintien de l'hémostase intra-placentaire par le biais du système des activateurs du plasminogène. Il existe une diminution des taux de certaines protéinases plasmatiques et placentaires en cas de PE, ainsi qu'une augmentation de certains inhibiteurs du plasminogène et une diminution de l'expression de l'activateur du plasminogène à la surface des cellules trophoblastiques (Mulhaupt, Mazar et al. 1994; Graham and McCrae 1996; Pang and Xing 2003).

Il existe également un profil anormal d'expression des *molécules d'adhésion* à la surface du trophoblaste en cas de PE, les CTEV perdant leur phénotype invasif (Zhou, Damsky et al. 1997; Kaufmann, Black et al. 2003).

La tension en oxygène environnant est un des facteurs dont dépend fortement la qualité de l'invasion des artères. La différenciation des CTEV est dépendante de la tension en oxygène, le phénotype invasif augmentant l'augmentation de la tension en oxygène. En conditions hypoxiques, les trophoblastes prolifèrent tout en se différenciant peu. Il n'est aujourd'hui pas possible d'affirmer si l'hypoxie placentaire est la cause ou la conséquence des défauts d'invasion trophoblastique et de remodelage vasculaire (Genbacev, Zhou et al. 1997; Caniggia, Mostachfi et al. 2000; Caniggia, Winter et al. 2000).

L'hypothèse d'une *origine immunitaire* dans la pathogénie de la PE repose sur de solides bases épidémiologiques. L'invasion trophoblastique correspond en effet à un phénomène de greffe semi-allogénique, et des mécanismes de tolérance maternelle sont nécessaires. Le nombre de cellules immunitaires activées serait augmenté en cas de PE. Chez les patientes prééclamptiques, le nombre de macrophages activés augmente très fortement dans la paroi artérielle utérine et on constate une augmentation de l'apoptose des CTEV. Ce

phénomène d'apoptose semble médié par la sécrétion de différents facteurs par les macrophages, dont le monoxyde d'azote et le tumor necrosis factor alpha (TNF α), les CTEV exprimant le récepteur. Par ailleurs, il existe une sous-expression de différents facteurs de protection immunitaire des CTEV. FasL est un facteur d'apoptose des cellules immunitaires notamment les lymphocytes T CD8 et jouerait donc à l'état normal un rôle de protection immunitaire pour les CTEV (Huppertz, Kadyrov et al. 2006; Heazell, Lacey et al. 2008). Son expression est diminuée en cas de PE, ainsi que celle de HLA-G, qui joue un rôle protecteur vis-à-vis des cellules NK (Lim, Zhou et al. 1997).

Hypoxie placentaire - Débris placentaire circulants

Une dysfonction placentaire va survenir progressivement, conséquence du défaut de remodelage vasculaire utérin. Il semble que cette dysfonction soit la conséquence d'une hypoxie chronique. Bien qu'il n'existe pas de preuve définitive de l'existence de ce phénomène, plusieurs arguments indirects viennent étayer cette hypothèse : augmentation de l'indice mitotique en cas de PE, augmentation de l'épaisseur du syncytium et de marqueurs moléculaires d'hypoxie et de stress oxydatif (Hubel 1999).

Le stress oxydatif semble en partie responsable de la symptomatologie liée à la PE. Une des conséquences est l'augmentation de l'apoptose et de la nécrose du syncytium et la libération augmentée de débris placentaires dans la circulation maternelle : ADN circulant, fragments de syncytiotrophoblaste, protéines cytoplasmiques. Cette augmentation de l'élimination de débris placentaires est mise en évidence par l'augmentation de leur concentration dans les veines utérines en cas de PE. Ces débris placentaires sont à l'origine d'une altération de la fonction endothéliale maternelle et d'une augmentation de la réponse inflammatoire liée à la grossesse (Redman and Sargent 2000).

Ce schéma physiopathologique défaut de remodelage vasculaire – hypoxie placentaire n'est pas aujourd'hui totalement applicable à certaines formes de PE moins sévères de fin de grossesse, sans RCIU associé notamment. Il est fréquent dans ces situations que la vascularisation utéro-placentaire apparaisse normale par examen des Doppler utérins. Cependant, il apparaît difficile d'affirmer que le Doppler des artères utérines soit un reflet réel de la vascularisation utéro-placentaire d'aval et les méthodes d'évaluation de cette vascularisation restent à développer. Ce travail de thèse permettra de largement développer ce concept.

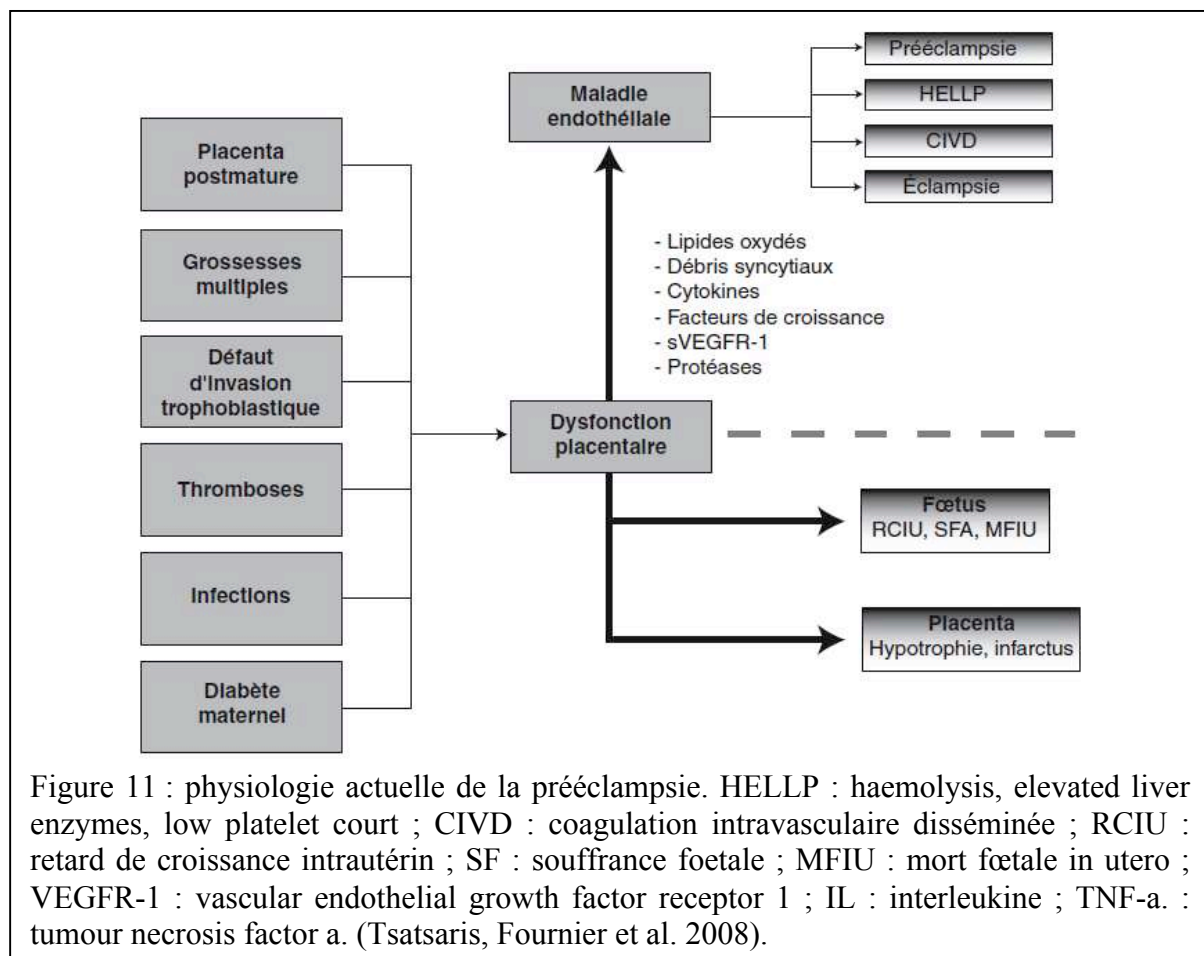
Maladie endothéliale

Les conséquences majeures de l'atteinte endothéliale maternelle dans la PE sont l'altération de la réactivité vasculaire aux substances vasomodulatrices, une activation de la coagulation et une augmentation de la perméabilité capillaire (Powers, Catov et al. 2008). De nombreux marqueurs circulants de dysfonctionnement endothélial sont retrouvés en cas de PE : facteur von Willebrand, fibronectine, endothéline... Il existe concomitamment une augmentation des résistances vasculaires périphériques due à une activation du système rénine-angiotensine par les cytokines placentaires. Par ailleurs, en cas de PE, il existe un relargage accru de sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1 – forme soluble du récepteur du VEGF de type 1) à l'origine d'un effondrement des taux de VEGF et PlGF, jouant un rôle majeur dans la dysfonction endothéliale maternelle systémique et la néphropathie glomérulaire (Tsatsaris, Fournier et al. 2008). La production d'endogline soluble est augmentée, elle va potentialiser la dysfonction endothéliale induite par sFlt-1 avec augmentation de la perméabilité vasculaire. Les taux d'endogline et de sFlt-1 sont augmentés avant l'apparition des signes cliniques, ce

qui en fait des candidats potentiels en tant que marqueurs pour un dépistage précoce (Tsatsaris, Goffin et al. 2003); (Levine, Maynard et al. 2004; Levine, Lam et al. 2006).

Les cellules endothéliales des capillaires glomérulaires rénaux sont également altérées, avec dysfonction rénale à l'origine de la protéinurie qui est à la base du diagnostic clinique. Ces lésions sont appelées « endothéliose glomérulaire » (Maynard, Min et al. 2003).

Il faut noter que le schéma précédemment proposé ne permet pas d'expliquer la survenue de prééclampsies chez des patientes présentant une vascularisation utéroplacentaire apparemment normale (Dopplers utérins normaux, absence de retard de croissance intra-utérin) comme c'est le cas pour les prééclampsies avec « gros placentas » (en cas de diabète maternel ou de grossesses multiples) ou pour les prééclampsies de fin de grossesse, souvent associées à un dépassement de terme, ou encore pour les prééclampsies survenant dans un contexte infectieux. Actuellement, la prééclampsie est considérée comme une pathologie maternelle secondaire à une dysfonction placentaire (dont l'origine est diverse) responsable de la libération, dans la circulation maternelle, de diverses substances ayant la capacité d'altérer la fonction endothéliale systémique (Figure 11).



1.2.4 Facteurs de risque et physiopathologie : aspects spécifiques relatifs au RCIU

Comme précisé plus haut, ce travail portant sur l'évaluation de la vascularisation utéro-placentaire, nous nous intéressons ici au phénomène de retard de croissance intra-utérin d'origine vasculaire placentaire. Cette définition concerne des fœtus indemnes de toute pathologie constitutive, mais n'ayant pu réaliser leur potentiel génétique de croissance en raison d'un défaut d'apports par le placenta.

Ce concept n'englobe que les fœtus pour lesquels une cassure de la courbe de croissance a pu être objectivée, ou les nouveau-nés présentant un petit poids pour l'âge gestationnel avec morphotype dit disharmonieux, ce qui correspond à des biométries abaissées pour le périmètre abdominal, les autres paramètres biométriques étant conservés.

L'étude de la littérature portant sur le retard de croissance intra-utérin (RCIU) est rendue complexe en raison de trois facteurs de confusion principaux. En premier lieu, les étiologies à l'origine des retards de croissance sont multiples, et la définition précise de l'origine des RCIU n'est souvent qu'imparfaitement précisée par les différents auteurs. La plupart des études englobent à la fois des RCIU disharmonieux d'origine vasculaire placentaire et des RCIU harmonieux, prenant leur origine dans une étiologie différente.

Ensuite, la définition même du RCIU est variable d'une étude à l'autre. Les paramètres retenus (poids de naissance, poids pour l'âge gestationnel, rapport poids / taille...) ainsi que les seuils (du 3^{ème} au 10^{ème} percentile le plus fréquemment) ne font pas consensus. Il n'est par ailleurs pas toujours fait clairement la différence entre les RCIU vrais et les fœtus petits pour l'âge gestationnel, groupe incluant des RCIU d'origine vasculaire placentaire mais également des fœtus de petit gabarit constitutionnel.

Enfin, les résultats concernant les fœtus avec RCIU d'origine vasculaire sont souvent inclus dans des études portant plus largement sur les pathologies vasculaires placentaires, incluant des patientes ne présentant qu'une prééclampsie isolée.

Au total, il est difficile de réaliser une analyse de la littérature permettant d'évaluer de façon précise et spécifique les facteurs épidémiologiques et physiologiques des RCIU vasculaires placentaires.

Paramètres influençant la croissance fœtale – étiologies des RCIU

La croissance fœtale est sous la dépendance de nombreux facteurs, tels que les paramètres physiologiques maternels (taille, poids avant la grossesse, gain pondéral pendant la grossesse, parité, altitude, âge maternel (<16 ou >35ans), ethnie, antécédent de RCIU ou de

macrosomie), paternels, le sexe du fœtus, facteurs environnementaux : tabac et autres toxiques, alimentation, altitude... Ainsi, les causes des retards de croissance couvrent un champ étiologique très large. Elles peuvent être regroupées en :

- causes fœtales : anomalies chromosomiques (*Trisomie 13, T18, T21, 45X0, délétions, disomies uniparentales, mosaïque confinée au placenta*), anomalies métaboliques, malformations congénitales (*agénésie pancréatique, anencéphalie, hernie diaphragmatique, laparoschisis, omphalocèle, agénésie/dysplasie rénales, syndromes polymalformatifs...*)
- causes infectieuses : Toxoplasmose, Cytomégalovirus...
- causes placentaires vasculaires
- facteurs maternels : statut nutritionnel (*famine, malabsorptions consécutives à une maladie inflammatoire cryptogénétique des intestins, une chirurgie bariatrique type By-pass, une pancréatite chronique*), hypoxie chronique (*pathologie pulmonaire, cardiopathie cyanogène, drépanocytose, mucoviscidose*), pathologies vasculaires (*HTA chronique, prééclampsie, pathologie du collagène, diabète de type I*)
- causes environnementales / toxiques (*haute altitude, stress physique ou psychologique, tabac, alcool, héroïne, cocaïne, traitements anticoagulants, anticonvulsivant, antimétaboliques...*)

En fonction du moment de l'apparition du mécanisme pathologique responsable du RCIU, de sa durée et de sa nature, le morphotype du fœtus sera différent. En cas de début très précoce, les paramètres biométriques sont touchés de façon homogène, on parle alors de RCIU symétrique ou harmonieux. En cas d'apparition plus tardive (surtout après 30 SA en

cas d'étiologie vasculaire), le retard de croissance sera disharmonieux avec une atteinte préférentielle des paramètres abdominaux et des membres. Cette croissance disharmonieuse est la conséquence de mécanismes d'adaptation mis en œuvre par le fœtus pour préserver la croissance et le développement des organes les plus fragiles par le phénomène de redistribution vasculaire au profit du cerveau et du cœur et au dépend des territoires périphériques et splanchniques (Lin and Santolaya-Forgas 1998; Evain-Brion and Malassine 2010).

Altération de la fonction placentaire et RCIU dit vasculaire

L'origine de ce défaut de fonctionnement placentaire serait également un défaut d'invasion trophoblastique. Ceci repose sur l'observation d'anomalies structurelles sur le placenta de grossesse avec RCIU. Macroscopiquement, l'épaississement de la membrane basale, les infarctus, thromboses et hématomes placentaires et les lésions de villite chronique sont plus fréquentes (Vedmedovska, Rezeberga et al. 2011; Vedmedovska, Rezeberga et al. 2011). Une diminution du nombre de villosités choriales, ainsi que de leur diamètre et donc de la surface d'échange est également observée. Le nombre d'artères est également abaissé, ainsi que leur diamètre et leur degré de ramification, potentiellement en rapport avec un déséquilibre des facteurs pro- et anti-angiogéniques (VEGF, PlGF, sFLT1...) (Arroyo and Winn 2008). Les artères spiralées apparaissent de plus petit calibre, conséquence de la persistance de la couche musculaire (Cetin and Antonazzo 2009; Evain-Brion and Malassine 2010).

Les altérations des Doppler ombilicaux seraient corrélés à la proportion de villosité choriales atteintes : l'index de résistance dans l'artère ombilicale augmente lorsque 30% des villosités sont touchées, une diastole nulle ou un reverse flow apparaît lors que plus de 50% à

70% des villosités chorales sont endommagées (Figueras and Gardosi ; Miller, Turan et al. 2008).

Outre l'aspect quantitatif, lié à la réduction de taille du placenta et donc de la surface d'échange, les apports sont également réduits par défaut de transfert des nutriments et de l'O₂ au fœtus. Ces phénomènes sont aggravés par le fait qu'il n'existe pas ou peu de possibilité de néoglucogénèse en anténatal et qu'en cas de RCIU, le taux d'extraction de l'O₂ par le fœtus est plus faible que chez l'enfant eutrophe. Il en va de même pour le métabolisme des acides aminés où, au défaut d'apport, s'ajoute une augmentation du catabolisme protéique.

En conclusion, l'origine placentaire du RCIU est à la fois quantitative par défaut de perfusion et d'apport et qualitative par anomalie des fonctions de transferts des nutriments vers le fœtus. Sur le versant fœtal, le développement d'un RCIU entraîne également une diminution des taux d'extraction fœtaux de ces nutriments.

1.2.5 Physiopathologie de la prééclampsie et du RCIU : points communs et différences

Ces deux pathologies de la grossesse, pouvant survenir de façon concomitante ou non chez une même femme enceinte, ont pour point commun un défaut d'implantation placentaire (Kaufmann, Black et al. 2003; Sibai, Dekker et al. 2005). Cependant, les manifestations maternelles et fœtales de ces pathologies sont différentes. Si la prééclampsie sévère et précoce est dans la majorité des cas associée à une croissance fœtale au minimum subnormale, les formes plus tardives et moins sévères de PE peuvent ne pas être accompagnées d'un RCIU. De même, le RCIU peut n'avoir aucun impact chez la mère (Lain and Roberts 2002; Sibai, Dekker et al. 2005).

Il apparaît cependant que les mères ayant eu une grossesse avec RCIU isolé sont comme les patientes avec PE plus exposées au risque d'accident ischémique et d'HTA dans

leur vie future. Des facteurs de risque communs sont retrouvés pour la survenue de la PE ou du RCIU : HTA, pathologie rénale, existence d'une maladie auto-immune, âge maternel élevé. Ces facteurs de risque entrent dans le cadre plus large des dysfonctions endothéliales maternelles préexistantes à la grossesse. Pendant la grossesse, la dysfonction endothéliale occupe une place centrale à la fois en cas de PE et en cas de RCIU. Comme développé plus haut, un nombre important de marqueurs de l'activation endothéliale sont élevés en cas de PE ou de RCIU : vascular cellular adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1, endothéline, fibronectine, E-selectine (Ness and Sibai 2006). Cependant, le niveau d'activation de ces différents facteurs est plus élevé en cas de PE qu'en cas de RCIU.

Il semble qu'une des différences majeures dans les phénomènes physiopathologiques amenant à la survenue de la PE et du RCIU puisse être retrouvée dans l'existence d'un terrain à risque de syndrome métabolique maternel. Les patientes présentant une obésité ont 5 fois plus de risque de développer une prééclampsie que les patientes avec BMI normal. De même, un syndrome métabolique est 5 fois plus fréquent chez les patientes développant une prééclampsie (Cedergren 2004; Sibai, Dekker et al. 2005). Par ailleurs, le rôle du tabac représente un apparent paradoxe : alors qu'il joue souvent un rôle central dans la survenue d'un RCIU, avec un effet-dose clairement établi (McDonald, Armstrong et al. 1992), il a un rôle clairement protecteur pour la survenue d'une prééclampsie (Conde-Agudelo, Althabe et al. 1999). Cependant, une majorité de patientes fumeuses ne présente pas de surpoids ou syndrome métabolique préexistant à la grossesse. Il apparaît *in fine* que les patientes fumeuses présentant également un syndrome métabolique présentent un risque très élevés de prééclampsie très sévère (Conde-Agudelo, Althabe et al. 1999).

1.2.6 Problématique actuelle

Prévenir la prééclampsie

En l'absence de réel traitement hors l'arrêt de la grossesse et en raison du diagnostic clinique tardif, la prévention est l'un des objectifs thérapeutiques principaux à ce jour. De nombreuses pistes ont été explorées, avec malheureusement une majorité d'échecs. Seule l'aspirine a fait la preuve de son intérêt dans cette indication et dans une moindre mesure les apports de calcium chez les patientes carencées. La grande difficulté rencontrée pour l'étude de l'intérêt potentiel de traitement préventifs de la PE est l'impossibilité à ce jour de définir clairement une population à risque et le niveau de risque a priori dans un groupe de patientes.

L'aspirine

Le premier essai randomisé ayant mis en évidence l'intérêt de l'administration d'aspirine à faible dose chez des femmes à risque élevé de PE a été publié en 1985 par Beaufils et al., ces résultats ayant été confirmés par la suite par d'autres essais randomisés (Beaufils, Uzan et al. 1986). L'intérêt de l'aspirine a été testé chez de nombreux groupes de femmes enceintes : nullipares, hypertendues, antécédents de PE, diabète de type 1, grossesses multiples et également patientes « tout venant ». Les termes de mise en route de l'administration ont été également très variables d'un essai à l'autre, allant du premier trimestre à 32 SA.

Deux méta-analyses reprenant 123 études publiées en 22 ans (59 études retenues in fine, rassemblant 37560 patientes) ont permis une mise au point majeure quant à l'intérêt de l'aspirine pour la prévention de la PE (Duley, Henderson-Smart et al. 2001; Askie, Duley et al. 2007). La première méta-analyse a confirmé l'intérêt préventif de l'aspirine de façon significative avec une réduction du risque de 17%. Dans le but de limiter les biais d'interprétation liés à l'hétérogénéité des patientes incluses dans les différents essais, une

deuxième méta-analyse reprenant toutes les données individuelles des patientes a été réalisée sur 32217 patientes. La réduction significative du risque retrouvée était de 10%.

Héparines de bas poids moléculaire (HBPM)

Il n'existe pas à l'heure actuelle d'arguments reposant sur un niveau de preuve suffisant pour valider l'intérêt des HBPM dans la prévention de la PE. Seules les patientes présentant par ailleurs une thrombophilie doivent se voir proposer ce traitement, en fonction de leurs antécédents thrombo-emboliques (Middeldorp 2004; Mello, Parretti et al. 2005; Sergio, Maria Clara et al. 2006).

Antioxydants : vitamine C, vitamine E

En cas de PE, il existe une production excessive de radicaux libres avec toxicité endothéliale, et une baisse des concentrations plasmatiques en vitamines C et E, deux antioxydants essentiels au maintien du métabolisme cellulaire et aux mécanismes de défense vis-à-vis du stress oxydatif. Une méta-analyse de 2005 avait montré un effet protecteur de l'administration de vitamine C et E (RR = 0,51 [0,32-0,80]) mais associé à une augmentation du risque de prématurité spontanée. Ces observations ont été remises en cause dans deux études récentes : absence de diminution du risque de PE mais augmentation du taux de prématurité dans le groupe traité (Briley, Poston et al. 2006; Rumbold, Crowther et al. 2006; Rumbold, Duley et al. 2008).

Calcium

Deux arguments principaux sont en faveur d'un intérêt potentiel du calcium dans la prévention de la PE. Tout d'abord, l'incidence des PE est plus faible chez certaines populations ayant des apports nutritionnels calciques importants, tels que les Indiens Mayas

ou les Ethiopiens. Ensuite, la calcémie et la calciurie sont abaissées en cas de PE. Ces taux anormaux de calcium auraient un effet potentiel sur les cellules musculaires lisses avec augmentation de la vasoconstriction. Les résultats d'études publiées sur une période de 25 ans et incluant 15528 patientes ont été étudiés dans une méta-analyse de 2004. Il apparaît que l'effet bénéfique est le plus important chez les populations à faible apport calcique et chez les femmes à risque initial de PE plus élevé.

Il est donc recommandé aujourd'hui d'instaurer un apport calcique chez les patientes à risque de PE et chez les patientes avec faible apport, après enquête alimentaire (Astrup 2010; Jain, Sharma et al. 2010; Sibai 2011).

Monoxyde d'azote (NO) et donneurs de NO

Le NO joue un rôle majeur dans les phénomènes d'implantation trophoblastique et dans la régularisation de la vascularisation placentaire. Les résultats des essais évaluant les donneurs de NO pour la prévention de la prééclampsie ont été évalués dans une méta-analyse de 2007 par Meher et al. Il n'a pas été mis en évidence d'effet protecteur, mais en revanche on note l'apparition d'effets secondaires importants en cours de traitement (Lees, Valensise et al. 1998; Cetin, Yurtcu et al. 2004; Meher and Duley 2007).

Autres pistes...

Le magnésium, le zinc, les diurétiques, jusqu'à la supplémentation du régime avec de l'ail, ont été évalués, sans qu'on n'ait pu mettre en évidence leur efficacité (Meher and Duley 2006; Meher and Duley 2006; Vollebregt, van der Wal et al. 2008; Jain, Sharma et al. 2010).

Prédire la prééclampsie

L'amélioration des performances cliniques en termes de prédiction de la prééclampsie à l'échelle individuelle est aujourd'hui le deuxième objectif majeur. Prédire la prééclampsie permettrait à la fois de progresser dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques et de mettre en place de nouveaux essais thérapeutiques sur des populations ciblées. Les outils de prédiction évalués sont cliniques, biologiques ou échographiques. Ces différentes approches sont aujourd'hui le plus souvent combinées.

Marqueurs prédictifs cliniques

Comme développé plus haut, le marqueur de risque principal aujourd'hui utilisé en pratique courante et amenant à la prescription d'aspirine est l'antécédent personnel de prééclampsie. D'autres facteurs sont utilisés pour placer la patiente dans un groupe à risque augmenté, tels que l'obésité, l'existence d'une hypertension, d'un diabète..., mais ils n'ont pas permis de mettre en évidence un bénéfice à la mise en place d'un traitement préventif.

La réalisation d'un Holter tensionnel au deuxième trimestre de la grossesse (mesure continue de la TA sur 24h), couplée ou non à un examen Doppler des artères utérines, n'a démontré qu'une valeur prédictive faible ne présentant pas d'intérêt clinique (Seed, Chappell et al. 2011).

Marqueurs biologiques

Les progrès acquis dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques de la prééclampsie ont permis d'évaluer de nombreux marqueurs, témoins potentiels de la dysfonction endothéliale et placentaire.

Une majorité de patientes ayant un dosage des marqueurs biologiques de risque de survenue de trisomie 21 (hCG, α FP, PAPP-A, inhibine A), la valeur prédictive de ces marqueurs pour la survenue d'une PE a été régulièrement évaluée. Les valeurs prédictives décrites dans la méta-analyse de Conde-Aguledo sont trop faibles pour permettre une utilisation en pratique courante (Conde-Agudelo, Villar et al. 2004).

Plus récemment, plusieurs auteurs ont évalué les taux de molécules d'adhésion solubles, telles que VCAM-1 et ICAM-1, avec des résultats parfois contradictoires d'une étude à l'autre (Kim, Ryu et al. 2004).

Marqueurs échographiques : Doppler des artères utérines

La valeur prédictive du spectre Doppler des artères utérines a été très largement évaluée, étant donné qu'elle pourrait être le reflet de la mise en place adéquate du système vasculaire utéro-placentaire. Au décours de la majorité des grossesses, l'artère utérine perd son caractère élastique dès le premier trimestre. L'étude des flux sanguins par examen Doppler classique permet alors de mettre en évidence une absence de reflux (ou notch) entre la systole et la diastole. Un spectre artériel avec absence de notch proto-diastolique et indice de résistance faible est ainsi censé refléter une invasion trophoblastique adéquate et la perte d'élasticité des vaisseaux artériels utérins.

L'intérêt du Doppler utérin a principalement été évalué au deuxième trimestre de la grossesse. Les valeurs prédictives de cet examen, que le critère d'évaluation soit l'existence d'un notch ou un IR modifié, sont très variables d'une étude à l'autre. Les données les plus récentes vont dans le sens d'une absence de valeur prédictive pouvant présenter un intérêt clinique et la pratique de cet examen n'est actuellement par recommandée ni en population à bas risque ni en population à haut risque. Les performances de ce test sont par ailleurs

inférieures lorsqu'il est réalisé au premier trimestre. Seule sa valeur prédictive négative pourrait permettre de rassurer une partie des patientes initialement à risque (North, Ferrier et al. 1994; Phupong, Dejthevaporn et al. 2003; Yu, Smith et al. 2005; Espinoza, Romero et al. 2007; Anastasakis, Paraskevas et al. 2008; Phupong and Dejthevaporn 2008; Audibert, Boucoiran et al. 2010; Lovgren, Dugoff et al. 2010; Kuc, Wortelboer et al. 2011).

Associations de marqueurs

- Association de marqueurs biologiques

Les modifications de profils de plusieurs marqueurs, tels que le PlGF, l'activateur de l'inhibiteur du plasminogène et l'acide urique ont été évaluées, avec des valeurs prédictives restant faibles (LR+ 6,6 / LR- 0,15). L'association d'un rapport élevé sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) / PlGF et d'une élévation de l'endogline soluble semble être corrélée à une très forte élévation du risque de PE (OR 31,6 [10,7-93,4]). Cependant, l'hétérogénéité des périodes de prélèvement ne permet d'affirmer la valeur prédictive de ce test (North, Ferrier et al. 1994; Phupong, Dejthevaporn et al. 2003; Yu, Smith et al. 2005; Espinoza, Romero et al. 2007; Anastasakis, Paraskevas et al. 2008; Phupong and Dejthevaporn 2008; Audibert, Boucoiran et al. 2010; Lovgren, Dugoff et al. 2010; Kuc, Wortelboer et al. 2011).

- Association de critères échographiques

Il semble que l'association d'une anomalie Doppler des utérines et d'une diminution du volume placentaire au premier trimestre permettent d'améliorer la valeur prédictive de l'échographie, le LR+ atteignant alors 11,9. Ces résultats préliminaires doivent malgré tout être confirmés.

- Associations polymorphes

L'association de l'analyse Doppler des utérines et de paramètres maternels a été évaluée. Poon, en combinant mesure de la pression artérielle maternelle, Doppler des artères utérines et dosage de la PAPP-A, obtenait un taux de détection des PE précoce de 83.8%, avec 5% de faux positifs. Les résultats n'étaient en revanche pas significatifs pour les PE tardives et les HTA gestationnelles pures. Akolekar et al. rapportaient une sensibilité de 90 % avec un taux de 10% de FP pour le dépistage de la PE précoce en combinant le Doppler des artères utérines et le dosage du PIGF (Akolekar, Zaragoza et al. 2008). Foidart et al. ont évalués en 2010 l'association Doppler des AU et dosage de l'endogline soluble. Cent quatre vingt patientes témoins ont été comparées à 90 patientes ayant développé une PE (dont 30 précoces) : dans le groupe PE précoce, les taux d'endogline et l'index de pulsatilité des artères utérines étaient significativement augmentés et les taux de PAPP-A et de PIGF diminués. Le taux de détection des PE précoce (pour 10% de FP) était de 96.3% en combinant les facteurs maternels, l'endogline soluble, le PIGF et l'index de pulsatilité des artères utérines (Foidart, Munaut et al. 2010).

Ces résultats encourageants ne peuvent cependant pas être appliqués en population générale. En effet, l'ensemble des études peut être considéré comme ayant été réalisé en population à haut risque de survenue de prééclampsie.

Au total, aucune méthode ne permet à l'heure actuelle de prédire la survenue des pathologies vasculaires placentaires (PVP).

Les pathologies vasculaires placentaires (PVP), prééclampsie (PE) et RCIU, sont une des causes majeures de morbidité et mortalité maternelle et périnatale en France et dans les pays développés. Un défaut de vascularisation utéro-placentaire est présent dans ces deux pathologies. Cependant, PE et RCIU ne peuvent être totalement agrégés au sein d'un même ensemble physiopathologique. En effet, bien que ces deux affections puissent être présentes de façon concomitante chez une même patiente, cette situation n'est pas systématique. Par ailleurs, le profil clinique des patientes semble différer, la PE semblant survenir de façon préférentielle chez des femmes présentant une dysfonction endothéliale préexistante à la grossesse, dans le cadre du syndrome métabolique essentiellement. Enfin, les conséquences totalement opposées de facteurs environnementaux tels que le tabac entre PE (facteur protecteur) et RCIU (facteur de risque), confirment des substrats physiopathologiques spécifiques de chaque affection.

L'impossibilité de réaliser une évaluation objective in vivo de la vascularisation utéro-placentaire constitue un écueil majeur aussi bien pour la compréhension des phénomènes physiopathologiques amenant au développement de PVP que pour le développement de stratégies de dépistage et de prévention en début de grossesse.

1.3 Angiographie Doppler énergie tridimensionnelle (PDA) : intérêt potentiel pour l'étude de la vascularisation utéro-placentaire

1.3.1 Principes et limites du Doppler 2D

Echographie mode B : aspects techniques

Imagerie mode B

C'est une coupe anatomique représentant les tissus et les limites des organes traversés par les ultrasons. Elle est construite à partir des échos générés par des interfaces des tissus. Chaque écho est positionné sur l'écran grâce à la mesure du temps entre l'émission et la réception. Sa luminosité (*Brightness* pour B Mode) dépend de son amplitude c'est à dire son énergie.

Emission et réception du signal : sondes échographiques

L'élément piézo-électrique est une céramique qui a la propriété de transformer un signal électrique en onde de pression ultra-sonore et inversement. Anciennement, une sonde ne pouvait émettre qu'à une fréquence donnée. Aujourd'hui, les sondes utilisent des fréquences variables. Certaines peuvent gérer des fréquences composites (plusieurs fréquences associées). Pour les sondes abdominales elles varient de 3 à 10 MHz environ ; pour les sondes endocavitaires de 5 à 20 MHz environ.

Energie ou puissance

Ce sont les décibels en ultrason. L'énergie est proportionnelle à l'amplitude du signal. Elle n'a rien à voir avec la fréquence. Analogiquement, une petite fille peut chanter avec un son aigu (fréquence élevée, énergie faible), et Pavarotti avec une voix grave pouvait chanter avec beaucoup de force (fréquence basse, énergie élevée).

L'intensité

Ce mot est utilisé pour désigner la luminosité du blanc sur le moniteur. Plus un point est blanc et plus le signal reçu à une forte énergie.

Formation d'un point sur une image

Un point sur l'écran (ou pixel) représente un écho de l'ultrason émis (on parle d'onde incidente et d'onde réfléchie). Il se forme quand il rencontre une interface entre deux éléments de propriété mécanique différente. Son énergie est proportionnelle à la différence d'impédance. Quand les deux structures sont très différentes (par exemple muscle-os) l'énergie (ou amplitude) de l'onde réfléchie est forte ; quand la différence d'impédance est petite, l'énergie de l'onde réfléchie est faible (l'unité de l'énergie acoustique est le décibel : dB). L'énergie de l'onde réfléchie se traduit sur l'écran par l'intensité du blanc (Brightness). Le point est positionné sur l'écran par la simple mesure du temps t entre l'émission et la réception.

L'atténuation

L'atténuation associe la réflexion, la diffusion et l'absorption. La diffusion est constituée des ondes réfléchies et transmises dans une direction oblique (diffraction); suivant la surface rencontrée celles-ci auront des directions variables. Usuellement, la seule onde réfléchie analysée est celle qui revient au cristal émetteur, les autres sont perdues. L'absorption est le phénomène de perte calorique : on peut estimer l'index thermique et l'index mécanique par unité de volume ; ces 2 index apparaissent sur l'écran. Plus la fréquence est élevée, plus l'absorption est importante. De la même façon, seuls les sons graves parviennent à l'oreille d'une fête au lointain.

Doppler : principes techniques

Effet Doppler

Découvert indépendamment par Christian Doppler en 1842, puis six ans plus tard par Hippolyte Fizeau, l'effet Doppler est la modification de la fréquence d'une onde enregistrée par le récepteur en raison du déplacement relatif de l'émetteur par rapport au récepteur.

L'exemple le plus simple et le plus compréhensible est le changement de son des voitures qui passent devant nous et qu'on observe tous quand nous sommes au bord de la route. Elles arrivent avec un bruit aigu et s'éloignent avec un son plus grave, alors que le nombre de tours par minute du moteur n'a pas changé. L'émetteur, la voiture, se déplace par rapport au récepteur, l'observateur ; la fréquence entendue est modifiée par le déplacement. L'onde sonore est comprimée quand elle se rapproche, le son est aigu, elle est dilatée quand elle s'éloigne, elle est plus grave. Si le récepteur se déplace vers l'émetteur, la fréquence augmente: le son est plus aigu ; si le récepteur s'éloigne de l'émetteur, la fréquence diminue: le son est plus grave. Cela n'échappe pas aux enfants quand on les entend jouer aux petites voitures.

La PRF

Pour le Doppler, la PRF est la fréquence de répétition des pulses, c'est-à-dire le nombre d'ondes ultrasonores successives émises et reçues par la sonde par seconde. Elle doit être réglée en fonction de la vitesse analysée. Elle est élevée pour les vitesses rapides ; et basse pour les vitesses lentes. Elle varie de 500Hz à 10kHz environ.

Doppler couleur

Il s'agit d'une cartographie couleur des vitesses moyennes enregistrées par effet Doppler avec autant de petites fenêtres que de points de couleur sur l'image brute. Il permet de connaître la direction des flux et donne une idée des vitesses. Quand le flux va vers la sonde, la couleur est rouge-orange ; quand le flux s'éloigne de la sonde, la couleur est bleue. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la vitesse.

Doppler puissance ou énergie

C'est une cartographie couleur de l'amplitude (la puissance réfléchié ultrasonore) globale des globules rouges en mouvement. Il est donc dépendant de l'hématocrite. Le codage de signal ne se fait pas par analyse spécifique des différentes fréquences qui composent le signal Doppler mais en intégrant la totalité de l'amplitude du signal. Le signal résultant a donc une intensité plus élevée que le signal Doppler couleur. Dans sa forme la plus simple, toute notion de sens du flux et de vitesse est perdue.

Le Doppler puissance offre plusieurs avantages sur le Doppler couleur: résolution spatiale élevée, faible dépendance vis-à-vis de l'angle incident, sensibilité élevée aux flux lents et aux petits vaisseaux.

Limites du Doppler 2D pour l'étude de la vascularisation utéro-placentaire

L'analyse de la vascularisation d'un organe d'intérêt par Doppler 2D peut être réalisée selon deux principes. Le premier consiste à effectuer une analyse anatomique purement descriptive des flux observés et de leur direction (en cas d'utilisation du Doppler couleur) au sein d'un organe. Ces flux observés vont directement dépendre des réglages de la machine préalablement décrits et aucune quantification n'est alors possible. L'analyse est ainsi purement subjective et non reproductible.

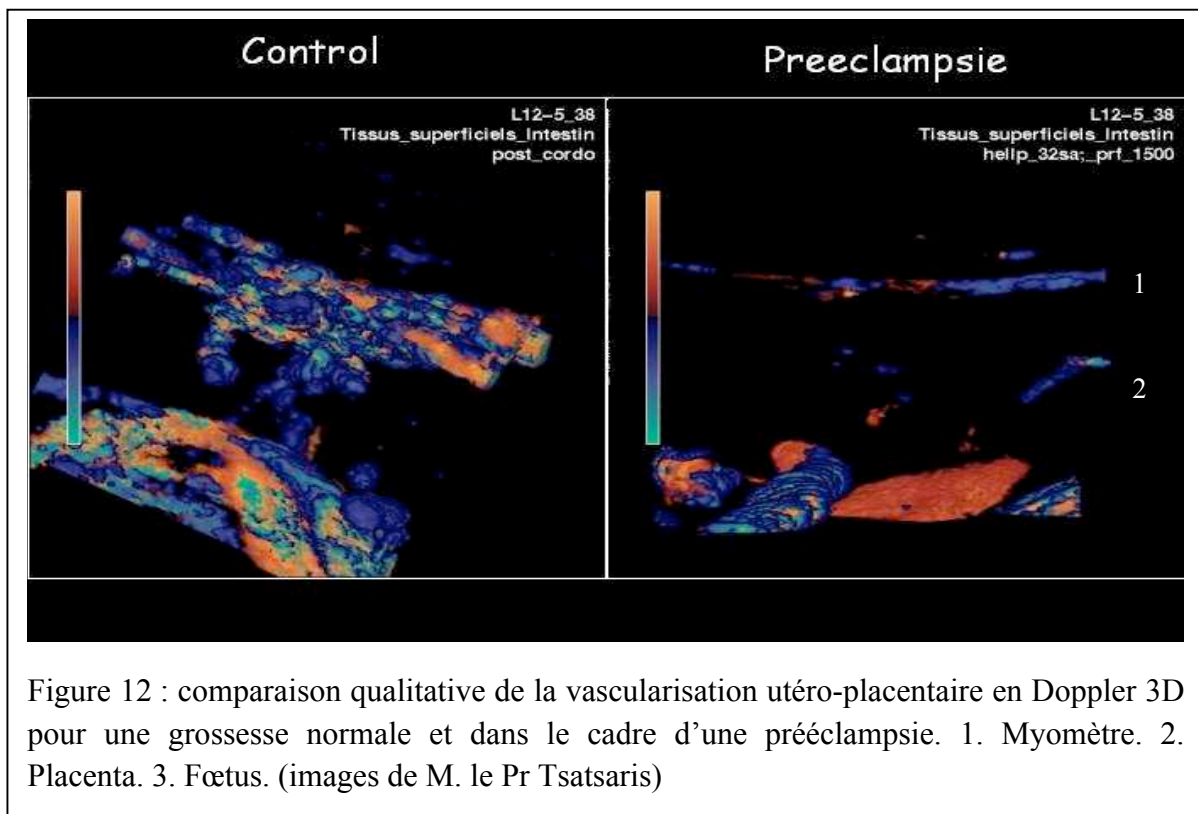
La deuxième approche consiste à repérer un vaisseau afférent ou efférent considéré comme étant représentatif de la vascularisation d'aval ou d'amont respectivement, par exemple artère et veine rénales ou artères utérines. La mesure continue des vitesses de flux permet l'analyse du spectre Doppler de ce vaisseau : profils de vitesses et directions des flux en systole et diastole, pic de vitesse, indices de résistance etc... Si ce type de mesures peut être considéré comme valable dans le cas d'organes dont la vascularisation n'est dépendante que d'un seul vaisseau afférent principal, comme dans le cas du rein par exemple, la situation est différente pour les organes ou système dont la vascularisation est anastomotique.

La vascularisation utéro-placentaire est organisée en système complexe, présentant une interface directe entre vaisseaux fœtaux et sang maternel. La chambre intervillieuse est perfusée par le biais d'un shunt vasculaire myométrial sous-placentaire. L'analyse de la perfusion utéro-placentaire ne peut pas être correctement appréhendée par la simple analyse du spectre Doppler d'un vaisseau afférent, l'artère utérine. La faible performance de cet examen en pratique clinique démontre clairement les limites de cette approche.

1.3.2 Intérêts potentiels de l'imagerie Doppler 3D pour l'étude de la vascularisation utéro-placentaire

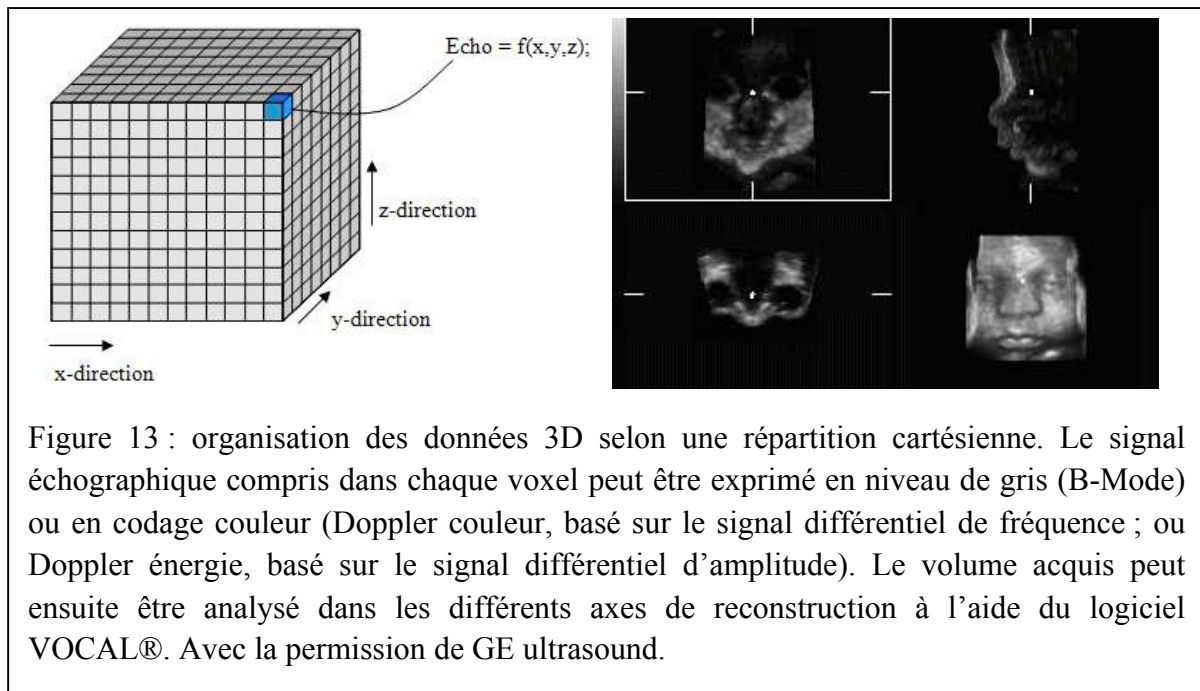
Il est aujourd'hui possible d'évaluer le volume et les paramètres Doppler de l'unité utéro-placentaire par échographie tridimensionnelle. Les premières acquisitions impliquaient un balayage manuel de la zone d'intérêt par l'opérateur, puis une reconstruction tridimensionnelle secondaire. Au départ, le mode Doppler couleur était utilisé. Tsatsaris et al. (données non publiées) ont été les premiers à réaliser des acquisitions tridimensionnelles de l'unité utéro-placentaire chez des femmes présentant une grossesse normale et chez des patientes avec prééclampsie (Figure 12). L'importante diminution de la vascularisation tant

au sein du myomètre que du placenta chez la patiente présentant une prééclampsie est ici très démonstrative. L'intérêt potentiel d'une approche permettant de réaliser une évaluation de la vascularisation directement au sein de l'unité utéro-placentaire et ne se heurtant pas à l'écueil de l'impossibilité d'utiliser des produits de contraste en cours de grossesse est évident. Cependant, ce type d'approche était uniquement qualitative et peu reproductible aussi bien pour la construction des images que l'interprétation d'un éventuel défaut de perfusion.



1.3.3 Concept d'Angiographie Doppler énergie tridimensionnelle (PDA)

Il est aujourd'hui possible de réaliser des acquisitions automatisées d'un volume d'intérêt, le balayage étant effectué par la sonde (absence de mouvement de la part de l'opérateur). L'échographie tridimensionnelle repose sur les mêmes principes que l'échographie bidimensionnelle, l'image étant reconstruite en 3D par l'apposition des différents plans acquis consécutivement lors du balayage. Les informations volumiques sont ensuite mises en mémoire pour analyse secondaire tel que représenté dans la Figure 13.



L'unité de volume analysée en échographie tridimensionnelle est appelée un voxel, pour « *volume element* » (équivalent du pixel, « *picture element* » en 2D). Le volume acquis peut ensuite être retravaillé secondairement. La technique d'imagerie 3D en niveau de gris peut être associée au mode Doppler Puissance. La 2ème version du logiciel VOCAL® (Virtual Organ Computer Analysis) permet l'analyse du volume acquis et des paramètres Doppler

dans l'organe ou une partie de l'organe étudié, réalisant alors une biopsie virtuelle (découpage automatique, semi-automatique ou manuel).

Classiquement, une acquisition est appelée volume d'intérêt (VOI, *volume of interest*), et la région spécifiquement analysée par l'opérateur est appelée région d'intérêt (ROI, *region of interest*).

L'utilisation la plus connue du grand public est le rendu de volume : ce mode permet de présenter en 3D la surface d'un élément d'intérêt, dans un but d'analyse morphologique (Figure 14).



Figure 14 : exemple d'images obtenues grâce au mode de rendu de surface en imagerie 3D. A gauche, visage d'un fœtus humain vers 32 semaines d'aménorrhée. A droite, image du pôle céphalique d'un fœtus de brebis vers j130. Images personnelles.

Cependant, un des intérêts majeurs de l'échographie tridimensionnelle réside dans la possibilité de déterminer une ROI précise, et d'extraire des données quantifiées de signal échographique (mode B et Doppler) au sein de cette ROI. Différentes approches sont disponibles pour déterminer les limites d'une ROI : utilisation de modes automatiques tels que la biopsie 3D, ou traçage manuel des limites du volume d'intérêt par l'opérateur (Figure 15).

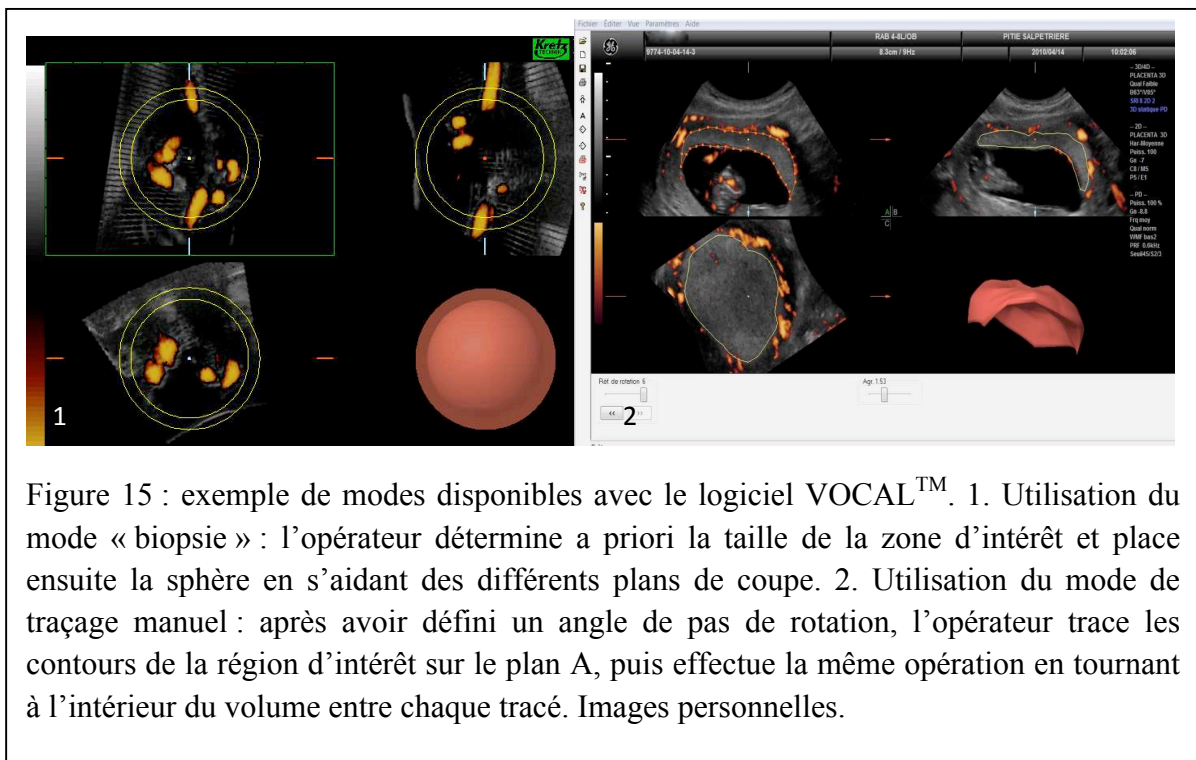
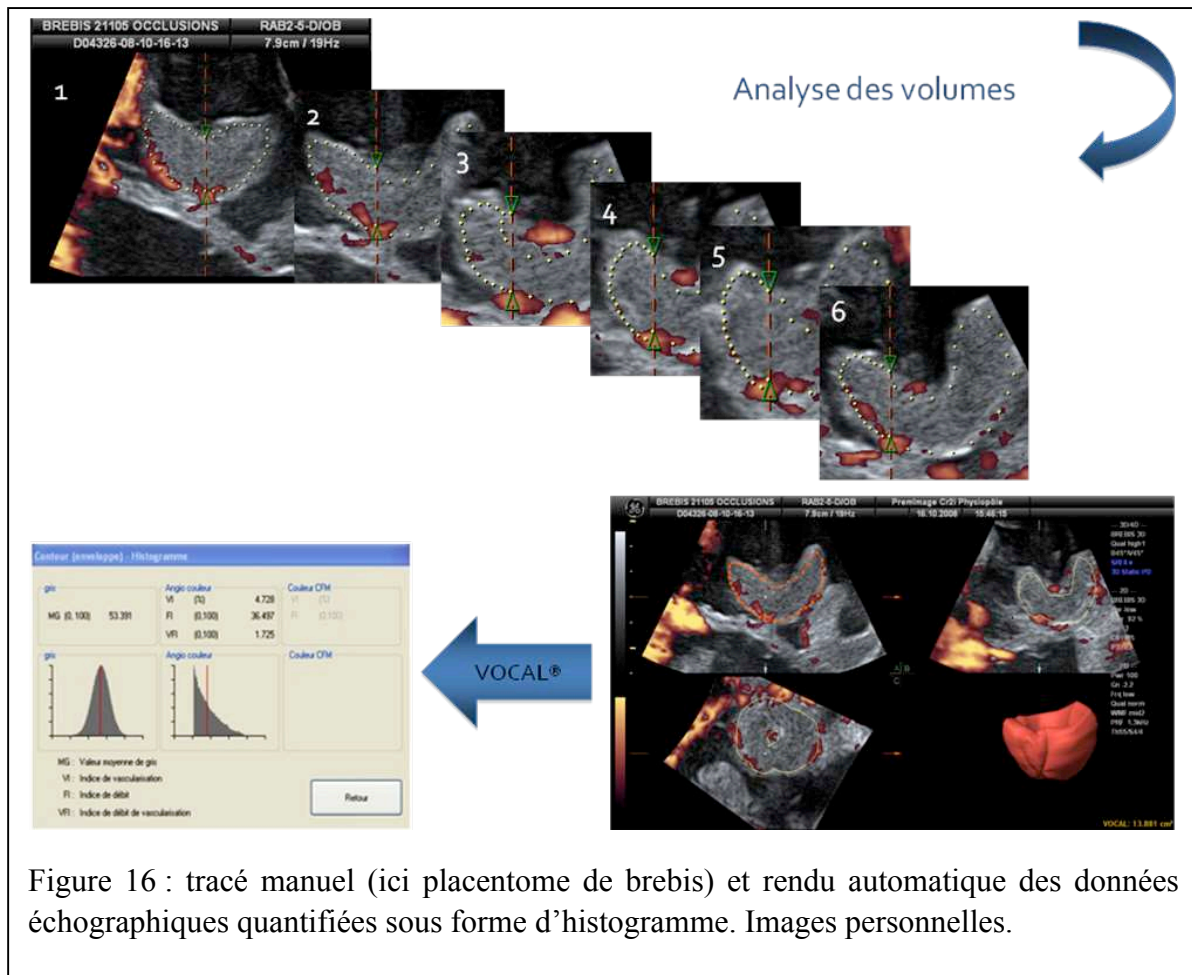


Figure 15 : exemple de modes disponibles avec le logiciel VOCALTM. 1. Utilisation du mode « biopsie » : l'opérateur détermine a priori la taille de la zone d'intérêt et place ensuite la sphère en s'aidant des différents plans de coupe. 2. Utilisation du mode de traçage manuel : après avoir défini un angle de pas de rotation, l'opérateur trace les contours de la région d'intérêt sur le plan A, puis effectue la même opération en tournant à l'intérieur du volume entre chaque tracé. Images personnelles.

Au sein d'une ROI prédéterminée, il est possible de quantifier le signal « gris » et le signal « couleur ». Le logiciel VOCAL™ permet d'extraire ces données, qui sont automatiquement présentées sous forme d'un histogramme (Figure 16).



Le calcul compare en fait le nombre de voxels de couleur au nombre de voxels en niveau de gris. Le résultat est rendu en niveau de gris (*Mean Grey*) et sous forme de 3 indices (VI, FI et VFI) pour les paramètres Doppler :

- un *index de vascularisation (VI)* : pourcentage de voxels colorés qui reflète la densité des vaisseaux dans un volume étudié,

- un *index de flux (FI)* : l'intensité de ces voxels est cotée de un à 100, selon l'intensité des flux sanguins,
- un *index de perfusion (VFI)* : produit des deux précédents représentant la perfusion du tissu.

L'utilisation du Doppler énergie est justifiée car elle est basée sur l'intensité du signal (et non pas sur sa fréquence comme le Doppler couleur) et a par conséquent une plus grande sensibilité pour les flux de très faible vitesse. De plus, l'image Doppler n'est pas dépendante de l'angle d'insonation ni soumise au phénomène d'aliasing. Toutes ces caractéristiques permettent une meilleure visualisation des petits vaisseaux (Vignal 2009).

1.3.4 Intérêt de l'angiographie Doppler 3D quantifiée pour l'étude de la vascularisation utéro-placentaire

La possibilité de quantifier le signal Doppler énergie au sein de l'unité utéro-placentaire présente un intérêt potentiel majeur dans le domaine de l'étude des défauts de placentation. Cette technique, non invasive et ne nécessitant pas l'utilisation de produits de contraste potentiellement tératogènes, a très rapidement été évaluée chez la femme enceinte. En 2004, Mercé et al ont étudié la reproductibilité de la quantification du signal Doppler 3D placentaire (Merce, Barco et al. 2004). Les coefficients de corrélations intra-classes observés étaient excellents (au minimum 0.85), ainsi que la reproductibilité intra-observateur.

Zalud et al ont, en 2007, évalué la vascularisation utéro-placentaire par Doppler 3D quantitatif au 2^{ème} trimestre (Zalud and Shaha 2007). Ces premiers travaux ont confirmé la faisabilité de la technique chez la femme enceinte. Guiot et al. ont les premiers rapportés les résultats de la quantification Doppler 3D placentaires chez des grossesses normales et des

grossesses marquées par un RCIU : il existait une différence significative avec une chute des différents indices 3D chez les patientes avec RCIU (Guiot, Gaglioti et al. 2008).

Ainsi, l'angiographie Doppler 3D est très rapidement apparue comme un outil présentant un intérêt potentiel majeur pour l'étude et le dépistage des pathologies vasculaires placentaires.

1.3.5 Limites techniques – Questionnements

Bien que très prometteuse, cette nouvelle approche d'étude tridimensionnelle de la vascularisation d'une région d'intérêt présentait dès sa conception des limites et questionnements techniques majeurs.

En premier lieu, le rendu des résultats en termes de quantification du signal Doppler est fait sous la forme d'indices 3D, VI, FI et VFI, dont le niveau et le type de corrélation avec les flux réels au sein d'un organe d'intérêt n'était en 2005 absolument pas évalués. Ils n'ont été évalués *in vitro* par le groupe de Raine-Fenning (Université de Nottingham) qu'à partir de 2008 (Raine-Fenning, Nordin et al. 2008; Martins, Raine-Fenning et al. 2010).

Ensuite, l'analyse des flux en mode Doppler énergie est beaucoup plus sensible à différents paramètres physiologiques et de réglage de la machine que lors de l'utilisation du mode Doppler couleur, pour lequel le rendu de résultats est essentiellement dépendant de l'angle entre le faisceau ultrasonore et le flux étudié. Ainsi, la profondeur de l'organe étudié, le niveau d'atténuation du signal par les tissus, le réglage du gain Doppler, de paramètres tels que la PRF (*pulse repetition frequency* : fréquence de répétition des impulsions écho) ont potentiellement un impact majeur sur les résultats observés en Doppler 3D pour un même niveau de perfusion d'un organe. Là encore, les seules données disponibles ont été évaluées *in vitro* en 2008 (Raine-Fenning, Nordin et al. 2008).

La technique étant a priori sensible à des facteurs physiologiques tels que la profondeur de la ROI, il apparaît d'emblée que les résultats ne peuvent être extrapolés d'une patiente à l'autre en terme de niveau de perfusion réel d'un organe pour des indices Doppler 3D donnés. Par conséquent, il est rapidement apparu que l'utilité de la technique en pratique clinique, impliquant une utilisation chez des patientes présentant des BMI très variables et des situations anatomiques placentaires également différentes, était à démontrer et dépendrait du niveau de sensibilité de l'angiographie Doppler pour identifier les défauts de perfusion placentaires (Raine-Fenning, Welsh et al. 2008).

La vascularisation utéro-placentaire est organisée en système complexe, présentant une interface directe entre vaisseaux fœtaux et sang maternel. La chambre intervillieuse est perfusée par le biais d'un shunt vasculaire myométrial sous-placentaire. L'analyse de la perfusion utéro-placentaire ne peut pas être correctement appréhendée par la simple analyse du spectre Doppler d'un vaisseau afférent, l'artère utérine.

L'angiographie Doppler 3D, permettant la quantification du signal Doppler dans un volume d'intérêt, est très rapidement apparue comme un outil présentant un intérêt potentiel majeur pour l'étude et le dépistage des pathologies vasculaires placentaires.

Cependant, cette nouvelle technique devait être évaluée sur de nombreux aspects techniques fondamentaux : corrélation entre indices mesurés et flux vasculaires réels, impact des réglages in vivo, impact de différents paramètres physiologiques. Sa sensibilité clinique et expérimentale était également à démontrer.

Objectifs de la thèse

2 Objectifs de la thèse

Les causes de la dysfonction placentaires dans la PE et le RCIU vasculaire sont multifactorielles et variables, rendant l'étude de ces pathologies très complexe. Bien que la théorie de l'hypoperfusion placentaire ne soit pas directement démontrée pour une partie des PE, ce phénomène semble occuper une place centrale dans les PE sévères et les RCIU vasculaires.

Il n'est cependant pas possible aujourd'hui de parler de réelle évaluation de la perfusion de l'unité utéro-placentaire en pratique clinique courante avec les techniques disponibles. Comme déjà développé, cette évaluation de la vascularisation se heurte à un écueil majeur : l'impossibilité d'utiliser des produits de contraste en cours de grossesse en raison du risque tératogène. La seule technique disponible et utilisée en pratique est l'échographie Doppler bidimensionnelle, pulsée, couleur ou énergie. Quel que soit le mode utilisé, cette approche implique de repérer un vaisseau estimé comme présentant un intérêt majeur pour l'évaluation de la perfusion de la région d'intérêt.

Ainsi, seul l'examen Doppler des artères utérines est utilisé en pratique courante pour l'évaluation plus ou moins précoce de la vascularisation utéro-placentaire, avec les limites extrêmement importantes que nous avons déjà pu envisager. Pour le fœtus, différentes régions font l'objet d'évaluation, le dépistage et le diagnostic de RCIU vasculaire reposant essentiellement sur l'analyse du Doppler ombilical.

A côté de l'étude de la physiopathologie de ces pathologies *in vitro*, qui ont permis des progrès majeurs en termes de compréhension des mécanismes sous-tendant le dysfonctionnement placentaire et ses conséquences maternelles et fœtales, et qui offre

aujourd'hui l'espoir d'un dépistage plus ciblé basé sur le dosages de marqueurs biologiques au premier trimestre de la grossesse, des progrès apparaissent primordiaux à réaliser dans l'évaluation *in vivo* de la vascularisation utéro-placentaire.

Appréhender l'existence et l'importance d'éventuels défauts de vascularisation utéro-placentaire est un axe de recherche majeur tant pour le dépistage, le diagnostic ou la compréhension des phénomènes physiopathologiques du RCIU vasculaire et de la PE.

L'approche quantitative offerte par le Doppler énergie tridimensionnel présente un grand potentiel dans ce contexte. Comme précédemment développé, ce nouveau concept permet d'étudier la vascularisation de manière globale au sein d'une zone d'intérêt, en s'affranchissant des biais liés à l'étude forcément indirecte d'un vaisseau afférent jugé principal. Il s'agit également de la première technique offrant la possibilité d'une telle approche intra-organique sans nécessité d'injection de produit de contraste, et donc utilisable en cours de grossesse.

Notre équipe a démontré la faisabilité et l'intérêt potentiel de cette méthode chez la femme enceinte (voir chapitre Résultats 4.4). Ces résultats ont été confirmés par d'autres, utilisant d'autres approches de repérage de la région d'intérêt. Malgré tout, comme tout concept nouveau, l'angiographie 3D soulève de nombreuses questions d'ordre technique et clinique.

Ainsi, s'agissant d'une quantification de signal « image couleur » (les voxels) et non de vitesse de flux ou d'index de pulsativité, le degré et le type de corrélation avec les flux réels restait à démontrer *in vivo*.

Par ailleurs, cette technique apparaît potentiellement sensible à de nombreux paramètres de réglages de l'appareil au moment de l'acquisition.

Enfin, la sensibilité de la méthode pour détecter *in vivo* une hypoperfusion reste à confirmer, ainsi que sa valeur prédictive en termes de survenue de RCIU et/ou PE.

L'objectif de notre travail était de réaliser ces différentes évaluations préliminaires, techniques et cliniques, de la technique d'angiographie Doppler 3D.

Dans ce but, nos recherches ont été organisées autour de trois axes principaux :

1. La réalisation d'**évaluations fondamentales de la technique** échographique sur **modèle animal** de brebis gestante. Un modèle de brebis permettant d'évaluer la perfusion placentaire par angiographie 3D avec quantification et contrôle concomitants de la vascularisation utérine a été développé. Ce modèle a permis d'évaluer le degré de corrélation entre indices Doppler 3D et débit réel dans l'unité utéro-placentaire, ainsi que l'impact de différents paramètres de réglage à débit constant.
2. L'**évaluation de la sensibilité** et du niveau de valeur prédictive de la méthode sur un **modèle expérimental** de RCIU par défaut de perfusion placentaire chez la lapine gestante.
3. L'**évaluation de la méthode en pratique clinique** sur une cohorte de 170 femmes enceintes. Une étude prospective multicentrique observationnelle a été menée dans ce but de 2009 à 2011. La vascularisation utéro-placentaire a été étudiée au premier trimestre par angiographie Doppler 3D. Les résultats ont été analysés en termes de

faisabilité et de valeur prédictive de survenue d'un RCIU et/ou PE plus tardivement dans la grossesse.

Méthodologie Générale

3 Méthodologie générale

3.1 Acquisitions Doppler tridimensionnelles

A l'heure actuelle, seuls deux constructeurs d'échographes mettent à disposition la technique de quantification Doppler 3D : General Electric Medical Systems Ultrasound (GE) et Medison. L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, clinique ou expérimentaux, l'a été sur des machines GE. Pour les études cliniques, des appareils Voluson 730 Expert (General Electric Medical Systems Ultrasound, Vélizy, France), munis de sondes volumiques abdominales cadencées à 2.2-6.5 MHz ont été utilisés. Pour les études sur modèles expérimentaux animaux, des Voluson E8 ont été utilisés, la sonde volumique étant adaptée à la taille de l'animal modèle.

Chez la femme, les acquisitions 3D en mode Doppler couleur étaient effectuées au centre de l'unité utéro-placentaire au décours d'un examen échographique entrant dans le cadre du suivi habituel de leur grossesse. Pour les modèles animaux, les acquisitions étaient réalisées sous anesthésie générale directement au contact de l'utérus après réalisation d'une laparotomie. Les raisons de l'utilisation de ce mode opératoire seront développées pour chaque modèle.

Pour chaque protocole, la technique d'acquisition était standardisée pour tous les paramètres d'acquisition avec programme prédéfini dans chaque machine : fenêtre, profondeur, paramètres Doppler. Il était impossible de modifier les paramètres pour les opérateurs réalisant les acquisitions. Une touche spécifique pour l'acquisition a été mise en place informatiquement sur chaque machine par le fabricant. Les paramètres de réglage des

machines étaient systématiquement définis lors d'essais préliminaires (non décrits dans la thèse) : le réglage permettant d'obtenir le meilleur signal visuel Doppler non artéfacté était retenu.

Les acquisitions étaient automatiquement mises en mémoire sur le disque dur de la machine et sur un disque dur externe pour analyse ultérieure.

3.2 Analyse des volumes

Les analyses ont été réalisées secondairement pour chaque protocole. Elles étaient effectuées systématiquement en aveugle, l'observateur n'ayant jamais connaissance du contexte clinique ou expérimental correspondant à chaque volume.

Le logiciel VOCAL™ (Virtual Organ Computer-aided AnaLysis software, GE VOLUSON) a permis de réaliser une reconstruction tri-dimensionnelle du volume acquis après sélection d'un pas de rotation de 9°, 15° ou 30° pour visualiser toutes les faces. Un traçage manuel des contours de la zone d'intérêt était effectué à chaque rotation, le plan A servant de plan de référence (voir Figure 16). Le traçage manuel a systématiquement été retenu afin d'obtenir une quantification la plus exhaustive possible du signal Doppler dans l'unité utéro-placentaire. La technique de la biopsie 3D (voir Figure 15) n'a jamais été utilisée car elle ne permet pas une analyse globale du volume d'intérêt (VOI) acquis et qu'elle implique forcément un biais de sélection d'une région d'intérêt (ROI) par l'observateur.

3.3 Choix des modèles animaux

3.3.1 Modèles disponibles pour la recherche en imagerie échographique périnatale

Le but de ce travail de thèse, sur le plan de la recherche fondamentale, était de réaliser *in vivo* les évaluations techniques nécessaires à une meilleure compréhension des indices Doppler 3D rendus pour l'unité utéro-placentaire.

Deux études ont ainsi été tout d'abord réalisées chez la brebis. Le premier protocole expérimental consistait à évaluer le type et le degré de corrélation existant entre le débit sanguin dans l'unité utéro-placentaire et les valeurs de 3D Doppler, les paramètres de réglage de la machine restant standardisés pour toutes les acquisitions. Le deuxième consistait, également chez la brebis, à évaluer cette fois-ci l'impact de variations graduelles appliquées sur chacun des paramètres majeurs de réglages de la machine, sur la valeur des indices à débit de perfusion utéro-placentaire constant.

La brebis a été choisie pour plusieurs raisons. D'une part sa taille, la brebis pesant entre 50 et 70kg et le fœtus à terme (145 jours de gestation) pesant 3 à 4 kg, permettant une approche facile pour les procédures chirurgicales nécessaires à la mise en place de capteurs vasculaires pour le contrôle du débit utéro-placentaire, ainsi qu'une manipulation aisée. Les gestations comprennent le plus souvent un ou deux fœtus, et seules des brebis gestantes de singleton ont été retenues pour cette étude. De plus, l'organisation de son placenta en sous-unités appelés placentomes (mesurant à j130 entre 2 et 4cm de diamètre en moyenne), qui sont tout à fait compatibles à la réalisation d'acquisitions Doppler 3D avec un appareil et une sonde utilisés en pratique clinique courante.

Des essais préliminaires, non détaillés dans ce document, avaient préalablement été réalisés chez d'autres espèces utilisées couramment pour la recherche périnatale : le lapin et la rate gestante. Il est tout d'abord apparu que les acquisitions Doppler 3D n'étaient pas techniquement réalisables chez les animaux de très petite taille comme la rate gestante. En effet, la fréquence respiratoire extrêmement rapide est à l'origine de nombreux artefacts lors de l'acquisition des volumes. Les acquisitions étaient en revanche réalisables chez la lapine, avec cependant un nombre d'images avec artefacts élevés rendant nécessaire la réalisation

d'acquisition directement au contact de la corne utérine gravide (un repérage précis des unités utéro-placentaires acquises était également possible uniquement par laparotomie).

D'autre part, les caractéristiques physiologiques gestationnelles de la brebis en font un animal idéal pour la réalisation de procédures invasives en cours de gestation. Il est possible d'avoir un accès direct à la corne utérine gravide après exposition par laparotomie sous anesthésie générale puis de réaliser des procédures de plusieurs heures tout en maintenant une perfusion utéro-placentaire stable et sans risque de survenue d'avortement (Morel, Tran et al. 2008).

En février 2010, à l'invitation du groupe ERIN (*European Ruminant Infrastructure Network*), une mise à jour bibliographique a été réalisée concernant l'utilisation des modèles ruminants pour la recherche périnatale en général. Ce texte, actuellement en cours de révision pour être soumis pour la revue *Theriogenology*, est placé à la fin de ce chapitre (paragraphe 3.3.4). Ce travail nous a permis de rappeler la nécessité de disposer de modèles animaux de grande taille dans certaines situations expérimentales.

3.3.2 Modèles animaux de restriction de croissance *in utero*

Données générales

Pour des raisons éthiques évidentes, les modèles animaux sont très largement utilisés dans le domaine de la recherche périnatale. Comme discuté plus haut, ils présentent un intérêt majeur pour l'évaluation souvent invasive de nouvelles techniques ou de nouveaux traitements avant leur application chez la femme enceinte. Les animaux modèles sont également largement utilisés pour l'étude de phénomènes physiologiques ou physio-pathologiques. Par ailleurs, bien que les règles qualitatives de la recherche expérimentale poussent à diminuer le nombre d'animaux utilisés, augmenter la qualité des protocoles et remplacer au maximum les

procédures expérimentales animales par des études *in vitro* ou *in silico* (règle des « 3R » : Réduire, Raffiner, Remplacer), de nombreuses hypothèses ne peuvent être vérifiées que par la réalisation d'une expérimentation animale, seule à même d'apporter une réponse physiologique intégrée.

De nombreux modèles sont couramment utilisés dans le cadre plus restreint de l'étude des pathologies de la vascularisation utéro-placentaire. Les validations techniques de l'outil « angiographie Doppler 3D » ayant été réalisées chez la brebis gestante, l'apport de cette nouvelle approche a ensuite été évalué à partir de plusieurs modèles animaux de pathologie de la vascularisation utéro-placentaire. En effet, dans la littérature, il existe de nombreux modèles animaux de pathologie de la vascularisation utéro-placentaire, mais les approches expérimentales, souvent très différentes, souffrent dans la majorité des cas d'un défaut d'évaluation des conséquences utéro-placentaires *in vivo* des différentes perturbations appliquées.

L'évaluation de la vascularisation utéro-placentaire par angiographie Doppler 3D a été réalisée sur un modèle de RCIU vasculaire chirurgical et sur un modèle pharmacologique chez le lapin. Les résultats de ce travail seront développés dans le chapitre 4. Par la suite, la technique a également été évaluée sur un modèle de RCIU vasculaire chez l'ovin (non rapporté dans ce document). Elle a aussi été utilisée dans le cadre du suivi de la gestation de clones bovins (voir chapitre discussion – perspectives). Les résultats des travaux réalisés chez la vache seront rapidement abordés dans les perspectives et feront l'objet de publications ultérieures.

Un travail de revue de la littérature a été réalisé en début de thèse et publié dans la revue de l'Académie Vétérinaire de France (voir chapitre 3.3.3). Comme développé dans cet

article, il n'existe pas aujourd'hui d'espèce idéale ni de procédure idéale. En effet, chaque espèce reste un modèle dont la physiologie de la gestation ne peut être qu'en partie comparable aux phénomènes observés dans l'espèce humaine. Le choix de l'espèce doit être fait en prenant en compte de multiples paramètres, dont, entre autres, la pertinence physiologique par rapport à la question posée, le coût, l'impact éthique, les possibilités de manipulations et de réalisation de procédures techniques et les outils disponibles sur le plan expérimental. Le type de perturbation réalisée dans chaque protocole est très variable et dépend à la fois de la faisabilité pour chaque espèce et des conséquences attendues. Enfin, les structures macroscopiques et microscopiques placentaires, particulières *in fine* à chaque espèce, ont un impact majeur sur l'interprétation finale des résultats.

Modélisation expérimentale en médecine périnatale : le concept des « poupées russes »

Ce modèle simplifié de représentation des différents niveaux d'approches envisageables lors de la réalisation de protocoles expérimentaux visant à étudier la croissance fœtale a été développé par H. J. Schröder (Schroder 2003). Bien que schématique, ce modèle permet de clairement compartimenter le niveau de perturbation de la gestation appliqué de façon expérimentale, ainsi que de clarifier l'interprétation des résultats. Le schéma (Figure 17) rappelle que le fœtus est au sein de l'unité utéro-placentaire, elle-même au sein de la mère, d'où la comparaison à des poupées-russes. L'intérêt de l'utilisation de modèles animaux pour l'étude de la vascularisation utéro-placentaire et de la croissance fœtale réside dans la possibilité d'étudier des conséquences physiologiques dites intégrées chez la mère et le fœtus. Le concept de compartiments précisé ici doit être systématiquement considéré pour la mise au point ou l'interprétation de protocoles expérimentaux.

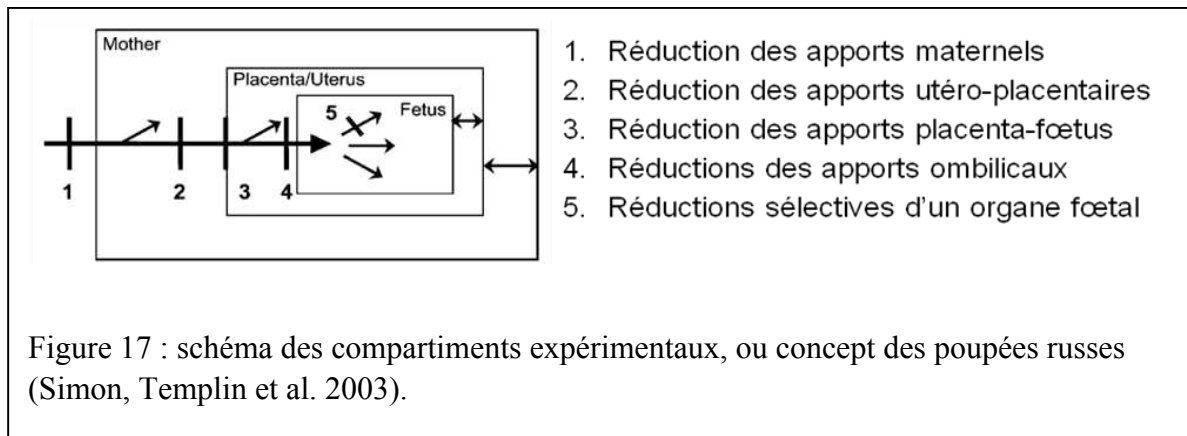


Figure 17 : schéma des compartiments expérimentaux, ou concept des poupées russes (Simon, Templin et al. 2003).

Les niveaux de perturbation 1 à 3 sont couramment utilisés, avec des approches expérimentales très variées. Les niveaux 4 et 5 ne sont que rarement décrits. Le niveau d'action le plus en amont est l'action directe sur la mère (niveau 1). Les actions peuvent être de plus en plus sélectives avec *in fine* des actions fœtales directes, en aval de l'unité utéro-placentaire (niveaux 2 à 5).

Lors de la réalisation ou de l'interprétation d'un protocole expérimental avec tentative de perturbation de la croissance ou de la vascularisation utéro-placentaire, l'âge gestationnel ou la période durant laquelle la perturbation est appliquée est primordial à considérer. Les conséquences fœtales globales ou pour un organe donné sont en effet fortement dépendante de la période de croissance et de différenciation considérée. Le choix de l'animal a ici également un rôle central, car les phases de croissance et de maturation des différents organes sont fortement variables d'une espèce à l'autre à période de gestation comparable. Ainsi, on compare souvent les espèces utilisant le temps relatif (pourcentage de temps de la gestation) plutôt que la durée absolue. Enfin, une attention particulière doit être portée au type de placenta, dont la structure macroscopique et microscopique est différente d'une espèce à l'autre.

Placentation comparée

Données générales

Viviparité et placentation datent du Dévonien, c'est-à-dire d'environ 380 millions d'années. Un spécimen de poisson fossile, le *Masterpiscis attenboroughi*, a en effet été découvert en 2008 en Australie (Long, Trinajstic et al. 2008), pour lequel des fœtus, un sac vitellin ainsi qu'un cordon ombilical contenant des vaisseaux sanguins ont pu être identifiés. Au long de la gestation, les vertébrés vivipares développent un système de 4 membranes : chorion, amnios, vésicule vitelline et allantoïde. Le placenta est considéré comme formé lorsque les membranes fœtales sont soit apposées soit fusionnées à la muqueuse utérine et que des échanges materno-fœtaux s'établissent alors au niveau de cet organe.

Excepté chez les oiseaux, la placentation se produit chez toutes les classes de mammifères (Carter 2008). Le placenta est de type chorio-allantoïdien chez la plupart des mammifères : la membrane chorionique est reliée à la circulation fœtale par les vaisseaux allantoïdiens. Chez les carnivores, le placenta est de type chorio-vitellin, la membrane chorionique étant irriguée par les vaisseaux vitellins. Chez les rongeurs, le sac vitellin remplace localement le chorion formant ainsi la membrane la plus externe et étant à l'origine d'un placenta dit vitellin (Leiser and Kaufmann 1994). Chez les poissons et les reptiles vivipares l'épithélium vitellin représente la zone d'échanges materno-fœtaux (Evain-Brion 2010).

Les structures placentaires présentent une extrême diversité d'une espèce à l'autre, tant pour la forme générale de l'organe que l'organisation des inter-digitations materno-fœtales,

des flux sanguins fœto-maternels que la nature et le nombre de couches séparant circulation maternelle et fœtale. La classification couramment utilisée est celle de Grosser, fondée sur le nombre de couches cellulaires séparant circulation maternelle et circulation fœtale, ou distance interhémale (Evain-Brion 2010).

Aspects macroscopiques

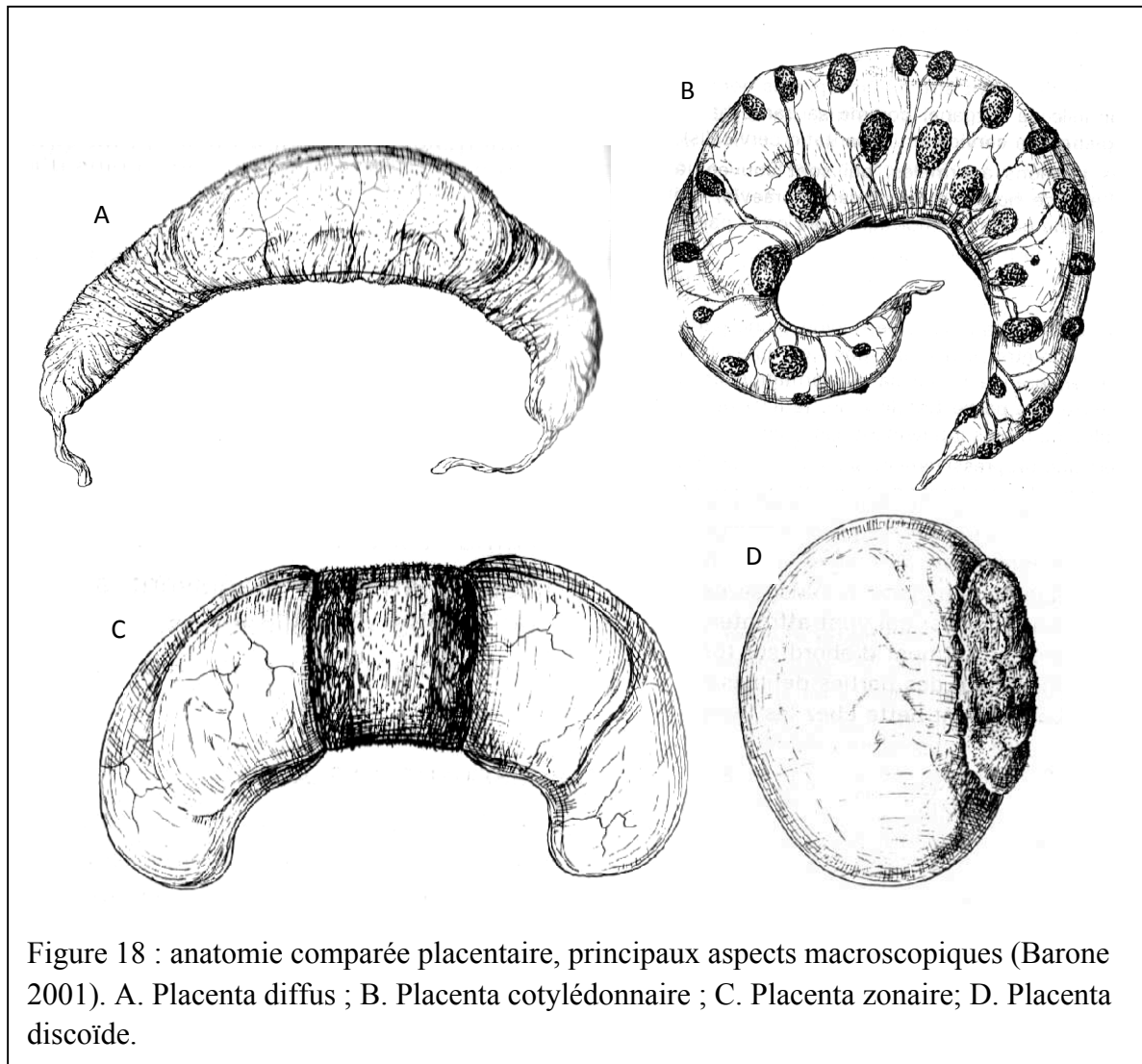
On peut observer quatre formes majeures de placenta : diffus, cotylédonnaire, zonaire et discoïde (Figure 18), les deux premiers types étant adéridés (Barone 2001).

Le placenta diffus est observé chez les équidés, les camélidés, les tragulidés, les lémurien et les suidés notamment. Le chorion est couvert par des microcotylédons constitués par de petites houppes de villosités, faiblement engrainés dans les cryptes de la muqueuse utérine. Chez les porcins, ces microcotylédons sont organisés en plis irréguliers.

Le placenta cotylédonnaire est présent chez les ruminants (à l'exception des camélidés et des tragulidés). Les structures cotylédonaires sont ici groupées en des plaques épaisses appelées cotylédons, développés en regard des caroncules de la muqueuse utérine (cryptes dans lesquelles les cotylédons sont engrainés). Le placenta est ainsi subdivisé en un ensemble de masses arrondies ou ovoïdes appelées placentomes, dont le nombre varie d'une espèce à l'autre.

Le placenta zonaire est développé en une ceinture complète, large et épaisse, autour de la partie moyenne du sac chorial. Ce type de placenta est commun à tous les carnivores.

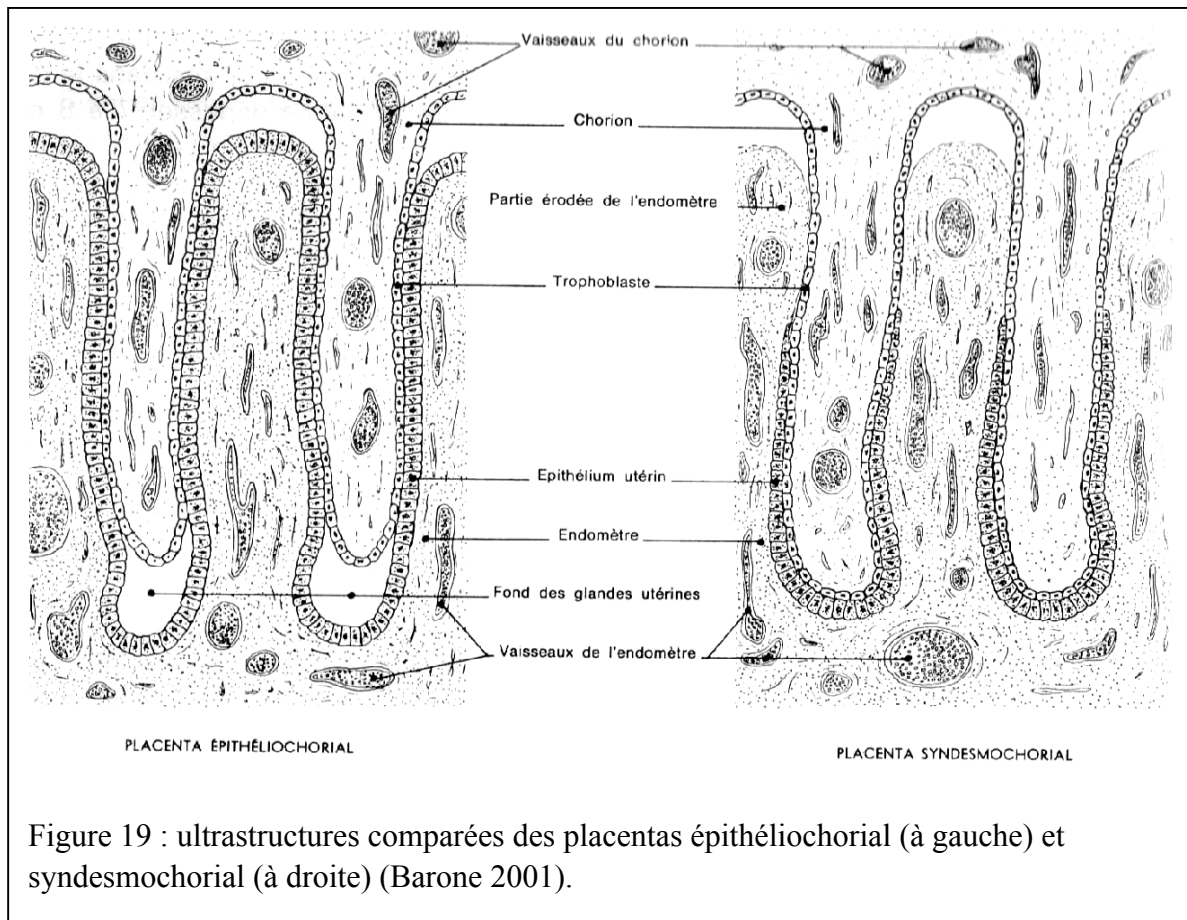
Dans le placenta discoïde, les villosités trophoblastique prennent une organisation labyrinthique ou trabéculaire et sont regroupées dans un organe placentaire circulaire. Il est présent chez les primates et les lagomorphes.



Ultrastructure

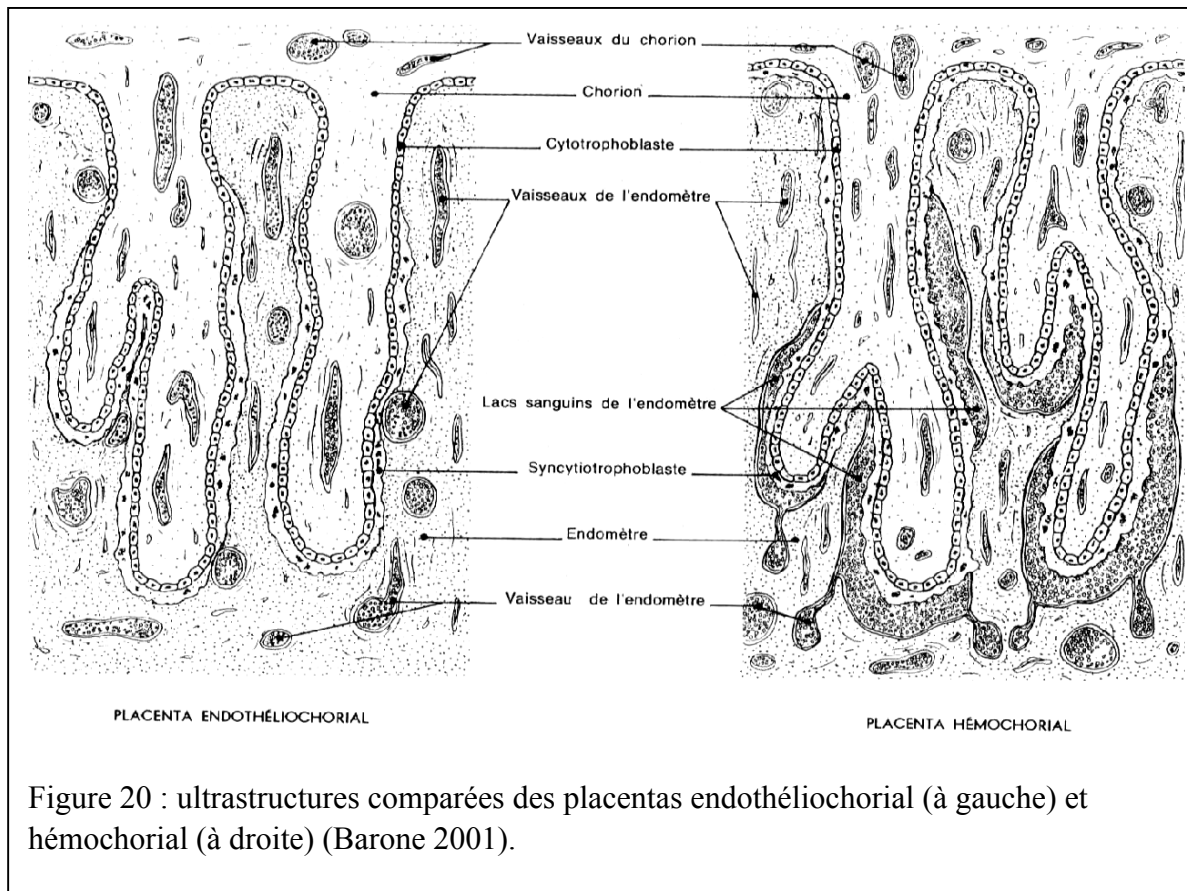
Dans la placentation **épithéliochoriale**, le chorion fœtal recouvert par le trophoblaste est apposé directement sur l'épithélium utérin de l'endomètre maternel. Le blastocyste est simplement attaché à l'endomètre sans l'envahir. Ce type de placentation est observé notamment chez la vache, la jument, la brebis et la truie. Les circulations maternelle et fœtale sont séparées par six couches cellulaires : l'endothélium des capillaires maternels, le

conjonctif maternel, l'épithélium utérin, le trophoblaste, le conjonctif fœtal et l'endothélium des capillaires fœtaux (Figure 19), avec une surface d'échange importante en raison de l'interdigitation des micro-villosités. Dans certains placentas épithéliochoριαux (brebis, vache...) il existe des cellules polynucléées qui migrent et fusionnent avec les cellules de l'épithélium utérin, avec formation d'un syncitium hybride materno-fœtal. Ces cellules sont à l'origine de la sécrétion d'hormone lactogène placentaire vers la circulation maternelle. Chez les équidés, il existe un phénomène d'invasion plus marqué : au niveau la ceinture chorionique, qui entoure le conceptus, se différencie à 38-40 jours de gestation des structures appelées cupules endométriales formées de cellules trophoblastiques qui prolifèrent et phagocytent les cellules épithéliales utérines, avec pénétration dans le stroma endométrial. Les cupules endométriales sont à l'origine de la production de la gonadotrophine équine. Elles disparaissent vers 120 jours de gestation et seul le placenta épithéliochorial non-invasif persiste jusqu'à terme (330 jours).



Enfin, une distinction peut être faite entre placenta épithéliochorial et syndesmochorial (qui peut être considéré comme une simple variété du précédent). Le placenta syndesmochorial est présent chez quelques ruminants à placenta cotylédonnaire, tels que la brebis. L'enracinement est alors plus complet entre trophoblaste et épithélium maternel.

Chez les carnivores, le trophoblaste détruit l'endomètre et se trouve au contact de l'endothélium des vaisseaux maternels : il en résulte la placentation **endothéliochoriale** (Figure 20).



Chez les rongeurs et lagomorphes ainsi que chez tous les primates supérieurs, l'invasion de l'endomètre et des vaisseaux maternels par le trophoblaste conduit à la formation d'un placenta **hémochorial** avec contact direct entre les cellules trophoblastiques et le sang maternel (Figure 20). Le nombre d'assises trophoblastiques permet de distinguer les placentas de type hémotrichorial (rongeurs), hémodichorial (lagomorphes) et hémomonochorial (espèce humaine et cobaye). Ces assises peuvent être de nature cellulaire (cytotrophoblaste) ou syncytiale (syncytiotrophoblaste). Lors des placentations endothéliochoriales et hémochoriales il existe un phénomène de réaction déciduale, avec différenciation des cellules du stroma et de l'endomètre en cellules déciduales.

3.3.3 Article publié dans la revue *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* :
« Modèles animaux de retard de croissance intra-utérin d'origine vasculaire »

3.3.4 Article publié dans le cadre du Symposium ERIN – 2010 – Cracovie : « Intérêt des ruminants domestiques pour la recherche biomédicale en médecine périnatale ». En cours de soumission à la revue *Theriogenology*

Dans le cadre de ma thèse, j'ai été invité par les organisateurs du symposium ERIN (*European Ruminant Infrastructure Network*), qui a eu lieu les 11 et 12 mars 2010 à Cracovie (Pologne), à présenter un travail concernant l'intérêt des modèles ruminants pour la recherche biomédicale périnatale. Ce travail de revue est actuellement en cours de modification pour soumission à la revue *Theriogenology*.

Résultats acquis

4 Résultats acquis

4.1 Résultats 1 – Corrélation entre indices Doppler énergie 3D et le flux réel de perfusion utéro-placentaire : évaluation sur modèle de brebis gestante

4.1.1 Résumé de la méthodologie

Introduction

Les indices Doppler 3D sont en relation avec la quantité de signaux Doppler dans le volume d'intérêt et de l'intensité de ce signal. En effet le signal Doppler dépend de la présence d'un flux dans le volume étudié et son intensité dépend du nombre d'éléments réfléchissants ou de cellules sanguines dans les vaisseaux. Alors que l'outil Doppler 3D était mis à disposition sur les échographes commerciaux, il n'existait jusqu'en 2008 aucune donnée permettant d'évaluer le niveau et le type de corrélation existant entre les différents indices 3D (VI, FI et VFI) et le débit sanguin dans un organe d'intérêt.

La corrélation entre perfusion dans un volume d'intérêt et indices Doppler 3D a initialement été évaluée *in vitro* (Raine-Fenning, Nordin et al. 2008; Jones, Hutchinson et al. 2009), à l'aide d'un fluide mimant les éléments figurés sanguins (particules de nylon réfléchissantes). Deux modèles ont été utilisés : dans le premier, un fantôme échographique a été mis au point : il s'agit d'une boîte permettant la transmission des ondes ultrasonores à l'intérieur de laquelle différents systèmes de tubes (diamètres variables, branchés ou non) étaient placés et perfusés. La variation du débit, de l'hématocrite simulée et de la complexité du réseau de perfusion ont été évaluées. Dans le deuxième modèle, un cotylédon de placenta humain était également perfusé à des débits variables une fois placé dans un fantôme échographique.

Les différents facteurs testés affectaient d'une manière relativement uniforme les trois indices : l'hématocrite (taux de particules de nylon réfléchissantes), le débit, la profondeur et le nombre de tubes perfusés. Les valeurs de VI et VFI augmentaient de façon linéaire avec la

concentration de particules réfléchissantes dans le fluide sans phénomène de plateaux, contrairement à FI dont les valeurs ne semblaient pas influencées par une concentration supérieure à 2%. L'hématocrite semble donc influencer la quantification de la vascularisation. Cependant, ces résultats présentaient un intérêt plus que modéré d'un point de vue clinique, les variations appliquées de l'hématocrite (de 0 à 40%) ne correspondant pas à des situations réalistes *in vivo*.

Les valeurs de VI et VFI augmentaient de façon linéaire avec l'augmentation du nombre de vaisseaux sans phénomène de plateau. Les auteurs décrivaient également une relation linéaire entre le débit et les valeurs des indices VI et VFI, alors que FI atteignait rapidement un plateau.

La profondeur d'analyse était associée à une baisse significative des valeurs des indices, selon une relation linéaire pour VI et VFI. La valeur de FI semblait moins sensible à l'atténuation, avec des valeurs relativement stables jusqu'à une profondeur de 55 mm. Au-delà, FI suivait une décroissance comparable à celles de VI et VFI.

Les mesures réalisées sur le modèle de perfusion d'un placentome *in vivo* (Jones, Hutchinson *et al.* 2009) ont également mis en évidence une forte influence du débit de perfusion sur les valeurs calculées des trois indices, mais seule l'évolution du VI présentait une relation linéaire.

Différentes considérations expérimentales concernant ces modèles *in vitro* doivent être prises en compte dans l'interprétation de ces résultats. En effet, ces modèles reflètent des situations très différentes de ce que nous pouvons observer *in vivo*. Le réseau vasculaire placentaire est beaucoup plus complexe que ce qui peut être mimé à l'aide de fantômes. Les résultats discordants entre le modèle de fantôme et le modèle de perfusion d'un cotylédon,

décrits par la même équipe, vont dans ce sens. La perfusion d'un cotylédon semble plus proche d'une situation *in vivo*, mais elle offre moins de possibilités de contrôle expérimental du protocole d'étude comparée à l'utilisation d'un fantôme. Cependant, le caractère *ex vivo* de l'étude amène à se poser des questions quant au recrutement vasculaire de l'organe en fonction du débit de perfusion (nombre de vaisseaux dans lesquels circule le sang, qui peut varier en fonction du débit). En effet, le VI correspond au pourcentage de signal Doppler dans le volume d'intérêt et représenterait a priori la quantité de vaisseaux sanguins ou densité vasculaire. Le phénomène d'augmentation linéaire du VI avec l'augmentation du débit de perfusion dans le modèle *ex vivo* pourrait ainsi être en relation avec un recrutement vasculaire augmentant avec ce débit. Cette explication théorique n'est plus valable lorsque l'on considère l'augmentation de ce même VI dans le modèle *in vitro* alors même qu'un seul tube de perfusion de 4mm est utilisé. Par ailleurs, le fluide utilisé pourra avoir un impact direct sur les indices calculés.

Pour ces différents arguments, la corrélation entre les indices Doppler 3D et le débit au sein d'un organe devait être vérifiée *in vivo*.

L'objectif de cette étude, qui a été réalisée dans le cadre de l'encadrement d'un étudiant en Master II, M. le Docteur F. Pachy, était de mettre au point un modèle expérimental animal permettant de démontrer la corrélation entre les indices Doppler 3D et la vascularisation tissulaire réelle instantanée au sein du placenta.

Matériel et Méthode

Modèle animal

L'étude a été réalisée sur 7 brebis entre 91 et 131 jours de gestation : le poids fœtal correspondait alors au poids fœtal humain entre 24 SA et 38 SA (Barone 2001; Morel, Tran et al. 2008). La brebis a été retenue comme modèle animal d'étude pour ses caractéristiques anatomiques qui permettaient l'utilisation de matériel d'imagerie disponible en pratique clinique humaine. Afin d'assurer un meilleur contrôle expérimental des débits de perfusion de la corne utérine gravide, seules des brebis porteuses de singletons ont été utilisées. La compliance de l'utérus de brebis permettait par ailleurs un travail expérimental confortable de part l'absence de contractions (Morel, Tran et al. 2008). Les brebis, de type Pré-Alpes, pesaient en moyenne 60 kg et provenaient de l'élevage de l'INRA de Jouy-en-Josas. Les brebis gestantes étaient sélectionnées par échographie 40 jours après la mise en lutte du troupeau.

D'un point de vue anatomique, la vascularisation de l'utérus de brebis est principalement assurée par les artères utérines qui résultent de la division antérieure des artères iliaques internes (Pelage, Laurent et al. 2001; Pelage, Laurent et al. 2002; Laurent, Wassef et al. 2009).

De plus, la morphologie cotylédonnaire du placenta représente une des caractéristiques majeures de ce modèle car elle facilitait l'acquisition volumétrique de chaque unité fonctionnelle utéro-placentaire.

Abord chirurgical et système de contrôle des flux

Après abord par laparotomie sous anesthésie générale, une dissection vasculaire minutieuse après repérage du tronc commun de l'artère utérine de la corne gravide a été réalisée. Une sonde de débitimétrie Transonic calibrée pour une mesure en aiguë (EMKA® technologies) a été placée sur ce vaisseau, ainsi qu'un occluteur vasculaire en amont de celle-ci (système de pompe péri vasculaire permettant de faire varier le débit). Ce système permettait à la fois de disposer d'une mesure du débit sanguin dans l'artère utérine en temps réel et de faire varier ce débit par plateaux à l'aide de l'occluteur.

Une ligature du tronc commun de l'artère utérine de la corne non gravide ainsi que des anastomoses utéro ovarienne ipsi et controlatérale a été réalisée en début de procédure, le tronc commun de l'artère utérine de la corne gravide assurant alors l'apport vasculaire principal du placenta.

Acquisitions échographiques – Analyse des volumes

Les examens échographiques ont été effectués à l'aide d'un appareil VOLUSON Expert modèle E8 (General Electric Medical Systems Ultrasound, Vélizy, France) muni d'une sonde volumique abdominale de 3,5 – 5 MHz Figure voluson E8. Les paramètres d'acquisitions (puissance Doppler 100%, Gain -2,2, qualité 3D normal, fréquence de répétition des pulses ou PRF 1.3 KHz, Filtre des mouvements de paroi ou WMF Moyenne, fréquence faible, angle du secteur 70°, l'angle de balayage 3D de 45°, vitesse de balayage lente) ont été prédéterminés, les paramètres principaux étant d'utiliser une PRF la plus basse possible et un gain Doppler le plus élevé possible en obtenant une majorité d'acquisitions non artéfactées. Les artefacts

surviennent lorsque la vitesse des flux étudiés est trop basse, le signal Doppler vasculaire ne pouvant alors plus être distingué des artefacts Doppler liés aux mouvements maternels ou fœtaux.

Les acquisitions étaient réalisées pour différents placentomes de façon concomitante à l'obtention de différents plateaux stabilisés de perfusion. La sonde était placée au contact de la corne gravide dans le but de s'affranchir du biais d'atténuation de signal lié à la profondeur de la zone d'intérêt.

Les volumes ont été analysés à l'aide du programme VOCAL™. Un traçage manuel avec élimination des vaisseaux d'origine fœtale au niveau de la houppe choriale, à l'apex du placentome, a été réalisé. Le but était d'obtenir des indices représentatifs essentiellement du signal Doppler d'origine vasculaire maternel. La méthode de traçage a été validée en terme de reproductibilité intra et inter-observateur, et en utilisant différents pas de rotation (données *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology online*, (Morel, Pachy et al. 2010)).

Résultats

Au total, 70 volumes ont pu être acquis dans des conditions expérimentales optimales (débit parfaitement stable). Seuls 48 volumes non artéfactés ont été analysés. Les débits étudiés allaient de 0 à 400 mL/mn. L'augmentation progressive du débit au niveau du tronc commun de l'artère utérine de la corne gravide était associée à une augmentation significative des trois indices Doppler enregistré au niveau des placentomes. Le niveau de corrélation élevé, évalué par le coefficient de corrélation de Pearson, était plus important pour les débits les plus faibles. Le VI présentait une relation linéaire à l'augmentation de débit, alors que le FI présentait une relation logarithmique. Les résultats sont plus largement développés dans l'article publié dans *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* en 2010 (chapitre 4.1.2).

Discussion

La mise au point d'un modèle expérimental original de contrôle de la perfusion utéro-placentaire a permis de valider pour la première fois *in vivo* le niveau et la nature de la corrélation entre le débit utéro-placentaire et les indices Doppler 3D. Seul un modèle expérimental animal pouvait permettre de réaliser ce type de validation technique, les données validées *in vitro* n'étant pas directement extrapolable à un organisme *in vivo*.

Bien que les écart-types des indices Doppler 3D mesurés soient plus élevés pour des débits plus importants, le haut niveau de corrélation avec le débit réel permet de considérer cette technique comme une nouvelle méthode non invasive d'angiographie.

Le potentiel offert par cette nouvelle approche d'évaluation fonctionnelle placentaire *in vivo* restait alors à évaluer à la fois en médecine humaine et sur modèles expérimentaux de RCIU. En effet, la sensibilité de l'angiographie en termes de différenciation de différents niveaux de perfusion du placenta en contexte clinique ou expérimental devait être testée en considérant la variabilité malgré tout importante des indices rendus à débit équivalent (voir courbes de corrélation).

- 4.1.2 Article publié dans la revue « *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* » (2010) :
« *Correlation between uteroplacental three-dimensional power Doppler indices and true uterine blood flow: evaluation in a pregnant sheep model* »

4.2 Résultats 2 – Impact des paramètres de réglage de la machine (2D, Doppler et 3D) sur la valeur des indices utéro-placentaires à débit constant : évaluation sur modèle expérimental de brebis gestante.

Travail réalisé en 2010-2011, article en cours de finalisation pour soumission à la revue *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*.

4.2.1 Introduction

Le travail réalisé en 2008-2009 avait permis à la fois de confirmer le haut niveau de corrélation entre indices Doppler 3D et perfusion placentaire réelle et de mettre au point un modèle expérimental original de contrôle de la perfusion utéro-placentaire (Morel, Pachy et al. 2010).

Cependant, la critique majeure régulièrement formulée à l'égard de la technique d'angiographie Doppler 3D est sa forte dépendance à de nombreux paramètres, à la fois de réglage de la machine et physiologiques maternels (Raine-Fenning, Welsh et al. 2008). En effet, contrairement à une analyse classique de spectre vasculaire en Doppler 2D pulsé qui n'est que très peu dépendante de paramètres extérieurs en-dehors de l'angle dès lors qu'un signal peut être acquis, l'intensité du signal Doppler énergie est fortement dépendante de l'atténuation liée la profondeur d'acquisition et à la nature des tissus interposés entre sonde et zone d'intérêt.

Par ailleurs, l'intensité mesurée du signal Doppler énergie est très fortement dépendante de paramètres de réglage de la machine, essentiellement du gain Doppler énergie, qui est un réglage direct de l'intensité énergie ou couleur rendue à l'écran à flux équivalent, mais également de la PRF (Pulse Repetition Frequency) qui est un réglage qui a un impact direct sur la gamme de vitesses de flux captés (plus on augmente la PRF, plus on limite la sensibilité aux flux rapides uniquement) (Raine-Fenning, Welsh et al. 2008).

Enfin, s'agissant des indices Doppler 3D, l'ensemble des paramètres de réglage peut être considéré comme ayant un impact potentiel sur les indices mesurés. En effet, les paramètres ayant une influence sur le niveau de gris (région avec absence de signal Doppler)

tels que le gain 2D ont un impact potentiel sur le VI et le VFI, ces indices étant un rapport de signal couleur sur signal gris. De nombreux autres paramètres ayant un impact sur la qualité d'image et par conséquent sur la vitesse de balayage (donc la durée d'acquisition à volume final équivalent) ont également un impact potentiel sur les indices rendus à débit équivalent. Parmi eux, la brillance (Rise) et le niveau de qualité 3D (Qual 3D) étaient à évaluer.

L'impact des paramètres a été évalué *in vitro* par l'équipe de Nottingham (Raine-Fenning, Nordin et al. 2008). La description complète de ces résultats ne présente pas d'intérêt majeur ici, dès lors que l'on considère que toutes les critiques développées concernant l'évaluation *in vitro* sur les mêmes modèles de la corrélation avec le débit de perfusion s'appliquent également.

Une critique supplémentaire est cependant à formuler : un fantôme *in vitro* ne présente aucun mouvement, contrairement à une patiente ou un modèle animal. Cette absence totale de mouvement, et donc d'artefact Doppler, permet une évaluation *in vitro* de l'ensemble des possibilités offertes par les machines en termes de paramètres de réglages, alors même qu'une partie importante des paramètres extrêmes de réglages n'offrira *in vivo* que des images fortement artéfactées et *in fine* non interprétables.

Le but de ce travail réalisé en 2009-2010 était d'évaluer *in vivo* l'impact des paramètres de réglage majeur sur les indices Doppler 3D mesurés au niveau placentaire à débit constant.

4.2.2 Matériels et Méthode

Modèle animal – Procédure chirurgicale

Le modèle animal de brebis gravide précédemment décrit a été utilisé (Morel, Pachy et al. 2010). Pour ce protocole, seul le capteur transonoc a été placé sur l'artère utérine de la corne gravide de façon à assurer un suivi continu du niveau de perfusion de la corne gravide. L'occluseur n'a donc pas été utilisé, et les autres vaisseaux utéro-placentaires n'ont pas été ligaturés. Le reste du protocole expérimental était le même. Cinq brebis gravides ont été utilisées.

Acquisitions échographiques

Pour chaque brebis, une fois le débit stabilisé dans l'artère utérine gravide, des séries d'acquisitions ont été réalisées pour chaque pas de paramètre de réglage : gain 2D, qui correspond à la brillance des gris à l'écran (de -15 à +15, 18 pas) ; qualité 3D, qui correspond à la vitesse de balayage lors de l'acquisition du volume (de minimale à maximale, 6 pas) ; brillance, qui est un paramètre de brillance globale de l'image (de 1 à 12, 6 pas) ; Wmf (Wall Motion Filter), qui est un filtre de lissage de l'image (de faible à maximal, 7 pas) ; PRF (pulse repetition frequency), qui est la fréquence de répétition des pulses, paramètre de réglage ayant un impact direct théorique sur la vitesse des flux détectés (de 0,1 à 4, 9 pas) ; gain Doppler énergie, qui est un réglage de brillance du signal Doppler énergie à l'écran (de -15 à 0, 10 pas). A partir d'un réglage basal (paramètres définis au décours de l'étude de corrélation), uniquement le paramètre étudié était modifié. Pour chaque pas de réglage (soit 56 au total), 2 à 3 acquisitions ont été réalisées pour chaque brebis. Seules les acquisitions non artéfactées ont été utilisées pour l'analyse finale.

L'impact de chaque paramètre sur les indices 3D mesurés a été évalué à débit constant, à l'aide de représentations graphiques (chaque indice étant rapporté à chaque réglage). Un test de Dunnett a été appliqué afin de déterminer pour quel type de réglage les résultats observés étaient significativement différents des indices mesurés avec le réglage basal. Le test de Dunnett permet de comparer les moyennes de différents groupes. Il est spécifiquement conçu pour les situations où tous les groupes doivent être opposés au groupe de référence (ici le réglage « basal »). Il est utilisé après qu'une analyse de variance a permis de rejeter l'hypothèse d'égalité des moyennes des distributions. Son objectif est d'identifier les groupes dont les moyennes sont significativement différentes de la moyenne du groupe de référence. Il teste l'hypothèse nulle qu'aucun groupe n'a sa moyenne significativement différente de la moyenne du groupe de référence.

4.2.3 Résultats

Un total de 662 volumes a été analysé. Deux brebis, entre 90 et 100 jours de gestation, présentaient un débit stable de 80mL/min, pour lesquelles 290 volumes ont été acquis. Les trois autres brebis, entre 125 et 135 jours de gestation, présentaient un débit stable de 150mL/min, pour lesquelles 372 volumes ont été acquis. Les images n'étaient pas exploitables pour des PRF supérieures à 4.

Impact des paramètres de réglage 2D : gain 2D, Wmf, brillance

Seuls les résultats globaux sont présentés ici (débits 80 et 150 mis en commun). Il n'existait de différence de profil d'évolution des indices entre les deux débits observés.

Il n'existait pas de corrélation entre le gain 2D et les indices mesurés. Seul le FI présentait une différence significative entre un gain à +11 et le réglage basal (Figure 21).

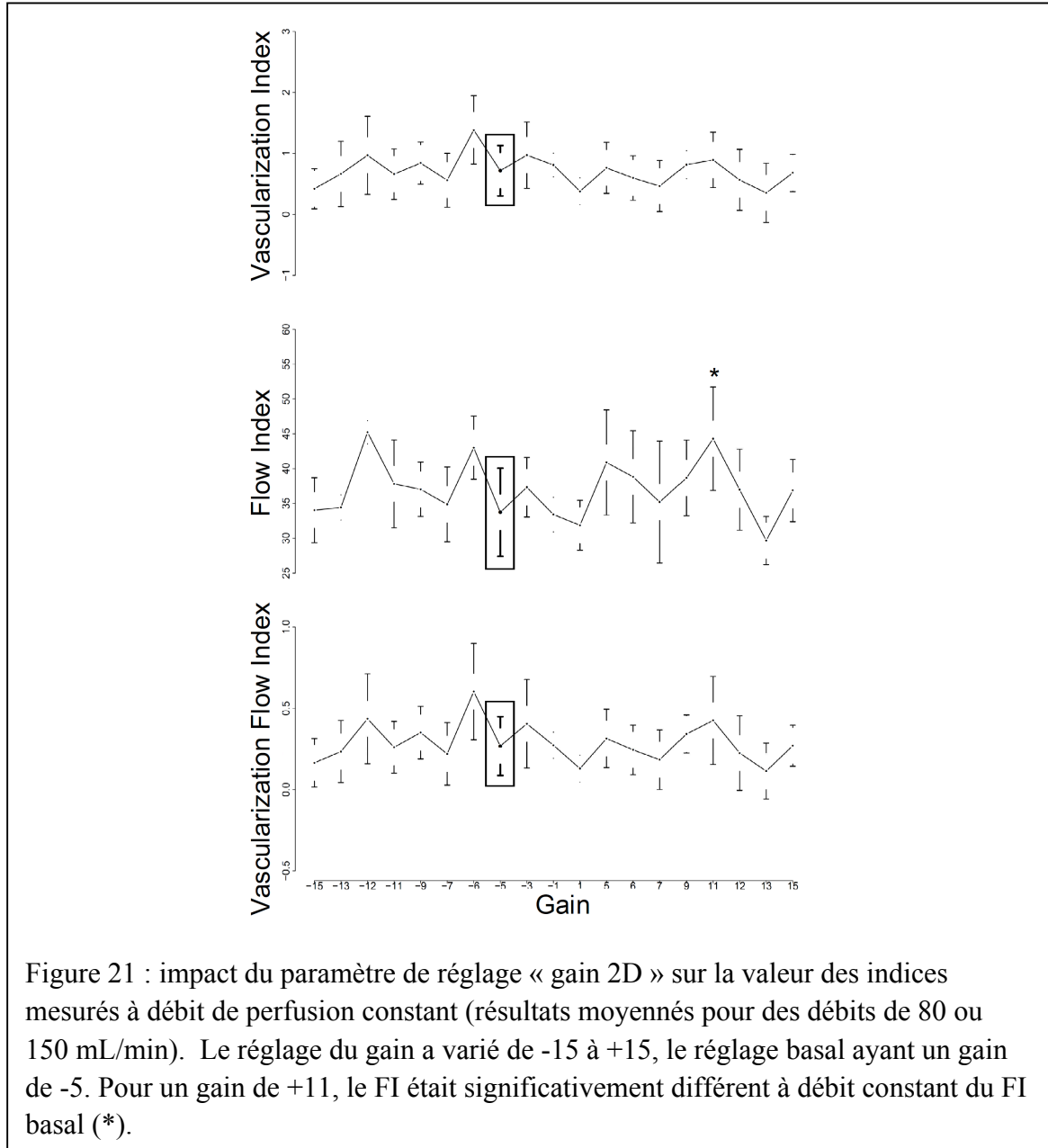
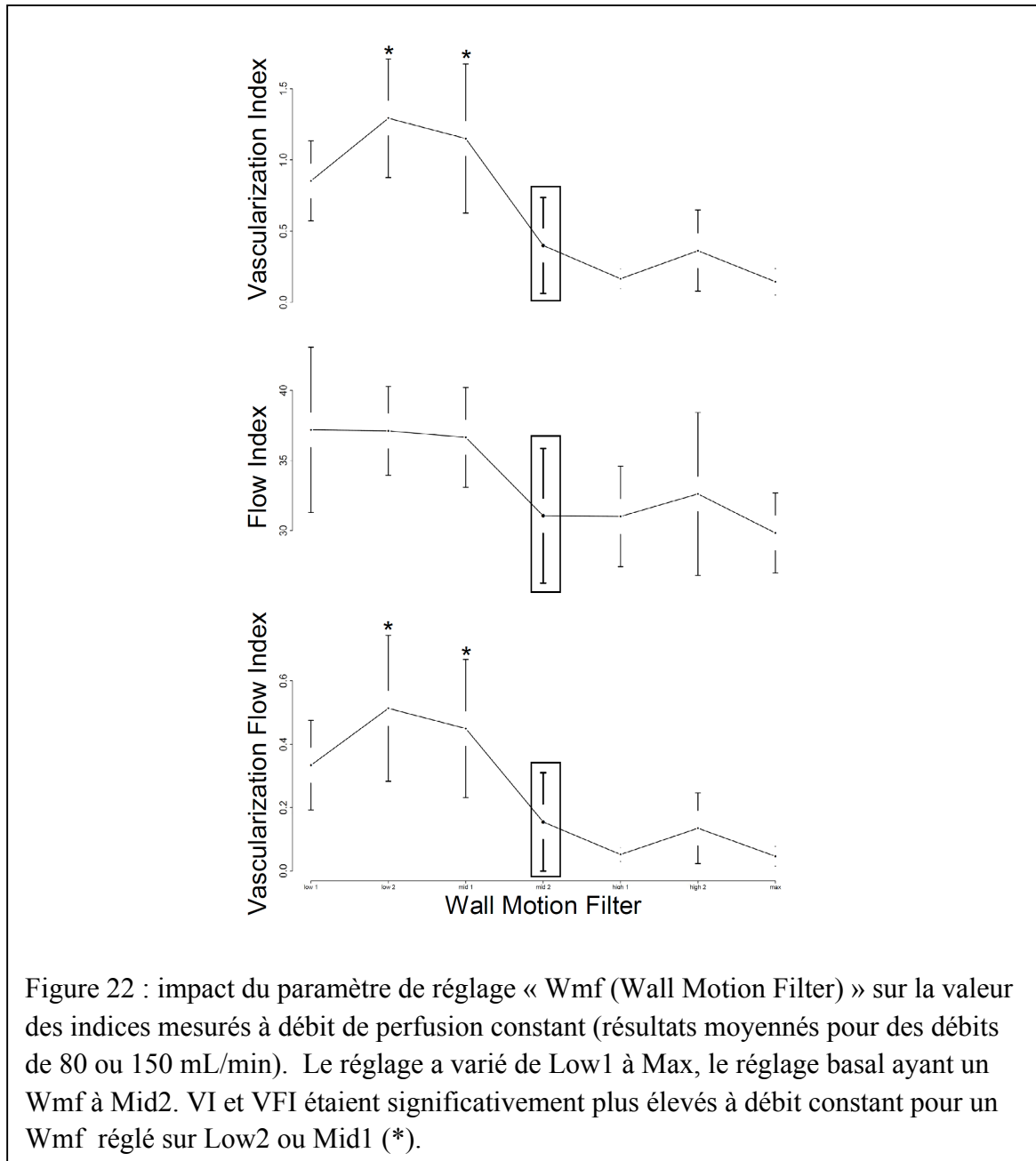


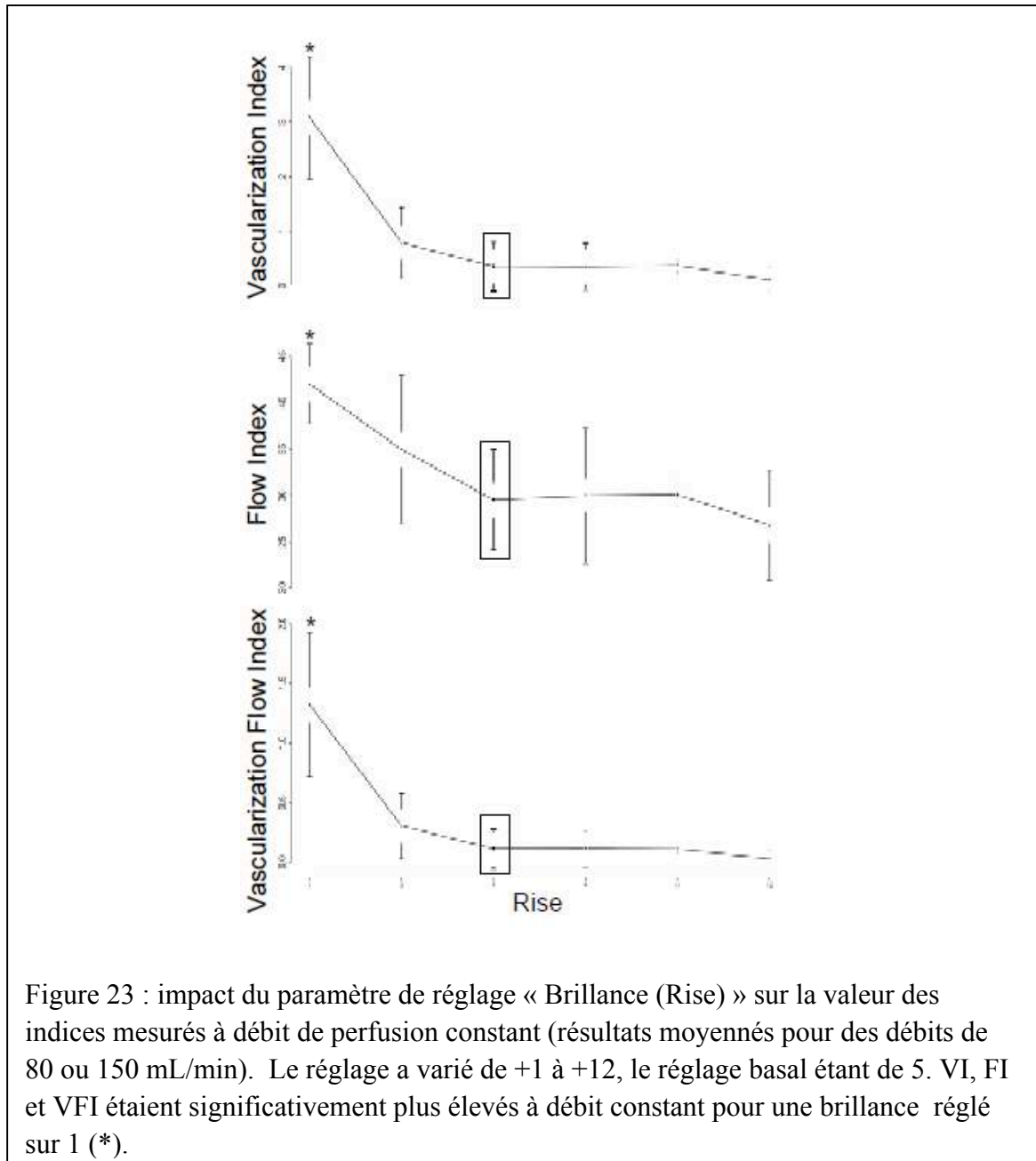
Figure 21 : impact du paramètre de réglage « gain 2D » sur la valeur des indices mesurés à débit de perfusion constant (résultats moyennés pour des débits de 80 ou 150 mL/min). Le réglage du gain a varié de -15 à +15, le réglage basal ayant un gain de -5. Pour un gain de +11, le FI était significativement différent à débit constant du FI basal (*).

Le Wmf avait un impact non linéaire sur les indices : les VI et VFI étaient significativement augmentés pour des Wmf bas et moyen 1, par rapport au réglage basal (moyen 2) (Figure 22). Pour les Wmf plus élevés, il n'existait plus d'impact notable.

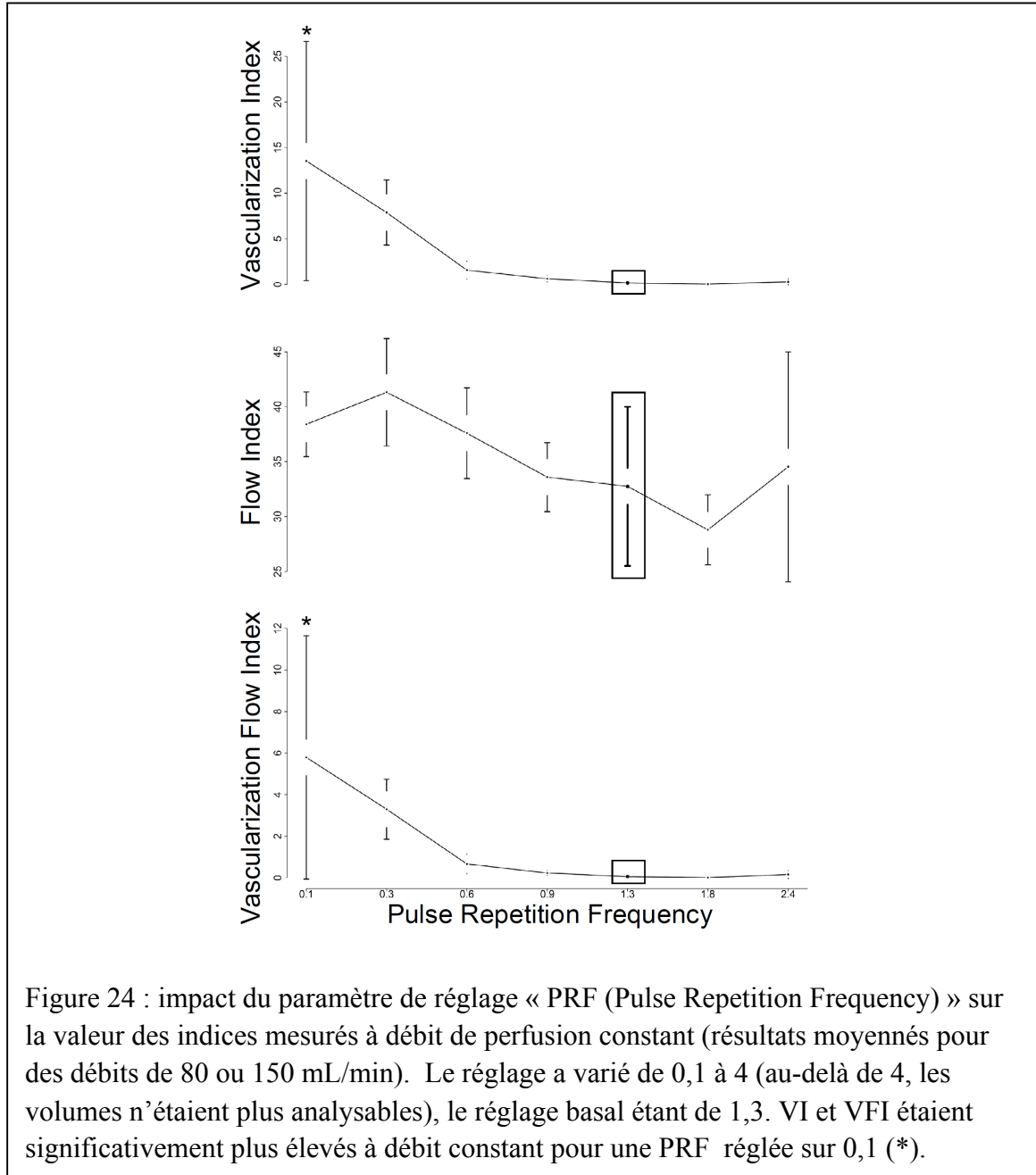


Le même profil était observé pour le FI en fonction du Wmf, sans différence significative par rapport au réglage basal.

La diminution de la brillance (*Rise*) était à l'origine d'une élévation significative des indices pour une brillance de 1 (versus niveau basal à 5) pour l'ensemble des indices. De 3 à 12, il n'y avait plus d'impact notable de la brillance sur les indices mesurés (Figure 23).



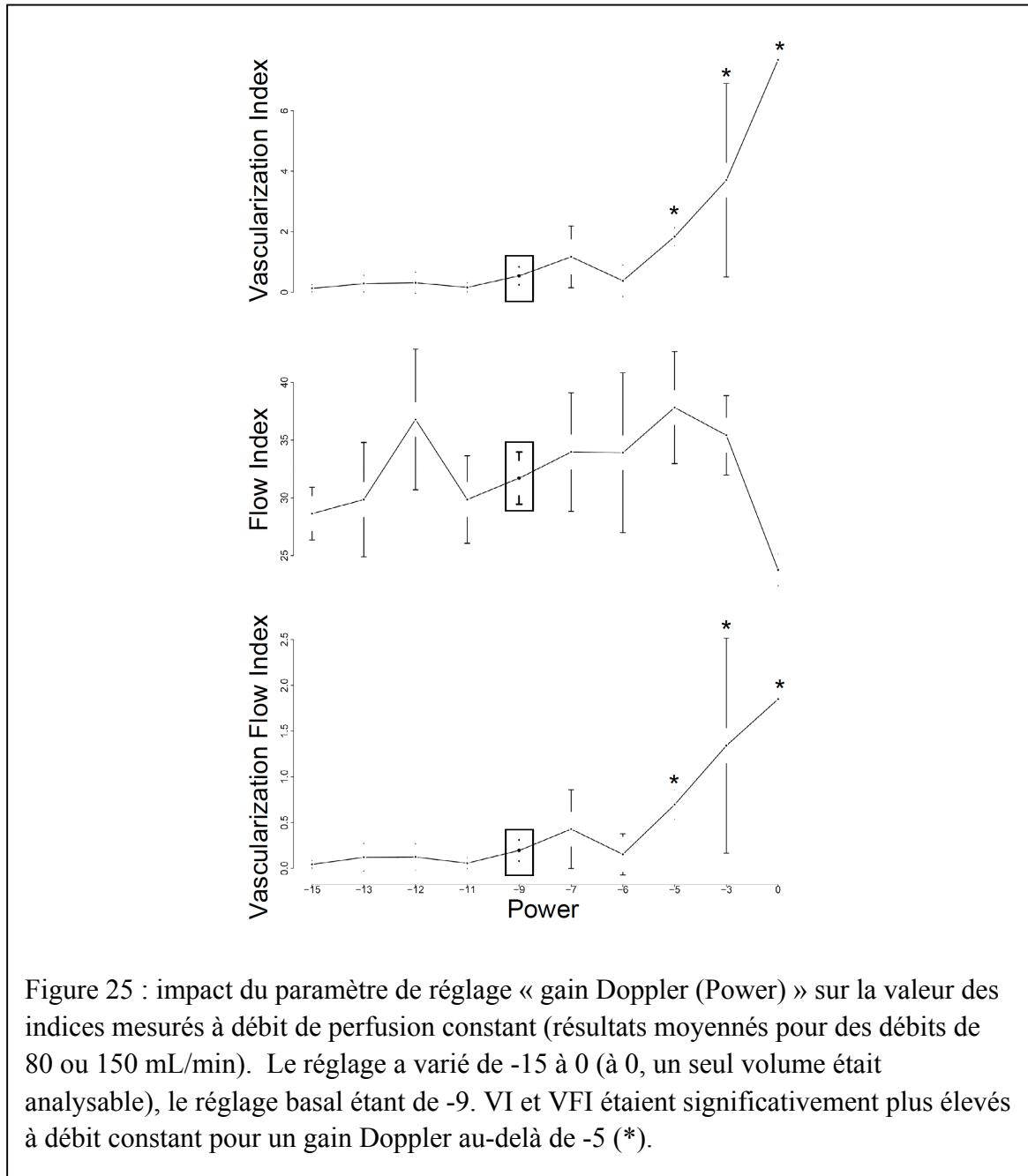
Impact des paramètres de réglages Doppler énergie et 3D : PRF, gain Doppler énergie, qualité 3D



Les VI et VFI présentait une augmentation en-dessous d'une valeur de PRF de 0,6. Cette augmentation était significative pour une PRF à 0,1 (basal à 1,3). Au-delà de 0,6 de PRF, il n'était plus noté d'impact significatif sur VI et VFI malgré une tendance à la

diminution. Les variations de PRF n'avaient pas d'impact systématisé ni significatif sur le FI (Figure 24).

L'augmentation du gain Doppler était à l'origine d'une augmentation concomitante des valeurs de VI d'allure exponentielle (Figure 25).



Le gain Doppler variait de -15 à 0, avec un réglage basal à -9. Les indices étaient abaissés de manière non significative entre -9 et -15. L'augmentation des VI et VFI devenait significative au-delà de -5. La variation du gain Doppler n'avait pas d'impact systématisé sur la variation du FI, et il n'était pas observé de différence significative par rapport au réglage basal.

La variation du paramètre de réglage « qualité 3D », de Low à Max (réglage basal : High 1) n'avait pas d'impact systématisé ni significatif sur la valeur des indices Doppler 3D (Figure 26).

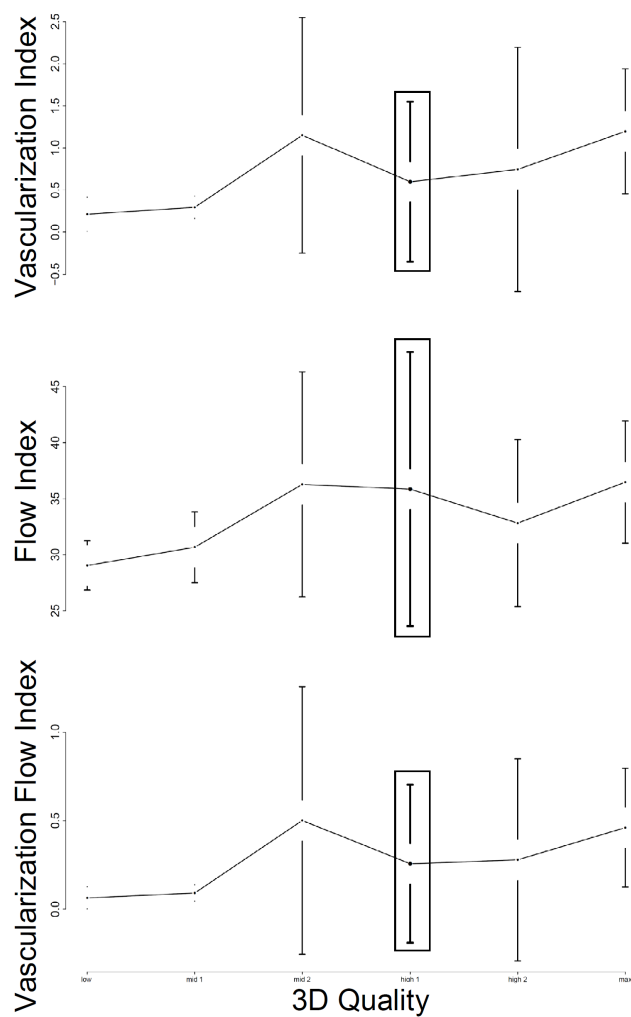


Figure 26 : impact du paramètre de réglage « qualité 3D (Qual 3D) » sur la valeur des indices mesurés à débit de perfusion constant (résultats moyennés pour des débits de 80 ou 150 mL/min). Le réglage a varié de Low à Max, le réglage basal étant High 1.

Les paramètres de réglage pour lesquels une différence significative était observée pour au moins un des indices par rapport au réglage basal sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : paramètres de réglage pour lesquels une différence significative était observée pour au moins un des indices par rapport au réglage basal (test de Dunnett). Les paramètres correspondant au réglage « basal » sont indiqués en gras. Les mesures réalisées au réglage « basal » ont été effectuées pour chaque série de variations de paramètres, ce qui explique que les moyennes et écart-types sont indiquées pour chaque série. Il n'existait pas de différence significative entre les séries de mesures réalisées au réglage « basal ». La différence était considérée comme étant significative pour un $p < 0,05$.

		VI Moy [+/-SD] (p)	FI Moy [+/-SD] (p)	VFI Moy [+/-SD] (p)
Gain 2D	11 vs -5	0.66 [+/- 0.51] vs 0.72 [+/- 0.46] (NS)	37.82 [+/- 7.73] vs 33.73 [+/- 7.08] (0,05)	0.26 [+/- 0.19] vs 0.27 [+/- 0.2] (NS)
Wmf	Low2 vs Mid2	1.29 [+/- 0.69] vs 0.4 [+/- 0.51] (<0,0001)	37.11 [+/- 5.29] vs 31.06 [+/- 7.2] (NS)	0.51 [+/- 0.39] vs 0.15 [+/- 0.23] (0,0062)
	Mid1 vs Mid2	1.15 [+/- 0.74] vs 0.4 [+/- 0.51] (0,0096)	36.65 [+/- 5.04] vs 31.06 [+/- 7.2] (NS)	0.45 [+/- 0.31] vs 0.15 [+/- 0.23] (0,05)
Brillance	1 vs 5	3.08 [+/- 0.98] vs 0.35 [+/- 0.32] (<0,0001)	42.01 [+/- 3.73] vs 29.52 [+/- 3.92] (0,004)	1.32 [+/- 0.53] vs 0.11 [+/- 0.12] (<0,0001)
PRF	0,1 vs 1,3	13.53 [+/- 22.87] vs 0.63 [+/- 0.8] (0,034)	38.4 [+/- 5.15] vs 32.75 [+/- 8.88] (NS)	5.8 [+/- 10.22] vs 0.23 [+/- 0.29] (0,045)
Gain PD	-3 vs -9	3.71 [+/- 4.54] vs 0.54 [+/- 0.67] (0,0001)	35.42 [+/- 4.87] vs 31.7 [+/- 5.09] (NS)	1.34 [+/- 1.67] vs 0.2 [+/- 0.26] (0,0001)
	-5 vs -9	1.84 [+/- 0.1] vs 0.54 [+/- 0.67] (0,0001)	37.82 [+/- 2.64] vs 31.7 [+/- 5.09] (NS)	0.7 [+/- 0.09] vs 0.2 [+/- 0.26] (0,0001)

4.2.4 Discussion

Le modèle expérimental original de contrôle de la perfusion utéro-placentaire mis au point pour l'évaluation de la corrélation avec les flux (Morel, Pachy et al. 2010) a permis d'évaluer pour la première fois *in vivo* l'impact des paramètres de réglage de la machine sur les indices Doppler 3D utéro-placentaires mesurés cette fois à débit constant. Seul un modèle expérimental animal pouvait permettre de réaliser ce type de validation technique, les données validées *in vitro* n'étant pas ici non plus directement extrapolable à un organisme *in vivo*, tel qu'abordé en introduction de ce travail.

Un impact des paramètres de réglage sur les indices mesurés est ici confirmé *in vivo*. Tel qu'attendu, l'existence d'artefacts liés à la fois aux mouvements maternels et fœtaux, et ce malgré la réalisation de la procédure sous anesthésie générale, n'a pas permis d'évaluer l'ensemble des possibilités de réglages contrairement à une évaluation sur modèle *in vitro*. Il apparaît par ailleurs, peut-être en raisons d'écart-types des valeurs des indices mesurés plus importants *in vivo* qu'*in vitro*, qu'il n'existe que peu de différences significatives pour les différents réglages évalués. Les différences significatives de valeurs d'indices à débit constant ne sont la plupart du temps observés qu'aux réglages extrêmes, qui sont peu ou pas utilisés en pratique courante. L'impact différents des paramètres de réglage sur le VI et le FI est confirmé, y compris pour les paramètres jouant a priori uniquement sur l'image 2D ou le type d'acquisition 3D.

Ces résultats mettent en évidence un impact théorique des réglages finalement plus faible que celui attendu en théorie ou décrit *in vitro* (Raine-Fenning, Nordin et al. 2008; Raine-Fenning, Welsh et al. 2008). Il n'est cependant pas possible d'extrapoler de ces

résultats expérimentaux chez l'animal une quelconque possibilité de comparer des résultats d'indices acquis avec des paramètres de réglage différents, que ce soit en pratique clinique ou expérimentale. En effet, le protocole expérimental décrit ici a permis d'évaluer l'impact de chaque paramètre pas à pas par rapport à un réglage de base. En pratique, la complexité du post-traitement (traitement a posteriori du signal échographique brut afin d'améliorer l'image à l'écran) fait que l'amélioration de l'image par l'opérateur passe par des menus accessibles sur le clavier de contrôle avec modification d'un ensemble de paramètres de façon concomitante. Il n'est pas possible d'extrapoler l'impact d'une modification concomitante de plusieurs paramètres sur les indices à partir de données évaluant l'impact de chaque paramètre pris isolément. Cependant, une modélisation mathématique pourrait permettre de définir une gamme de paramètres de réglages utilisables sans impact significatif sur les indices.

4.3 Résultats 3 – Quantification de la vascularisation utéro-placentaire par angiographie Doppler 3D chez un modèle expérimental de retard de croissance intra-utérin chez le lapin

Ce travail réalisé dans le cadre de l'encadrement du travail de Master 2 de M. Edouard Lecarpentier est actuellement en cours de relecture (soumission à la revue *Radiology*).

4.3.1 Résumé de la méthodologie

Introduction

Les évaluations techniques fondamentales réalisées chez la brebis gestante ont permis de progresser dans la compréhension de la quantification du signal Doppler en échographie tridimensionnelle. Le niveau de corrélation élevé des indices avec les flux placentaires et le haut niveau de reproductibilité de calcul des indices Doppler 3D ont permis de confirmer l'intérêt potentiel de cette approche pour l'évaluation de la vascularisation utéro-placentaire *in vivo* (Morel, Pachy et al. 2010).

Cependant, les écart-types importants constatés pour chaque indice mesuré à débit constant nous amenaient alors à poser clairement la question de la capacité de cet outil à distinguer une perfusion placentaire normale d'une perfusion placentaire abaissée tant sur modèle animal qu'en pratique clinique (Morel, Pachy et al. 2010; Morel, Grange et al. 2011). A ce stade de nos recherches, courant 2009, le projet de développer un modèle d'hypoperfusion placentaire chronique chez l'animal a été mis en place.

L'objectif de ce travail était de mettre au point un modèle d'hypoperfusion placentaire chronique chez le lapin et d'évaluer l'intérêt de l'outil angiographique Doppler 3D dans ce contexte.

Le lapin a été choisi pour deux raisons principales : il présente un placenta hémochorial et sa taille est compatible avec la réalisation d'acquisitions Doppler tridimensionnelles. Le lapin est un modèle largement utilisé pour l'étude de pathologies de la gestation. La durée de la gestation (environ 31 jours) est relativement courte. La placentation

du lapin et de l'espèce humaine présentent de nombreuses similarités : elles sont de type hémochorial et de forme discoïde. Comme chez la femme, à la naissance, le ratio poids du placenta / poids du fœtus est de 1/5. Le lapin est une espèce polytoque, avec des portées pouvant atteindre 6 à 8 fœtus par corne utérine, ce qui permet de multiplier d'autant les acquisitions écho-angiographiques de placentomes différents. La taille des fœtus et des placentas les rendent accessibles à l'examen écho-angiographique en utilisant les mêmes sondes qu'en pratique clinique humaine. La sonde d'échographie, quand elle est directement appliquée sur la corne utérine, peut parcourir en un seul balayage les $\frac{3}{4}$ du placenta.

Alors que le placenta humain est hémomonochorial et d'architecture villose, le placenta chez le lapin est hémodichorial et de structure labyrinthique (Figure 27). Le sang fœtal arrive au placenta par les deux artères ombilicales qui s'anastomosent à la plaque chorale.

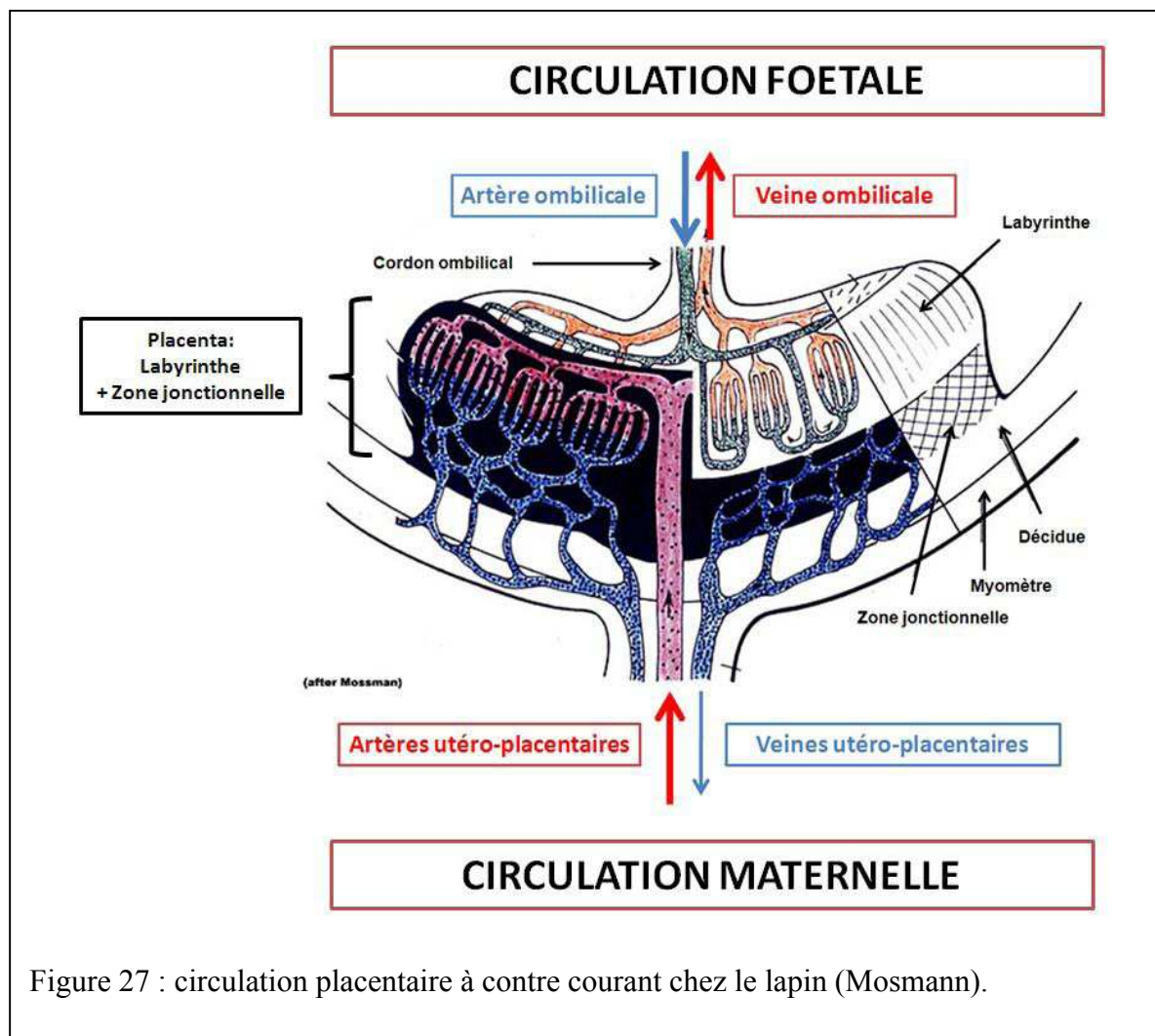


Figure 27 : circulation placentaire à contre courant chez le lapin (Mosmann).

Les branches de ces artères se divisent et forment un réseau capillaire au sein du labyrinthe qui circule de la plaque chorale vers la décidue. Un réseau veineux ramène le sang oxygéné vers la plaque chorale et le cordon. Contrairement à la circulation fœtale, qui s'effectue toujours à l'intérieur des vaisseaux sanguins, le sang maternel s'écoule librement dans les "espaces vasculaires maternels", suivant des colonnes trophoblastiques depuis la plaque chorale vers la plaque basale. Ainsi le sang fœtal et le sang maternel circulent à contre-courant au sein du labyrinthe, ce qui optimise les capacités de transfert et d'échange (McArdle, Denton et al. 2009).

L'endothélium joue un rôle très important dans la régulation de la circulation sanguine au sein du placenta (Klinger 2007). Les cellules endothéliales des vaisseaux utérins synthétisent des composants qui permettent le maintien de l'équilibre vasomoteur comme l'endothéline (vasoconstricteur) et le monoxyde d'azote NO (vasodilatateur). Après sa synthèse dans la cellule endothéliale par la NO synthase (eNOS), le NO diffuse facilement vers la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV). Dans la CMLV, le NO active la guanylate cyclase soluble, augmentant ainsi la concentration intracellulaire de GMPc, qui active à son tour des protéines kinases GMPc-dépendantes qui vont induire une baisse de la concentration intracellulaire de calcium et la relaxation (Figure 28).

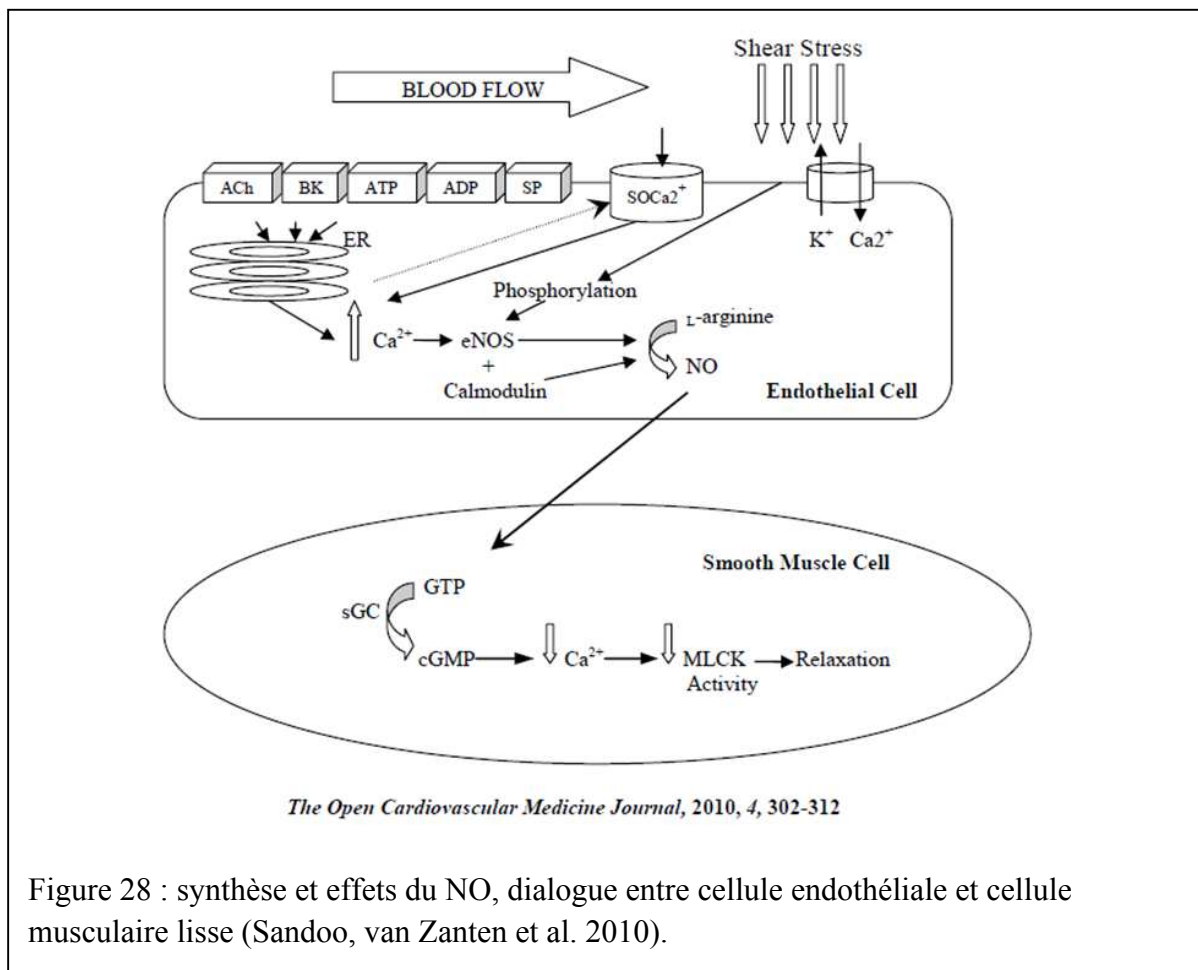


Figure 28 : synthèse et effets du NO, dialogue entre cellule endothéliale et cellule musculaire lisse (Sandoo, van Zanten et al. 2010).

La relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires permet une vasodilatation et donc une réduction des résistances vasculaires, ce qui, à différentiel de pression constant, engendre une augmentation des débits locaux (Klinger 2007). De nombreux stimuli locaux et hormonaux (acétylcholine, bradykinine, ADP, ATP, substance P, forces de cisaillement) modulent l'expression et l'activité de la eNOS, assurant la régulation du débit sanguin (Sandoo, van Zanten et al. 2010).

Le L-NAME (Nw-nitro-L-arginine chlorhydrate d'ester méthylique) est un inhibiteur non sélectif de la NOS. Yallampalli et al. (Yallampalli and Garfield 1993) ont montré, sur un modèle de rate, que l'injection sous cutanée de L-NAME à dose constante, à partir du 17ème jour de gestation, était responsable d'une diminution significative du poids des rats nouveau-nés. L'importance du RCIU induit était liée à la dose administrée : pour une même durée de gestation, le poids moyen des rats nouveau-nés était de $6,2 \pm 0,1$ g pour les rats nouveau-nés du groupe témoin, $5,1 \pm 0,1$ g pour une dose de 25 mg/J ($p < 0,001$) et $4,6 \pm 0,1$ g ($p < 0,001$) pour une dose de 50 mg/J. D'autres études chez la rate ont montré que l'administration de L-NAME pendant la gestation était responsable d'un syndrome "preeclampsia-like" (Molnar, Suto et al. 1994).

Enfin, Thaete et al. ont montré par des techniques de microsphères radioactives, sur un modèle de rate gestante, que l'injection de L-NAME diminuait le débit sanguin placentaire et utérin (Thaete, Kushner et al. 2005). Ainsi, l'administration de L-NAME à des femelles gestantes apparaît comme un modèle pharmacologique intéressant de RCIU par diminution de la perfusion placentaire. L'effet vasoconstricteur utero placentaire est susceptible d'être appréhendé par l'écho-angiographie 3D.

Matériel et Méthode

Lapines gestantes – injections de L-NAME

Au total 26 lapines primipares de souche INRA (New Zealand INRA 1077 et PS19) âgées de 16 à 20 semaines ont été utilisées. Des injections de L-NAME (Sigma-Aldrich©, France), ont été faites par voie sous cutanée toutes les jours à heure fixe pendant 4 jours entre G24 et G28. Le L-NAME était dilué dans 2 mL de sérum physiologique stérile. Les doses quotidiennes de L-NAME rapportées au poids moyen des lapines gestantes de 4 kg, étaient de 125 mg (31,25 mg/kg), 250 mg (62,5 mg/kg), 500 (125 mg/kg), et 1000 mg (250 mg/kg).

Protocole chirurgical et anesthésique

Toutes les acquisitions écho-angiographiques ont été effectuées à G28. Ce terme a été volontairement choisi en avance de 72 heures sur le terme spontané, afin d'éviter les modifications qui pourraient être liées à la préparation au part. Afin de minimiser le phénomène d'atténuation dont nous savons qu'il influe de manière quasi linéaire sur les paramètres de vascularisation et pour assurer une parfaite concordance entre les acquisitions écho-angiographiques et les analyses biométriques placentaires et fœtales, nous avons choisi d'effectuer les acquisitions directement au contact de la corne utérine. Les expériences ont donc été menées après une laparotomie sous anesthésie générale.

A G28, les animaux étaient apportés au bloc opératoire après 12 heures de jeûne. Une injection de 0,3 g de kétamine (Imalgène®, Merial) était effectuée en intramusculaire et l'induction de l'anesthésie générale était obtenue par inhalation au masque d'un mélange d'isoflurane (5%) + oxygène (95%). L'abdomen et les espaces inguinaux étaient rasés et désinfectés à la bétadine dermique d'usage vétérinaire. La lapine était positionnée en

décubitus dorsal et restait en ventilation spontanée pendant toute la procédure. La pression artérielle moyenne était monitorée de façon invasive par un cathéter artériel fémoral relié à une tête de pression positionnée à hauteur du cœur maternel et préalablement calibrée. Le signal de pression était converti par un transducteur (Biopack systems, Goleta®, USA). Après un temps de stabilisation, le tracé de la pression artérielle était enregistré sur microordinateur par le logiciel Acqknowledge® (Biopack systems, Goleta®, USA) pendant toute la durée de l'intervention. La concentration inhalée d'isoflurane était en permanence ajustée afin de maintenir une pression artérielle moyenne (PAM) supérieure à 50 mmHg. La fréquence cardiaque variait pendant l'intervention entre 250 et 300/min. Un tapis chauffant était placé sous l'animal afin de prévenir l'hypothermie.

Acquisitions écho-angiographiques 3D

Les deux cornes utérines étaient extériorisées par laparotomie médiane et le nombre de fœtus par corne était noté. Les acquisitions écho-angiographiques 3D ont toutes été effectuées par le même opérateur, avec le même échographe de modèle Voluson E8 (GE Medical Systems, Zipf, Autriche) et la même sonde trans-abdominale micro-convexe 3D (RNA 5–9-MHz) selon une procédure préalablement standardisée en terme de profondeur, de fenêtre de tir Doppler et de paramètres 3D. La sonde, maintenue immobile par l'opérateur pendant l'acquisition, était positionnée directement au contact de la corne utérine en regard de la plaque basale du placenta située systématiquement chez le lapin sur le bord mésial de la matrice. La pression d'application de la sonde était minimale afin d'éviter de perturber le retour veineux local. Une première série complète de deux acquisitions écho-angiographique par placenta était effectuée et enregistrée dans le disque dur de l'échographe au format adéquat non compressé.

Mesures biométriques

Au cours de la césarienne, la corne d'origine et la position respective dans leur corne de chaque fœtus et de chaque placenta a été notée. Chaque fœtus a été mesuré (longueur craniocaudale) et pesés. Le placenta et la décidue ont été séparés et pesés. Une prise de sang maternelle de 20mL a été effectuée ainsi qu'un prélèvement de sang fœtal pour dosage ultérieur de la concentration de L-NAME, et l'animal a été euthanasié par une injection intravasculaire de Dolethal® (0.7mg/kg).

Echo-angiographie 3D : reconstruction et analyse des volumes 3D

L'intégralité du contour de chaque placenta a été manuellement dessinée avec une palette graphique selon des pas de rotation de 15° à l'aide du programme VOCAL™.

Résultats

Les acquisitions écho-angiographiques ont été effectuées sur 21 lapines (8 lapines témoins et 13 lapines L-NAME), en raison de 5 avortements spontanés. Parmi les gestations encore évolutives à G28, 18 fœtus étaient morts *in utero*, tous dans le groupe L-NAME. Les fœtus morts *in utero* ont systématiquement été éliminés des analyses biométriques et écho-angiographiques. Au total, les analyses ont pu être effectuées sur 180 fœtus (108 dans le groupe L-NAME, 72 dans le groupe témoin). Il n'y avait pas de différence significative pour la taille de la portée entre le groupe L-NAME et le groupe témoin ($9,194 \pm 0,17$ versus $9,241 \pm 0,192$ dans le groupe L-NAME et témoin, respectivement).

Le poids fœtal à G28 était significativement inférieur dans le groupe L-NAME par rapport au groupe témoin ($27,40 \pm 0,55g$ vs $33,14 \pm 0,62g$, $p < 0,0001$). La taille fœtale à G28 était significativement inférieure dans le groupe L-NAME ($8,65 \pm 0,09$ cm vs $10,59 \pm 0,14$ cm, $p < 0,0001$). Le poids de placenta seul était significativement inférieur dans le groupe L-

NAME ($3,76 \pm 0,14\text{g}$ vs $4,47 \pm 0,16\text{ g}$, $p < 0,0001$). Il n'avait pas de différence significative pour le poids de la décidue ($1,96 \pm 0,09\text{ g}$ vs $2,07 \pm 0,08\text{ g}$, $p = 0,1524$). Nous avons mis en évidence avec les posologies croissantes de L-NAME un effet dose sur le poids et la taille des fœtus à G28.

Deux acquisitions écho-angiographiques ont été effectuées par placenta, soit 144 analyses dans le groupe témoin et 216 dans le groupe L-NAME. Le VI est significativement inférieur dans le groupe L-NAME comparé au groupe contrôle ($4,1 \pm 0,1$ vs $8,7 \pm 2,2$ $p < 0,05$). Les mêmes résultats ont été retrouvés avec le FI ($29,3 \pm 5,5$ vs $33,9 \pm 7,7$ $p < 0,05$) et le VFI ($1,3 \pm 1,3$ vs $3,4 \pm 3,9$ $p < 0,05$). Sur l'effectif de placentas analysés, il n'était pas retrouvé de corrélation significative dose/effet entre la posologie du L-NAME et les indices écho angiographiques de vascularisation. Cependant, une tendance à la baisse des indices avec l'augmentation des posologies de L-NAME a été retrouvée.

Discussion

L'inhibition de la synthèse du NO par le L-NAME a déjà été étudiée chez la lapine gestante mais pour en évaluer les conséquences cardiovasculaires maternelles (Losonczy, Mucha et al. 1996). Des modèles animaux de RCIU ont par ailleurs déjà été développés avec le L-NAME (Bahtiyar, Buhimschi et al. 2007), mais **c'est la première fois à notre connaissance qu'un modèle de RCIU par administration de L-NAME est décrit chez le lapin.**

Le L-NAME est une molécule vasoconstrictrice, chez la rate gestante Thaete et al. (Thaete, Kushner et al. 2005) ont montré qu'elle provoque une diminution du débit utéro-placentaire. Mayr et al. (Mayr, Lederer et al. 2005), par des méthodes de moule vasculaire et Mandala et al. (Osol, Barron et al. 2009) en histologie ont montré que le L-NAME inhibe le remodelage et l'augmentation de calibre des artères maternelles utéro-placentaires des rates

gestantes. Le RCIU constaté sur notre modèle résulte probablement d'un défaut de perfusion utéro-placentaire.

Entre G24 et G28, la croissance fœtale chez le lapin est importante, et l'embryogénèse est terminée. Le poids fœtal passe en moyenne de $14,33 \pm 0,18$ g à $34,45 \pm 0,94$ g, le poids du placenta passe de $5,51 \pm 0,16$ g à $6,08 \pm 0,15$ g et le débit sanguin maternel placentaire de $1,62 \pm 0,20$ mL/min à $3,25 \pm 0,14$ mL/min) (Bruce and Abdul-Karim 1973) (Figure 16). Nous avons choisi d'administrer le L-NAME à cette période pour optimiser l'impact potentiel sur la croissance fœtale tout en réduisant au maximum la durée d'exposition. **La fenêtre de traitement est donc tardive, mais il s'agissait premièrement de développer un modèle d'hypoperfusion placentaire afin d'évaluer les performances de l'écho-angiographie 3D et non de développer un modèle précoce de défaut d'invasion trophoblastique.**

A notre connaissance la technique d'écho-angiographie 3D est appliquée ici pour la première fois chez la lapine gestante. Les résultats montrent que les indices quantitatifs de vascularisation obtenus par écho-angiographie 3D sont significativement inférieurs dans le groupe L-NAME, témoignant d'une hypoperfusion placentaire. Ces résultats apportent la preuve que cette technologie d'imagerie fonctionnelle est suffisamment sensible pour déceler des différences de vascularisation placentaire sur des petits modèles animaux comme le lapin. L'écho-angiographie est donc une technique d'imagerie fonctionnelle non invasive qui présente un intérêt pour l'évaluation des modèles animaux de RCIU.

4.3.2 Article soumis à la revue *Radiology* (2011) : « *Quantification of utero-placental vascularization in a rabbit model of IUGR with three-dimensional power Doppler angiography* »

4.4 Résultats 4 : Quantification de la vascularisation utéro-placentaire chez la femme en cas de Prééclampsie/RCIU par *PDA* : données préliminaires.

4.4.1 Résumé de la méthodologie

Introduction

Cet article rapporte notre première expérience clinique de l'étude de la vascularisation utéro-placentaire par PDA. Grâce au prêt d'un appareil VOLUSON 730 Expert (GE Medical systems, Zipf, Austria) sur une période de 6 mois en 2004-2005, une étude pilote a pu être réalisée à la Maternité Port-Royal (APHP, Paris).

Le but de ce travail était d'évaluer la faisabilité de la technique et de réaliser une première évaluation de la quantification des indices Doppler 3D placentaires et myométriaux de façon concomitante. En effet, le shunt myométrial sous-placentaire décrit par Schaaps-Tsatsaris et al. et dont la formation dépend des remaniements vasculaires utérins de début de grossesse présente un rôle physiologique potentiellement majeur dans les mécanismes de régulation des échanges materno-fœtaux (Schaaps, Tsatsaris et al. 2005). Il semble donc que chez la femme, l'étude de cette vascularisation myométriale doive être réalisée de façon concomitante à celle de la vascularisation placentaire.

Matériel et Méthode

Durant la période d'étude, 43 femmes enceintes ont été incluses au deuxième ou au troisième trimestre. Il n'était techniquement possible de ne réaliser qu'une acquisition par patiente en cours de grossesse, en raison de la disponibilité limitée de l'appareil.

Toutes les acquisitions étaient effectuées à l'aide d'une sonde abdominale RAB 3.5 – 5 MHz à balayage automatique. Afin de limiter au maximum les biais liés à la technique

d'acquisition, seules les patientes présentant un placenta antérieur ont été incluses. Les variations de profondeur du volume d'intérêt étaient ainsi mineures. Par ailleurs, l'ensemble des paramètres d'acquisition, en modes 2D, Doppler énergie et 3D, étaient standardisés. Deux acquisitions volumiques séquentielles étaient systématiquement effectuées chez chaque patiente par le même opérateur.

Les volumes acquis étaient mis en mémoire, l'analyse étant réalisée secondairement. Un consentement écrit était systématiquement recueilli, bien que s'agissant d'une étude observationnelle non interventionnelle.

L'analyse des volumes a été réalisée à l'aide du programme VOCAL™ (GE Medical systems). Un tracé manuel de chaque zone d'intérêt, ie le volume placentaire et la zone myométriale sous-placentaire, a été réalisé pour chaque volume non artéfacté. Le plan A était utilisé, avec un pas de rotation de 30° entre chaque tracé. La reproductibilité intra et inter observateur de la technique a été évaluée, ainsi que la reproductibilité inter-acquisition pour une même patiente, par calcul des coefficients de corrélation intra-classe entre les séries de mesures, ainsi que par la réalisation de graphes de Bland et Altman. Les résultats en termes d'indices de vascularisation ont ensuite été rapportés à l'issue de grossesse ainsi qu'au terme d'acquisition (résultats non inclus dans la version finale de l'article).

Résultats

A l'issue de l'étude, 38 patientes avaient présenté une grossesse normale et 5 patientes une grossesse marquée par un RCIU et/ou une prééclampsie. L'analyse des volumes a été réalisable pour l'ensemble des patientes, avec une reproductibilité élevée à la fois en intra- et en inter-observateur pour l'ensemble des indices. Le niveau de reproductibilité était comparable pour le myomètre et pour le placenta.

Ainsi, les coefficients de corrélations intra-classes étaient au minimum de 0,94 pour le myomètre et de 0,97 pour le placenta.

L'analyse des résultats a également permis de mettre en évidence une diminution significative des indices moyens VI et VFI au troisième trimestre, par rapport à ceux mesurés au deuxième trimestre.

Discussion

Il s'agit de la première observation avec l'application de la méthode d'analyse manuelle de l'ensemble du volume placentaire et myométrial analysable. Cependant, ces résultats étaient en désaccords avec d'autres observations, pour lesquelles les indices restaient stables aux deuxièmes et troisièmes trimestres. Cette discordance est très probablement à mettre sur le compte de l'impact des réglages sur la nature du signal mesuré en mode Doppler énergie, les différents auteurs pouvant tout à fait rapporter des acquisitions de flux de vitesses différentes.

Bien que tous les résultats obtenus aient fait l'objet de communications orales, les données en fonction de l'issue de la grossesse n'ont pas été publiées dans l'article final, à la demande des relecteurs du fait du nombre limité de patientes, ainsi que pour centrer le message sur le travail de reproductibilité. Cette étude préliminaire avait permis de confirmer l'existence d'une chute significative des valeurs d'indices de vascularisation chez les cinq patientes présentant une prééclampsie / RCIU.

Il s'agissait de la première observation avec l'application de la méthode d'analyse manuelle de l'ensemble du volume placentaire et myométrial analysable. Les autres auteurs avaient en effet utilisé la technique décrite plus haut de la « biopsie 3D ». De plus, il s'agissait

également de la première observation d'une chute des indices Doppler dans le myomètre également en cas de prééclampsie / RCIU.

4.4.2 Article publié dans la revue *The Journal of Maternal-fetal and Neonatal Medicine* (2010) « *Vascularization of the placenta and the sub-placental myometrium: feasibility and reproducibility of a three-dimensional power Doppler ultrasound quantification technique. A pilot study* »

4.5 Résultats 5 – étude de cohorte humaine prospective multi-centrique

4.5.1 Introduction

L'étude de la vascularisation utéro-placentaire par Doppler 3D quantitatif réalisée en 2005 chez 43 patientes (Morel, Pachy et al. 2010), dont 38 grossesses normales et 5 pré-éclampsies, suivies à la Maternité Port-Royal entre 15 et 39 SA, avait permis de démontrer un niveau élevé de reproductibilité intra et inter-observateur.

Pour les grossesses compliquées de prééclampsie, une chute significative des paramètres Doppler-3D avait été observée pour les VI et VFI placentaires et myométriaux ($p < 0.05$). Aucune différence significative n'était en revanche retrouvée pour les différentes valeurs de FI ou les sous-volumes. Il s'agissait de la première observation avec l'application de la méthode d'analyse manuelle de l'ensemble du volume placentaire et myométrial analysable. Dans les autres publications, les auteurs ont en effet utilisé la technique décrite plus haut de la « biopsie 3D » (Guiot, Gaglioti et al. 2008; Noguchi, Hata et al. 2009; Costa, Rice et al. 2010). De plus, il s'agissait également de la première observation d'une chute des indices Doppler dans le myomètre en cas de prééclampsie / RCIU.

Concernant le premier trimestre, il semblait, dans les premières études publiées, que la baisse des paramètres Doppler soit retrouvée. Cependant ces études sont peu nombreuses et de méthodologies variables (Bozkurt, Basgul Yigiter et al. 2010; Odeh, Ophir et al. 2011; Odibo, Goetzinger et al. 2011; Pomorski, Zimmer et al. 2011). En tout état de cause, les résultats observés en terme de différences de paramètres Doppler 3D en cas de prééclampsie avérée ou à venir semblent confirmer la théorie de défaut de vascularisation placentaire.

Dans le but d'évaluer l'intérêt potentiel de cette approche pour le dépistage précoce de la prééclampsie, 70 patientes à bas risque de survenue d'une prééclampsie ou d'un RCIU vasculaire et 100 patientes à haut risque ont été incluses dans une étude observationnelle prospective multicentrique. Seules les données concernant les patientes à bas risque ont été analysées ici, en effet toutes les issues de grossesses des patientes à haut risque ne sont pas disponibles à ce jour.

L'objectif principal était d'établir les valeurs normales chez les patientes à bas risque et de déterminer les facteurs qui les influençaient. L'objectif secondaire était d'évaluer la possibilité de mettre en évidence des différences de vascularisation placentaire et/ou myométriale dès le premier trimestre entre les patientes qui ont eu une issue de grossesse avec pathologie vasculaire placentaire et celles avec issue de grossesse normale. Pour ce faire, les volumes utéro-placentaires acquis au premier trimestre de la grossesse ont été analysés, par la suite nous avons analysé les facteurs physiologiques susceptibles de modifier les résultats et enfin les valeurs obtenues ont été comparées en fonction de l'issue de grossesse.

4.5.2 Matériel et méthode

Population d'étude

Les critères d'inclusion des patientes étaient une grossesse unique et une patiente pouvant bénéficier d'une échographie 3D avant la fin du premier trimestre. La définition de la situation de haut risque de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire était basée sur les critères suivants : présence d'antécédent personnel ou familial plaçant la patiente dans un groupe à risque avec risque relatif supérieur à 3 :

- antécédent personnel de prééclampsie (RR 7.19)
- antécédent de restriction de croissance in utero (5.6)

- diabète de type 1 (RR 3.56)
- hypertension (RR 8.8)
- insuffisance rénale, maladies auto-immunes (RR 6.9)
- syndrome des anti-phospholipides (RR 9.72).

Les femmes étaient considérées à bas risque lorsque le risque relatif était inférieur à 3. A l'heure actuelle, seules les patientes à bas risque de PVP (pathologie vasculaire placentaire – prééclampsie ou RCIU) : l'inclusion de femmes à haut risque a en effet été plus longue à réaliser, l'ensemble des issues de grossesse de cette cohorte à haut risque n'était par conséquent pas disponible au moment de l'analyse statistique.

Les patientes ont été incluses dans chacun des quatre centres participant à l'étude : services de Gynécologie-Obstétrique, Hôpital Lariboisière et Hôpital Bichat, Hôpital la Pitié-Salpêtrière et Maternité Port-Royal. Lors de leur première consultation de suivi de grossesse classique, il était proposé aux patientes remplissant les critères d'inclusion de rencontrer un des médecins investigateurs de chaque centre. Des plages spécifiques de rendez-vous rapides en consultation pour une éventuelle inclusion étaient organisées dans chaque centre afin d'assurer une inclusion précoce au premier trimestre. Elles se sont vu exposer les principes généraux de l'étude. Une fiche d'information leur a été remise. Une feuille de consentement éclairée était signée par la patiente si elle acceptait de participer à cette étude. Lors de chaque inclusion, un cahier de recueil personnel était assigné à chaque patiente et le suivi échographique immédiatement organisé. Etaient recueillies par le médecin investigateur toutes les données concernant les antécédents. Les données concernant le suivi de grossesse et son issue étaient recueillies en prospectif lors de chaque passage en consultation ou en hospitalisation. Une procédure permettant le respect de l'anonymat a été mise en place.

Chaque patiente incluse a été suivie au maximum durant 30 semaines (inclusion à 11 SA, suivi jusqu'au terme). Les inclusions ont été réalisées sur une période de 17 mois : de juillet 2009 à décembre 2010.

Acquisitions et analyses Doppler

Examens échographiques

Chaque patiente incluse a bénéficié d'une acquisition Doppler 3D de l'unité utéro-placentaire à l'échographie de référence pratiquée classiquement en cours du premier trimestre de la grossesse, c'est à dire entre 11 et 14 SA. La participation à l'étude n'a donc pas entraîné de réalisation d'examen spécifique pour les patientes ; l'examen échographique du premier trimestre était uniquement prolongé par une acquisition de volume utéro-placentaire (environ 2 minutes).

Technique d'acquisition

Les examens échographiques ont été effectués sur des échographes de type Voluson 730 Expert (General Electric Medical Systems Ultrasound, Vélizy, France), muni d'une sonde volumique abdominale cadencée à 2.2-6.5 MHz. Une acquisition 3D en mode Doppler couleur était effectuée au centre de l'unité utéro-placentaire. La technique d'acquisition était standardisée pour tous les paramètres d'acquisition avec programme prédéfini dans chaque machine : fenêtre, profondeur, paramètres Doppler. Il était impossible de modifier les paramètres pour les opérateurs réalisant les acquisitions. Une touche spécifique pour l'acquisition « étude placenta 3D » a été mise en place informatiquement sur chaque machine par le fabricant.

Les acquisitions étaient automatiquement mises en mémoire sur le disque dur de la machine et sur un disque dur externe dans chaque centre. Les analyses ont été réalisées

secondairement, sans que l'observateur n'ait connaissance de l'issue de grossesse et les résultats n'ont en aucun cas été pris en compte pour le suivi de grossesse des patientes incluses.

Le logiciel VOCAL™ (Virtual Organ Computer-aided AnaLysis software, GE VOLUSON) a permis de réaliser une reconstruction tri-dimensionnelle du volume acquis après sélection d'un pas de rotation de 30° pour visualiser toutes les faces. Le placenta et le myomètre (en regard de la zone d'insertion placentaire) ont été reconstruits pour chaque patiente. Un traçage manuel des contours de la zone d'intérêt était effectué à chaque rotation, le plan A servant de plan de référence (Figure 29).

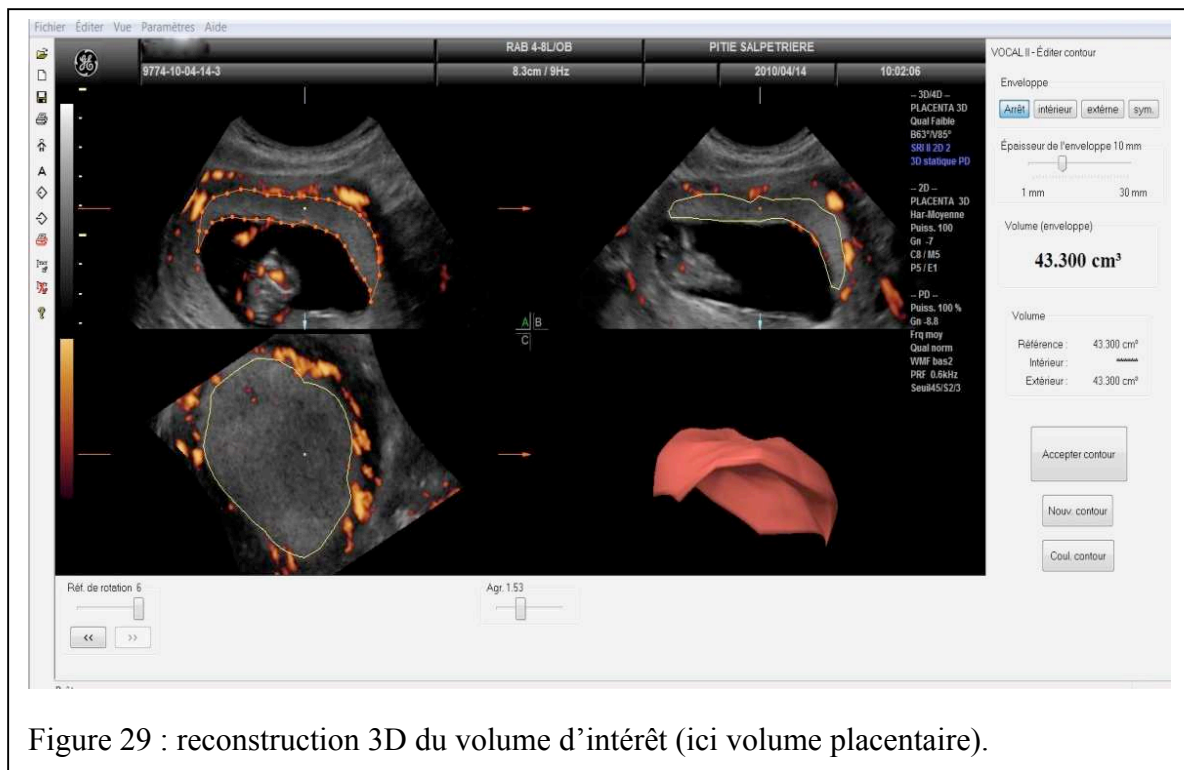


Figure 29 : reconstruction 3D du volume d'intérêt (ici volume placentaire).

Le volume, le niveau de gris moyen et les paramètres de vascularisation (VI: vascularization index, FI: flow index et VFI: vascularization flow index) du placenta et du

myomètre ont été calculés automatiquement par le logiciel VOCAL™ et présentés sous forme d'un histogramme.

L'opération a été réalisée pour le placenta puis pour le myomètre pour chaque volume acquis.

Analyse des données

Les différents paramètres cliniques et de l'anamnèse des femmes incluses ainsi que de leur nouveau-nés ont été analysés et sont rapportés sous forme de moyennes, médianes et pourcentages.

Toutes les valeurs des indices Doppler 3D du placenta d'une part et du myomètre d'autre part, des grossesses n'ayant pas présenté de complications liées à une pathologie vasculaire placentaire, ont permis d'établir les valeurs normales des différents paramètres : calculs des valeurs minimales et maximales, moyennes \pm écart-type, médianes (1^{er} et 3^{ème} quartiles (Q1 ; q3)).

Par ailleurs, les valeurs des indices Doppler 3D au niveau du placenta et du myomètre ont été analysées en fonction de différents paramètres pouvant varier selon les patientes : localisation placentaire (antérieures vs autres localisations), profondeur moyenne du volume étudié, BMI de la patiente en début de grossesse, parité, âge gestationnel.

Parmi les patientes à bas risque, les valeurs des différents paramètres 3D placentaires et myométriaux ont été comparés entre 2 groupes : les patientes n'ayant pas présenté de pathologie et les patientes ayant présenté une PVP. Comme décrit dans l'introduction, la survenue d'une HTA gravidique (HTAg) était définie par une HTA supérieure à 140 /90 mmHg, confirmée au moins par 2 mesures et apparaissant au-delà de 20 SA. La PE était

définie devant l'association HTA > 140/90 et protéinurie > 0.3g/24h. L'HTAg était considérée comme sévère si les pressions systoliques ou diastoliques dépassaient respectivement 160 ou 110 mmHg. Le RCIU était défini par un poids de naissance inférieur au 10^{ème} percentile selon les courbes AUDIPOG (Association des Utilisateurs de Dossiers Informatisés en Pédiatrie, Obstétrique et Gynécologie).

Par ailleurs, dans le but nous affranchir d'un éventuel effet de l'âge gestationnel sur les mesures, nous avons également comparé les quotients de ces valeurs : ratio valeur/Longueur Cranio-Caudale (LCC).

Outils statistiques

Le logiciel SAS (version 9.2) a été utilisé pour l'analyse des données. En cas de variable paramétrique, un test de Student a été utilisé pour comparer les moyennes. En cas de variable non paramétriques, un test de Mann-Whitney a été utilisé. L'impact des différents paramètres sur les valeurs « normales » des indices (BMI, position du placenta...) a fait l'objet d'une analyse uni et multivariée.

Cadre éthique

Le protocole de l'étude a reçu l'avis favorable du comité d'éthique du CEERB (Comité de l'évaluation de l'Ethique des projets de Recherche Biomédicale) sous la référence 09-011, puis du CCTTIRS (Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé) sous la référence 09.224 et de la CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) le 24/09/2009 sous la référence AT/YPA/SV/SN/GDP/AR091422. Par ailleurs, un accord éthique pour le territoire américain

a été demandé et obtenu auprès du NHI (National Health Institute) en date du 29/06/2009 sous le n° NCT00930397.

Financement

Tous les hôpitaux disposaient d'ores et déjà d'un appareil Voluson 730 Expert. General Electric a mis à disposition des centres un ingénieur biomédical qui a assuré la mise en place du programme d'acquisition spécifique de l'étude sur chaque appareil, la formation des investigateurs, la maintenance, ainsi qu'un contrôle qualité des acquisitions au début, à mi-parcours et à la fin de l'étude.

Un attaché de recherche clinique a assuré l'enregistrement des inclusions, vérifiait l'exhaustivité des renseignements relevés dans les cahiers d'observation, le classement des données informatiques échographiques, la mise à jour du tableur pour étude statistique, et le suivi des issues de grossesse.

4.5.3 Résultats

Description de la population

Entre juillet 2009 et mars 2010, **70 patientes** à bas risque de prééclampsie ont été incluses dans l'étude. **Trois patientes** ont été exclues de l'analyse car perdues de vue. Les caractéristiques principales des patientes et des issues de grossesses sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : caractéristiques maternelles et Longueur Cranio Caudale (LCC) au moment de la réalisation de l'acquisition pour les 67 patientes à bas risques incluses.

	Médiane/ Moyenne (a,b)	Mini-maxi	n
Age (années) (a)	31.79 ± 5.06	19.31; 43.03	67
BMI (kg/m ²) (b)	22.48 [19.92;25.39]	16.65;35.38	66
Gestité (b)	1 (0;3)	0;8	67
Parité (b)	1 (0;1)	0;4	67
LCC (mm) (b)	63.24 ± 9.4	45;83.6	67

(a) Moyenne +/- σ (la variable suit une loi normale)

(b) Médiane (Q1, q3) (la variable ne suit pas une loi normale)

Dans cette population, 16.7% des patientes fumaient avant la grossesse et 12,1% avaient un tabagisme actif au premier trimestre.

Trente pour cent des patientes avaient déjà présenté au moins 1 fausse-couche. Toutes les grossesses ont été obtenues spontanément (n=67). Seulement 9% des patientes n'ont pas souhaité réaliser de dépistage des aneuploïdies par le dosage des marqueurs sériques maternels.

Aucune patiente n'a été transférée dans un autre centre en pré ou péri-partum. Aucun décès maternel n'a été signalé.

Deux patientes ont développé des pathologies maternelles en rapport avec une insuffisance placentaire. Une patiente a présenté une prééclampsie en fin de grossesse (diagnostiquée à 40SA). La seconde patiente a présenté une HTA gravidique sévère à 32 SA diagnostiquée au moment de la découverte de la mort fœtale.

Parmi les enfants, 2 décès sont survenus. Le premier est survenu per-partum dans un contexte d'accouchement prématuré, avec naissance d'un enfant eutrophe à 23 SA et 4j, il n'a donc pas été comptabilisé dans les PVP. Le second est survenu in utero à 32 SA chez une patiente présentant une HTA gravidique sévère d'emblée sans protéinurie, avec naissance d'un enfant présentant un RCIU (Poids de naissance : 1240g), malgré la surveillance *in utero*.

Par ailleurs, 4 autres enfants avaient un poids inférieur au 10ème percentile pour l'âge gestationnel. Les caractéristiques des enfants sont représentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : caractéristiques des enfants.

	Médiane (Q1 ; Q3)	Mini- Maxi	n
Terme de naissance	39SA+4j (38SA+1j ; 40SA+5j)	23SA+4j - 41SA+6j	67
Poids naissance (en g)	3380 (3010 - 3630)	595 - 4740	67
Hypotrophie (<10°P)			
Taille naissance (en cm)	50 (49 - 51)	33 - 55	64
Apgar 1 min	10 (9 - 10)	1 - 10	65
Apgar 5 min	10 (10 - 10)	2 - 10	65
Apgar 10 min	10 (10 - 10)	1 - 10	64

Au total, 6 grossesses ont été affectées par une pathologie en relation avec une insuffisance placentaire (PVP) soit 9%. Leurs caractéristiques physiques et leurs antécédents obstétricaux n'étaient pas significativement différents de la population des patientes dont l'issue de grossesse était normale.

Description des valeurs normales et de l'impact des facteurs physiologiques

En ce qui concerne les acquisitions, tous les volumes recueillis étaient conformes aux critères demandés. L'analyse a été possible dans tous les cas pour le placenta et dans 66/67 cas pour le myomètre (analyse impossible chez une des patientes en raison de cônes d'ombre trop importants).

Tableau 4 : Valeurs placentaires dans les grossesses normales (n=61) au premier trimestre de la grossesse.

Variable	Médiane/Moyenne	Mini-maxi	IC
Volume (a)	52.52 [41.01;68.32]	14.88;162.83	55.87 [50.42;61.32]
<i>Quotient placentaire (a)</i>	<i>0.84 [0.65;1.07]</i>	<i>0.24;2.34</i>	<i>0.88 [0.8;0.96]</i>
Mid Grey (b)	31.75±6.09	16.05;46	31.75 [30.45;33.05]
<i>Quotient Mid Grey (b)</i>	<i>0.51±0.11</i>	<i>0.26;0.79</i>	<i>0.51 [0.49;0.53]</i>
VI (a)	6.9 [4.68;10.76]	0.51;21.63	7.91 [6.97;8.85]
<i>Quotient VI (a)</i>	<i>0.11 [0.08;0.16]</i>	<i>0.01;0.38</i>	<i>0.13 [0.11;0.15]</i>
VFI (a)	2.81 [1.82;4.82]	0.15;10.14	3.42 [2.96;3.88]
<i>Quotient VFI (a)</i>	<i>0.05 [0.03;0.07]</i>	<i>0;0.17</i>	<i>0.05 [0.04;0.06]</i>
FI (b)	41.49±4.9	28.21;54.88	41.49 [40.44;42.54]
<i>Quotient FI (b)</i>	<i>0.67±0.11</i>	<i>0.45;0.92</i>	<i>0.67 [0.65;0.69]</i>

(a) Médiane (Q1, q3) (la variable ne suit pas une loi normale)

(b) Moyenne +/- σ (la variable suit une loi normale)

Les valeurs normales et l'analyse de l'impact des facteurs physiologiques ont été étudiées dans le groupe de femmes n'ayant pas développé de PVP, soit 61 femmes. Les valeurs normales des volumes, MG, VI, FI et VFI, définies sur cet échantillon sont représentées dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 5 : Valeurs myométriales dans les grossesses normales (n=61) au premier trimestre de la grossesse.

Variable	Moyenne/ médiane	Mini-maxi	IC
Volume (a)	90.78 [55.11;115.48]	14.41;242.43	92.89 [83.54;102.24]
<i>Quotient myométrial (a)</i>	<i>1.54 [0.92;1.92]</i>	<i>0.22;3.17</i>	<i>1.48 [1.33;1.63]</i>
Mid Grey (b)	24.18±12.3	7.46;98.16	24.18 [21.55;26.81]
<i>Quotient Mid Grey (b)</i>	<i>0.39±0.18</i>	<i>0.1;1.34</i>	<i>0.39 [0.35;0.43]</i>
VI (a)	20.97 [16.29;33.28]	3.05;55	24.09 [21.47;26.71]
<i>Quotient VI (a)</i>	<i>0.36 [0.26;0.52]</i>	<i>0.05;0.89</i>	<i>0.39 [0.35;0.43]</i>
VFI (a)	10.27 [7.25;18.51]	1.02;33	12.67 [11.03;14.31]
<i>Quotient VFI (a)</i>	<i>0.17 [0.12;0.28]</i>	<i>0.02;0.53</i>	<i>0.2 [0.17;0.23]</i>
FI (b)	49.75±6.72	32.8;64.3	49.75 [48.31;51.19]
<i>Quotient FI (b)</i>	<i>0.8±0.15</i>	<i>0.47;1.24</i>	<i>0.8 [0.77;0.83]</i>

(a) Médiane (Q1, q3) (la variable ne suit pas une loi normale)

(b) Moyenne +/- σ (la variable suit une loi normale)

L'étude des facteurs physiologiques a débuté par l'analyse de la localisation placentaire et de la répartition de cette localisation en fonction du BMI de façon à éliminer un biais de recrutement.

Le placenta était antérieur chez 47.9% des patientes. La répartition des localisations placentaires chez les patientes incluses était indépendante de leur BMI (Tableau 6).

Tableau 6 : Situation placentaire (n et (%)) et répartition en fonction du BMI.

BMI (kg/m ²)	Localisation non antérieure	Localisation antérieure	Total
<19	5 (7.58)	4 (6.06)	9 (13.64)
[19,24]	16 (24.24)	17 (25.76)	33 (50.00)
[24,30]	10 (15.15)	8 (12.12)	18 (27.27)
[30,35]	4 (6.06)	1 (1.52)	5 (7.58)
≥ 35	0 (0.00)	1 (1.52)	1 (1.52)
Total	35 (53.03)	31 (46.97)	66 (100.00)

Concernant les facteurs maternels et obstétricaux non modifiables susceptibles de faire varier les différents paramètres calculés, les résultats sont les suivants.

- Pour la localisation placentaire: les volumes et les MG ainsi que le quotient volume du placenta et du myomètre étaient augmentés quand le placenta était non-antérieur ($p < 0.03$). En revanche, les indices Doppler n'étaient pas impactés.

- Pour la profondeur : les volumes, quotients volumes et les MG pour le placenta ($p < 0.05$) et le myomètre ($p < 0.02$) ainsi que le quotient MG du myomètre augmentaient avec la profondeur du volume étudié.
- Aucun des paramètres pour le placenta et le myomètre ne variait en fonction du BMI, ni en fonction de la parité, ni de la consommation tabagique.
- Selon l'âge gestationnel : les valeurs volume, MG, VI, VFI et FI placentaire et myométriales n'étaient pas modifiés.

Comparaison des valeurs des groupes avec/ sans PVP : placenta

Le volume placentaire ne différait pas entre les 2 groupes. Les valeurs de MG, VI, VFI et FI étaient significativement diminuées en cas de développement ultérieur d'un PVP avec respectivement $p = 0.003, 0.0007, 0.0005$ et 0.0002 . Il en était de même pour les quotients avec des $p = 0.03, 0.002, 0.001$ et 0.04 . Les données sont reportées dans le tableau 7.

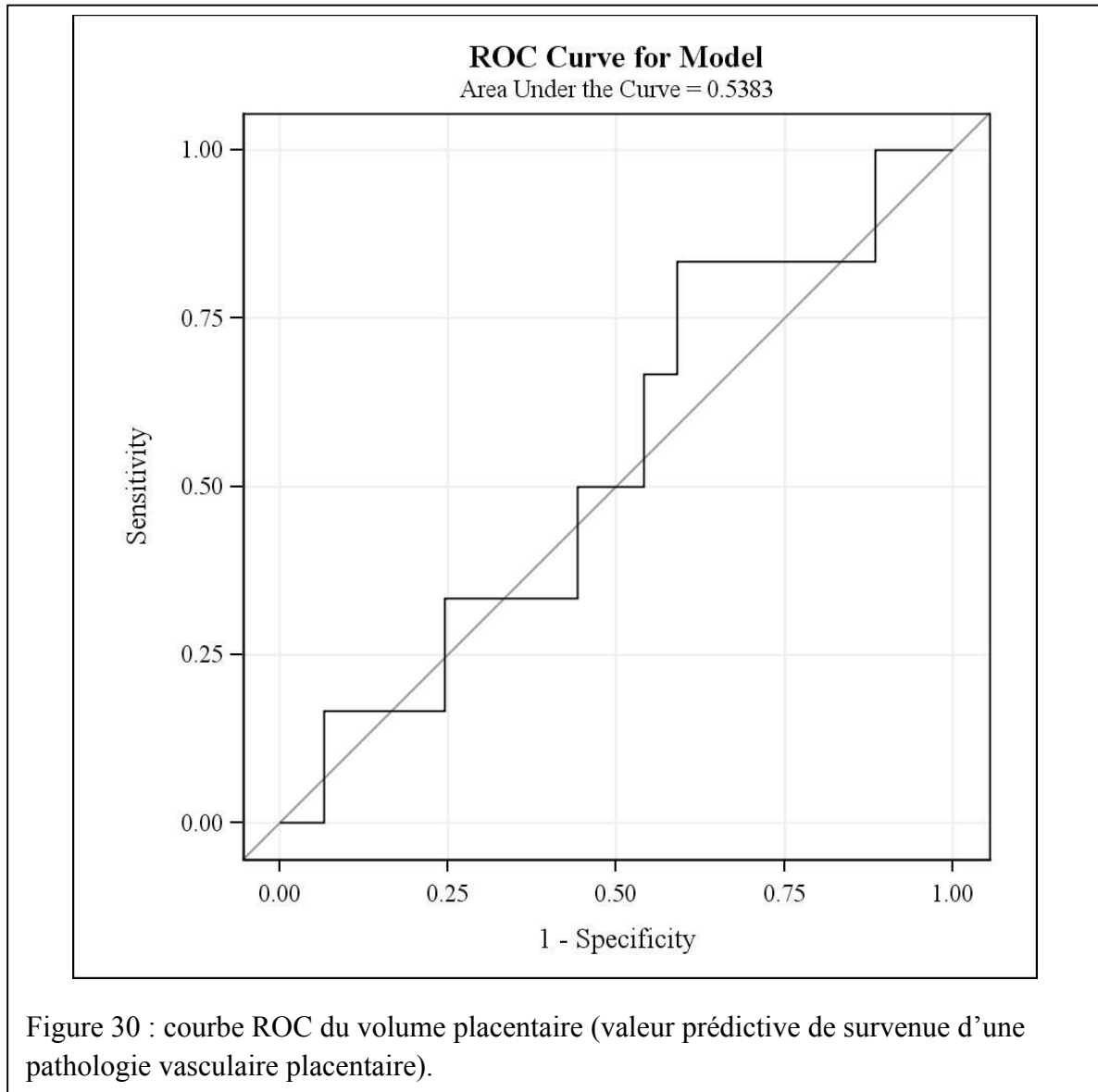
Tableau 7 : Comparaison des valeurs placentaires (grossesses normales/ PVP).

	Grossesses normales (n= 61)	PVP (n=6)	<i>p</i>
Volume (a)	52.52 [41.01;68.32]	50.91 [39.14;57.5]	0.76
<i>Quotient placentaire (a)</i>	<i>0.84 [0.65;1.07]</i>	<i>0.76 [0.59;1.13]</i>	<i>0.75</i>
Mid Grey (b)	31.75±6.09	23.93±4.88	0.003
<i>Quotient Mid Grey (b)</i>	<i>0.51±0.11</i>	<i>0.4±0.12</i>	0.028
VI (a)	6.9 [4.68;10.76]	1.73 [0.97;2.6]	0.0007
<i>Quotient VI (a)</i>	<i>0.11 [0.08;0.16]</i>	<i>0.03 [0.01;0.05]</i>	0.0016
VFI (a)	2.81 [1.82;4.82]	0.59 [0.32;0.96]	0.0005
<i>Quotient VFI (a)</i>	<i>0.05 [0.03;0.07]</i>	<i>0.01 [0;0.02]</i>	0.0008
FI (b)	41.49±4.9	33.41±2.47	0.0002
<i>Quotient FI (b)</i>	<i>0.67±0.11</i>	<i>0.56±0.15</i>	0.038

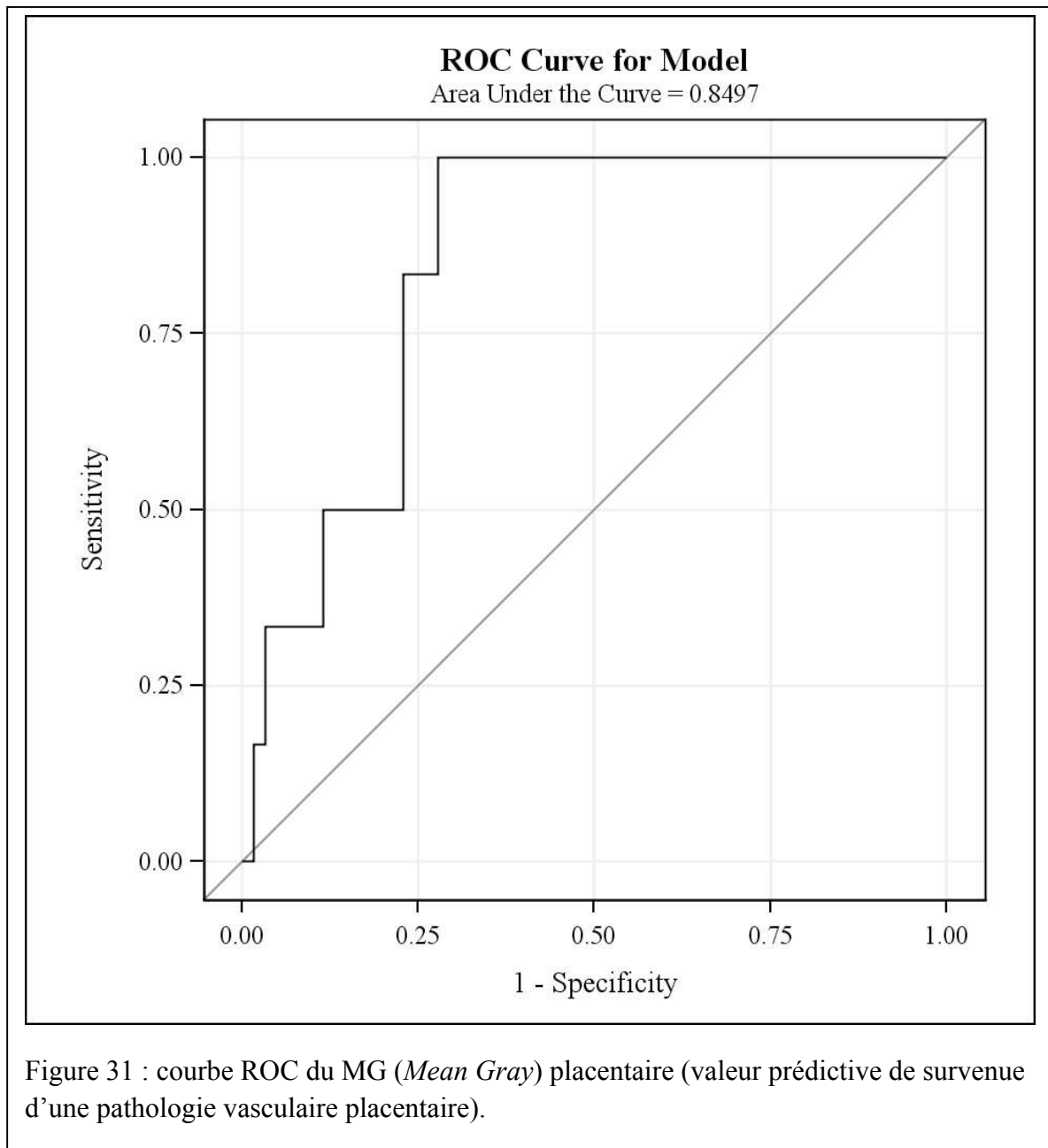
(a) Médiane (Q1, q3) (la variable ne suit pas une loi normale)

(b) Moyenne +/- sd (la variable suit une loi normale)

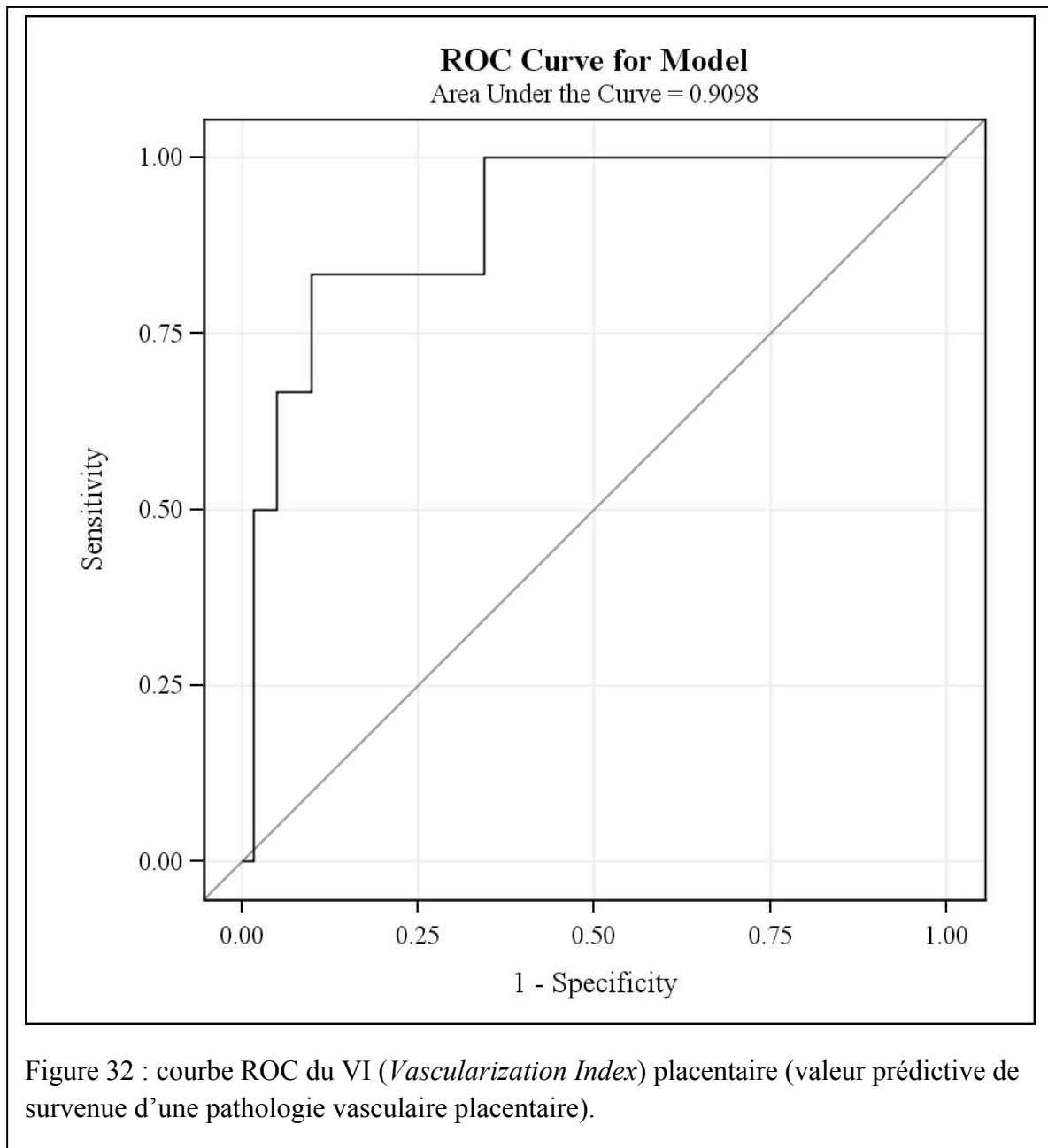
Les valeurs prédictives, sensibilité et spécificité étaient élevées, avec des AUC jusqu'à 0.943 pour le FI. Les courbes ROC (*Receiver Operating Characteristics* : une courbe ROC est le tracé des valeurs de la sensibilité Se en fonction de 1-Sp) pour chaque paramètre sont présentées en figures pour les valeurs placentaires (Figures 30 à 34).



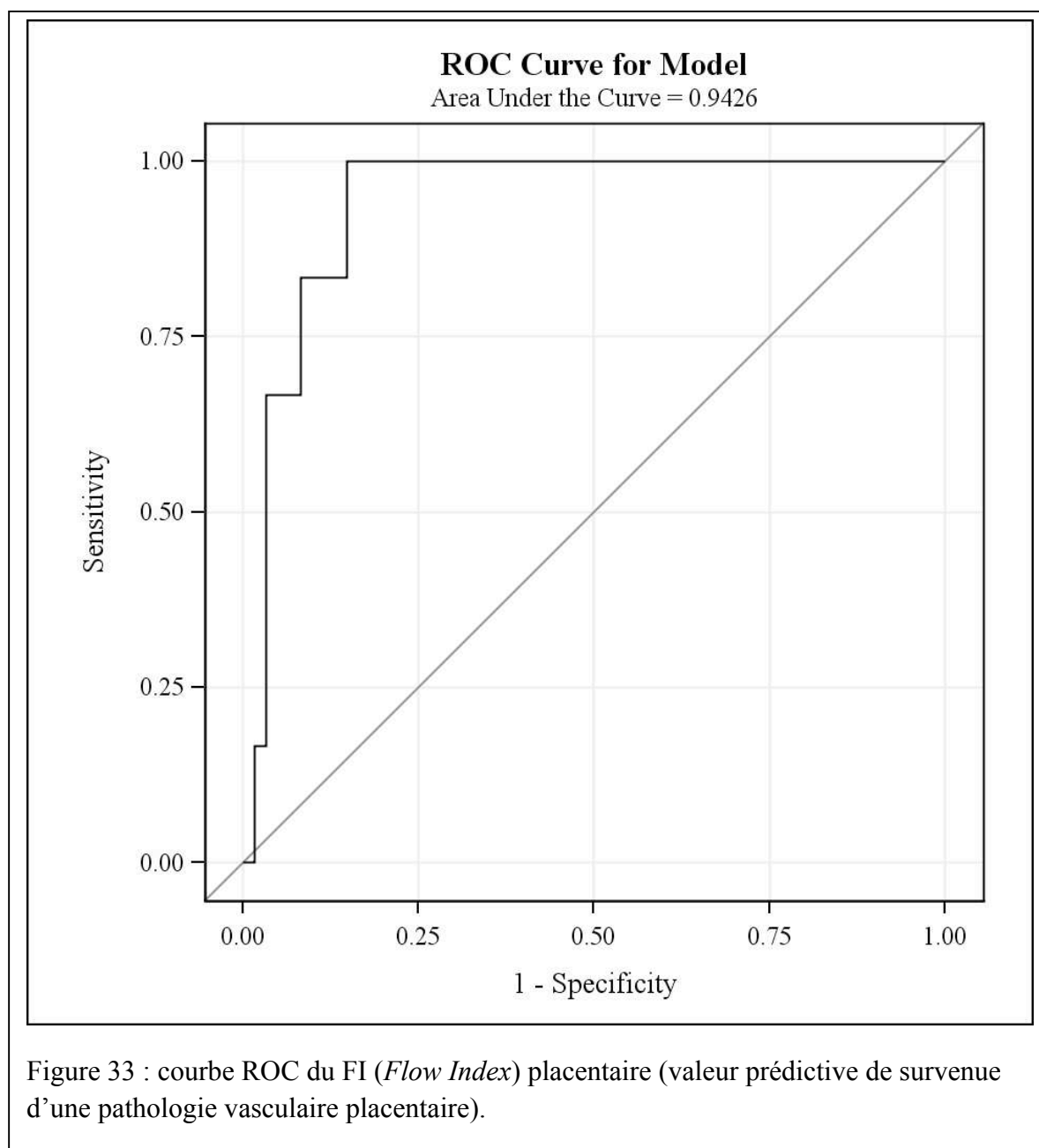
Pour le volume placentaire les différences n'étaient pas significatives entre les patientes avec issue de grossesse normale et PVP.



Pour un MG seuil de 28.65, la Se était de 100%, la Sp de 72%, la VPP 26% mais une VPN de 100%. Pour un MG seuil de 27.45, la Se était de 83%, la Sp de 77%, la VPP 26% mais une VPN de 98%.



Pour un VI seuil de 2.601, la Se était de 83%, la Sp de 90%, la VPP 45% mais une VPN de 98% et pour un seuil de 5.624, la Se était de 100%, la Sp de 66%, la VPP 22% mais une VPN de 100%.



Pour un FI seuil de 35.538, la Se était de 83%, la Sp de 92%, la VPP 50% mais une VPN de 98% et pour un seuil de 36.784, la Se était de 100%, la Sp de 85%, la VPP 40% mais une VPN de 100%.

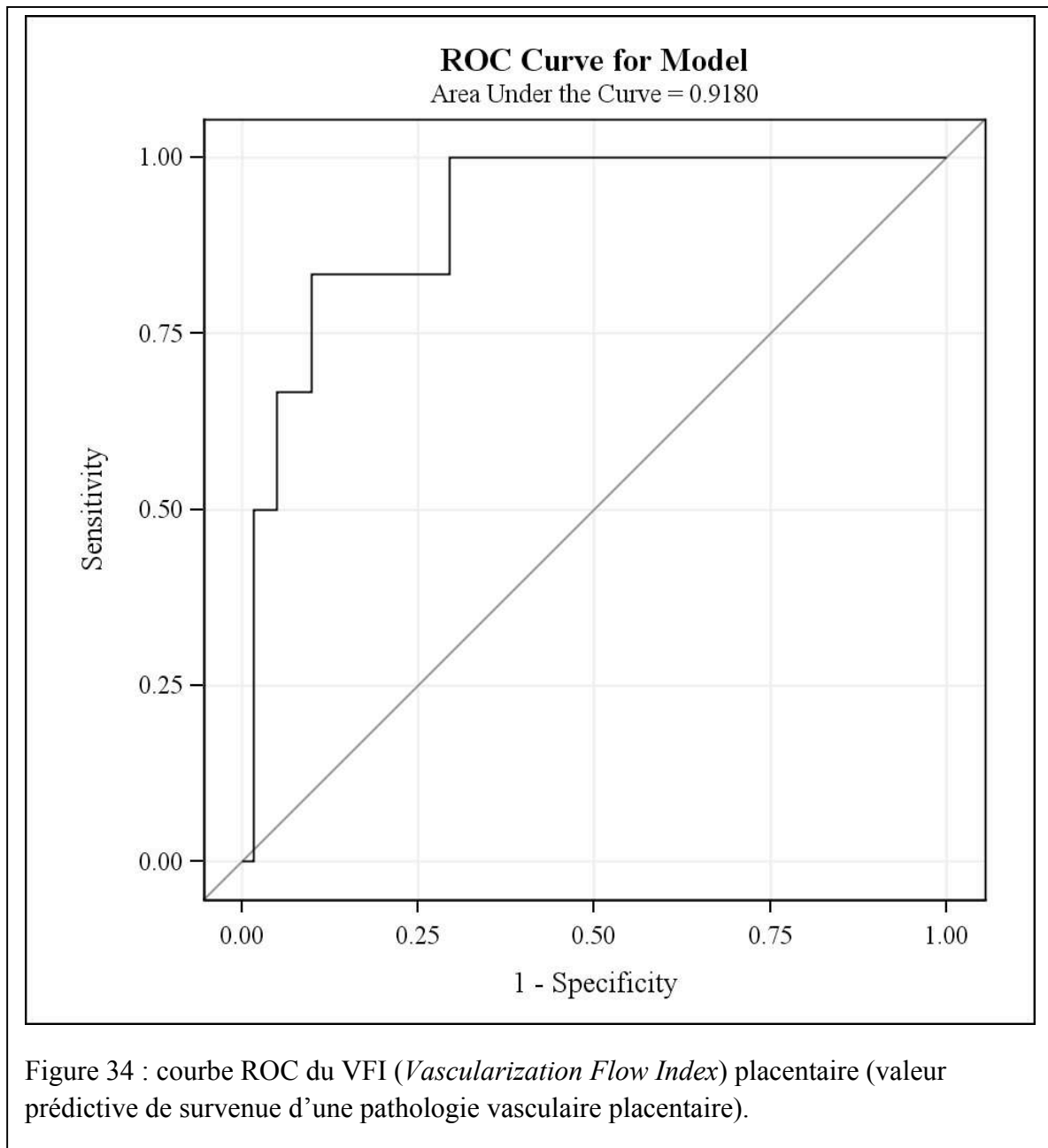


Figure 34 : courbe ROC du VFI (*Vascularization Flow Index*) placentaire (valeur prédictive de survenue d'une pathologie vasculaire placentaire).

Pour un VFI seuil de 0.957, la Se était de 83%, la Sp de 90%, la VPP 45% mais une VPN de 98% et pour un seuil de 1.999, la Se était de 100%, la Sp de 70%, la VPP 25% mais une VPN de 100%.

Comparaison des valeurs des groupes avec/ sans PVP : myomètre

L'analyse du myomètre a été possible chez toutes les patientes sauf une (patiente dont l'enfant présentait un poids de naissance sous le 10^{ème} percentile mais sans HTA ni PE). Chez toutes les patientes analysées, le volume et son quotient n'étaient pas différents. Le niveau de gris, son quotient, le VI et le VFI étaient significativement plus bas chez les patientes avec PVP par rapport aux patientes avec issue de grossesse normale, avec $p = 0.0064$, 0.0075 , 0.029 et $p = 0.027$ respectivement. Le quotient VFI était à la limite de la significativité ($p = 0.0503$). Les valeurs de FI et de son quotient n'étaient pas différentes dans les 2 groupes. Ces données sont résumées dans le tableau 8.

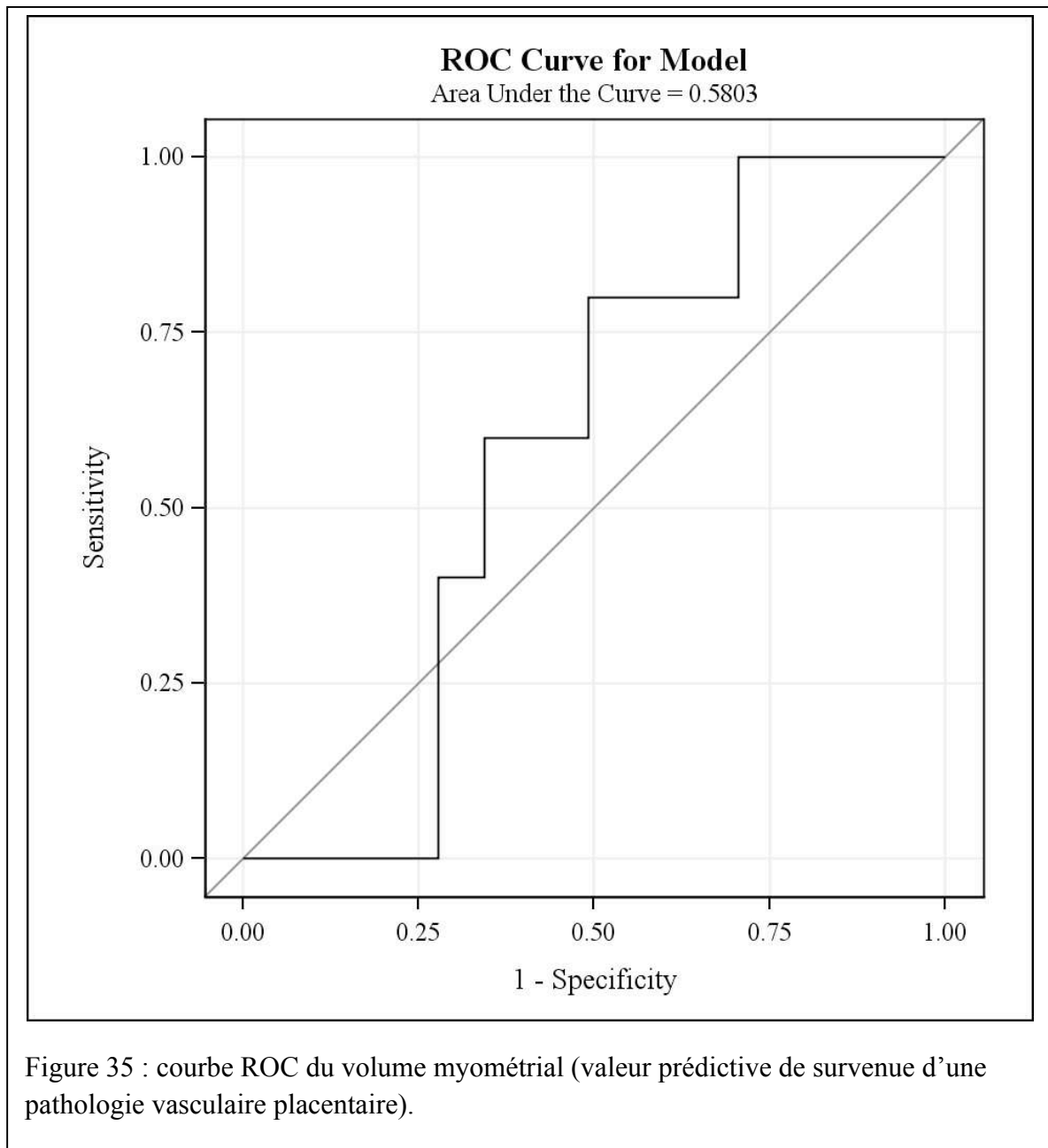
Tableau 8 : Comparaison des valeurs myométriales (grossesses normales/ PVP)

	Grossesses normales n = 61	PVP n = 5	<i>p</i>
Volume (a)	90.78 [55.11;115.48]	75.41 [67.17;89.45]	0.557
<i>Quotient placentaire (a)</i>	1.54 [0.92;1.92]	1.29 [1.19;1.33]	0.459
Mid Grey (b)	24.18±12.3	13.81±4.66	0.0064
<i>Quotient Mid Grey (b)</i>	0.39±0.18	0.22±0.07	0.0075
VI (a)	20.97 [16.29;33.28]	12.97 [5.5;16.74]	0.029
<i>Quotient VI (a)</i>	0.36 [0.26;0.52]	0.19 [0.07;0.3]	0.075
VFI (a)	10.27 [7.25;18.51]	5.6 [2.82;7.47]	0.027
<i>Quotient VFI (a)</i>	0.17 [0.12;0.28]	0.08 [0.03;0.13]	0.0503
FI (b)	49.75±6.72	44.54±5.1	0.0961
<i>Quotient FI (b)</i>	0.8±0.15	0.71±0.18	0.23

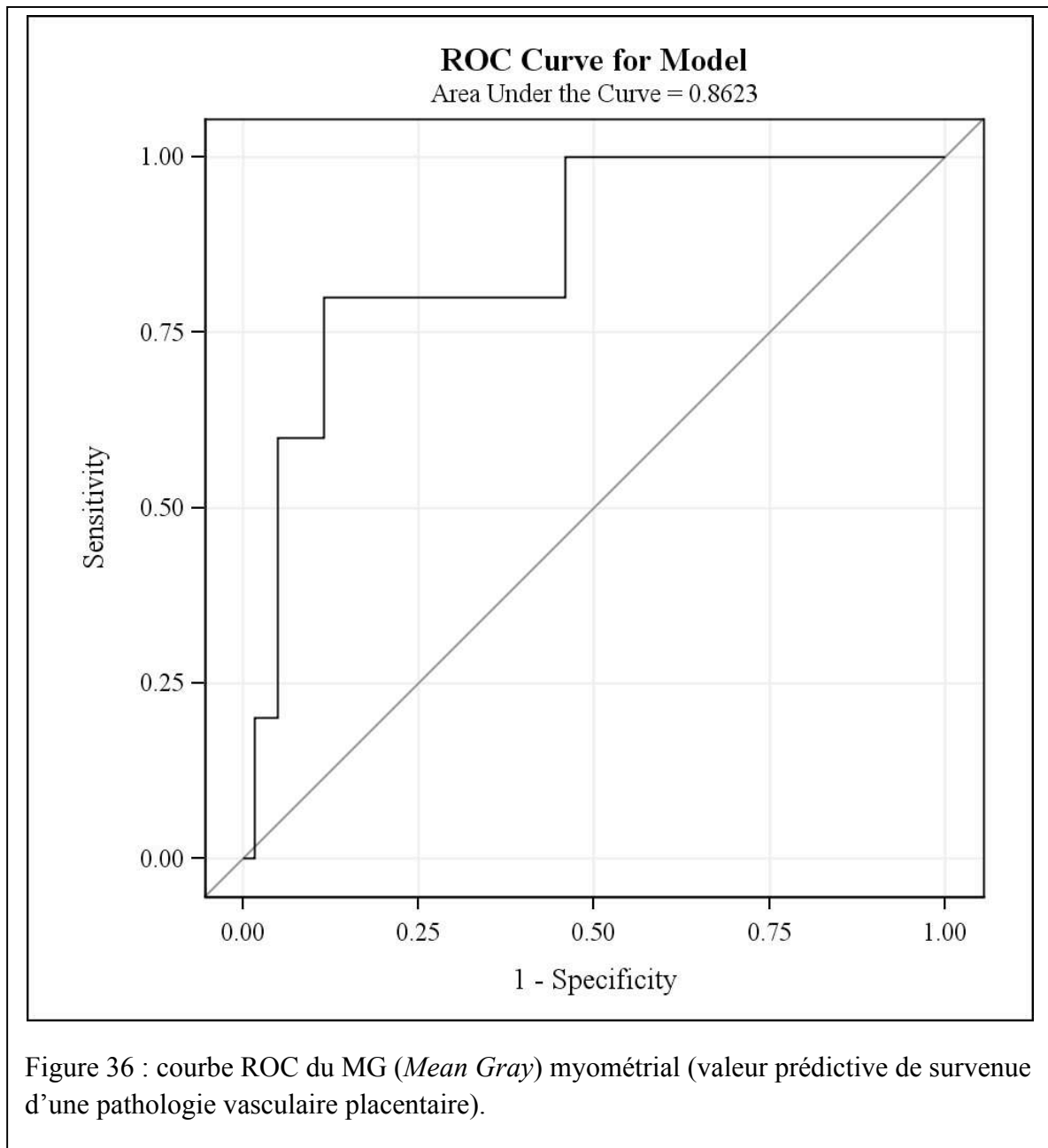
(a) Médiane (Q1, q3) (la variable ne suit pas une loi normale)

(b) Moyenne +/- sd (la variable suit une loi normale)

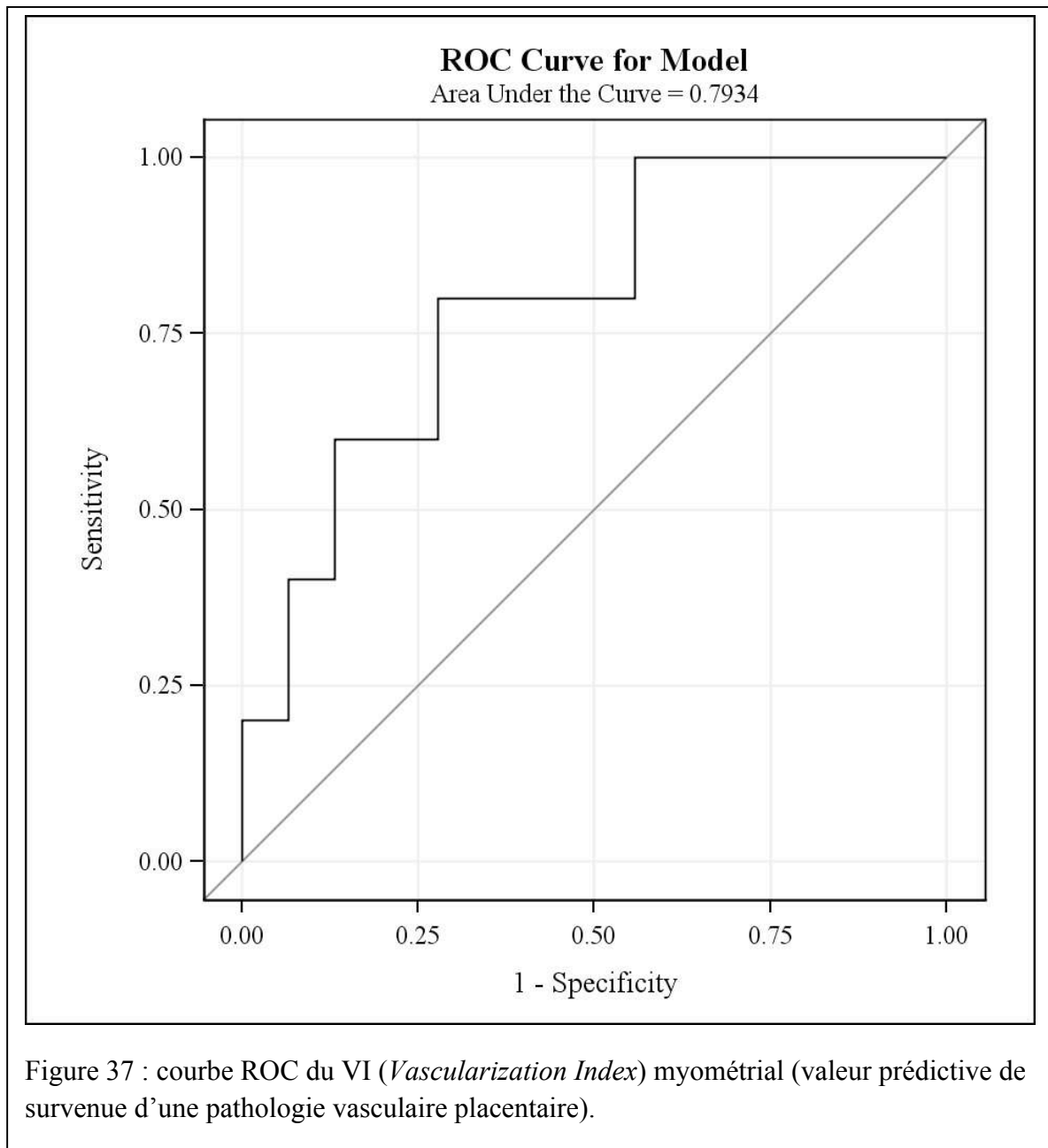
Les résultats en termes de sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives et négative sont représentés ci-dessus sous formes de courbes ROC (Figures 35 à 39).



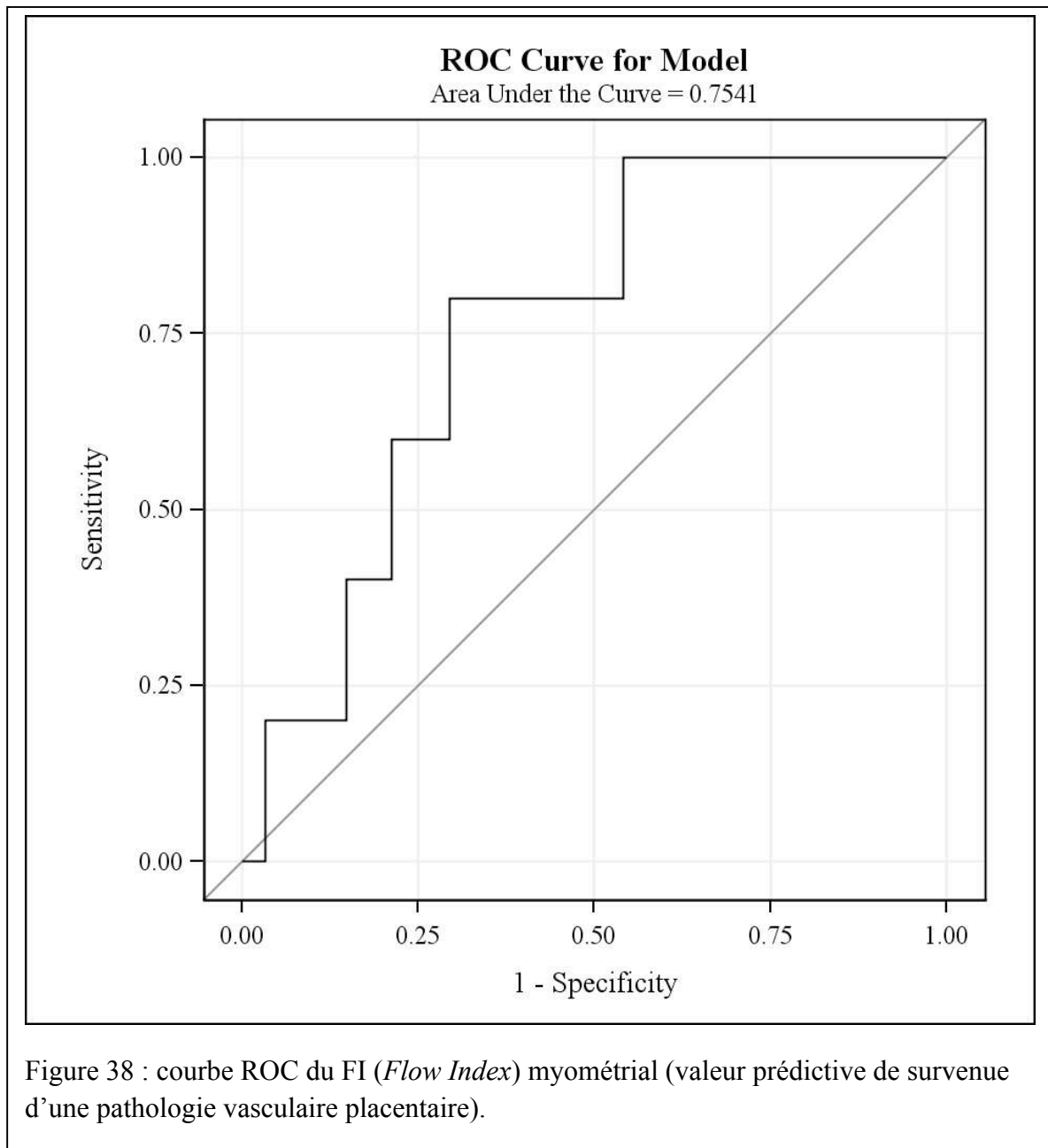
Pour le volume myométrial les différences n'étaient pas significatives entre les patientes avec issue de grossesse normale et PVP.



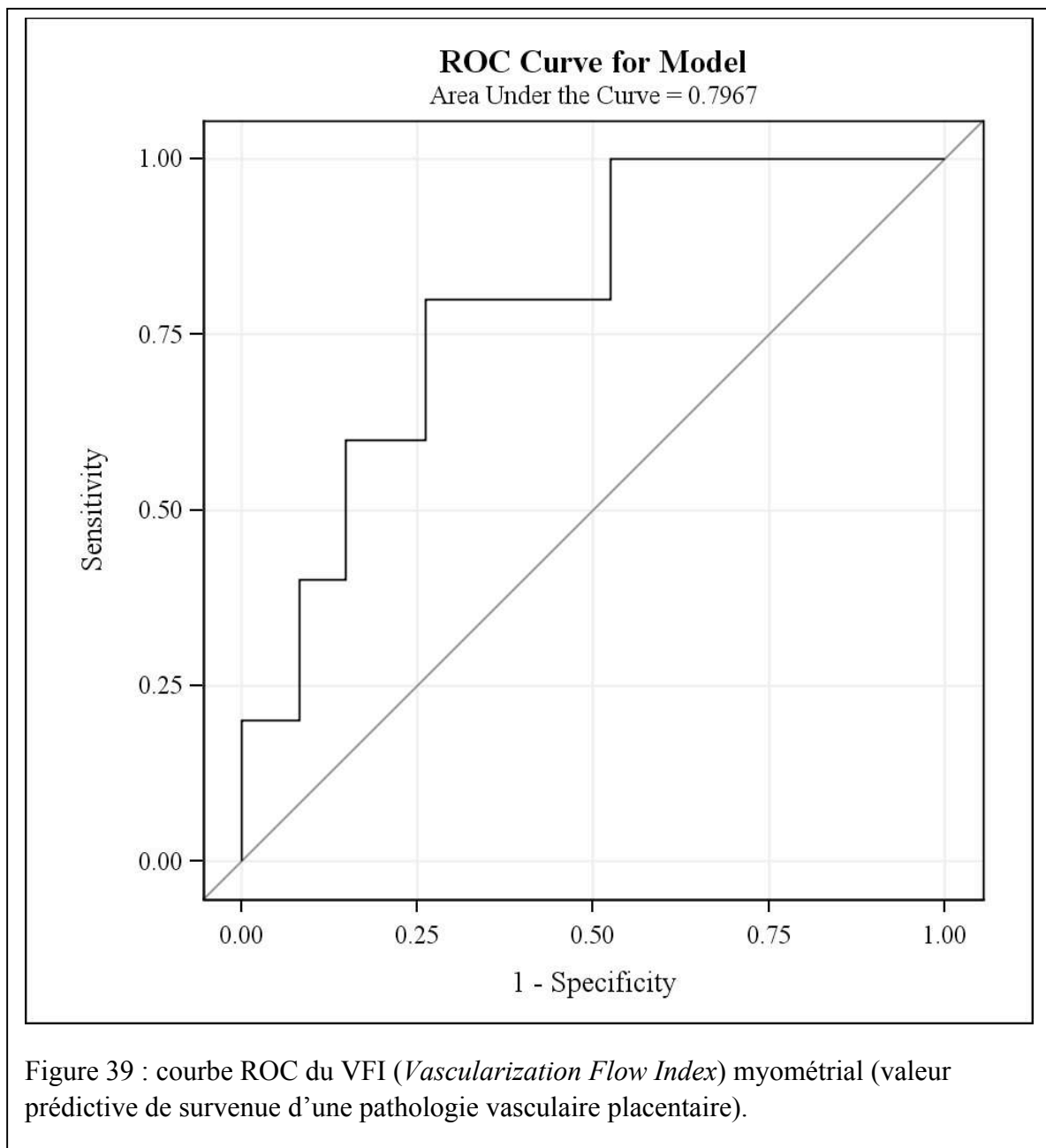
Pour un MG seuil de 14.177, la Se était de 80%, la Sp de 89%, la VPP 36% mais une VPN de 98% et pour un seuil de 21.134, la Se était de 100%, la Sp de 54%, la VPP 15% mais une VPN de 100%.



Pour un VI seuil de 16.742, la Se était de 80%, la Sp de 72%, la VPP 19% mais une VPN de 98% et pour un seuil de 21.314, la Se était de 100%, la Sp de 44%, la VPP 13% mais une VPN de 100%.



Pour un seuil de 46.553, la Se était de 80%, la Sp de 70%, la VPP 18% mais une VPN de 98% et pour un seuil de 51.163, la Se était de 100%, la Sp de 46 %, la VPP 13% mais une VPN de 100%. Pour mémoire, les différences n'étaient pas significatives pour ce paramètre ($p = 0.096$).



Pour un VFI seuil de 7.468, la Se était de 80%, la Sp de 74%, la VPP 20% mais une VPN de 98% et pour un seuil de 10.885, la Se était de 100%, la Sp de 43%, la VPP 13.5% mais une VPN de 100%.

4.5.4 Discussion

Il n'est pas possible aujourd'hui de parler de réelle évaluation de la perfusion de l'unité utéro-placentaire en pratique clinique courante avec les techniques disponibles. Comme déjà développé, cette évaluation de la vascularisation se heurte à un écueil majeur : l'impossibilité d'utiliser des produits de contraste en cours de grossesse en raison du risque tératogène.

Ainsi, seul l'examen Doppler des artères utérines est utilisé en pratique courante pour l'évaluation plus ou moins précoce de la vascularisation utéro-placentaire, avec les limites extrêmement importantes que nous avons déjà pu envisager.

L'étude de la physiopathologie des PVP *in vitro* a permis des avancées majeures en termes de compréhension des mécanismes sous-tendant le dysfonctionnement placentaire et ses conséquences maternelles et fœtales, avancées qui offrent aujourd'hui l'espoir d'un dépistage plus ciblé basé sur le dosage de marqueurs biologiques au premier trimestre de la grossesse. Des progrès apparaissent par ailleurs primordiaux à réaliser dans l'évaluation *in vivo* de la vascularisation utéro-placentaire. Appréhender l'existence et l'importance d'éventuels défauts de vascularisation utéro-placentaire est donc un axe de recherche majeur tant pour le dépistage, le diagnostic ou la compréhension des phénomènes physiopathologiques du RCIU vasculaire et de la PE.

Le but de cette étude était d'étudier la quantification de la vascularisation utéro-placentaire par angiographie Doppler 3D, dans une cohorte de femmes à bas risque et d'analyser la faisabilité de cette technique et sa valeur prédictive de la survenue d'une pathologie vasculaire placentaire.

Dans la littérature, les premières études réalisées chez la femme ont été faites au 2^{ème} ou au 3^{ème} trimestre de la grossesse. Ces études ont permis de montrer une tendance à une

diminution des indices Doppler chez les femmes pré-éclamptiques et/ou dont le fœtus présente un RCIU (Zalud and Shaha 2007; Guiot, Gaglioti et al. 2008; Noguchi, Hata et al. 2009; Costa, Rice et al. 2010; Morel, Grange et al. 2010).

Les influences respectives de la localisation placentaire et de la profondeur moyenne du volume d'intérêt ont également été évaluées. Le BMI ne modifiant aucun des paramètres Doppler ni les valeurs des volumes et du niveau de gris, la répartition des localisations placentaires en fonction du BMI des patientes a été évaluée et un éventuel biais de recrutement a été éliminé (50 % des patientes avec un BMI < 24 et 42% des patientes avec un BMI > 24 avaient un placenta antérieur). Hafner en 2001 ne retrouvait pas non plus de variations des mesures des volumes en fonction du BMI (Hafner, Metzenbauer et al. 2001).

Si les études *in vitro* ont tendance à montrer une diminution des indices de vascularisation corrélés à la profondeur (Raine-Fenning, Nordin et al. 2008), cette diminution n'est pas significative *in vivo* dans la limite de profondeur d'exploration chez les femmes incluses dans ce travail (Guiot, Gaglioti et al. 2008; Rizzo, Capponi et al. 2008; de Paula, Ruano et al. 2009).

Ce travail a permis de montrer des diminutions très significatives des valeurs VI, VFI et FI placentaires ainsi que de leurs quotients (ratio rapporté à la LCC) chez les femmes ayant présenté une pathologie en rapport avec une insuffisance placentaire. Les résultats pour le myomètre sont également significatifs pour les valeurs de VI et VFI. Les valeurs prédictives négatives ainsi que les sensibilités et spécificités de cette technique dépassent largement celles du Doppler des artères utérines.

L'effectif de l'échantillon est peu important et comme il s'agit d'un groupe de patientes à bas risque, l'incidence des événements pathologiques est faible (3% de taux

d'HTAg / PE, taux comparable à celui retrouvé en population générale). Malgré tout, la valeur prédictive de l'examen apparaît ici très élevée.

La diminution la plus significative a été observée pour la valeur du FI placentaire avec une AUC de 0.94. Les résultats sont en accord avec la plupart des publications précédentes et ce, quelle que soit la technique (biopsie ou placenta entier) utilisée (Rizzo, Capponi et al. 2008; Dar, Gebb et al. 2010; Hafner, Metzenbauer et al. 2010; Odeh, Ophir et al. 2011; Odibo, Goetzinger et al. 2011). Ces résultats sont également retrouvés au deuxième trimestre (Guiot, Gaglioti et al. 2008; Noguchi, Hata et al. 2009; Costa, Rice et al. 2010; Pomorski, Zimmer et al. 2011). Dans notre étude, pour un FI seuil de 35.538, la sensibilité était de 83%, la spécificité de 92%, la VPP 50% mais une VPN de 98% et pour un seuil de 36.784, la sensibilité était de 100%, la spécificité de 85%, la VPP 40% mais une VPN de 100%.

Les études au premier trimestre sont encore peu nombreuses et si les résultats traduisent tous une baisse plus ou moins significative des 3 indices Doppler 3D en cas de survenue d'une PVP, le choix du paramètre le plus adapté reste difficile.

Très peu d'études ont porté sur la vascularisation du myomètre de façon indépendante du placenta en-dehors de celle de Hafner et al. en 2010 (Hafner, Metzenbauer et al. 2010). Dans son travail sur 383 patientes issues de la population générale, le VI placentaire et le VI myométrial étaient plus bas chez celles qui ont présenté par la suite une PE et/ou une HTA gravidique (n=10). Entre ces 2 paramètres, le VI myométrial était celui qui avait la plus grande aire sous courbe ROC mais les A.U.C. ne sont pas disponibles dans l'article publié.

En conclusion, dans notre étude, en population à bas risque, le meilleur indice était le FI placentaire avec une A.U.C. de 0,943. Selon le seuil choisi (35,538 ou 36,784), la sensibilité variait de 83 à 100% et la spécificité de 85 à 92% soit un RV (rapport de vraisemblance) + de 6,67 à 10,37 et un RV – de 0 à 0,18. La quantification de la vascularisation placentaire par la méthode que nous proposons ici montre sa supériorité par rapport à la méthode classiquement utilisé du Doppler des artères utérines pour prédire la survenue d'une pathologie vasculaire placentaire. La technique est au moins aussi performante que les méthodes plus complexes combinant les facteurs de risques maternels, au Doppler des artères utérines et aux dosages de différents marqueurs biochimiques, qui pour la plupart ne sont pas dosés en pratique courante. Elle a l'avantage d'être simple, réalisable rapidement, dans le même temps que l'échographie de dépistage recommandée au premier trimestre. Pour autant, les dosages de la PAPP-A et de l'HCG faisant partie du dépistage proposé des aneuploïdies, il sera intéressant de reprendre nos données en incluant ces dosages pour espérer améliorer encore les valeurs prédictives positives.

Discussion

5 Discussion générale

5.1 Aspects techniques fondamentaux : corrélation aux flux, impact des paramètres

Le plateau technique de l'INRA de Jouy-en-Josas m'a permis de mettre au point un modèle expérimental de brebis gestante assurant la possibilité de contrôler et de moduler le débit utéro-placentaire en temps réel. Ce modèle a pu être utilisé à la fois pour évaluer le degré de corrélation entre indices Doppler 3D et débit utéro-placentaire réel *in vivo* en conditions expérimentales (Morel, Pachy et al. 2010) et pour évaluer l'impact de plusieurs paramètres de réglage de la machine au moment des acquisitions, sur la valeur calculée des indices à débit constant.

Les résultats, publiés (corrélation aux flux) ou en cours de publication (impact des paramètres), confirment l'intérêt majeur de l'utilisation des modèles animaux pour progresser dans la compréhension d'aspects techniques fondamentaux de nouvelles techniques d'imagerie telles que l'angiographie Doppler 3D. En effet, bien que nécessaires, les évaluations *in vitro* tels que décrites par l'équipe de Raine-Fenning ne peuvent constituer qu'une première étape. Les conditions expérimentales lors de l'utilisation de fantômes échographiques sont très contrôlées, mais présentent le désavantage d'être relativement éloignées de la réalité physiologique intégrée *in vivo* par de nombreux aspects.

In vitro, il n'est en effet pas possible d'effectuer une perfusion de sang en conditions physiologiques. Pour l'étude du Doppler 3D, l'équipe de Nottingham avait fait le choix d'utiliser une perfusion de particules de nylon réfléchissantes. Les caractéristiques acoustiques et rhéologiques de ce type de perfusion restent éloignées de celle du sang :

hématocrites extrêmes (variant de 0.01 à 8%), absence de phénomènes rhéologiques. Par ailleurs, les tubes utilisés pour la perfusion dans le fantôme mimaient un système vasculaire extrêmement simplifié, lorsque l'on considère la complexité de la vascularisation utéro-placentaire telle que décrite en introduction. Enfin, l'absence totale d'artefact de mouvement représente une limite majeure de l'évaluation du Doppler sur ce type de systèmes expérimentaux (Raine-Fenning, Nordin et al. 2008; Morel, Pachy et al. 2010).

L'évaluation *in vivo* de l'évolution des indices en fonction du débit de perfusion utéro-placentaire a permis d'acquérir de nouvelles données non observées *in vitro*. L'impact majeur des artefacts de mouvements, maternels ou fœtaux, a été confirmé : il n'a en effet été possible de ne conserver qu'une petite partie des acquisitions pour l'analyse finale. Par ailleurs, il est apparu, certainement en rapport avec des conditions physiologiques de circulation plus complexes *in vivo* qu'*in vitro*, que plus le débit augmentait, plus les écart-types des indices mesurés augmentaient également. Cette « perte de précision » n'avait absolument pas été mise en évidence *in vitro*. Enfin, il a été démontré *in vivo* que la relation FI-débit réel était beaucoup plus complexe qu'initialement observée *in vitro* : tel qu'abordé en introduction, le FI est un paramètre en théorie sensible aux paramètres rhéologiques, ce qui constitue une limite de l'utilisation de fluides de perfusion avec particules de nylon.

Il est par ailleurs intéressant de constater qu'une partie des différences observées quant à l'évaluation de l'impact des flux sur les indices Doppler *in vivo* par rapport à un système de fantôme est retrouvée lors de l'utilisation d'un système de perfusion d'un cotylédon placentaire *ex vivo*. Pour ce protocole expérimental, un cotylédon de placenta humain était perfusé par le même fluide que celui utilisé pour les fantômes. L'intérêt ici était d'exploiter le système vasculaire cotylédonnaire. Avec ce système *ex vivo*, la corrélation indices-flux est

également plus complexe, avec des écart-types plus importants pour les débits plus élevés (Jones, Hutchinson et al. 2009).

L'utilisation d'un modèle expérimental animal pour l'évaluation de l'impact des paramètres de réglages sur les valeurs mesurées des indices 3D à débit constant présente un intérêt tout aussi essentiel par rapport aux évaluations *in vitro*. Tel que discuté lors de la présentation de nos résultats sur modèle de brebis gestante, la gamme de réglages qui est utilisée pour l'évaluation *in vitro* de l'impact sur l'ensemble des résultats est très éloignée de ce qui est réellement faisable en termes d'acquisition *in vivo*. En effet, l'existence des mouvements de la mère et du fœtus fait que pour les réglages avec la sensibilité Doppler la plus basse, aucun signal ne peut être extrait du « bruit de fond » échographique. Pour les réglages avec la sensibilité Doppler la plus élevée (en énergie ou en vitesse de flux) les acquisitions sont systématiquement artéfactées et il est alors impossible de faire la part entre signal Doppler correspondant à un flux vasculaire et signal Doppler correspondant à un artefact de mouvement.

En dépit de ces observations, les profils généraux d'évolution des indices en fonction des paramètres (diminution, stabilité ou augmentation) sont comparables *in vitro* et *in vivo* pour les différents réglages. Cependant, sur la gamme de réglages testés *in vivo*, l'évolution des indices mesurés à débit constant est régulièrement différente des résultats observés *in vitro* (Raine-Fenning, Nordin et al. 2008). Les surprises les plus importantes ont été essentiellement l'impact rarement significatif en conditions physiologiques des modifications de la PRF (qui influe directement sur la vitesse des flux observés) et du gain Doppler (qui influe directement sur l'intensité du signal Doppler). *In vivo*, les différences n'étaient significatives la plupart du temps que pour des réglages « extrêmes », non utilisés en pratique.

L'impact réel des réglages sur les indices mesurés à débit constant est finalement plus faible que celui attendu en théorie ou décrit *in vitro* (Raine-Fenning, Nordin et al. 2008; Raine-Fenning, Welsh et al. 2008). Ces résultats pourraient permettre dans l'avenir de définir une gamme de réglages limités utilisables en pratique clinique ou expérimentale par différentes équipes dans des situations prédéfinies et pour lesquelles une absence d'impact significatif de modification des réglages dans cette gamme pourrait être démontrée. Les résultats de Doppler 3D pourraient ainsi être plus aisément comparés d'une équipe à l'autre (Martins 2010; Welsh 2011).

5.2 Apport du Doppler dans la compréhension des modèles (RCIU)

L'intérêt majeur des modèles expérimentaux animaux pour l'étude des pathologies de la gestation telles que le RCIU et leurs conséquences à plus long terme a été développé dans le chapitre méthodologie (Barker 1990; Barker 1992; Barker 1997; Schroder 2003; Barker 2006; Morel, Tran et al. 2008). De nombreux modèles expérimentaux sont couramment utilisés pour tenter de reproduire des RCIU et d'en évaluer les conséquences immédiates ou à long terme.

Cependant, l'hétérogénéité des approches et des espèces utilisées, ainsi que l'absence fréquente de reproductibilité du RCIU d'un protocole à l'autre posent un problème majeur d'interprétation des résultats et de leur utilisation future en pratique clinique (Neitzke, Harder et al. 2008; Neitzke, Harder et al. 2011).

Tout comme en pratique clinique humaine, une des limitations majeures des travaux publiés portant sur des modèles expérimentaux de RCIU est constituée par l'absence de données fonctionnelles *in vivo* concernant le placenta (Ergaz, Avgil et al. 2005; McCarthy, Kingdom et al. 2011; Neitzke, Harder et al. 2011). Ainsi, et tel que modélisé par Schröder (

voir notre chapitre méthodologie (Schroder 2003)), les informations concernant les altérations fonctionnelles placentaires en cours de gestation sont aujourd'hui manquantes.

Le travail réalisé sur la lapine gestante dans le cadre de cette thèse a permis de démontrer la faisabilité de l'évaluation fonctionnelle placentaire par angiographie Doppler 3D sur un modèle de RCIU. Cette méthode est également applicable chez la brebis (Morel, Pachy et al. 2010) et a été utilisée en 2010 lorsque nous avons tenté d'obtenir un RCIU par ligatures vasculaires chez la brebis gestante. Ce protocole a été interrompu prématurément en raison de l'absence d'obtention de RCIU malgré la réalisation de ligatures vasculaires multiples (artères utérines et anastomoses). Il n'a pas été jugé possible de publier ces résultats alors même que les validations techniques sur la brebis n'étaient pas achevées mais il est prévu de le faire dans le futur proche. En tout état de cause, les mesures des indices Doppler 3D réalisées chez ces brebis avant et après ligatures ont permis de mettre en évidence une absence de chute significative de la perfusion utéro-placentaire. Ces données Doppler ont été confirmées par la réalisation d'évaluations de la vascularisation utéro-placentaire des brebis par technique angiographique : il est apparu que suite à la réalisation des ligatures, de nombreux vaisseaux accessoires présentaient un calibre fortement augmenté, assurant alors le relais de la vascularisation et maintenant le débit utéro-placentaire. Ces données rejoignent des données publiées par mon équipe en clinique humaine suite à la réalisation de ligatures vasculaires utérines dans le contexte d'hémorragies du post-partum (Fargeaudou, Morel et al. 2010).

L'évaluation de la vascularisation utéro-placentaire en cours de gestation apparaît comme un axe majeur de progrès dans la compréhension de la modélisation animale de RCIU expérimentaux. L'angiographie Doppler 3D est utilisable facilement en pratique courante et pour un moindre coût. Cette technique présente cependant le désavantage de ne pas pouvoir

être utilisée chez des animaux de petite taille, notamment la rate ou la souris gestante, en raison à la fois des limites techniques en termes de résolution ultrasonographique et d'artefacts de mouvement. Pour ces espèces, les approches type IRM semblent devoir être privilégiées, malgré leur coût plus élevé et les difficultés de mise en œuvre (Salomon, Siauve et al. 2005; Salomon, Siauve et al. 2006).

5.3 Doppler 3D : progrès acquis, quel impact pour la lecture des études cliniques ?

Les progrès acquis depuis 2005 dans la compréhension des aspects techniques fondamentaux de l'angiographie Doppler 3D permettent aujourd'hui de défendre cette approche en tant que nouvel outil pour l'évaluation fonctionnelle placentaire non invasive. En raison des importantes limites techniques inhérentes au concept de Doppler 3D, cette approche a été initialement très fortement critiquée (Guiot, Gaglioti et al. 2008; Raine-Fenning, Welsh et al. 2008; Welsh 2008; Jones, Raine-Fenning et al. 2011).

Les défauts majeurs mis en avant étaient la forte sensibilité de cette approche à différents paramètres physiologiques tels que la profondeur d'acquisition ou l'atténuation liée à des paramètres pariéto-acoustiques maternels, l'impact supposé majeur des paramètres de réglage sur les indices mesurés, l'absence de corrélation démontrée avec le débit réel, etc... L'angiographie Doppler 3D conserve aujourd'hui bien entendu ces différents défauts, qui ont par ailleurs été régulièrement discutés lors de la présentation de nos résultats. Cependant, les évaluations réalisées sur modèles de brebis gestantes ont permis de mieux appréhender le degré de corrélation avec les flux réels. Elles ont également permis de démontrer qu'en pratique réelle, c'est-à-dire dans une gamme de réglage utilisable en pratique et non sur la gamme complète de réglages disponibles, les différences de valeurs d'indices mesurés à débit constant n'étaient que rarement significatives.

L'impact de différents paramètres tels que la profondeur ou la situation du placenta a également été évalué *in vivo* lors de l'étude de cohorte dont les résultats ont été présentés. Il apparaît que pour des patientes à bas risque avec des issues de grossesse normales, ces différents paramètres n'amènent pas à observer de différences significatives des valeurs des indices d'une patiente à l'autre.

Enfin, une des critiques initiale majeure était le supposé manque de reproductibilité de la technique. Evaluée par le calcul de coefficients de corrélation intraclasse, il est apparu chez la femme et chez l'animal que la reproductibilité d'analyse était en fait très élevée dès lors qu'une technique d'analyse globale était utilisée (Morel, Pachy et al. 2010; Morel, Grange et al. 2011; Morel, Tsatsaris et al. 2011). En revanche, nos résultats ont confirmé l'existence d'une variabilité plus importante lorsque l'on compare deux acquisitions séquentielles chez une même patiente ou un même animal à débit constant. Ce phénomène est bien illustré par l'importance des écart-types observés dans les résultats des deux protocoles réalisés chez la brebis. Il est certainement dû à la durée de la séquence d'acquisition, dont l'impact a été confirmé lors de l'étude chez la brebis portant sur les paramètres de réglages (voir Qual 3D). Le temps de balayage différent nécessaire à l'obtention du volume d'intérêt fait que les données Doppler acquises sur une coupe échographique incluse dans le volume peuvent varier d'un balayage à l'autre.

Malgré ces limites en termes de reproductibilité, l'étude réalisée chez le lapin et l'étude de cohorte humaine ont permis de démontrer que l'angiographie Doppler 3D était une technique suffisamment sensible pour détecter les défauts de perfusion utéro-placentaire avec des valeurs prédictives élevées de survenue de RCIU ou de pathologie vasculaire placentaire.

5.4 Courrier publié dans la revue *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* : « Réponse à A. Welsh concernant les aspects techniques du Doppler 3D ».

5.5 Courrier publié dans la revue *The American Journal of Obstetrics and Gynecology* :
« Intérêt de l'analyse d'un plus grand volume placentaire »

6 Perspectives

L'ensemble des travaux à venir seront poursuivis dans le cadre plus large de la fondation PremuP.

6.1 Chez l'animal

6.1.1 Application de la technique chez des modèles de RCIU de brebis

Rapidement décrit dans la discussion, un modèle de RCIU vasculaire chez la brebis gravide a fait l'objet d'une tentative de mise au point à l'INRA. L'utilisation de la technique Doppler 3D pour l'étude de la vascularisation utéro-placentaire a permis de mettre en évidence une absence de défaut de perfusion après ligature, confirmée par technique de radiologie angiographique avec injection de produit de contraste. Dès que les résultats de validations techniques auront été publiés dans leur ensemble, une communication courte portant sur l'apport de l'angiographie Doppler 3D pour la compréhension d'éventuels échecs d'obtentions de RCIU sur modèles expérimentaux sera soumise. L'approche vasculaire directe pour le développement d'un modèle de RCIU chez la brebis semble donc limitée.

Dans le contexte des problématiques étudiées par mon équipe d'accueil INRA, notamment l'évaluation des conséquences à long termes de perturbations du développement *in utero* chez les petits ruminants, des approches nutritionnelles sont par contre actuellement poursuivies (Laporte-Broux, Roussel et al. 2011) (dépôt d'un projet ANR en octobre 2011). Comme développé dans le paragraphe méthodologie, la brebis, qui est un animal de taille humaine, présente un intérêt majeur pour l'étude du développement fœtal et sur les interventions possibles au niveau fœto-placentaire durant la gestation, mais aussi pour des

travaux de néonatalogie, avec des agneaux ou chevreaux de taille et poids comparables à un nouveau-né humain.

Le mouton est par ailleurs un animal d'importance économique majeure : il y a actuellement plus de 1.000 millions de moutons dans le monde, ce qui représente une production annuelle de viande de 14 millions de tonnes (contre 65 millions de tonnes de viande de bœuf).

Enfin, les nouvelles biotechnologies de transgénèse permettant le développement de modèles transgéniques par recombinaison homologe, de nouvelles approches paraissent possibles qui ne pourraient pas être développées chez les rongeurs du fait de leur petite taille. Afin de préparer ces études en cours et à venir chez la brebis, j'ai effectué durant ma thèse, avec l'aide de M. Frédéric Pachy et Mlle Lucie Guilbaud, un travail longitudinal de modélisation de la croissance fœtale échographique chez la brebis dans le but de disposer de courbes de croissance normale sur plusieurs paramètres : diamètre bipariétal, périmètre abdominal, longueur fémorale, Doppler ombilical. Des acquisitions systématiques de placentomes en Doppler 3D ont également été réalisées. Ces données de gestations dites « témoins » seront prochainement soumises pour publication et pourront servir dans l'avenir de courbes de référence.

Il est aujourd'hui tout à fait envisageable d'utiliser à titre systématique la quantification de la vascularisation utéro-placentaire par Doppler 3D comme outil de modélisation chez la brebis gravide, quel que soit l'approche expérimentale mise en œuvre pour l'obtention de RCIU.

Enfin, le Doppler 3D est aujourd'hui également utilisé chez le fœtus pour l'évaluation fonctionnelle d'organes tels que le cerveau ou les reins (Pooh and Pooh 2002). La taille des

foetus de brebis le permettant, le Doppler 3D pourrait également être évalué dans de telles indications.

6.1.2 Perspectives sur modèle de RCIU chez le lapin

Un modèle de RCIU par injection de L-NAME a été développé dans le cadre du Master II de M. E. Lecarpentier. Le défaut de vascularisation utéro-placentaire a été confirmé. Les données d'échographies 3D sont soumises pour publication.

Un travail complémentaire a été effectué par M. Lecarpentier au décours de son année de Master II. Le réseau vasculaire placentaire a en effet fait également l'objet d'une quantification histologique par histomorphométrie (Carter, Gothlin et al. 1971; Mayr, Lederer et al. 2005). Les résultats ont permis de confirmer le défaut de vascularisation observé par échographie. Ces données sont en cours de publication.

La lapine fait également l'objet aujourd'hui d'une mise au point d'un deuxième modèle de RCIU, cette fois par ligatures vasculaires utérines. Les ligatures ont été réalisées au contact direct de la corne de façon à limiter le risque de reperfusions anastomotiques, phénomène observé chez la brebis. Ce modèle fera l'objet d'une évaluation à la fois par Doppler 3D et histomorphométrie.

Dès lors que ces différentes approches auront été caractérisées sur le plan placentaire par Doppler 3D et histomorphométrie, ces modèles de RCIU pourront permettre de réaliser des travaux sur le devenir immédiat et à long terme de la descendance.

6.1.3 Apport du Doppler 3D dans l'évaluation de la fonction placentaire sur modèle de perturbation endocrinienne chez la brebis gestante (collaboration université du Michigan)

Une collaboration avec le Dr Padmanabhan de l'université du Michigan a été mise en place en 2011, sur le modèle décrit dans le résumé ci-dessous, présenté au congrès annuel de la Society for the Study of Reproduction en 2011.

FETAL PROGRAMMING: TESTOSTERONE TREATMENT DURING PREGNANCY ADVANCES PLACENTOME DIFFERENTIATION.

Astapova O^{1,3}, Steckler TL^{1,3}, Jackson LM^{2,3}, MohanKumar PS⁴, Ford SP⁵, Foster DL^{2,3}, Padmanabhan V^{1,2,3}.

Departments of ¹Pediatrics, ²Obstetrics & Gynecology and ³the Reproductive Sciences Program, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan; ⁴College of Veterinary Medicine, Michigan State University, East Lansing, MI; ⁵Department of Animal Science, University of Wyoming, Laramie, WY.

During pregnancy in sheep, placentomes facilitate nutrient exchange between mother and fetus. As pregnancy advances, progressive morphological differentiation of Type A placentomes into Types B, C and D increases the proportion of fetal surface area and the efficiency of nutrient exchange. In intrauterine growth retardation models, this differentiation occurs earlier to compensate for maternal undernutrition. Recently, we determined that prenatal testosterone (T) treatment produces growth retardation in sheep (Endocrinology 145:790, 2004). In the present study, we tested the hypothesis that prenatal T exposure accelerates placentome differentiation. Fetal number and weight, as well as placentome number, weight (g) and type were determined in control (C) and T-treated (100 mg, im, twice weekly, Days 30 to 90 of gestation) sheep on Days 65 and 90 of gestation (Day 65: n=10 C, n=10 T; Day 90: n=10 C, n=12 T). T-treated females had on average 14% fewer placentomes than controls at both times (P=0.059). There was a gestational day by treatment interaction on placentome weight (P<0.01), which was evident in T-treated females as a decrease on Day 65 and an increase on Day 90. There were fewer Type A placentomes in T-treated sheep at both times (P<0.05). There were no treatment differences in Type B or D placentomes. The decrease in Type A was compensated by an increase (P<0.0001) in number and weight of Type C placentomes at both Day 65 and 90. The advanced differentiation to Type C increased placentome efficiency (fetal weight/placentome weight) on Day 65 of gestation (C: 0.23±0.03 vs. T: 0.35±0.02; P<0.01). Despite the reduced number, placentome efficiency of T-treated sheep was similar to controls on Day 90 of gestation (C: 1.41±0.08 vs. T: 1.23±0.07). Upon visual inspection, placentomes of T-treated sheep appeared to be more vascular suggesting that the increased efficiency of T-treated sheep may be a function of increased blood flow. In undernutrition models as placentomes advance from Type A through D, their vascularity increases (SF Ford, personal observation). Our findings suggest that prenatal T advances placentome differentiation and that this may serve as a compensatory mechanism to increase nutrient delivery between mother and fetus to reduce growth-retardation. Supported by NIH HD- 41098.

Résumé présenté lors du 37th *Annual Meeting of the SSR (Society for the Study of Reproduction)*.

Une série d'acquisitions de volumes placentaires a été réalisée sur une cohorte de brebis exposées à la testotérone (voir résumé) par le Dr Lecarpentier, dans le cadre d'un financement obtenu pour mes travaux de thèses. Les volumes acquis sont en cours d'analyse à l'aide du programme VOCALTM et les placentomes vont prochainement faire l'objet d'une étude histomorphométrique (encadrement d'une étudiante en Thèse, Mlle Jie Duan, O. Morel et P. Chavatte-Palmer).

6.1.4 Application du PDA pour l'étude du placenta de clone chez la vache

L'équipe de l'INRA de Jouy-en-Josas est une des équipes pionnières dans le domaine du clonage chez la vache (Heyman, Vignon et al. 1998; Heyman, Cornthwaite et al. 1999; Renard, Legouy et al. 1999; Chavatte-Palmer, Heyman et al. 2000; Heyman, Zhou et al. 2002; Heyman, Tamassia et al. 2003). Les gestations de clones sont marquées par une pathologie associant excès de croissance fœtale, risque élevé de mort fœtale in utero, hydramnios et placenta de très grande taille.

Dans le cadre d'un programme de clonage réalisé en 2011, l'angiographie Doppler 3D a été utilisée pour réaliser une exploration fonctionnelle longitudinale des placentas de clones. Les résultats sont présentés dans le résumé ci-après de M. le Dr Le Cléac'h, qui a été sélectionné pour une présentation orale dans le cadre de la compétition étudiante de la conférence annuelle de l'association Européenne de Transfert d'Embryons et qui sera présenté sous forme de poster à l'International Embryo Transfer Society en janvier 2012.

Ultrasound evaluation of fetal and placental development in SCNT and AI bovine pregnancies
Nicolas Le Cleac'h*^{1,2}, Christophe Richard³, Hélène Kiefer^{1,2}, Edouard Lecarpentier^{1,4}, Valérie Hall e³,
Olivier Morel^{1,4}, Daniel Le Bourhis⁵, Hélène Jammes^{1,2}, Pascale Chavatte-Palmer^{1,4}, INRA, UMR1198
Biologie du Développement et Reproduction, F-78352 Jouy-en-Josas, France¹, ENVA, Biologie du
Développement et Reproduction, F-94704 Maisons-Alfort, France,² INRA, Unité Commune
d'Exp rimentation Animale, F-91630 LEUDEVILLE, France³, PremUp Foundation, F-75004 Paris, France⁴,
UNCEIA, F-94704 Maisons-Alfort, France⁵

Since the first success in sheep, the production of viable cloned offspring by somatic cell nuclear transfer (SCNT) is still doomed by a high incidence of pregnancy failure and fetal death. In cattle, most gestation losses are initially due to early fetal losses during the pre-implantation period and thereafter to abnormal placentation associated with an overgrowth of the fetus known as the Abnormal Offspring Syndrome (AOS). As a consequence, the IETS recommendations include regular ultrasound (US) evaluation of the SCNT pregnancies, with qualitative US evaluation of the placentomes, fetal movements and fluids being proposed. The objective of this study was to evaluate the use of new, quantitative parameters, for the assessment of fetoplacental development in AI and SCNT bovine pregnancies.

22 heifers of 4 different breeds were used as SCNT recipients and 11 Holstein heifers were used as AI controls (C). All SCNT fetuses were produced as previously published in the laboratory, using the same fibroblast donor. Animals were scanned every 2 weeks from D150, using a Voluson-i (GE Medical Systems) with a transabdominal multifrequency probe (2.2-6.5 MHz), allowing automatic 3D volume and Doppler acquisition. Each time, 7 placentomes were scored from 0 to 3 according to echogenicity, general appearance and degree of edema and their 2D surface was measured. Fetal intercoastal width (ICW) was measured in a coronal view just behind the heart. Doppler velocimetry indices, pulsatility index (PI) and resistance index (RI) of one of the two fetal umbilical arteries were obtained and the diameters of the umbilical vessels were measured (UD). 3D power Doppler was performed to obtain Vascular Index (VI), Flow Index (FI) and Vascular Flow Index (VFI).

So far, 27 heifers have either delivered (N=10 SCNT and 7C) or pregnancies have been terminated due to AOS (N=10 SCNT). 1500 and 197 placentomes have been analyzed for 2D and 3D analyses, respectively. The mean placentome score is significantly higher (less normal) in SCNT compared to C ($p < 0.0001$) but does not vary according to gestational age. The placentome surface is also significantly larger in SCNT vs C ($p < 0.0001$) but also in SCNT that did not go to term vs those that were alive at birth ($p < 0.002$). Fetal ICW and UD are consistently larger in SCNT vs C ($p < 0.0001$) at all stages of pregnancy and there is a significant correlation ($r^2 = 0.81$) between ICW at 15 days before term and birthweight. PI and RI were not different between SCNT and C. Intra-operator reproducibility of 3D analyses was very high (intra-class correlation coefficient: 80-95% for a 95% confidence interval). There was no significant difference for VI, FI nor VFI between SCNT and C.

On-going work taking into account pregnancy outcomes indicate that placentome scores can be useful indicators of pregnancy outcome in SCNT pregnancies. In contrast, the abnormal vascularization observed by histology in SCNT placentomes does not appear to be accompanied by abnormal placental blood flow, when analyzed using quantitative 3D Doppler.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project received financial support from ANR (ref PCS-09-GENM-022).

6.2 En clinique

6.2.1 Etude prospective de cohorte : résultats attendus chez une cohorte de patientes à haut risque

Les résultats obtenus chez les patientes à bas risque en termes de valeur prédictive de survenue de pathologie vasculaire placentaire (PVP) sont exceptionnels pour une étude réalisée en population générale. L'étude des patientes à haut risque de survenue de PVP telles que définies dans le matériels et méthode de ce travail est en cours. L'ensemble des issues de grossesses a été récupéré et les volumes analysés. Ces résultats seront disponibles au printemps 2012.

Si la valeur prédictive du Doppler 3D est confirmée sur l'ensemble des patientes étudiées, ce test devra ensuite être évalué « en intention de traiter », ce qui signifie que son intérêt devra être évalué en termes de nombres de cas de PVP prévenus par l'administration d'un traitement préventif chez les patientes identifiées comme étant à haut risque.

Dans un premier temps les traitements ayant fait la preuve de leur efficacité pourront être évalués (aspirine et calcium), mais la capacité de sélectionner des patientes à véritable haut risque doit nous amener à évaluer d'autres pistes de prévention. Comme cela a pu être évoqué en introduction, l'impossibilité jusqu'à aujourd'hui d'identifier des patientes à véritable haut risque constituait un écueil majeur pour l'évaluation de l'efficacité des différents traitements préventifs testés.

6.2.2 Etude Doppler 3D et morphométrie placentaire (Début des inclusions à Nancy : mai 2012)

L'objectif est d'évaluer le degré de corrélation entre les indices de vascularisation Doppler énergie 3D utero-placentaire et la mesure quantitative de la vascularisation utérine et placentaire par technique morphométrique sur placenta humain. Les techniques histomorphométriques utilisées dans le cadre du Master II de M. Lecarpentier chez le lapin (résultats non rapportés dans cette thèse) seront utilisées sur des placentas humains, toujours en collaboration avec mon équipe d'accueil de thèse à l'INRA (Dr Anne Tarrade).

Deux groupes de patientes seront analysés. Un premier groupe (groupe contrôle) de patientes donnant naissance par césarienne à un enfant eutrophe en-dehors de tout contexte de prééclampsie. Un deuxième groupe de patientes (groupe pathologie placentaire) césarisées pour suspicion d'hypoxie fœtale ou arrêt de croissance dans un contexte de pré éclampsie et/ou de RCIU. L'acquisition Doppler 3D de la vascularisation utéro placentaire s'effectuera dans les 24-48 heures qui précèdent la naissance. L'information des patientes quant au but et au déroulement de l'étude, ainsi que l'obtention de leur consentement signé seront assurés avant l'échographie. Après la césarienne, le placenta sera acheminé à l'état frais au laboratoire de pathologie où il sera conditionné puis prélevé. L'analyse morphométrique de la vascularisation placentaire sera effectuée secondairement par technique de stéréologie. Le degré de corrélation entre quantification Doppler et morphométrique sera évalué.

Le but est d'établir le degré de corrélation entre les indices écho-angiographiques et les quantifications histologiques de morphométrie vasculaire en situation physiologique et dans les situations de restriction chronique de perfusion que sont le RCIU et la prééclampsie.

Une bourse de thèse de l'état chinois a été obtenue pour ce travail et une étudiante, Mlle Jie Duan, est actuellement accueillie à Nancy pour une période de trois ans sous mon encadrement pour la réalisation de ce travail.

6.2.3 Etude physiologique de la perfusion de la chambre intervilleuse au 1^{er} trimestre avec apport de produits de contraste échographiques (Début des inclusions à Nancy : septembre 2012)

L'objectif de cette étude est d'évaluer qualitativement et quantitativement la perfusion de la chambre intervilleuse au premier trimestre de la grossesse humaine (de 7 SA à 14 SA) par échographie Doppler énergie tridimensionnelle sensibilisée par un produit de contraste.

Il est aujourd'hui admis que l'implantation de l'embryon et les premiers stades du développement trophoblastique au sein de l'endomètre se font en situation d'hypoxie et que la chambre intervilleuse est dépourvue de sang maternel jusqu'à au moins 10 SA. Il semble que seules des sécrétions endométriales et un ultra filtrat plasmatique baignent les villosités choriales avant ce terme (Jauniaux, Burton et al. 1991; Jaffe, Jauniaux et al. 1997). La partie terminale des artères spiralées semble en effet être obturée au moins en partie par l'invasion endovasculaire du trophoblaste extravillieux qui forme des bouchons trophoblastiques ou plugs endovasculaires. Jusqu'à ce jour, aucune exploration échographique n'a permis d'étudier de manière descriptive la cinétique d'apparition du sang maternel dans la chambre intervilleuse. Les résultats expérimentaux montrent que le signal Doppler énergie quantifié en 3D est hautement corrélé au degré de perfusion de l'organe étudié. Cependant, ce signal Doppler énergie est le reflet de mouvements de particules réfléchissantes et n'est pas spécifique d'un flux sanguin. Il est donc possible qu'un signal ne correspondant pas à un déplacement de globules rouges soit mesuré dans la chambre intervilleuse par cette technique.

Le produit de contraste SonoVue® est constitué de microbulles d'hexafluorure de soufre agissant comme réflecteurs du faisceau d'ultrason dont le diamètre d'environ 6 micromètres est comparable à celui d'un globule rouge. Par conséquent, ce produit de contraste, qui améliore l'échogénicité du sang et permet une amélioration du rapport signal/bruit ultrasonore, ne pourra être observé au niveau de la chambre intervillieuse que si celle-ci est effectivement perfusée par le sang maternel. Son utilité et son innocuité ont été démontrées dans l'étude de la micro-vascularisation de carcinome hépato cellulaire, mais il ne dispose pas d'AMM chez la femme enceinte. Il n'est donc pas envisageable de l'utiliser à ce jour au décours de grossesse désirée évolutive, et nous proposons de mener cette étude chez des patientes ayant exprimé à deux reprises un désir d'interruption volontaire de grossesse.

La participation à l'étude sera proposée au décours de la deuxième consultation de demande d'IVG, et le consentement éclairé des patientes sera recueilli. Seule les patientes candidates à une IVG chirurgicale entre 7 et 14 SA dans le cadre de la loi pourront être incluse.

L'acquisition Doppler 3D contrasté sera réalisée sous anesthésie générale au bloc opératoire. Cette méthodologie permettra d'éviter tout risque d'administration de produit de contraste avec poursuite ultérieure d'une grossesse évolutive, le SonoVue® n'ayant pas d'AMM chez les femmes enceintes, situation qui serait envisageable en cas de demande d'IVG médicamenteuse. Ceci permettra également de limiter au maximum l'aspect interventionnel de ce protocole : aucune voie veineuse spécifique ne sera nécessaire et l'acquisition échographique sera réalisée sous anesthésie générale, ne pouvant alors être à l'origine d'un inconfort pour la patiente.

Ce travail qui est en cours de relecture sur le plan éthique fera l'objet de l'encadrement d'une étudiante en Master II (Mme le Dr Perdriolle-Gallet) et entrera également dans le cadre des travaux de thèse de Mlle Jie Duan.

7 Conclusion

Ces années de thèse m'ont offert un accès à de nombreux aspects de la recherche dans le domaine de l'étude de la vascularisation utéro-placentaire normale et pathologique. Des progrès ont été obtenus sur le plan fondamental (nouvelle technique d'imagerie fonctionnelle que constitue le Doppler 3D), sur le plan de la modélisation expérimentale animale, et sur le plan clinique. J'ai bénéficié d'un environnement très privilégié sur le plan matériel et exceptionnel sur le plan humain, tant à l'APHP qu'à l'INRA et dans le cadre de PremuP.

Mes directeurs, Pascale Chavatte-Palmer et Vassilis Tsatsaris, ont su me faire bénéficier de leurs enseignements et de leur encadrement tout en m'offrant en permanence une grande liberté dans le développement et l'organisation de mes recherches, ainsi que dans l'encadrement de nos étudiants communs. Je tiens également à remercier tout particulièrement Mme le Docteur Danièle Evain-Brion pour son soutien permanent et son rôle primordial dans l'obtention des financements nécessaires à la réalisation de ces travaux et au bon déroulement de ma thèse.

Ces années de thèse ont été marquées par de grands changements sur les plans professionnels et personnels, pour lesquels Pascale et Vassilis ont été également des grands soutiens, pour les moments de joies ou de peines. Je ne saurais jamais assez les en remercier.

Ces travaux de recherche, inscrits dans mon cursus universitaire, m'ont permis de prendre depuis septembre 2010 la responsabilité du service d'obstétrique de la Maternité Régionale Universitaire de Nancy. Je garderai le regret de n'avoir pu pleinement profiter des années de poste d'accueil INSERM obtenues avec le soutien de Mme Evain-Brion. Mon statut

universitaire, cependant, me permet aujourd'hui de poursuivre les travaux initiés à la fois à Nancy et en collaboration avec l'INRA et la fondation PremuP. J'ai rejoints en septembre 2011 l'unité INSERM U947 du Professeur Jacques Felblinger à Nancy, dont la thématique est l'imagerie adaptative diagnostique et interventionnelle (IADI). Les travaux cliniques qui seront prochainement initiés s'appuieront sur le centre d'investigation clinique de cette unité. L'expertise des chercheurs de l'IADI sur la thématique de l'imagerie des organes en mouvement sera par ailleurs exploitée dans le but de progresser dans le domaine de l'imagerie utéro-placentaire par IRM.

8 Références

- (1990). "National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy." Am J Obstet Gynecol **163**(5 Pt 1): 1691-1712.
- Abi-Said, D., J. F. Annegers, et al. (1997). "A case-control evaluation of treatment efficacy: the example of magnesium sulfate prophylaxis against eclampsia in patients with preeclampsia." J Clin Epidemiol **50**(4): 419-423.
- Akolekar, R., E. Zaragoza, et al. (2008). "Maternal serum placental growth factor at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation in the prediction of pre-eclampsia." Ultrasound Obstet Gynecol **32**(6): 732-739.
- Alexander, S. (2002). "On the prevention of preeclampsia: nutritional factors back in the spotlight?" Epidemiology **13**(4): 382-383.
- Anastasakis, E., K. I. Paraskevas, et al. (2008). "Association between abnormal uterine artery Doppler flow velocimetry, risk of preeclampsia, and indices of arterial structure and function: a pilot study." Angiology **59**(4): 493-499.
- Anastasiadis, P., P. Tsikouras, et al. (2007). "Hypertensive disorders in pregnancy: risk factors and epidemiologic analysis." Clin Exp Obstet Gynecol **34**(3): 154-158.
- Aplin, J. D., T. Haigh, et al. (2000). "Tissue interactions in the control of trophoblast invasion." J Reprod Fertil Suppl **55**: 57-64.
- Arroyo, J. A. and V. D. Winn (2008). "Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta." Semin Perinatol **32**(3): 172-177.
- Askie, L. M., L. Duley, et al. (2007). "Antiplatelet agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data." Lancet **369**(9575): 1791-1798.
- Astrup, A. (2010). "Calcium reduces risk of pre-eclampsia." Lancet **376**(9757): 1986; author reply 1986-1987.
- Audibert, F., I. Boucoiran, et al. (2010). "Screening for preeclampsia using first-trimester serum markers and uterine artery Doppler in nulliparous women." Am J Obstet Gynecol **203**(4): 383 e381-388.

- Bahtiyar, M. O., C. Buhimschi, et al. (2007). "Contrasting effects of chronic hypoxia and nitric oxide synthase inhibition on circulating angiogenic factors in a rat model of growth restriction." Am J Obstet Gynecol **196**(1): 72 e71-76.
- Barker, D. J. (1990). "The fetal and infant origins of adult disease." BMJ **301**(6761): 1111.
- Barker, D. J. (1992). "Fetal growth and adult disease." Br J Obstet Gynaecol **99**(4): 275-276.
- Barker, D. J. (1997). "The long-term outcome of retarded fetal growth." Clin Obstet Gynecol **40**(4): 853-863.
- Barker, D. J. (2006). "Adult consequences of fetal growth restriction." Clin Obstet Gynecol **49**(2): 270-283.
- Barone (2001). "Anatomie comparée des mammifères domestiques." **Tome 4: Splanchnologie II.**
- Bauer, R., B. Walter, et al. (2003). "Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **110 Suppl 1**: S40-49.
- Beaudoin, S., P. Barbet, et al. (2003). "Developmental stages in the rabbit embryo: guidelines to choose an appropriate experimental model." Fetal Diagn Ther **18**(6): 422-427.
- Beaufils, M., S. Uzan, et al. (1986). "Prospective controlled study of early antiplatelet therapy in prevention of preeclampsia." Adv Nephrol Necker Hosp **15**: 87-94.
- Benirschke K, K. P. (2000). "Pathology of the human placenta." New York: Springer-Verlag.
- Bernard, N. and Y. Giguere (2003). "Genetics of preeclampsia: what are the challenges?" J Obstet Gynaecol Can **25**(7): 578-585.
- Best, L. G., S. T. Dorsam, et al. (2009). "Genetic thrombophilia variants and risk for preeclampsia among American Indians." Hypertens Pregnancy **28**(1): 85-94.
- Blackburn (2003). "Prenatal period and placental physiology." Blackburn ST, editor. Maternal, fetal, neonatal physiology. A clinical perspective. St-Louis: WB Saunders.
- Blaschitz, A., H. Hutter, et al. (2001). "HLA Class I protein expression in the human placenta." Early Pregnancy **5**(1): 67-69.
- Bodnar, L. M., R. B. Ness, et al. (2005). "The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index." Ann Epidemiol **15**(7): 475-482.
- Bozkurt, N., A. Basgul Yigiter, et al. (2010). "Correlations of fetal-maternal outcomes and first trimester 3-D placental volume/3-D power Doppler calculations." Clin Exp Obstet Gynecol **37**(1): 26-28.

- Briley, A. L., L. Poston, et al. (2006). "Vitamins C and E and the prevention of preeclampsia." N Engl J Med **355**(10): 1065-1066; author reply 1066.
- Brosens, I., W. B. Robertson, et al. (1967). "The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy." J Pathol Bacteriol **93**(2): 569-579.
- Brosens, I. A., W. B. Robertson, et al. (1970). "The role of the spiral arteries in the pathogenesis of pre-eclampsia." J Pathol **101**(4): Pvi.
- Bruce, N. W. and R. W. Abdul-Karim (1973). "Relationships between fetal weight, placental weight and maternal placental circulation in the rabbit at different stages of gestation." J Reprod Fertil **32**(1): 15-24.
- Burton, G. J. and E. Jauniaux (2001). "Maternal vascularisation of the human placenta: does the embryo develop in a hypoxic environment?" Gynecol Obstet Fertil **29**(7-8): 503-508.
- Burton, G. J., E. Jauniaux, et al. (1999). "Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited." Am J Obstet Gynecol **181**(3): 718-724.
- Caniggia, I., H. Mostachfi, et al. (2000). "Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3)." J Clin Invest **105**(5): 577-587.
- Caniggia, I., J. Winter, et al. (2000). "Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia." Placenta **21 Suppl A**: S25-30.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-395.
- Carmeliet, P. and D. Collen (1999). "Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development." Curr Top Microbiol Immunol **237**: 133-158.
- Carr, D. B., M. Epplein, et al. (2005). "A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **193**(3 Pt 2): 965-972.
- Carter, A. M. (2008). "What fossils can tell us about the evolution of viviparity and placentation." Placenta **29**(11): 930-931.

- Carter, A. M., J. Gothlin, et al. (1971). "An angiographic study of the structure and function of the uterine and maternal placental vasculature in the rabbit." J Reprod Fertil **25**(2): 201-210.
- Cedergren, M. I. (2004). "Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome." Obstet Gynecol **103**(2): 219-224.
- Cetin, A., N. Yurtcu, et al. (2004). "The effect of glyceryl trinitrate on hypertension in women with severe preeclampsia, HELLP syndrome, and eclampsia." Hypertens Pregnancy **23**(1): 37-46.
- Cetin, I. and P. Antonazzo (2009). "The role of the placenta in intrauterine growth restriction (IUGR)." Z Geburtshilfe Neonatol **213**(3): 84-88.
- Chaouat, G. (1999). "Regulation of T-cell activities at the feto-placental interface--by placenta?" Am J Reprod Immunol **42**(4): 199-204.
- Chaouat, G., A. Assal Meliani, et al. (1995). "IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau." J Immunol **154**(9): 4261-4268.
- Chaouat, G., S. Zourbas, et al. (2002). "A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy." J Reprod Immunol **53**(1-2): 241-256.
- Chavatte-Palmer, P., Y. Heyman, et al. (2000). "[Cloning and associated physiopathology of gestation]." Gynecol Obstet Fertil **28**(9): 633-642.
- Claris, O., J. Beltrand, et al. (2010). "Consequences of intrauterine growth and early neonatal catch-up growth." Semin Perinatol **34**(3): 207-210.
- Claris, O., S. Besnier, et al. (1996). "Incidence of ischemic-hemorrhagic cerebral lesions in premature infants of gestational age \leq 28 weeks: a prospective ultrasound study." Biol Neonate **70**(1): 29-34.
- Clark, D. E., S. K. Smith, et al. (1998). "Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation." J Endocrinol **159**(3): 459-467.
- Conde-Agudelo, A., F. Althabe, et al. (1999). "Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review." Am J Obstet Gynecol **181**(4): 1026-1035.

- Conde-Agudelo, A., J. Villar, et al. (2004). "World Health Organization systematic review of screening tests for preeclampsia." Obstet Gynecol **104**(6): 1367-1391.
- Costa, J., H. Rice, et al. (2010). "An assessment of vascularity and flow intensity of the placenta in normal pregnancy and pre-eclampsia using three-dimensional ultrasound." J Matern Fetal Neonatal Med **23**(8): 894-899.
- Craven, C. M., T. Morgan, et al. (1998). "Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts." Placenta **19**(4): 241-252.
- Dar, P., J. Gebb, et al. (2010). "First-trimester 3-dimensional power Doppler of the uteroplacental circulation space: a potential screening method for preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **203**(3): 238 e231-237.
- de Maat, M. P. and C. J. de Groot "Thrombophilia and pre-eclampsia." Semin Thromb Hemost **37**(2): 106-110.
- de Paula, C. F., R. Ruano, et al. (2009). "Quantitative analysis of placental vasculature by three-dimensional power Doppler ultrasonography in normal pregnancies from 12 to 40 weeks of gestation." Placenta **30**(2): 142-148.
- de Vries, J. I., W. J. Kist, et al. (2009). "Confounded thrombophilia studies in preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **201**(5): e11-12; author reply e12.
- Dekker, G., P. Y. Robillard, et al. (2011). "The etiology of preeclampsia: the role of the father." J Reprod Immunol **89**(2): 126-132.
- Duley, L., D. Henderson-Smart, et al. (2001). "Antiplatelet drugs for prevention of pre-eclampsia and its consequences: systematic review." BMJ **322**(7282): 329-333.
- Ergaz, Z., M. Avgil, et al. (2005). "Intrauterine growth restriction-etiology and consequences: what do we know about the human situation and experimental animal models?" Reprod Toxicol **20**(3): 301-322.
- Eskenazi, B., L. Fenster, et al. (1991). "A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia." JAMA **266**(2): 237-241.
- Espinoza, J., R. Romero, et al. (2007). "Identification of patients at risk for early onset and/or severe preeclampsia with the use of uterine artery Doppler velocimetry and placental growth factor." Am J Obstet Gynecol **196**(4): 326 e321-313.
- Esplin, M. S., M. B. Fausett, et al. (2001). "Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia." N Engl J Med **344**(12): 867-872.
- Evain-Brion, D., Ed. (2010). Le placenta Humain, Lavoisier.

- Evain-Brion, D. and A. Malassine (2010). "Le placenta humain." 91-107.
- Facchinetti, F., L. Marozio, et al. (2009). "Maternal thrombophilia and the risk of recurrence of preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **200**(1): 46 e41-45.
- Fargeaudou, Y., O. Morel, et al. (2010). "Persistent postpartum haemorrhage after failed arterial ligation: value of pelvic embolisation." Eur Radiol **20**(7): 1777-1785.
- Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocr Rev **18**(1): 4-25.
- Figueras, F. and J. Gardosi "Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management." Am J Obstet Gynecol **204**(4): 288-300.
- Foidart, J. M., C. Munaut, et al. (2010). "Maternal plasma soluble endoglin at 11-13 weeks' gestation in pre-eclampsia." Ultrasound Obstet Gynecol **35**(6): 680-687.
- Fournier, T., K. Handschuh, et al. (2008). "Role of nuclear receptors and their ligands in human trophoblast invasion." J Reprod Immunol **77**(2): 161-170.
- Garcia-Pascual, A., G. Costa, et al. (1996). "Characterization of nitric oxide synthase activity in sheep urinary tract: functional implications." Br J Pharmacol **118**(4): 905-914.
- Genbacev, O., Y. Zhou, et al. (1997). "Regulation of human placental development by oxygen tension." Science **277**(5332): 1669-1672.
- Goffinet, F., D. Aboulker, et al. (2001). "Screening with a uterine Doppler in low risk pregnant women followed by low dose aspirin in women with abnormal results: a multicenter randomised controlled trial." BJOG **108**(5): 510-518.
- Graham, C. H. and K. R. McCrae (1996). "Altered expression of gelatinase and surface-associated plasminogen activator activity by trophoblast cells isolated from placentas of preeclamptic patients." Am J Obstet Gynecol **175**(3 Pt 1): 555-562.
- Greenwold, N., E. Jauniaux, et al. (2003). "Relationship among maternal serum endocrinology, placental karyotype, and intervillous circulation in early pregnancy failure." Fertil Steril **79**(6): 1373-1379.
- Guiot, C., P. Gaglioti, et al. (2008). "Is three-dimensional power Doppler ultrasound useful in the assessment of placental perfusion in normal and growth-restricted pregnancies?" Ultrasound Obstet Gynecol **31**(2): 171-176.
- Haelterman, E., S. Marcoux, et al. (2007). "Population-based study on occupational risk factors for preeclampsia and gestational hypertension." Scand J Work Environ Health **33**(4): 304-317.

- Hafner, E., M. Metzenbauer, et al. (2001). "Correlation of first trimester placental volume and second trimester uterine artery Doppler flow." *Placenta* **22**(8-9): 729-734.
- Hafner, E., M. Metzenbauer, et al. (2010). "First trimester placental and myometrial blood perfusion measured by 3D power Doppler in normal and unfavourable outcome pregnancies." *Placenta* **31**(9): 756-763.
- Hansen, J. P. (1986). "Older maternal age and pregnancy outcome: a review of the literature." *Obstet Gynecol Surv* **41**(11): 726-742.
- Heazell, A. E., H. A. Lacey, et al. (2008). "Effects of oxygen on cell turnover and expression of regulators of apoptosis in human placental trophoblast." *Placenta* **29**(2): 175-186.
- Heckel, G. P. and C. E. Tobin (1956). "Arteriovenous shunts in the myometrium." *Am J Obstet Gynecol* **71**(1): 199-205.
- Hempstock, J., E. Jauniaux, et al. (2003). "The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure." *Hum Pathol* **34**(12): 1265-1275.
- Hernandez-Diaz, S., M. M. Werler, et al. (2002). "Risk of gestational hypertension in relation to folic acid supplementation during pregnancy." *Am J Epidemiol* **156**(9): 806-812.
- Heyl, W., B. Heintz, et al. (2005). "Increased soluble VCAM-1 serum levels in preeclampsia are not correlated to urinary excretion or circadian blood pressure rhythm." *J Perinat Med* **33**(2): 144-148.
- Heyman, J. A., J. Cornthwaite, et al. (1999). "Genome-scale cloning and expression of individual open reading frames using topoisomerase I-mediated ligation." *Genome Res* **9**(4): 383-392.
- Heyman, Y., M. Tamassia, et al. (2003). "Preliminary results on variability in oocyte recovery and developmental competence in cattle derived from embryonic cloning: work in progress." *Theriogenology* **60**(5): 891-900.
- Heyman, Y., X. Vignon, et al. (1998). "Cloning in cattle: from embryo splitting to somatic nuclear transfer." *Reprod Nutr Dev* **38**(6): 595-603.
- Heyman, Y., Q. Zhou, et al. (2002). "Novel approaches and hurdles to somatic cloning in cattle." *Cloning Stem Cells* **4**(1): 47-55.
- Hubel, C. A. (1999). "Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia." *Proc Soc Exp Biol Med* **222**(3): 222-235.
- Huppertz, B., M. Kadyrov, et al. (2006). "Apoptosis and its role in the trophoblast." *Am J Obstet Gynecol* **195**(1): 29-39.

- Hustin, J. and J. P. Schaaps (1987). "Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy." Am J Obstet Gynecol **157**(1): 162-168.
- Innes, K. E., J. A. Marshall, et al. (1999). "A woman's own birth weight and gestational age predict her later risk of developing preeclampsia, a precursor of chronic disease." Epidemiology **10**(2): 153-160.
- Irwin, D. E., D. A. Savitz, et al. (1994). "The risk of pregnancy-induced hypertension: black and white differences in a military population." Am J Public Health **84**(9): 1508-1510.
- Jaffe, R., E. Jauniaux, et al. (1997). "Maternal circulation in the first-trimester human placenta--myth or reality?" Am J Obstet Gynecol **176**(3): 695-705.
- Jain, S., P. Sharma, et al. (2010). "The role of calcium, magnesium, and zinc in pre-eclampsia." Biol Trace Elem Res **133**(2): 162-170.
- Jauniaux, E., G. J. Burton, et al. (1991). "Development of the early human placenta: a morphometric study." Placenta **12**(3): 269-276.
- Jauniaux, E., A. Watson, et al. (2001). "Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks' gestation." Am J Obstet Gynecol **184**(5): 998-1003.
- Jauniaux, E., A. L. Watson, et al. (2000). "Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure." Am J Pathol **157**(6): 2111-2122.
- Jones, N. W., E. S. Hutchinson, et al. (2009). "In vitro dual perfusion of human placental lobules as a flow phantom to investigate the relationship between fetoplacental flow and quantitative 3D power doppler angiography." Placenta **30**(2): 130-135.
- Jones, N. W., N. J. Raine-Fenning, et al. (2011). "Evaluating the intra- and interobserver reliability of three-dimensional ultrasound and power Doppler angiography (3D-PDA) for assessment of placental volume and vascularity in the second trimester of pregnancy." Ultrasound Med Biol **37**(3): 376-385.
- Kahn, S. R., R. Platt, et al. (2009). "Inherited thrombophilia and preeclampsia within a multicenter cohort: the Montreal Preeclampsia Study." Am J Obstet Gynecol **200**(2): 151 e151-159; discussion e151-155.
- Kam, E. P., L. Gardner, et al. (1999). "The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries." Hum Reprod **14**(8): 2131-2138.

- Kaufmann, P., S. Black, et al. (2003). "Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia." Biol Reprod **69**(1): 1-7.
- Kaufmann P, C. M. (1997). "Extravillous trophoblast in the human placenta (In: Foidart JM, Aplin JD, Kaufmann P, Schaaps JP, editors)." Trophoblast research. University of Rochester vol **10**.
- Kim, S. Y., H. M. Ryu, et al. (2004). "Maternal serum levels of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in preeclampsia." J Korean Med Sci **19**(5): 688-692.
- Klinger, J. R. (2007). "The nitric oxide/cGMP signaling pathway in pulmonary hypertension." Clin Chest Med **28**(1): 143-167, ix.
- Knuist, M., G. J. Bonsel, et al. (1998). "Risk factors for preeclampsia in nulliparous women in distinct ethnic groups: a prospective cohort study." Obstet Gynecol **92**(2): 174-178.
- Kuc, S., E. J. Wortelboer, et al. (2011). "Evaluation of 7 serum biomarkers and uterine artery Doppler ultrasound for first-trimester prediction of preeclampsia: a systematic review." Obstet Gynecol Surv **66**(4): 225-239.
- Lain, K. Y. and J. M. Roberts (2002). "Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia." JAMA **287**(24): 3183-3186.
- Landsbergis, P. A. and M. C. Hatch (1996). "Psychosocial work stress and pregnancy-induced hypertension." Epidemiology **7**(4): 346-351.
- Laporte-Broux, B., S. Roussel, et al. (2011). "Short-term effects of maternal feed restriction during pregnancy on goat kid morphology, metabolism, and behavior." J Anim Sci **89**(7): 2154-2163.
- Laurent, A., M. Wassef, et al. (2009). "Recanalization and particle exclusion after embolization of uterine arteries in sheep: a long-term study." Fertil Steril **91**(3): 884-892.
- Le Bouteiller, P. (2000). "HLA-G in the human placenta: expression and potential functions." Biochem Soc Trans **28**(2): 208-212.
- Lees, C., H. Valensise, et al. (1998). "The efficacy and fetal-maternal cardiovascular effects of transdermal glyceryl trinitrate in the prophylaxis of pre-eclampsia and its complications: a randomized double-blind placebo-controlled trial." Ultrasound Obstet Gynecol **12**(5): 334-338.

- Leiser, R. and P. Kaufmann (1994). "Placental structure: in a comparative aspect." Exp Clin Endocrinol **102**(3): 122-134.
- Levine, R. J., C. Lam, et al. (2006). "Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia." N Engl J Med **355**(10): 992-1005.
- Levine, R. J., S. E. Maynard, et al. (2004). "Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia." N Engl J Med **350**(7): 672-683.
- Lie, R. T., S. Rasmussen, et al. (1998). "Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study." BMJ **316**(7141): 1343-1347.
- Lim, K. H., Y. Zhou, et al. (1997). "Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia." Am J Pathol **151**(6): 1809-1818.
- Lin, C. C. and J. Santolaya-Forgas (1998). "Current concepts of fetal growth restriction: part I. Causes, classification, and pathophysiology." Obstet Gynecol **92**(6): 1044-1055.
- Lindqvist, P. G. and K. Marsal (1999). "Moderate smoking during pregnancy is associated with a reduced risk of preeclampsia." Acta Obstet Gynecol Scand **78**(8): 693-697.
- Long, J. A., K. Trinajstic, et al. (2008). "Live birth in the Devonian period." Nature **453**(7195): 650-652.
- Losonczy, G., I. Mucha, et al. (1996). "The vasoconstrictor effects of L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, in pregnant rabbits." Br J Pharmacol **118**(4): 1012-1018.
- Lovgren, T. R., L. Dugoff, et al. (2010). "Uterine artery Doppler and prediction of preeclampsia." Clin Obstet Gynecol **53**(4): 888-898.
- MacKay, A. P., C. J. Berg, et al. (2001). "Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia." Obstet Gynecol **97**(4): 533-538.
- Mamelle, N., M. Boniol, et al. (2006). "Identification of newborns with Fetal Growth Restriction (FGR) in weight and/or length based on constitutional growth potential." Eur J Pediatr **165**(10): 717-725.
- Mamelle, N., V. Cochet, et al. (2001). "Definition of fetal growth restriction according to constitutional growth potential." Biol Neonate **80**(4): 277-285.
- Marcoux, S., J. Brisson, et al. (1989). "The effect of cigarette smoking on the risk of preeclampsia and gestational hypertension." Am J Epidemiol **130**(5): 950-957.
- Marcoux, S., J. Brisson, et al. (1989). "The effect of leisure time physical activity on the risk of pre-eclampsia and gestational hypertension." J Epidemiol Community Health **43**(2): 147-152.

- Martins, W. P. (2010). "Three-dimensional power Doppler: validity and reliability." Ultrasound Obstet Gynecol **36**(5): 530-533.
- Martins, W. P., N. J. Raine-Fenning, et al. (2010). "Quantitative three-dimensional power Doppler angiography: a flow-free phantom experiment to evaluate the relationship between color gain, depth and signal artifact." Ultrasound Obstet Gynecol **35**(3): 361-368.
- Maynard, S. E., J. Y. Min, et al. (2003). "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia." J Clin Invest **111**(5): 649-658.
- Mayr, A. J., W. Lederer, et al. (2005). "Morphologic changes of the uteroplacental unit in preeclampsia-like syndrome in rats." Hypertens Pregnancy **24**(1): 29-37.
- McArdle, A. M., K. M. Denton, et al. (2009). "Ontogeny of placental structural development and expression of the renin-angiotensin system and 11beta-HSD2 genes in the rabbit." Placenta **30**(7): 590-598.
- McCarthy, F. P., J. C. Kingdom, et al. (2011). "Animal models of preeclampsia; uses and limitations." Placenta **32**(6): 413-419.
- McDonald, A. D., B. G. Armstrong, et al. (1992). "Cigarette, alcohol, and coffee consumption and prematurity." Am J Public Health **82**(1): 87-90.
- Meekins, J. W., R. Pijnenborg, et al. (1994). "A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies." Br J Obstet Gynaecol **101**(8): 669-674.
- Meher, S. and L. Duley (2006). "Garlic for preventing pre-eclampsia and its complications." Cochrane Database Syst Rev **3**: CD006065.
- Meher, S. and L. Duley (2006). "Rest during pregnancy for preventing pre-eclampsia and its complications in women with normal blood pressure." Cochrane Database Syst Rev(2): CD005939.
- Meher, S. and L. Duley (2007). "Nitric oxide for preventing pre-eclampsia and its complications." Cochrane Database Syst Rev(2): CD006490.
- Mello, G., E. Parretti, et al. (2005). "Low-molecular-weight heparin lowers the recurrence rate of preeclampsia and restores the physiological vascular changes in angiotensin-converting enzyme DD women." Hypertension **45**(1): 86-91.

- Merce, L. T., M. J. Barco, et al. (2004). "Reproducibility of the study of placental vascularization by three-dimensional power Doppler." J Perinat Med **32**(3): 228-233.
- Middeldorp, S. (2004). "Low-molecular-weight heparin to prevent pre-eclampsia: there is no evidence and potential harm." Neth J Med **62**(3): 69-70.
- Miller, J., S. Turan, et al. (2008). "Fetal growth restriction." Semin Perinatol **32**(4): 274-280.
- Molnar, M., T. Suto, et al. (1994). "Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation." Am J Obstet Gynecol **170**(5 Pt 1): 1458-1466.
- Moore, L. G., D. W. Hershey, et al. (1982). "The incidence of pregnancy-induced hypertension is increased among Colorado residents at high altitude." Am J Obstet Gynecol **144**(4): 423-429.
- Morel, O., G. Grange, et al. (2010). "Vascularization of the placenta and the sub-placental myometrium: feasibility and reproducibility of a three-dimensional power Doppler ultrasound quantification technique. A pilot study." J Matern Fetal Neonatal Med **24**(2): 284-290.
- Morel, O., G. Grange, et al. (2011). "Vascularization of the placenta and the sub-placental myometrium: feasibility and reproducibility of a three-dimensional power Doppler ultrasound quantification technique. A pilot study." J Matern Fetal Neonatal Med **24**(2): 284-290.
- Morel, O., F. Pachy, et al. (2010). "Correlation between uteroplacental three-dimensional power Doppler indices and true uterine blood flow: evaluation in a pregnant sheep model." Ultrasound Obstet Gynecol **36**(5): 635-640.
- Morel, O., N. Tran, et al. (2008). "Radiofrequency driven cord occlusion for selective termination of pregnancy: evaluation in the fetal sheep." Am J Obstet Gynecol **198**(2): 227 e221-225.
- Morel, O., V. Tsatsaris, et al. (2011). "First-trimester 3-dimensional power Doppler for the screening of preeclampsia: the analysis of a greater proportion of the uteroplacental unit might improve the accuracy of the method." Am J Obstet Gynecol **204**(2): e4-5; author reply e5-6.
- Morgan, T. and K. Ward (1999). "New insights into the genetics of preeclampsia." Semin Perinatol **23**(1): 14-23.

- Mowbray, J., R. Jalali, et al. (1997). "Maternal response to paternal trophoblast antigens." Am J Reprod Immunol **37**(6): 421-426.
- Multhaupt, H. A., A. Mazar, et al. (1994). "Expression of urokinase receptors by human trophoblast. A histochemical and ultrastructural analysis." Lab Invest **71**(3): 392-400.
- Neitzke, U., T. Harder, et al. (2011). "Intrauterine growth restriction and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal." Microcirculation **18**(4): 304-311.
- Neitzke, U., T. Harder, et al. (2008). "Intrauterine growth restriction in a rodent model and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal of the experimental evidence." Placenta **29**(3): 246-254.
- Ness, R. B. and B. M. Sibai (2006). "Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **195**(1): 40-49.
- Noguchi, J., K. Hata, et al. (2009). "Placental vascular sonobiopsy using three-dimensional power Doppler ultrasound in normal and growth restricted fetuses." Placenta **30**(5): 391-397.
- North, R. A., C. Ferrier, et al. (1994). "Uterine artery Doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation." Obstet Gynecol **83**(3): 378-386.
- Odeh, M., E. Ophir, et al. (2011). "Placental volume and three-dimensional power Doppler analysis in prediction of pre-eclampsia and small for gestational age between Week 11 and 13 weeks and 6 days of gestation." Prenat Diagn **31**(4): 367-371.
- Odibo, A. O., K. R. Goetzinger, et al. (2011). "Placental volume and vascular flow assessed by 3D power Doppler and adverse pregnancy outcomes." Placenta **32**(3): 230-234.
- Olsen, S. F. and N. J. Secher (2002). "Low consumption of seafood in early pregnancy as a risk factor for preterm delivery: prospective cohort study." BMJ **324**(7335): 447.
- Osol, G., C. Barron, et al. (2009). "Inhibition of nitric oxide synthases abrogates pregnancy-induced uterine vascular expansive remodeling." J Vasc Res **46**(5): 478-486.
- Oudejans, C. B., M. van Dijk, et al. (2007). "Genetics of preeclampsia: paradigm shifts." Hum Genet **120**(5): 607-612.
- Pang, Z. J. and F. Q. Xing (2003). "Expression profile of trophoblast invasion-associated genes in the pre-eclamptic placenta." Br J Biomed Sci **60**(2): 97-101.

- Pelage, J. P., A. Laurent, et al. (2001). "Arterial blood supply to the uterus in nonpregnant sheep: a pertinent model for clinical practice?" Invest Radiol **36**(12): 721-725.
- Pelage, J. P., A. Laurent, et al. (2002). "Uterine artery embolization in sheep: comparison of acute effects with polyvinyl alcohol particles and calibrated microspheres." Radiology **224**(2): 436-445.
- Perry, I. J. and D. G. Beevers (1994). "The definition of pre-eclampsia." Br J Obstet Gynaecol **101**(7): 587-591.
- Phupong, V. and T. Dejthevaporn (2008). "Predicting risks of preeclampsia and small for gestational age infant by uterine artery Doppler." Hypertens Pregnancy **27**(4): 387-395.
- Phupong, V., T. Dejthevaporn, et al. (2003). "Predicting the risk of preeclampsia and small for gestational age infants by uterine artery Doppler in low-risk women." Arch Gynecol Obstet **268**(3): 158-161.
- Pidoux, G., P. Gerbaud, et al. (2011). "Review: Human trophoblast fusion and differentiation: Lessons from trisomy 21 placenta." Placenta.
- Pijnenborg, R., J. M. Bland, et al. (1983). "Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy." Placenta **4**(4): 397-413.
- Pijnenborg, R., G. Dixon, et al. (1980). "Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy." Placenta **1**(1): 3-19.
- Pijnenborg, R., L. Vercruysse, et al. (1998). "Interaction of interstitial trophoblast with placental bed capillaries and venules of normotensive and pre-eclamptic pregnancies." Placenta **19**(8): 569-575.
- Pomorski, M., M. Zimmer, et al. (2011). "Comparative analysis of placental vasculature and placental volume in normal and IUGR pregnancies with the use of three-dimensional Power Doppler." Arch Gynecol Obstet.
- Pooh, R. K. and K. H. Pooh (2002). "The assessment of fetal brain morphology and circulation by transvaginal 3D sonography and power Doppler." J Perinat Med **30**(1): 48-56.
- Powers, R. W., J. M. Catov, et al. (2008). "Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia and risk of adverse pregnancy outcome." Reprod Sci **15**(4): 374-381.

- Raine-Fenning, N. J., N. M. Nordin, et al. (2008). "Determining the relationship between three-dimensional power Doppler data and true blood flow characteristics: an in-vitro flow phantom experiment." Ultrasound Obstet Gynecol **32**(4): 540-550.
- Raine-Fenning, N. J., N. M. Nordin, et al. (2008). "Evaluation of the effect of machine settings on quantitative three-dimensional power Doppler angiography: an in-vitro flow phantom experiment." Ultrasound Obstet Gynecol **32**(4): 551-559.
- Raine-Fenning, N. J., A. W. Welsh, et al. (2008). "Methodological considerations for the correct application of quantitative three-dimensional power Doppler angiography." Ultrasound Obstet Gynecol **32**(1): 115-117; author reply 117-118.
- Redman, C. W. (1991). "Current topic: pre-eclampsia and the placenta." Placenta **12**(4): 301-308.
- Redman, C. W. and M. Jefferies (1988). "Revised definition of pre-eclampsia." Lancet **1**(8589): 809-812.
- Redman, C. W. and I. L. Sargent (2000). "Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia." Placenta **21**(7): 597-602.
- Renard, J. P., E. Legouy, et al. (1999). "[Cloning: present and perspectives]." Contracept Fertil Sex **27**(6): 405-411.
- Rizzo, G., A. Capponi, et al. (2008). "First trimester uterine Doppler and three-dimensional ultrasound placental volume calculation in predicting pre-eclampsia." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **138**(2): 147-151.
- Robillard, P. Y., G. A. Dekker, et al. (1999). "Revisiting the epidemiological standard of preeclampsia: primigravidity or primipaternity?" Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **84**(1): 37-41.
- Ros, H. S., S. Cnattingius, et al. (1998). "Comparison of risk factors for preeclampsia and gestational hypertension in a population-based cohort study." Am J Epidemiol **147**(11): 1062-1070.
- Rosenberg, T. J., S. Garbers, et al. (2005). "Maternal obesity and diabetes as risk factors for adverse pregnancy outcomes: differences among 4 racial/ethnic groups." Am J Public Health **95**(9): 1545-1551.
- Rumbold, A., L. Duley, et al. (2008). "Antioxidants for preventing pre-eclampsia." Cochrane Database Syst Rev(1): CD004227.

- Rumbold, A. R., C. A. Crowther, et al. (2006). "Vitamins C and E and the risks of preeclampsia and perinatal complications." N Engl J Med **354**(17): 1796-1806.
- Salomon, L. J., N. Siauve, et al. (2005). "[Placental functional assessment using MRI: mice today, humans tomorrow?]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **34**(7 Pt 1): 666-673.
- Salomon, L. J., N. Siauve, et al. (2006). "In vivo dynamic MRI measurement of the noradrenaline-induced reduction in placental blood flow in mice." Placenta **27**(9-10): 1007-1013.
- Sandoo, A., J. J. van Zanten, et al. (2010). "The endothelium and its role in regulating vascular tone." Open Cardiovasc Med J **4**: 302-312.
- Saudan, P., M. A. Brown, et al. (1998). "Does gestational hypertension become preeclampsia?" Br J Obstet Gynaecol **105**(11): 1177-1184.
- Schaaps, J. P., V. Tsatsaris, et al. (2005). "Shunting the intervillous space: new concepts in human uteroplacental vascularization." Am J Obstet Gynecol **192**(1): 323-332.
- Schieve, L. A., A. Handler, et al. (1994). "Urinary tract infection during pregnancy: its association with maternal morbidity and perinatal outcome." Am J Public Health **84**(3): 405-410.
- Schroder, H. J. (2003). "Models of fetal growth restriction." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **110 Suppl 1**: S29-39.
- Seed, P. T., L. C. Chappell, et al. (2011). "Prediction of preeclampsia and delivery of small for gestational age babies based on a combination of clinical risk factors in high-risk women." Hypertens Pregnancy **30**(1): 58-73.
- Seidman, D. S., A. Samueloff, et al. (1990). "The effect of maternal age and socioeconomical background on neonatal outcome." Int J Gynaecol Obstet **33**(1): 7-12.
- Sergio, F., D. Maria Clara, et al. (2006). "Prophylaxis of recurrent preeclampsia: low-molecular-weight heparin plus low-dose aspirin versus low-dose aspirin alone." Hypertens Pregnancy **25**(2): 115-127.
- Sibai, B., G. Dekker, et al. (2005). "Pre-eclampsia." Lancet **365**(9461): 785-799.
- Sibai, B. M. (2005). "Diagnosis, prevention, and management of eclampsia." Obstet Gynecol **105**(2): 402-410.
- Sibai, B. M. (2005). "Thrombophilia and severe preeclampsia: time to screen and treat in future pregnancies?" Hypertension **46**(6): 1252-1253.

- Sibai, B. M. (2011). "Calcium supplementation during pregnancy reduces risk of high blood pressure, pre-eclampsia and premature birth compared with placebo?" Evid Based Med **16**(2): 40-41.
- Sibai, B. M., L. Kustermann, et al. (1994). "Current understanding of severe preeclampsia, pregnancy-associated hemolytic uremic syndrome, thrombotic thrombocytopenic purpura, hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet syndrome, and postpartum acute renal failure: different clinical syndromes or just different names?" Curr Opin Nephrol Hypertens **3**(4): 436-445.
- Simon, A. R., C. Templin, et al. (2003). "No evidence for productive PERV infection of baboon cells in in vivo infection model." Ann Transplant **8**(3): 24-34.
- Stone, C. D., O. Diallo, et al. (2007). "The combined effect of maternal smoking and obesity on the risk of preeclampsia." J Perinat Med **35**(1): 28-31.
- Stone, J. L., C. J. Lockwood, et al. (1994). "Risk factors for severe preeclampsia." Obstet Gynecol **83**(3): 357-361.
- Thadhani, R., M. J. Stampfer, et al. (1999). "High body mass index and hypercholesterolemia: risk of hypertensive disorders of pregnancy." Obstet Gynecol **94**(4): 543-550.
- Thaete, L. G., D. M. Kushner, et al. (2005). "Endothelin and the regulation of uteroplacental perfusion in nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction." Placenta **26**(2-3): 242-250.
- Tilton, Z., M. I. Hodgson, et al. (1989). "Complications and outcome of pregnancy in obese women." Nutrition **5**(2): 95-99.
- Tsatsaris, V., T. Fournier, et al. (2008). "[Pathophysiology of preeclampsia]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **37**(1): 16-23.
- Tsatsaris, V., F. Goffin, et al. (2004). "Circulating angiogenic factors and preeclampsia." N Engl J Med **350**(19): 2003-2004; author reply 2003-2004.
- Tsatsaris, V., F. Goffin, et al. (2003). "Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences." J Clin Endocrinol Metab **88**(11): 5555-5563.
- Tsatsaris V., M. A., Fournier T., Handschuh K., Schaaps J.-P., Foidart J.-M., Evain-Brion D. (2006). "Placenta humain." EMC (Elsevier SAS, Paris), Gynécologie/Obstétrique **5-005-A-10**.

- Vedmedovska, N., D. Rezeberga, et al. (2011). "Microscopic lesions of placenta and Doppler velocimetry related to fetal growth restriction." Arch Gynecol Obstet **284**(5): 1087-1093.
- Vedmedovska, N., D. Rezeberga, et al. (2011). "Placental pathology in fetal growth restriction." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **155**(1): 36-40.
- Vignal, P. (2009). "Angiographie par couplage de l'écho 3D au Doppler puissance: 3D-power Doppler angiography (3D-PDA). Application clinique en gynécologie." Imagerie de la Femme **19**.
- Villar, J., G. Carroli, et al. (2006). "Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions?" Am J Obstet Gynecol **194**(4): 921-931.
- Vollebregt, K. C., M. F. van der Wal, et al. (2008). "Is psychosocial stress in first ongoing pregnancies associated with pre-eclampsia and gestational hypertension?" BJOG **115**(5): 607-615.
- Weinstein, L. (1982). "Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy." Am J Obstet Gynecol **142**(2): 159-167.
- Welsh, A. (2011). "Comprehension of power Doppler quantification and a missed opportunity for landmark research." Ultrasound Obstet Gynecol **37**(3): 373-374; author reply 374-375.
- Welsh, A. W. (2008). "A caution regarding standardization of power Doppler to measure perfusion in placental tissue." Ultrasound Obstet Gynecol **31**(1): 111-112; author reply 112-113.
- Yallampalli, C. and R. E. Garfield (1993). "Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **169**(5): 1316-1320.
- Yu, C. K., G. C. Smith, et al. (2005). "An integrated model for the prediction of preeclampsia using maternal factors and uterine artery Doppler velocimetry in unselected low-risk women." Am J Obstet Gynecol **193**(2): 429-436.
- Zalud, I. and S. Shaha (2007). "Evaluation of the utero-placental circulation by three-dimensional Doppler ultrasound in the second trimester of normal pregnancy." J Matern Fetal Neonatal Med **20**(4): 299-305.

- Zhang, J., J. Zeisler, et al. (1997). "Epidemiology of pregnancy-induced hypertension." Epidemiol Rev **19**(2): 218-232.
- Zhou, Y., V. Bellingard, et al. (2003). "Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C." Dev Biol **263**(1): 114-125.
- Zhou, Y., C. H. Damsky, et al. (1997). "Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?" J Clin Invest **99**(9): 2152-2164.
- Zygmunt, M., D. Hahn, et al. (1998). "Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro." Placenta **19**(8): 587-593.
- Zygmunt, M., F. Herr, et al. (2002). "Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor." J Clin Endocrinol Metab **87**(11): 5290-5296.

9 Récapitulatif des publications et communications

Publications :

Indexées

- **“Correlation between VOCAL indices and true uterine flow: response to A. Welsh.”** Morel O, Tsatsaris V, Chavatte-Palmer P. *Ultrasound Obstet Gynecol*
- **“First-trimester 3-dimensional power Doppler for the screening of preeclampsia: the analysis of a greater proportion of the uteroplacental unit might improve the accuracy of the method.”** Morel O, Tsatsaris V, Chavatte-Palmer P. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 19.
- **“Correlation between uteroplacental three-dimensional power Doppler indices and true uterine blood flow: evaluation in a pregnant sheep model.”** Morel O, Pachy F, Chavatte-Palmer P, Bonneau M, Gayat E, Laigre P, Evain-Brion D, Tsatsaris V. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010;36(5):635-40.
- **“Vascularization of the placenta and the sub-placental myometrium: feasibility and reproducibility of a three-dimensional power Doppler ultrasound quantification technique. A pilot study.”** Morel O, Grangé G, Fresson J, Schaaps JP, Foidart JM, Cabrol D, Tsatsaris V. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010 17.

Non indexées

- **“The use of ruminant models in biomedical research”.** Morel O, Heyman Y, Laporte B., Pailhoux E, Bonneau M, Chavatte-Palmer P. *European Ruminant Integrated Network*, 2010.

- « **Correlation between quantitative three dimensional Doppler parameters and real blood flow within the utero-placental unit: evaluation in a pregnant sheep experimental model** » Morel O, Pachy F, Laigre P, Bonneau M, Tsatsaris V. International Symposium on Ruminant Physiology. 2009
- « **Animal models for intra-uterine growth retardation of vascular origin** » Chavatte-Palmer P, Morel O, Pachy F, Tsatsaris V, Bonneau M. ACAD, Jan 2009.

Communications :

5 communications orales internationales – 4 posters en anglais – 5 communications orales en français – 5 présentations en temps que conférencier invité

2006 : ISUOG Londres / SFMP France

2008 : Journée de la Reproduction, INRA / IFPA 2008 Vienne

2009 : ISRP France / WCPM Berlin / ISUOG Hambourg / congrès annuel Nancy – Prix de la meilleure communication / JFROG Paris

2010 : FANI Days Nantes / Premup Paris / ERIN Cracovie / Journées de périnatalité GHU Nord Parisien / COST Gemini Soustons / IFPA Sydney

2011 : Journées Françaises de Recherche en Obstétrique et Gynécologie – Prix de la meilleure communication

10 Soutiens financiers, partenariats industriels

- Contrat d'Initiation à la Recherche Clinique 2008
- ANR (Premimage) 2008
- Société Française de Médecine Périnatale 2008
- Prix Salat-Baroux 2009
- PremUP
- Région Ile de France 2008
- Fondation de l'Avenir 2010
- Académie de Médecine 2010
- Etat chinois / *bourse de thèse 2011-2014*

Evaluation of the utero-placental vascularization with the 3-dimensional power Doppler angiography technique. *Technical validations in the pregnant sheep model & clinical evaluations in pregnant women*

Intra-uterine growth retardation (IUGR) and preeclampsia (PE) are major complications of human pregnancy & are most often due to an insufficient utero-placental vascularization. Our aim was to evaluate the three-dimensional power Doppler angiography (PDA) as a new tool for the screening IUGR & PE & for the study placental function and IUGR in animal models.

The correlation between 3D Doppler indices and the real blood flow within the utero-placental unit was first evaluated in the pregnant sheep model, as well as the impact of machine settings. A higher correlation degree was observed for VI and VFI ($r = 0.86$ and 0.82 respectively $p < 0.0001$) than for FI ($r = 0.64$; $p < 0.0001$).

The interest of the technique was secondly demonstrated in a rabbit IUGR model (females treated with L-NAME).

Thirdly, the predictive value of PDA as a screening test for IUGR & PE was demonstrated by conducting a prospective multicentric study in 70 low risk pregnant women (AUC 0.95, 100% NPV with a specificity of 85% for a 36.784 placental FI threshold).

Keywords: 3D power Doppler, preeclampsia, growth retardation, placenta, animal models

Etude de la vascularisation utéro-placentaire par angiographie Doppler énergie tridimensionnelle.

Evaluations fondamentales de la technique sur modèles expérimentaux de brebis et lapines gestantes, et évaluations cliniques préliminaires chez la femme enceinte.

Retard de croissance intra-utérin (RCIU) et prééclampsie (PE) sont des complications majeures de la grossesse humaine et sont le plus souvent due à une insuffisance de vascularisation utéro-placentaire. Notre objectif était d'évaluer l'angiographie Doppler énergie tridimensionnelle (PDA) comme nouvel outil de dépistage de la PE et du RCIU et d'étude de la fonction placentaire et du RCIU sur modèles animaux.

La corrélation entre les indices Doppler 3D et l'écoulement de sang réel au sein de l'unité utéro-placentaires a d'abord été évaluée sur modèle de brebis gravide, ainsi que l'impact des réglages de la machine. Un degré de corrélation plus élevé a été observé pour VI et VFI ($r = 0,86$ et $0,82$ respectivement, $p < 0,0001$) que pour FI ($r = 0,64$, $p < 0,0001$).

L'intérêt de la technique a été ensuite démontré dans un modèle de RCIU chez le lapin (femelles traitées par du L-NAME).

Troisièmement, la valeur prédictive du PDA comme test de dépistage du RCIU et de la PE a été démontrée par la réalisation d'une étude prospective multicentrique chez 70 femmes enceintes à bas risque (AUC 0,95, 100% VAN avec une spécificité de 85% pour un seuil de 36.784 FI placentaire).

Mots-clés : Doppler énergie 3D, prééclampsie, retard de croissance, placenta, modèles animaux

Travail réalisé à l'INRA de Jouy-en-Josas, Domaine Vilvert (BDR – Dr Chavatte-Palmer) et au sein de l'APHP (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris).