



HAL
open science

Rôle du facteur de transcription STOX1 dans la physiopathologie de la prééclampsie: apport d'un modèle cellulaire et d'un modèle murin de transgénèse additive

Ludivine Gouny Gouny-Doridot

► To cite this version:

Ludivine Gouny Gouny-Doridot. Rôle du facteur de transcription STOX1 dans la physiopathologie de la prééclampsie: apport d'un modèle cellulaire et d'un modèle murin de transgénèse additive. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT: 2013PA05T017. tel-01015874

HAL Id: tel-01015874

<https://theses.hal.science/tel-01015874v1>

Submitted on 27 Jun 2014

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.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Champ disciplinaire : Sciences du vivant et environnement

Discipline : Biologie, médecine et santé

Spécialité : Génétique

Ecole Doctorale de rattachement : Gc2iD

(Génétique, Cellules, Immunologie, Infectiologie, Développement)

Présentée et soutenue publiquement par

Ludivine GOUNY-DORIDOT

Le 27 juin 2013

**ROLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION STOX1 DANS
LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA PREECLAMPSIE :
APPORT D'UN MODELE CELLULAIRE ET D'UN MODELE
MURIN DE TRANSGENESE ADDITIVE**

Directeur de thèse : Daniel VAIMAN

JURY

Pr Marc DELPECH

Dr Michel COHEN-TANNOUDJI

Pr Lionel CARBILLON

Dr Nathalie LEDEE

Dr Olivier SANDRA

Pr Alexandre HERTIG

Dr Daniel VAIMAN

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinateur

Examinateur

Examinateur

*À mon mari bien aimé et à ma famille,
grâce au soutien desquels j'ai pu arriver jusque là...*

*« This is not the end.
It is not even the beginning of the end.
But it is, perhaps, the end of the beginning »
Winston Churchill*

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de venir m'écouter lors de la soutenance. Je remercie Marc Delpéch, pour avoir accepté de présider ce jury. Je remercie les deux rapporteurs, Michel Cohen-Tannoudji et Lionel Carbillon, d'avoir consacré du temps à la correction de mon manuscrit. Et je remercie également Nathalie Ledée, Olivier Sandra et Alexandre Hertig d'avoir accepté d'être examinateurs.

Je veux également adresser mes plus vifs remerciements à Daniel Vaiman, qui a encadré cette thèse en trouvant l'équilibre qu'il me fallait entre diriger et accompagner. Je le remercie de m'avoir fait partager sa vision des choses sur de nombreux sujets, tant scientifiques que sociétaux. Cela m'a beaucoup apporté. Son soutien a été d'une importance déterminante. Son enthousiasme scientifique fait de la recherche un jeu quotidien passionnant. J'espère que les occasions d'échanger perdureront au delà de cette thèse.

Je remercie également chaleureusement tous les membres du labo, qui ont rendu mon environnement de travail si agréable. Avec une pensée particulière, je remercie Sandrine, pour sa patience et ses conseils, Céline, pour ses longs discours qui changent les idées et nous en donnent de nouvelles, Ahmed, pour son écoute et son thé à la menthe, Jana, pour ses conseils protéinés et sa gentillesse. Evidemment, je remercie vivement Capucine dont la bonne humeur, les sourires et l'écoute savent embellir les journées les plus difficiles, et qui est devenue au cours de ces quatre années une personne à laquelle je tiens beaucoup.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai travaillé directement, anciennes ou nouvelles. Ainsi, je remercie Sonia et Virginie, qui sont passées avant moi et m'ont donnée des clés pour cette aventure. Je remercie également les stagiaires que j'ai encadrés et avec lesquels j'ai beaucoup appris : Dorothee, Milena, Mathilde et Aurélien.

Je remercie tous les membres de l'association JeCCo avec lesquels j'ai discuté et partagé d'autres types d'expériences.

Je remercie mes amies, thésardes, qui ont pu comprendre cette expérience et m'en sortir de temps en temps : Rosa, Emma, Marija, Charlène, Marion. Leur présence a également participé à me faire évoluer et a rendu cette formation plus enrichissante.

Je remercie également ma famille et ma belle-famille, dont de nombreux membres me font le plaisir d'assister à ma soutenance. Je remercie en particulier de tout cœur mes parents dont le soutien sans faille m'a permis d'arriver jusque là. Ce sont eux qui ont entretenu ma curiosité et m'ont donné la confiance nécessaire pour entreprendre ces longues études. Je remercie également mon parrain, qui m'a fait découvrir le monde du laboratoire et a planté en moi cette petite graine de chercheur qui n'a ensuite fait que grandir.

Enfin, je remercie Gabriel, mon mari, qui m'a soutenue quotidiennement au cours de ces années de thèse, et qui, lui aussi, m'a donné confiance et soutien. Il a notamment su me faire sortir de ma thèse afin de profiter également de ce que la vie a de meilleur à offrir.

Résumé

La prééclampsie est une maladie fréquente de la grossesse, caractérisée par l'apparition *de novo* d'une hypertension et d'une protéinurie à partir de la 20^{ème} semaine d'aménorrhée. Ces symptômes s'aggravent au long de la grossesse, conduisant éventuellement à la mort maternelle en l'absence de prise en charge médicalisée. La thérapeutique définitive l'extraction du placenta, et donc du fœtus, ce qui induit une importante prématurité iatrogène. Les causes restent mal définies, mais il est bien admis que des anomalies au niveau de la mise en place du placenta sont au cœur de sa physiopathologie. Un défaut d'invasion trophoblastique des artères spiralées utérines semble être une constante de la maladie.

Des données épidémiologiques démontrent qu'il existe une forte composante génétique dans la prééclampsie, et en 2005, un clonage positionnel dans des familles hollandaises, aboutit à l'identification de *STOX1* comme le premier gène lié à cette maladie. *STOX1* code un facteur de transcription intervenant dans le contrôle de la prolifération et de l'invasion des trophoblastes. Dans notre laboratoire, l'étude de *STOX1* a été initiée par surexpression dans des cellules de choriocarcinome humain (modèle de trophoblastes) suivie d'une analyse transcriptomique. Celle-ci a révélé que les altérations d'expression génique observées suite à la surexpression de *STOX1* étaient significativement corrélées à celles trouvées dans des placentas prééclamptiques. La création de souris transgéniques exprimant la version humaine de *STOX1* sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire a alors été entreprise.

Mes travaux de thèse ont principalement consisté à caractériser le phénotype de ces souris. Nous avons décidé de croiser des mâles transgéniques avec des souris sauvages afin de limiter l'expression du transgène à l'unité fœto-placentaire. Ces souris sauvages développent au cours de leur gestation une hypertension sévère, et une protéinurie. Elles constituent donc un nouveau modèle de prééclampsie. De plus, nous avons observé des anomalies que l'on trouve également chez les patientes : une fibrose rénale, une élévation des taux sériques de facteurs pro-angiogéniques (le récepteur soluble du VEGF et l'endogline soluble). Ces souris ont également des marqueurs d'hypertrophie cardiaque, attestant de l'impact sévère de l'hypertension.

Pour mieux comprendre comment *STOX1* peut induire ce syndrome, nous avons étudié son impact dans le modèle cellulaire surexprimant *STOX1* et nous avons pu montrer une altération de la gestion du stress oxydatif et de la fonction mitochondriale.

En conclusion, nous avons obtenu et caractérisé un modèle de prééclampsie sévère, le seul existant montrant un phénotype hypertensif très marqué et très précoce. Ce modèle est un outil puissant pour découvrir de nouvelles voies impliquées dans la physiopathologie de la prééclampsie, pour rechercher de potentiels marqueurs diagnostiques précoces, tester des approches thérapeutiques innovantes et explorer les mécanismes responsables des conséquences à long terme de la prééclampsie.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	5
LISTE DES ABBREVIATIONS	7
Introduction.....	9
<u>Chapitre Un</u> Le placenta	11
I. Généralités.....	13
II. Les différents types de placenta des mammifères euthériens	15
III. Le développement du placenta humain	17
1. De la fécondation au blastocyste.....	17
2. L'endomètre et l'accueil du blastocyste	19
3. L'implantation et la mise en place des villosités choriales	21
4. L'invasion profonde (de la 3 ^{ème} à la 12 ^{ème} semaine de grossesse).....	23
5. Le contrôle de l'invasion profonde	25
6. Le placenta de la 4 ^{ème} semaine au terme.....	29
IV. Le développement du placenta murin.....	30
1. De la fécondation au blastocyste : le développement préimplantatoire	30
2. L'endomètre et l'accueil du blastocyste	33
3. L'implantation et le développement du placenta.....	37
4. Les gènes du développement placentaire	40
V. Les fonctions placentaires	44
1. Assurer la croissance foetale	44
2. Rôle endocrine et sécrétoire.....	46
i. La sécrétion hormonale par le placenta humain	47
ii. La sécrétion hormonale par le placenta murin.....	48
iii. La sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines.....	48
iv. Autres types de sécrétions.....	49
3. Induire une tolérance immunologique	49
i. L'unité foeto-placentaire : une hémi-allogreffe	49
ii. La tolérance immunitaire de l'unité foeto-placentaire chez l'humain.....	50
iii. La tolérance immunitaire de l'unité foeto-placentaire chez la souris.....	51
iv. Les mécanismes d'adaptation du système immunitaire maternel.....	52
4. Protéger le fœtus	56
<u>Chapitre Deux</u> La prééclampsie	58
I. Données cliniques et épidémiologiques	60

1.	Définition et données cliniques	60
2.	Incidence et données épidémiologiques	62
3.	Facteurs de risques	64
i.	Les facteurs de risque liés à la mère	65
ii.	Les facteurs de risque liés au père.....	66
iii.	Les facteurs de risque liés au couple	66
iv.	Les facteurs de risque liés à la grossesse	68
v.	Les facteurs de risque liés au mode de vie	69
4.	Traitements.....	70
i.	Le seul moyen curatif : retirer l'unité fœto-placentaire	70
ii.	Les traitements des symptômes	71
iii.	Les traitements préventifs	72
5.	Vers un diagnostic précoce ?	74
II.	La génétique de la prééclampsie	77
1.	Les études à l'échelle du génome entier	78
2.	Les études d'association de gène-candidats.....	79
3.	Perspectives concernant la génétique de la prééclampsie.....	81
III.	Physiopathologie de la prééclampsie	81
1.	Le placenta, l'organe dont les défauts sont à l'origine de la prééclampsie.....	81
2.	Première étape : une placentation défectueuse	82
3.	Deuxième étape : le syndrome maternel	85
i.	La dysfonction endothéliale et le déséquilibre des facteurs vasoactifs	86
ii.	La coagulopathie	88
iii.	Le stress oxydatif et le métabolisme des lipides.....	89
iv.	L'inflammation	90
v.	L'immunité	90
	<u>Chapitre Trois</u> Les modèles d'étude de la prééclampsie.....	93
I.	Les modèles cellulaires	95
1.	Les trophoblastes isolés à partir de placenta	95
2.	Les lignées de chorio-carcinome humain.....	96
i.	Les cellules BeWo.....	96
ii.	Les cellules JEG-3	96
iii.	Les cellules JAR.....	96
3.	Les lignées dérivées de cytotrophoblastes	97
i.	HTR8/Svneo.....	97
ii.	SGHPL.....	97
4.	Les trophoblastes dérivées de cellules souches humaines.....	98
5.	Limites des modèles cellulaires.....	99

II. Les modèles murins	99
1. Modèle murin : un bon modèle pour étudier les pathologies placentaires ?	100
2. Les différents modèles de prééclampsie obtenus chez la souris.....	101
i. La surexpression de sFlt1	101
ii. Les régulateurs de l'hypertension.....	102
iii. L'immunité innée et l'auto-immunité.....	103
iv. <i>Comt</i> et l'hypoxie	104
v. Les gènes soumis à empreinte parentale	104
3. Bilan.....	105
<u>Chapitre Quatre</u> Le facteur de transcription <i>STOX1</i>	106
I. Sa découverte	108
1. L'identification d'une région liée à la prééclampsie et soumise à un effet de l'origine parentale	108
2. <i>STOX1</i> , un gène soumis à empreinte	109
3. <i>STOX1</i> : un facteur de transcription	110
II. Sa remise en cause	111
1. <i>STOX1</i> et la prééclampsie : association génétique ?.....	112
2. Le statut d'empreinte de <i>STOX1</i>	113
III. Sa difficile réhabilitation	114
1. <i>STOX1</i> serait soumis à empreinte uniquement dans les cytotrophoblastes extravilloux des colonnes (ou certains d'entre eux).....	114
2. L'expression de <i>STOX1</i> au 1 ^{er} trimestre	115
3. Les études visant à comprendre la fonction de <i>STOX1</i> et sa pertinence vis à vis de la prééclampsie	116
i. <i>STOX1</i> , la prolifération et l'invasion.....	116
ii. Impact de la surexpression de <i>STOX1</i> dans un modèle cellulaire	116
Résultats.....	119
<u>Article 1</u> Les symptômes de prééclampsie induits par l'expression fOeto-placentaire de <i>STOX1</i> sont prévenus par l'aspirine	123
<u>Article 2</u> La surexpression de <i>STOX1</i> dans l'unité Foeto-placentaire induit une fonction placentaire altérée ainsi qu'une surcroissance foetale.....	139
<u>Article 3</u> La fonction cardiovasculaire dans un modèle murin de prééclampsie	163
<u>Article 4</u> <i>STOX1</i> est responsable d'une fonction mitochondriale altérée dans les cellules trophoblastiques	179
Discussion et perspectives	201
I. Bilan des principaux résultats obtenus	203
II. Le modèle murin <i>STOX1</i>	204
1. Comprendre comment le syndrome se développe dans nos souris.....	204
2. Tester des thérapeutiques innovantes	206

3. Explorer les conséquences à long terme	208
III. STOX1.....	208
IV. Conclusion.....	209
Références.....	211
Annexes	239
<u>Annexe 1</u> Revue : Comparative analysis of mice models for preeclampsia	241
<u>Annexe 2</u> Revue : DNA methylation, an epigenetic mode of gene expression regulation in reproductive science	249
<u>Annexe 3</u> la Régulation de mir34-A dans les pathologies placentaires.....	291
<u>Annexe 4</u> Les facteurs de transcription à doigt de Zinc sont dérégulés dans les pathologies placentaires	311
<u>Annexe 5</u> Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA3 expression and its association with placental diseases.....	331
<u>Annexe 6</u> Combination of promoter hypomethylation and PDX1 overexpression leads to TBX15 decrease in vascular IUGR placentas.....	345
<u>Annexe 7</u> Congrès	357
I. Communications orales en français.....	359
II. Communications orales en anglais.....	359
III. Présentation sous forme de poster à un congrès international.....	359

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 :	L'arbre phylogénétique des vertébrés simplifié.....	13
Figure 2 :	L'origine des tissus primitifs chez les mammifères	14
Figure 3 :	Le placenta chorio-vitellin du wallaby <i>Macropus eugenii</i>	15
Figure 4 :	Forme globale des placentas des mammifères euthériens.....	15
Figure 5 :	Les différents types de barrières hémato-placentaires	16
Figure 6 :	Le trajet et la rencontre des gamètes dans les voies génitales féminines.....	18
Figure 7 :	Le développement précoce chez l'humain.....	21
Figure 8 :	Le développement des villosités choriales.....	23
Figure 9 :	Les villosités choriales au 1 ^{er} trimestre de grossesse	23
Figure 10 :	Les cytotrophoblastes extravilleux (CEV)	24
Figure 11 :	Les molécules d'adhésions exprimées par les trophoblastes à l'interface fœto-maternelle	26
Figure 12 :	La régulation dépendante de l'oxygène via HIF1	29
Figure 13 :	La circulation materno-fœtale au cours de la grossesse.....	29
Figure 14 :	Le placenta à la fin du 3 ^{ème} mois.....	29
Figure 15 :	Le développement préimplantatoire murin <i>in vitro</i>	31
Figure 16 :	Le développement préimplantatoire murin <i>in vivo</i>	32
Figure 17 :	Les bases moléculaires du premier lignage au sein du blastocyste	33
Figure 18 :	L'implantation chez la souris	37
Figure 19 :	Le développement du placenta murin	38
Figure 20 :	Les lignages trophoblastiques et l'origine des différents types de TGCs.....	39
Figure 21 :	Les circulations sanguines maternelle et fœtale à contre-courant au cours de la gestation chez la souris	40
Figure 22 :	Les principaux échanges fœto-maternels	44
Figure 23 :	HLA-G et la tolérance immunitaire pendant la grossesse	51
Figure 24 :	Le système du complément et sa régulation	56
Figure 25 :	Les régions chromosomiques associées à la prééclampsie.....	78
Figure 26 :	Le défaut de remodelage des artères spiralées utérines en cas de prééclampsie	83
Figure 27 :	Les placentas humain et murin	100
Figure 28 :	Les symptômes de prééclampsie dans les différents modèles murins.....	105
Figure 29 :	Modèle d'héritabilité épigénétique et génétique de la prééclampsie.....	108
Figure 30 :	Les différentes isoformes de STOX1.....	110
Figure 31 :	STOX1 est apparenté à la famille des facteurs FOX et son domaine de liaison à l'ADN est très conservé	111
Figure 32 :	L'expression bi-allélique de STOX1 dans le placenta	113
Figure 33 :	Corrélation entre les modifications transcriptomiques des cellules surexprimant STOX1 et des placentas prééclamptiques	118

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Les complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) humain et murin.....	50
Tableau 2 :	Les principaux facteurs de risque de la prééclampsie	65
Tableau 3 :	Les principaux marqueurs précoces du futur développement d'une PE.....	75
Tableau 4 :	Les lignées cellulaires modèles de trophoblastes	98

LISTE DES ABBREVIATIONS

Corin : atrial natriuretic peptide-converting enzyme
DC(s) : cellule(s) dendritique(s) (Dendritic Cell(s))
EGF : Epidermal Growth Factor
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
HLA : Human Leucocyte Antigen
IFN γ : interféron γ
IGFBP-1 : Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1
KIR : Killer-cell immunoglobulin-like receptor
MAC : complexe d'attaque membranaire (du système du complément)
MAPK : Mitogen-activated protein kinases : MEK, Erk
MHC : système majeur d'histocompatibilité
MMP : métalloprotéases
NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NO : Oxyde Nitrique
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PE : prééclampsie
PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PIGF : Placental Growth Factor
ppO₂ : pression partielle en dioxygène
PTGS2 : prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (aussi dénommée COX2)
RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin
ROS : Reactive Oxygen Species
sENG : Endogline soluble
sFLT-1 : soluble de Fms-like tyrosine kinase 1, récepteur soluble du VEGF
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
TGC(s) : cellule(s) trophoblastique(s) géante(s)
TGF β : Transforming Growth Factor
TLR : Toll Like Receptor
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
uNK : cellules utérines Natural Killer
uPA : plasminogène de type urokinase
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VE-cadhérine : Vascular Endothelial-cadherin
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

CHAPITRE UN

LE PLACENTA

I. Généralités

Le placenta est un **organe transitoire d'échanges** physiologiques entre un organisme et sa descendance. Le placenta existe sous des formes variées au sein des êtres vivants. Il est **retrouvé au sein de nombreux taxons**, dans le règne animal et dans le règne végétal. Ainsi, il est décrit chez les plantes à fleurs dans lesquelles il se définit comme la partie de la surface d'un carpelle sur laquelle sont insérés les ovules (*Larousse.fr - Dictionnaires*). Il existe également chez certaines espèces d'invertébrés comme les scorpions et chez des vertébrés non mammaliens tels que certaines espèces de requins (Sélaciens Pleurobranches **Figure 1**) (*Kaufmann, 1991*).

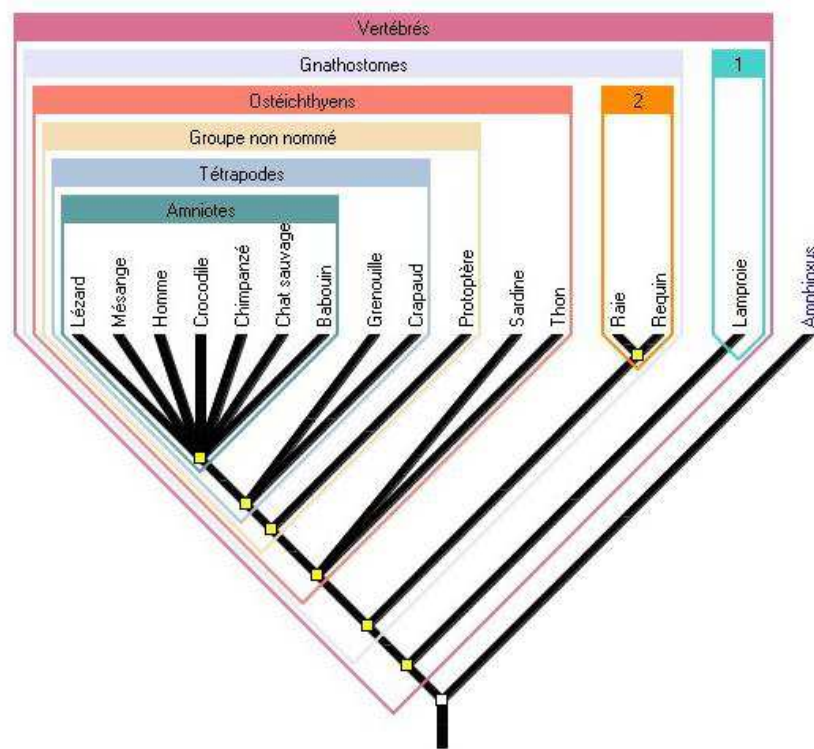


Figure 1 : L'arbre phylogénétique des vertébrés simplifié

D'après l'institut français de l'éducation (1 : Agnathes, 2 : Chondrychtiens)

<http://acces.ens-lyon.fr/evolution/logiciels/phylogene/telechargements-enseignants/arbres-de-reference>

Chez les amniotes (**Figure 1**), il y a **quatre membranes fœtales** :

- l'**amnios**, d'origine ectodermique, entoure la cavité amniotique et protège le fœtus des chocs mécaniques ;
- le **sac vitellin** dérivé de l'endoderme et du mésoderme extra-embryonnaire constitue une réserve nutritive pour l'embryon, il entoure l'œuf chez les oiseaux et chez certains reptiles;

- l'**allantoïde**, d'origine endodermique, est une extension de la vessie embryonnaire, dérivant elle-même du sinus urogénital et stocke les produits d'excrétion ;
- le **chorion**, formé par du mésoderme extra-embryonnaire et une couche de trophoblaste, est responsable des sécrétions endocrines (**Figure 2**). Le chorion peut fusionner avec le sac vitellin pour former le placenta chorio-vitellin ou avec l'allantoïde pour former le placenta chorio-allantoïde, suivant les espèces de mammifères et/ou les périodes de la gestation.

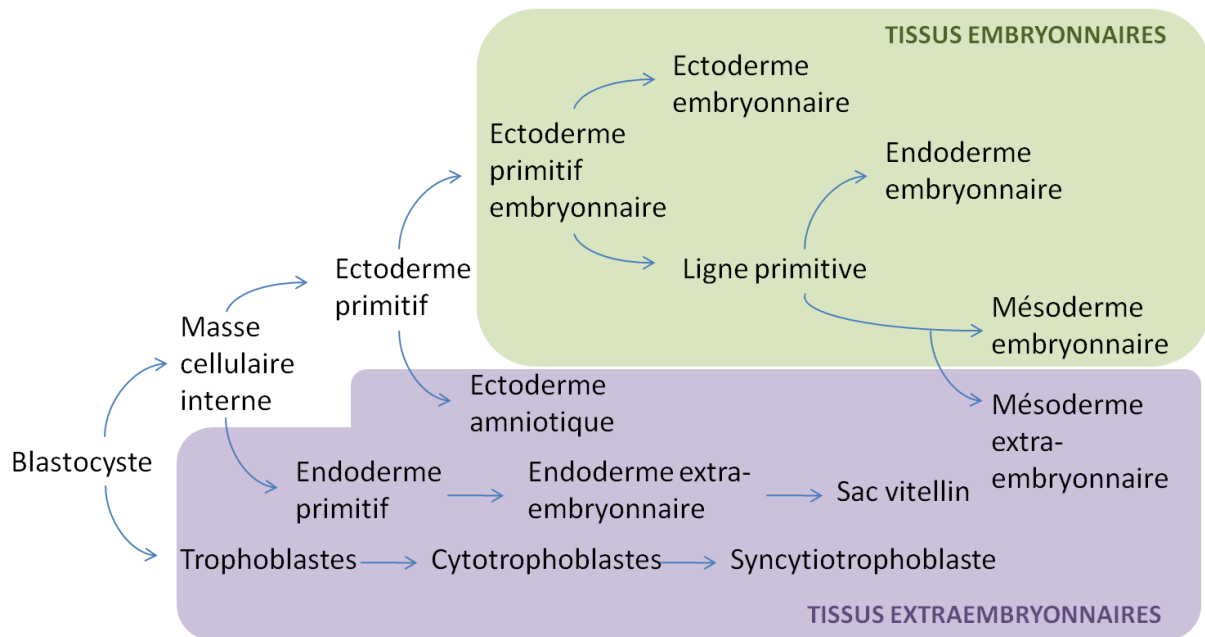


Figure 2 : L'origine des tissus primitifs chez les mammifères

Adapté de *Developmental Biology* (Gilbert and Singer, 2010)

Le **placenta chorio-vitellin** est un type de placenta dans lequel les villosités choriales sont irriguées par des vaisseaux vitellins dont l'origine est la vésicule vitelline lorsqu'elle entre en contact avec le chorion. C'est le type de placenta de la plupart des marsupiaux (**Figure 3**). Le placenta chorio-vitellin permet non seulement des échanges nutritifs et gazeux, mais également une reconnaissance maternelle (immunitaire) au cours de la grossesse et il sécrète en outre de nombreuses hormones (*Renfree, 2010; Wildman et al., 2006*). Il convient de noter que le blastocyste des marsupiaux n'a pas de masse cellulaire interne, et qu'on ne connaît chez ces espèces ni les signaux, ni les gènes qui vont déterminer le devenir des différentes cellules (*Renfree, 2010*).

Figure 3 : Le placenta chorio-vitellin du wallaby *Macropus eugenii*

Adapté de (*Renfree, 2010*)

Le **placenta chorio-allantoïde** est défini par la participation de l'allantoïde vascularisée pour l'établissement de la circulation fœto-maternelle. La vésicule allantoïdienne est une extension de l'intestin embryonnaire. Ce placenta est caractéristique de tous les mammifères euthériens (mais pas seulement, puisqu'il est également retrouvé chez les sauropodiens –dont les lézards et les serpents) (*Ferner and Mess, 2011*). En général, les placentas allantoïdiens envahissent plus profondément l'endomètre utérin.

Par la suite, nous nous intéresserons plus particulièrement aux placentas chorio-allantoïdes des mammifères euthériens. On estime l'apparition de ce type de placenta à environ 160 milliard d'années, au cours du Jurassique (*Luo et al., 2011*).

II. Les différents types de placenta des mammifères euthériens

Il existe également une grande variété de formes placentaires chez les mammifères euthériens. Les différents types de placenta ont ainsi été décrits selon divers **critères morphologiques** : la forme globale du placenta, l'interdigitation des tissus maternels et fœtaux, ou encore la profondeur de l'invasion des trophoblastes au sein du tissu maternel utérin.

Ainsi, concernant **la forme globale du placenta (Figure 4)**, on distingue les placentas diffus (porc, cheval) offrant une très large surface d'échange ; cotylédonaires (ruminants), avec des amas indépendants ; zonaires (félins) ; **discoïdes** (primates, souris) en forme de disque avec une face lisse du côté fœtal et une face irrégulière du côté maternel. On peut remarquer que dans le cas de l'espèce humaine, la face maternelle est creusée de sillons qui se croisent et délimitent des formes carrées nommées lobes placentaires (constitués d'un groupe de villosités séparés par des cloisons incomplètes), on dit que le placenta humain est pseudo-cotylédoné (ces lobes n'étant pas indépendants les uns des autres).

Figure 4 : Forme globale des placentas des mammifères euthériens

Adapté d'après *Embryologie humaine (Universités de Fribourg, Lausanne et Berne, 2005)*

La surface de contact restreinte entre la mère et l'enfant peut être augmentée par une interdigitation intense. L'interdigitation peut être plissée (porc), lamellaire, **villose** (homme), trabéculaire ou **labyrinthique** (souris).

Les mécanismes d'échange materno-fœtaux, tels que diffusion, transport de solutés et transport vésiculaire actif sont influencés par l'épaisseur des couches tissulaires séparant l'embryon de la mère. Cette barrière tissulaire sera d'autant plus mince que le trophoblaste pénétrera de manière invasive dans la muqueuse utérine. Elle constitue la **barrière hémato-placentaire**. Il en existe 3 types histologiques : épithéliochoriale, endothéliochoriale et hémochoriale (**Figure 4**).

Figure 5 : Les différents types de barrières hémato-placentaires

Adapté de *La reproduction chez les mammifères et l'homme* (Thibault and Levasseur, 2001)

Du côté fœtal sont invariablement présents, l'endothélium fœtal, le mésenchyme allantoidien et le trophoblaste. Du côté maternel en revanche, la composition est variable. Soit l'épithélium utérin est intact (placenta épithéliochorial), soit seul l'endothélium des vaisseaux maternels est intact (placenta endothéliochorial), soit comme c'est le cas chez l'homme, les deux font défaut (placenta hémochorial).

Dans le **placenta hémochorial**, le trophoblaste est en contact direct avec le sang maternel (*Aplin, 1991*). Et là encore, il y a une subdivision en fonction du nombre de couches cellulaires séparant la circulation fœtale de la circulation maternelle (**Figure 5**). Ainsi, dans l'espèce humaine, on parle de **placenta hémomonochorial** car à la fin de la grossesse, il n'y a plus qu'une couche de syncytiotrophoblaste séparant les deux circulations. Chez la souris, on dit que le placenta est **hémotrichorial** car trois couches de trophoblastes séparent les deux circulations.

Dans les placentas endothéliochoriaux et hémochoriaux, il y a une invasion plus marquée, avec la disparition de l'épithélium de l'endomètre maternel. L'endomètre maternel va se modifier au niveau du site d'implantation et devenir la décidue, qui sera expulsée lors de la délivrance. Le placenta est alors désigné comme **décidual**.

Comme les marsupiaux ont un placenta peu invasif de type épithéliochorial, on pourrait penser que le placenta chorio-allantoïdien ancestral était également de type épithéliochorial. Cependant, une étude récente basée sur la phylogénétique moléculaire et la phylogénie comparative placentaire tend à montrer que le placenta de l'ancêtre commun aux mammifères euthériens était hémochorial, de forme discoïde et avec une interdigitation de type labyrinthe (*Wildman et al., 2006*). Ainsi, les critères morphologiques utilisés dans la description des placentas ne correspondent pas à des critères évolutifs et différentes caractéristiques semblent être apparues de manière indépendante et répétée au cours de l'évolution des mammifères euthériens.

III. Le développement du placenta humain

1. De la fécondation au blastocyste

La fécondation proprement dite est l'ensemble des phénomènes qui résultent de la rencontre d'un gamète mâle (**spermatozoïde**) avec un gamète femelle (**ovocyte II**). Cette rencontre est précédée de la différenciation cellulaire des cellules de la lignée germinale (gamétogénèse) et d'un long cheminement des gamètes dans les voies génitales (**Figure 6**). Les **gamétogénèses** mâle et femelle ne seront pas détaillées ici mais elles ont été bien décrites dans *Human Reproduction* (*Baggott, 1997*). Il est cependant important de comprendre que, d'une part, les spermatozoïdes subissent un ensemble de **maturations** dans les voies génitales mâles (épididyme, canal déférent, canal éjaculateur et urètre) puis femelles (col de l'utérus, cavité utérine, trompes) indispensables à la réussite de la fécondation, notamment grâce à un ensemble de mécanismes nommés « capacitation ». D'autre part, au cours de chaque cycle menstruel, l'organisme maternel produit un ovule (ovocyte II ayant expulsé son premier globule polaire, entouré d'une zone pellucide séquestrant le globule polaire et de cellules du cumulus) et se prépare à recevoir un potentiel embryon sous l'effet d'un taux élevé d'**œstrogènes** et une sécrétion croissante de **progestérone** (phases ovulatoire et lutéale). En effet, au niveau de la trompe, il y a une diminution de l'épaisseur de l'épithélium, une activation des mouvements ciliaires, une contraction des muscles lisses ainsi qu'une accentuation de la vascularisation (ces modifications permettent de faciliter la migration de l'œuf, s'il y a eu fécondation) ; il y a également des modifications de l'endomètre (voir partie III-2) qui le rendent propice à la nidation de l'œuf, quelques jours plus tard (*Baggott, 1997*).

Quelques centaines de spermatozoïdes seulement (sur les 100 millions éjaculés environ) arrivent à proximité de l'ovocyte ; ceux-ci doivent tout d'abord traverser les cellules du cumulus et la zone pellucide qui entourent l'ovocyte convoité. Cette traversée peut être réalisée grâce à la **réaction acrosomique**, durant laquelle les spermatozoïdes libèrent plusieurs types d'enzymes stockées dans leurs acrosomes (situés à la tête des spermatozoïdes) : les hyaluronidases digèrent la matrice extracellulaire (acide hyaluronique) agrégeant normalement les cellules du cumulus, et des enzymes protéolytiques (telles que l'acrosine) fragilisent la structure de la zone pellucide. Cette réaction est accompagnée d'une **hyperactivation** des spermatozoïdes qui se traduit par une plus grande motilité grâce à une plus grande amplitude des mouvements latéraux du flagelle, facilitant ainsi leur passage. S'en suit une étape d'**adhésion/fusion**, pour laquelle deux protéines sont indispensables : CD9 sur l'ovocyte et IZUMO-1 sur le spermatozoïde (*Inoue et al., 2005; Ziyat et al., 2006*). Le mécanisme de fusion des membranes gamétiques reste cependant un grand mystère. Suite à la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte, une **réaction corticale** se produit avec une sécrétion vésiculaire importante, ayant comme résultat d'empêcher d'autres spermatozoïdes de pénétrer dans l'ovocyte (**monospermie**) (*Ghetler et al., 1998; Sengoku et al., 1999*). L'ovocyte va alors reprendre sa méiose puis les pronoyaux mâle et femelle vont se décondenser, se répliquer et fusionner. La première division de l'œuf peut alors se faire (environ 24h après la fusion des deux gamètes).

Figure 6 : Le trajet et la rencontre des gamètes dans les voies génitales féminines

Adapté d'après *Bio Web : cours de bio en ligne (Boseret, 2010)*

Le zygote va alors migrer dans la trompe tout en continuant à se diviser : c'est la **segmentation**. Ainsi, les 2 cellules (appelées blastomères) vont en donner 4 puis 8, 16, 32 et au 4^{ème} jour de développement, on atteint les 64 cellules, c'est le stade **morula**.

Entre le 4^{ème} jour et le 5^{ème} jour de développement, la zone pellucide va disparaître et du liquide va s'infiltrer, ce qui va créer une cavité : le blastocœle. Au 6^{ème} jour, l'embryon est alors au stade **blastocyste**. On peut alors distinguer la masse cellulaire interne qui donnera notamment l'embryon, des cellules en périphérie qui s'organisent en épithélium, constituant le **trophectoderme** (dont les cellules sont des trophoblastes). Le destin vers l'un ou l'autre de ces types cellulaires semble être sous la dépendance de **facteurs transcriptionnels**, dont le rôle et les mécanismes d'action ont été bien établis chez la souris. Chez l'homme, ces facteurs

ont été mis en évidence dans le trophoctoderme (CDX2) ou dans la masse cellulaire interne (OCT4, NANOG) au niveau messager (ARN) et protéique (*Adjaye et al., 2005; Niakan and Eggan, 2012*). Toutefois, leur nécessité pour cette différenciation initiale n'est pas encore clairement démontrée.

Il est important de noter que le bon déroulement de l'ensemble des étapes décrites ci-dessus, ainsi que celles de la nidation, l'implantation et la placentation (qui seront décrites plus loin) est essentiel à la reproduction et qu'une anomalie dans l'une ou l'autre de ces étapes peut être responsable d'une hypofertilité ou d'une infertilité.

2. L'endomètre et l'accueil du blastocyste

À chaque cycle menstruel, l'endomètre se prépare à accueillir une éventuelle grossesse. Ainsi, sous l'influence de l'œstradiol (1^{ère} partie du cycle), il y a une phase proliférative puis sous l'influence de la progestérone (après l'ovulation), il y a une phase sécrétoire (chimio-attraction de l'éventuel blastocyste). Ces modifications permettent de définir une « **fenêtre d'implantation** » qui dure environ 4 jours chez la femme (soit 6 à 10 jours après l'ovulation). Cette fenêtre d'implantation est finement contrôlée par l'expression coordonnée de chimiokines, de métalloprotéases, de molécules d'adhésion, de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires (*Merviel et al., 2010*).

Lorsqu'il y a eu fécondation et que le blastocyste s'appose à l'endomètre, on parle de **réaction déciduale**, qui se caractérise par la transformation de l'endomètre en décidue. Cette transformation est la somme des modifications ayant lieu à chaque cycle menstruel, et de celles induites par la présence du blastocyste, leurs spécificités (en fonction de la présence ou de l'absence du blastocyste) n'étant pas toujours très claires. Elles sont principalement sous **contrôle hormonal** : du côté maternel, le 17- β -œstradiol et la progestérone, et du côté fœtal, l'hormone chorionique gonadotrope sécrétée par le syncytiotrophoblaste, dérivé du trophoctoderme. Ces modifications semblent être également influencées par l'**environnement immunitaire**, qui est fortement modifié suite à un rapport sexuel (impact du liquide séminal et des spermatozoïdes) (*Remes Lenicov et al., 2012; Robertson, 2005; Robertson et al., 2011; Sharkey et al., 2007, 2007, 2012*). Par exemple, l'équipe de Sarah Robertson a démontré récemment que le plasma séminal, riche en protéines membres de la famille du TGF β jouait un rôle pivot dans l'activation inflammatoire du tissu utérin. De plus, une série

de travaux au cours des dix dernières années montre que **l'activation inflammatoire** de l'utérus (provoquée suite à une blessure au niveau de l'endomètre, par exemple) joue un rôle prépondérant dans la réussite de l'implantation (*revue par Almog et al., 2010; Dekel et al., 2010; Gnainsky et al., 2010; Huang et al., 2011; Kalma et al., 2009*). A noter que le TGF β est un acteur essentiel de la transformation des cellules T naïves en cellules T régulatrices (*Jhunjhunwala et al., 2012; Zhang et al., 2010*).

Au niveau de l'endomètre, on observe différentes modifications : les vaisseaux de l'endomètre deviennent congestifs et dilatés, les glandes endométriales se développent (avec une sécrétion riche en glycogène et en mucus) et la paroi utérine devient localement œdémateuse. Il y a également une **augmentation de la vascularisation** locale, avec une **spiralisation des vaisseaux**. La **matrice extracellulaire endométriale** subit également des modifications qui concourent à la rendre plus perméable à l'invasion trophoblastique (hydratation, changement de type de collagène, apparition de protéoglycanes).

Pendant la fenêtre d'implantation, les **intégrines** $\alpha 1\beta 1$ (récepteur au collagène), $\alpha 5\beta 1$ (récepteur à la fibronectine) et $\alpha V\beta 3$ (récepteur à la vitronectine) sont toutes les trois exprimées sur l'épithélium de l'endomètre. D'après des expériences *in vitro*, le blastocyste stimule l'expression de $\alpha V\beta 3$ via l'interleukine IL-1 (*Lessey et al., 1996; Simón et al., 2000*). Ces cellules épithéliales expriment également de façon importante la **mucine** MUC-1, une glycoprotéine qui aurait un rôle inhibant l'adhésion et serait d'après des expériences *in vitro* induite lors de l'apposition du blastocyste ; celui-ci serait alors capable d'inhiber MUC-1, on le dit ainsi compétent (*Meseguer et al., 2001*). Ces protéines interviennent dans le contrôle de l'adhésion, de la migration et de l'invasion au cours de l'implantation et de la placentation (*Staun-Ram and Shalev, 2005*).

La **sécrétion** de protéines par l'épithélium glandulaire, comme la glycodéline, participe notamment à la tolérance (*Scholz et al., 2008; Soni and Karande, 2010*). Les cellules stromales vont augmenter en taille et se différencier en volumineuses cellules déciduales. Elles produisent alors un grand nombre de **facteurs de croissance** et de régulateurs de ces facteurs : notamment l'Epidermal Growth Factor (EGF), le Fibroblast Growth Factor (FGF), le Transforming Growth Factor β (TGF- β) et l'Insulin-like Growth Factor Binding Proteins 1 (IGFBP-1). Elles sécrètent également des **hormones** telles que la prolactine et la rénine (*Healy, 1991*). L'ensemble de ces sécrétions participe à la prolifération cellulaire et à la néoangiogénèse utérine.

Pendant la fenêtre d'implantation, le tissu endométrial subit également une infiltration lymphoïde (macrophages, lymphocytes, cellules NK, basophiles). Une régulation des cellules **Natural Killer utérines (uNK)** semble être essentielle à l'implantation, puisqu'un défaut ou un excès en uNK a été observé chez des patientes avec un échec d'implantation suite à une fécondation *in vitro* (FIV) (*Sifer and Poncelet, 2011*). Leurs recrutements dépendent notamment de la prolactine sécrétée par les cellules décidualisées (*Carlino et al., 2008*). Ces cellules de l'immunité sécrètent des cytokines qui jouent un rôle primordial dans la tolérance immunitaire de la grossesse, l'implantation et le contrôle de l'invasion profonde (décrite à la partie III-5) (*Eastabrook et al., 2008*).

3. L'implantation et la mise en place des villosités choriales

Après l'apposition du blastocyste (**Figure 7, a**) sur l'endomètre maternel, qui a lieu environ 6 jours après la fécondation dans l'espèce humaine, le trophoblaste prolifère et se différencie en deux types cellulaires : le **syncytiotrophoblaste** primitif en périphérie formant une couche multinucléée sans limites cellulaires distinctes (syncytium) et le **cytotrophoblaste** sous-jacent, composé de cellules mononucléées, dont la fusion alimente le syncytiotrophoblaste. Cette fusion est favorisée notamment par l'expression d'ERVWE1, un gène issu d'un rétrovirus endogène codant pour la Syncytin 1, une glycoprotéine membranaire (*Cáceres and Thomas, 2006*), dont l'interaction avec la connexine 43 conditionne la fusion (*Dunk et al., 2012*). Aux environs de 7-8 jours, ce syncytiotrophoblaste primitif s'infiltré entre les cellules épithéliales de la muqueuse utérine : c'est l'**implantation** (**Figure 7, b**). Cette implantation est de type interstitiel, le complexe embryonnaire pénétrant entièrement dans le tissu conjonctif maternel hautement vascularisé. Le syncytiotrophoblaste prolifère rapidement, en synthétisant des enzymes protéolytiques qui lysent les tissus endométriaux, ce qui permet la pénétration de l'ensemble du blastocyste dans l'épaisseur de l'endomètre (**Figure 7, c**). Cette lyse de l'endomètre va engendrer une réaction inflammatoire locale, ce qui va déclencher la réaction déciduale (décrite dans le paragraphe III-2).

Figure 7 : Le développement précoce chez l'humain

Adapté d'après *Embryologie Humaine – Le site* (*Rabineau et al., 2004*)

Au cours de la première semaine, l'embryon se nourrit par simple diffusion. Mais par la suite, sa croissance reposera sur la performance de la circulation utéro-placentaire, dont la mise en place débute à partir de 9 jours. Cette circulation repose sur **l'unité structurale et fonctionnelle du placenta : la villosité choriale**. Tout d'abord, des lacunes trophoblastiques commencent à se former au sein du syncytiotrophoblaste grâce à la confluence de vacuoles extra-cytoplasmiques : c'est le **stade lacunaire (Figure 7, c)**. Entre 10 et 12 jours, les lacunes trophoblastiques vont former des réseaux intercommunicants qui forment l'ébauche des espaces intervilloux du placenta. Le syncytiotrophoblaste érode les capillaires du stroma maternel, ce qui permet une infiltration de ce réseau lacunaire (**Figure 7, c**). Cela crée une **circulation utéro-placentaire primitive** (il est important de noter qu'il s'agit de la circulation d'un infiltrat sans hématies maternelles, ce qui sera détaillé plus loin). Cette microcirculation permet notamment le passage de l'hormone Chorionique Gonadotrope (hCG) sécrétée par le syncytiotrophoblaste vers la circulation sanguine maternelle. La sécrétion d'hCG est aussi utilisée pour détecter la grossesse grâce à une prise de sang ou un test urinaire.

Vers 13-14 jours, le cytotrophoblaste va s'infiltrer dans les travées du syncytiotrophoblaste, formant les **villosités primaires (Figure 8, a)** (*Castellucci et al., 1990*). Du mésenchyme allantoïdien dérivé du mésoderme extra-embryonnaire extra-cœlomique (**Figure 7, d**) va ensuite s'infiltrer dans ces villosités, qui deviennent alors **secondaires (Figure 8, b)**. Au sein de ce mésenchyme, vers 17-19 jours, des angioblastes se différencient en tissu conjonctif mésenchymateux et en îlots vasculo-sanguins primitifs, sous l'effet du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), du PlGF (Placental Growth Factor) et de l'angiopoïétine sécrétés par les cytotrophoblastes (*Zhou et al., 2003*). Ces sécrétions sont dépendantes de l'état physiologique hypoxique ($ppO_2 \approx 3\%$) des villosités à ce stade (*Burton et al., 2009*). Ces processus de **vasculogénèse** et d'**angiogénèse** donnent naissance aux premiers capillaires et aux premières cellules sanguines fœtales (érythroblastes) au sein de l'axe mésenchymateux nouvellement formé. Peu après, les vaisseaux sanguins s'anastomosent avec les vaisseaux ombilicaux de l'embryon. Les villosités contenant des vaisseaux sanguins différenciés sont appelées **villosités tertiaires (Figure 8, c)**. Les cytotrophoblastes situés au sommet des villosités prolifèrent et referment les **chambres intervillouses** en formant la coque cytotrophoblastique (**Figure 8, c**), qui sépare le

syncytiotrophoblaste de la muqueuse utérine. Au cours de ce développement villositaire, il y a une importante ramification et deux types de villosités choriales se forment : les villosités **flottantes**, qui flottent dans la chambre intervillieuse, et les villosités crampons, qui sont ancrées sur la caduque inter-utéro-placentaire (**Figure 9, a**).

Figure 8 : Le développement des villosités choriales

Adapté d'après *Embryologie Humaine – Le site (Rabineau et al., 2004)*

Ainsi, vers la fin de la 3^{ème} semaine de grossesse, **les villosités placentaires sont fonctionnelles**. Elles sont constituées de leur axe de tissu conjonctif contenant les cellules mésenchymateuses et les vaisseaux embryonnaires. Cet axe est entouré par une couche interne de **cytotrophoblastes villeux prolifératifs** et d'une couche externe de **syncytiotrophoblaste proliférant peu**. La barrière placentaire est alors constituée de quatre couches tissulaires : l'endothélium capillaire des villosités, le tissu conjonctif lâche qui en occupe l'axe, les cytotrophoblastes villeux et le syncytiotrophoblaste (**Figure 9, b : coupe de villosité chorale au 1^{er} trimestre**). Le système permettant **la circulation utéro-placentaire** proprement dite est ainsi mis en place (mais ne sera réellement effectif qu'à 12 semaines).

Figure 9 : Les villosités choriales au 1^{er} trimestre de grossesse

Adapté d'après *Embryologie Humaine – Le site (Rabineau et al., 2004)*

4. L'invasion profonde (de la 3^{ème} à la 12^{ème} semaine de grossesse)

Certaines cellules cytotrophoblastiques ne font pas strictement partie de l'arbre villositaire, ce sont les **cytotrophoblastes extravilleux (CEV, Figure 10, a)**, ainsi retrouvés au sommet des villosités crampons (coques cytotrophoblastiques accolées à la muqueuse utérine), dans la décidue ou encore dans la paroi des vaisseaux maternels. Au sommet des villosités crampons, les CEV sont prolifératifs et groupés en colonne. Certains CEV vont progressivement perdre leur caractère prolifératif et migrer pour envahir l'endomètre maternel en **interagissant avec les cellules déciduales et les cellules immunocompétentes** intra-déciduales, telles que les cellules uNK. Ces interactions semblent jouer un rôle clé dans

l'immunotolérance de l'hémi-allogreffe que constitue le fœtus (voir partie V-3). Les CEV migrent également dans la décidue et dans le premier tiers du myomètre, produisant ainsi une **invasion particulièrement profonde**. Ces CEV sont dits **CEV interstitiels**. Certains de ces CEV vont persister dans la paroi utérine et terminer leur migration en se différenciant en **cellules géantes bi- ou tri-nucléées**, dont le rôle demeure mystérieux. Ces cellules géantes libéreraient des vasodilatateurs (notamment oxyde nitrique, NO, et monoxyde de carbone, CO), agissant sur les artères utérines spiralées (*Lyall, 2003, 2005*). D'autres CEV migrent plus spécifiquement au niveau des artérioles maternelles et forment des **bouchons intraluminaux** (**Figure 10, a**), ce qui crée une obstruction de la lumière artérielle. Il en résulte l'absence d'hématies maternelles dans la chambre intervillieuse jusqu'à la 10^{ème} semaine de grossesse (la chambre intervillieuse contient alors un infiltrat sans élément figuré sanguin). Cet **environnement hypoxique** (environ 3% de pression partielle en Oxygène, ppO₂) est considéré comme physiologique (*Carbillon et al., 2001; James et al., 2006*). Cette hypoxie est probablement nécessaire pour deux raisons principales : 1) limiter l'afflux d'oxygène vers l'embryon qui n'a pas encore synthétisé la machinerie permettant la destruction des radicaux libres de l'oxygène pour ainsi le protéger des effets tératogènes de ces radicaux libres pendant la phase d'organogénèse ; et 2) permettre la prolifération rapide des cellules trophoblastiques dont les divisions sont induites dans une situation d'hypoxie (*Mondon et al., 2005*).

Figure 10 : Les cytotrophoblastes extravilloux (CEV)

Adapté d'après (*Alsat et al., 1999*)

Cependant le maintien de cette hypoxie physiologique conduit à la désagrégation progressive des bouchons, et permet une **augmentation progressive de la ppO₂** jusqu'à environ 10-12% à la fin du 1^{er} trimestre de la grossesse (*Rodesch et al., 1992*). Cette augmentation va constituer un signal de différenciation qui va rendre les CEV interstitiels et ceux des bouchons invasifs. Les CEV invasifs vont ainsi migrer de façon spécifique vers les parois des artères spiralées utérines qu'ils vont envahir par voie endo- et péri-vasculaire. Les CEV vont ensuite progressivement se substituer aux cellules endothéliales maternelles (**Figure 10, b**) pour se différencier en **CEV endovasculaires** avec des caractéristiques de cellules endothéliales (*Aplin, 1991; Damsky and Fisher, 1998*). Ceci se fait notamment grâce à une apoptose des cellules endothéliales induites par les CEV via des interaction

Fas/FasL (*Ashton et al., 2005*). Au cours de cette invasion, on observe également la disparition totale de la tunique musculaire lisse qui est remplacée par une paroi fibreuse atone insensible aux molécules vasoactives. Ce n'est qu'à partir de 12 semaines post-fécondation, que la **circulation utéro-placentaire** devient réellement fonctionnelle grâce à la dissolution des bouchons luminaux (**Figure 10, b**). Elle constitue alors un système d'échange très performant et une mise en contact intime (3 couches cellulaires : l'endothélium embryonnaire, les cytotrophoblastes et le syncytiotrophoblaste) des circulations sanguines maternelle et fœtale.

Ainsi, les artères spiralées utérines perdent leurs capacités constrictrices caractéristiques, assurant un flux sanguin régulier et abondant, fondamental à la croissance fœtale. Cette **invasion très profonde**, jusqu'au premier tiers du myomètre est **spécifique de l'espèce humaine**, et pourrait être lié aux besoins particulièrement importants de la croissance cérébrale du fœtus, qui drainent environ 50% des besoins en oxygène contre environ 20% dans les autres espèces de mammifères (*Robillard et al., 2002*).

5. Le contrôle de l'invasion profonde

L'invasion profonde par les **trophoblastes extravilleux**, essentielle à la croissance fœtale et donc à la grossesse, est **finement contrôlée** par différents mécanismes : une régulation spatio-temporelle des molécules d'adhésion et des métalloprotéases, et une régulation par la tension en oxygène. C'est sans doute le bon fonctionnement de ces régulations qui font de l'invasion cytotrophoblastique un exemple unique d'invasion « pseudotumorale » contrôlée. Une comparaison de ce contexte et du contexte tumoral permettrait sans doute de déterminer certains des mécanismes menant à une invasion incontrôlée (*pour revue, voir Louwen et al., 2012*).

La différenciation progressive des cytotrophoblastes extravilleux (CEV) en cellules à phénotype invasif semble dépendante de la **régulation spatio-temporelle des molécules d'adhérence** qu'ils expriment (*Harris et al., 2009a*), telles que les intégrines (qui participent à l'adhésion entre les cellules et les constituants de la matrice extra-cellulaire), les cadhérines, les immunoglobulines-like et les sélectines. En effet, au cours de l'invasion de la décidue et de ses vaisseaux, la différenciation des CEV et l'acquisition de différents phénotypes (prolifératif, interstitiel, invasif ou endovasculaire) se traduisent par l'expression de

marqueurs cytologiques spécifiques (**Figure 11**). Le rôle primordial des intégrines de surface exprimées par les CEV au cours de leur migration est bien établi (*Damsky et al., 1994*). Ainsi, les cellules prolifératives expriment les **intégrines** formées par les chaînes $\alpha 6\beta 4$ qui n'interagissent pas avec la muqueuse utérine alors qu'en revanche, les cellules interstitielles expriment les intégrines $\alpha 5\beta 1$ capables d'interagir avec cette muqueuse. Les CEV endovasculaires expriment des **molécules d'adhésion de type vasculaire** au contact du sang maternel telles que VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) ou la VE-cadhérine (vascular endothelial-cadherin) comme d'authentiques cellules endothéliales (*Zhou et al., 1997a*). Les CEV changent également de **récepteurs de surface** au cours de leur migration et de l'évolution de leur phénotype. Par exemple, les CEV perdent leurs récepteurs à l'EGF au profit du récepteur à l'oncogène c-erbB2 à des stades plus invasifs (*Jokhi et al., 1994*). Au cours de la migration des CEV, la décidue est un partenaire indispensable, et lors de la réaction déciduale, des **modifications essentielles de la matrice extracellulaire de l'endomètre** ont lieu (voir partie III-2). La décidue intervient alors pour guider les CEV par des mécanismes de reconnaissance cellule-matrice et produit un certain nombre de facteurs diffusibles qui vont moduler cette invasion, tels que le facteur de croissance EGF ou le régulateur du facteur de croissance IGF-1, l'IGFBP-1. Ce dernier peut interagir avec les CEV interstitiels grâce aux intégrines $\alpha 5\beta 1$ (*Jones et al., 1993*).

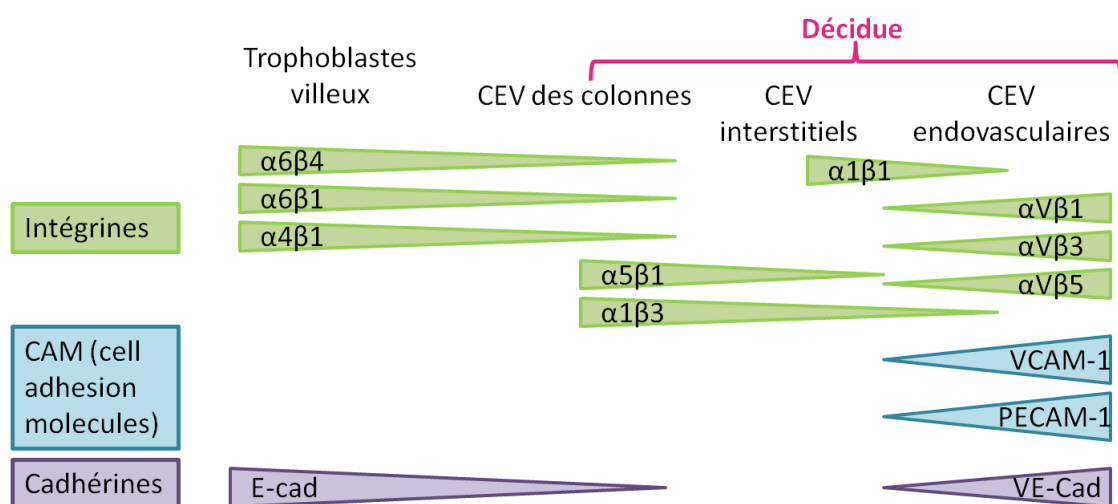


Figure 11 : Les molécules d'adhésions exprimées par les trophoblastes à l'interface fœto-maternelle

Adapté d'après (*Aplin et al., 2009; Harris et al., 2009a*)

Afin de progresser au sein de la décidue, les cytotrophoblastes sécrètent des enzymes protéolytiques qui solubilisent la matrice maternelle, et la rendent ainsi plus perméable. L'efficacité de l'invasion dépend donc de la capacité des CEV à sécréter ces facteurs (*Cohen and Bischof, 2007*). Il s'agit notamment des **métalloprotéases matricielles** (MMP) de type collagénases et gélatinases et **des activateurs du plasminogène** de type uPA (urokinase plasminogen activator) et t-PA (tissue plasminogen activator) (*Multhaupt et al., 1994; Polette et al., 1994*). Les CEV synthétisent également des inhibiteurs spécifiques de ces protéases, respectivement les TIMP (tissue inhibitors of metalloproteases), PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1 ou SERPINE1) et PAI-2 (Plasminogen Activator Inhibitor-2 ou SERPINB2), permettant une autorégulation du système et empêchant une protéolyse excessive (*Eastabrook et al., 2008; Graham and Lala, 1991; Huppertz et al., 1998*). Le type de MMP synthétisées et activées par les CEV est différent suivant le stade de différenciation des CEV au sein de la décidue. Ainsi, la MMP-9 (gélatinase B) remplace progressivement la MMP-2 (gélatinase A) à des étapes plus invasives. Parallèlement, les CEV interagissent avec les diverses cellules intra-déciduales (cellules épithéliales, fibroblastes, macrophages, lymphocytes et uNK) ce qui participe à la migration des CEV, notamment du fait de la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines. De ce point de vue, les cellules immunitaires maternelles jouent un rôle majeur. Ces facteurs solubles, stimulant ou inhibant l'invasion, agissent notamment en **régulant la synthèse des protéines matricielles, des protéases et de leurs inhibiteurs** (*Eastabrook et al., 2008*). Des cytokines au sein de l'utérus jouent également un rôle dans la régulation de l'expression des MMP et de leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs). Par exemple, le TNF α régule l'expression de MMP-9 (*Bischof, 2001*), l'IL-1 β régule positivement les MMP-2, MMP-9 et uPA, alors que le TGF- β 1 régule positivement les inhibiteurs TIMP-1 et -2, PAI-1 et -2 (*Karmakar and Das, 2002*). Il a également été montré *in vitro* que des facteurs dérivés de cellules stromales déciduales augmentaient les capacités invasives de lignées cellulaires trophoblastiques et altéraient l'expression d'intégrines, de MMP et de TIMPs (*Godbole et al., 2011*).

La migration trophoblastique et la différenciation des CEV sont également modulées par la **tension en oxygène** dans l'environnement cellulaire. L'analyse des modalités de l'arrivée du sang maternel a mis en évidence une **hypoxie physiologique** s'interrompant en fin de premier trimestre. Avant 10 semaines, l'observation de coupes de placenta montre du plasma dépourvu d'hématies circulant dans l'espace intervilloux. Cette situation induit localement une faible pression partielle en oxygène (ppO $_2$ à environ 3% ou moins) qui peut

déclencher la transcription cellulaire des gènes régulés par l'hypoxie. Au-delà de 10 semaines, le sang circule dans l'espace intervilloux, et sa ppO₂ ainsi que celle des tissus décidaux s'élève (ppO₂ à environ 10-12%). Cette élévation est probablement en rapport avec la présence d'hémoglobine et l'augmentation du débit sanguin. L'ouverture des artères utéro-placentaires, en augmentant la ppO₂ dans l'espace intervilloux, semble intervenir dans les processus de **différenciation des CEV** et l'acquisition de leurs caractéristiques phénotypiques (molécules de surfaces, MMP exprimées, etc.). Vraisemblablement, en **condition hypoxique** (avant 10 semaines de grossesse), c'est le **phénotype non invasif** qui s'exprime et les **CEV prolifèrent**. Après 10 semaines, en présence d'une ppO₂ plus élevée, les CEV cessent de proliférer et acquièrent un phénotype invasif. En effet, des travaux montrent que des **explants de villosités** crampons extraites à 8 semaines d'aménorrhées, cultivés en présence de **2 % d'O₂** (hypoxie), développent des excroissances produites par la **prolifération du cytotrophoblaste**. À l'inverse, en présence de 20 % d'O₂ (hyperoxie), ces excroissances n'apparaissent pas et la prolifération cellulaire cesse. De même, *in vitro*, des travaux montrent que le **profil des molécules d'adhésion exprimées par le trophoblaste est influencé par l'oxygène** (Genbacev *et al.*, 1992, 1997; Mondon *et al.*, 2005). L'oxygène apparaît ainsi comme un facteur clé dans le mécanisme de la placentation en raison du contrôle qu'il exerce sur la transcription de certains gènes.

Ce contrôle s'effectue grâce à des **molécules sensibles à la ppO₂**. Plusieurs facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie, HIF-1, -2 et -3 (**Hypoxia Inducible Factor -1,-2-3**) ont été mis en évidence. Dans le cas d'HIF-1, la sous-unité **HIF-1 α** est stabilisée en hypoxie et, après sa translocation dans le noyau, elle forme un hétérodimère avec la sous-unité HIF-1 β (également appelé ARNT, Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). La liaison du dimère HIF-1 à une séquence régulatrice HRE (Hypoxia Response Element) de l'ADN avec d'autres cofacteurs, induit la **transcription des gènes sensibles à l'hypoxie**. En revanche, dans un contexte normoxique, les **prolyl-hydroxylases** (PHD) sont activées et vont hydroxyler les prolines du domaine carboxy-terminal d'HIF1 α dès sa sortie du noyau (Lee *et al.*, 2004). La forme hydroxylée fixe alors le facteur suppresseur de tumeur de von Hippel-Lindau (pVHL), qui participe à la formation d'un complexe ayant une activité E3-ubiquitine-ligase (Cockman *et al.*, 2000). L'HIF-1 α se lie alors à des ubiquitines et est dégradé par le protéasome (**Figure 12**) (Kallio *et al.*, 1999).

Figure 12 : La régulation dépendante de l'oxygène via HIF1

Adapté d'après (*Carroll and Ashcroft, 2005*)

6. Le placenta de la 4^{ème} semaine au terme

Au début de la grossesse, les villosités se sont développées dans toutes les directions, en formant la **sphère choriale**. Au sein de cette sphère, les villosités choriales tertiaires se ramifient à partir de la 4^{ème} semaine (**Figure 12, a**) et dans chaque arborescence, une différenciation vasculaire a lieu et une **unité vasculaire** se forme (**Figure 12, b**). L'axe vasculaire est alors constitué d'une veine centrale (vaisseau efférent) et de deux artérioles para-centrales (vaisseaux afférents) reliés entre elles par un réseau capillaire sous trophoblastique. Ce système vasculaire est lui-même relié aux **vaisseaux ombilicaux**.

Figure 13 : La circulation materno-fœtale au cours de la grossesse

Adapté d'après *Embryologie Humaine – Le site (Rabineau et al., 2004)*

À partir de la fin du deuxième mois, les villosités choriales orientées vers la cavité utérine vont progressivement dégénérer et cela formera le **chorion lisse** (couche avasculaire constituée d'une seule couche de cytotrophoblaste et de mésenchyme extra-embryonnaire). À l'opposé, les villosités faisant face à la paroi utérine continuent à se développer et forment le **placenta discoïde** typique de l'espèce humaine à la fin du 3^{ème} mois (**Figure 14**). Au cours du 4^{ème} mois, les cytotrophoblastes villositaires cessent de proliférer et disparaissent des villosités pour ne subsister que sous la forme de quelques amas de cellules isolées sous le syncytiotrophoblaste (**Figure 13, c**). Le sang maternel n'est alors séparé des vaisseaux fœtaux que par une couche trophoblastique (le syncytiotrophoblaste) : le **placenta hémomonochorial est formé**. La coque trophoblastique fait, quant à elle, place à du tissu conjonctif. Des cytotrophoblastes confluent alors entre les chambres intervillieuses et constituent les septa inter-cotylédonaires qui délimitent les cotylédons apparents sur la face maternelle du placenta observables lors de la délivrance.

Figure 14 : Le placenta à la fin du 3^{ème} mois

Adapté d'après *Embryologie Humaine – Le site (Rabineau et al., 2004)*

À la fin de la grossesse, le placenta humain mesure environ **20 cm de diamètre** et **3 cm d'épaisseur**, il pèse environ **500 g**. L'ensemble des villosités représente une surface de 10 à 14 m² et contient un **réseau sanguin capillaire de 50 km**. Il y a environ 2 à 6 µm entre le sang fœtal et le sang maternel. Le débit sanguin maternel est évalué à 500 mL par minute dans le placenta.

IV. Le développement du placenta murin

La souris est indubitablement le **modèle animal mammifère** le plus utilisé, initialement de par sa petite taille, sa **gestation relativement courte (19 jours environ)** et la taille de ses **portées (4 à 12 petits)**. Dès le début du 20^{ème} siècle, on en réalise ainsi l'élevage et différentes lignées sont établies au milieu du siècle (avec un fond génétique stable) (*Nagy, 2003*). Les études du développement précoce chez la souris commencent également vers les années 1950 avec les premières cultures de blastocystes *in vitro* (*Hammond, 1949; Whitten, 1956*), alors qu'elles étaient auparavant plutôt effectuées chez le lapin (gamètes de taille supérieure). De plus, avec la mise au point de la transgénèse (*Gordon and Ruddle, 1981; Gordon et al., 1980*), de l'inactivation de gène (*Hooper et al., 1987; Kuehn et al., 1987*) dans les années 1980, et la disponibilité (publique) de la séquence et de l'assemblage du génome murin en 2001 (*Lindblad-Toh et al., 2001*), la souris est de loin l'outil le plus puissant pour déterminer le rôle fonctionnel de gènes du développement en situation physiologique ou physiopathologique.

1. De la fécondation au blastocyste : le développement préimplantatoire

Chez la souris, l'accouplement se fait normalement au cours de la nuit alors que la femelle est en œstrus (le cycle œstral dure environ 4 à 5 jours). Environ 50 millions de spermatozoïdes sont éjaculés, mais seuls 100 à 200 atteindront les ampoules des oviductes où sont les ovocytes (8 à 12 à chaque cycle). Les spermatozoïdes arrivés à proximité des ovocytes doivent tout d'abord traverser les cellules du cumulus et la zone pellucide qui entourent ces ovocytes, comme c'est le cas dans l'espèce humaine. De même que chez l'homme, la **réaction acrosomique** a lieu pour réaliser ce passage, et elle est également

accompagnée d'une **hyperactivation** des spermatozoïdes. Une fois cette traversée effectuée, des échanges entre les gamètes via la trogocytose ou des structures vésiculaires (exosome-like) ont été décrits (*Barraud-Lange et al., 2007; Miyado et al., 2008*). Cependant, le rôle de ces échanges n'a pas encore été déterminé. S'en suit une étape d'**adhésion/fusion**, pour laquelle, comme chez l'homme, les deux protéines Cd9 et Izumo-1 sont indispensables (*Inoue et al., 2005; Kaji et al., 2000; Miyado et al., 2000; Le Naour et al., 2000*). De nombreuses protéines ont été décrites comme augmentant l'efficacité de l'adhésion/fusion (ADAMs, intégrines, Crisp, GPI-APs...), cependant les mécanismes précis contrôlant ces étapes restent à découvrir. Une **réaction corticale** se produit également après la pénétration d'un spermatozoïde (responsable de la **monospermie**) (*Burkart et al., 2012*). L'ovocyte va alors reprendre sa méiose puis les pronoyaux mâle et femelle vont se décondenser, se répliquer et fusionner. Chez la souris, plusieurs ovocytes sont expulsés à chaque cycle mais ni ces ovulations ni les fécondations qui vont s'en suivre ne sont synchrones. Ainsi, le 1^{er} clivage des différents ovocytes fécondés se fait au cours de plusieurs heures, environ 24h après la fusion des deux gamètes. On parle alors du développement préimplantatoire.

Il faut noter qu'il existe beaucoup d'études sur le développement préimplantatoire, principalement réalisées dans des conditions de cultures *in vitro* (**Figure 15**), et notamment des études transcriptomiques à haut débit (*Hamatani et al., 2004; Wang et al., 2004; Zeng et al., 2004*).

Figure 15 : Le développement préimplantatoire murin *in vitro*

Adapté d'après (*Valley et al., 2010*)

Chez la souris, suite à l'accouplement, un bouchon muqueux se forme à la sortie du vagin, qui permet de déterminer le début de la gestation (E0,5 pour « Embryonic day » le jour où ce bouchon est observé, soit environ 12h après la fécondation). *In vivo*, le zygote va migrer au sein de l'oviducte pendant environ 3 jours (**Figure 16**) tout en continuant à se diviser : c'est la **segmentation**. Au stade 8 cellules, l'embryon se compacte : l'adhésion entre les cellules se fait plus marquée et les cellules s'aplatissent. La **cadhérine E** a été montrée comme essentielle pour ce phénomène (*De Vries et al., 2004*). Les cellules deviennent alors polarisées, avec un domaine apical dirigé vers l'extérieur de l'embryon (*Cockburn and Rossant, 2010*). Les divisions suivantes seront soit symétriques (si le plan de division se trouve sur un rayon de la sphère formé par l'embryon), soit asymétriques (si le plan de

division est dans le même sens que le bord de l'œuf). Dans le premier cas, les cellules filles resteront **polarisées** (avec un extérieur et un intérieur), et dans le second cas, la cellule fille extérieure sera polarisée et la cellule fille intérieure sera **apolaire**. Cela crée deux populations de cellules : les cellules polarisées à l'extérieur qui donneront le **trophectoderme** et les cellules apolaires au centre qui donneront la **masse cellulaire interne**. Cette compaction se fait à environ E2,5-E3. Au stade 32 cellules (E3,5), le blastocœle se forme : l'embryon est alors au stade **blastocyste**. Pendant 24h, le blastocyste va subir une maturation, pendant laquelle la **zone pellucide disparaît** et la masse cellulaire interne se différencie en **endoderme primitif** (du côté du blastocœle, qui participera à la formation des annexes extra-embryonnaire) et en **ectoderme primitif** (entre l'endoderme primitif et le trophectoderme, qui donnera l'embryon proprement dit). À E4,5, le blastocyste, dit alors tardif, est prêt à s'implanter.

Figure 16 : Le développement préimplantatoire murin *in vivo*

Adapté d'après (*Wang and Dey, 2006*).

Le contrôle de ces différenciations, d'abord en trophectoderme et masse cellulaire interne, puis de masse cellulaire interne en ectoderme et endoderme primitifs, se font notamment grâce à des **facteurs de transcription**, sous le contrôle de l'activation de certaines **voies de signalisation**, dont le rôle a été bien étudié par des expériences de reconstitution de blastocystes chimériques et par l'utilisation de souris invalidées (*Chen et al., 2010; Cockburn and Rossant, 2010*). Ainsi, dans les cellules situées sur l'extérieur du blastocyste, il existe une inhibition de la voie de signalisation Hippo, ce qui entraîne la translocation de Yap (Yes associated protein 1) dans le noyau. Yap peut alors interagir avec Tead4 (TEA domain family member 4) et ensemble, ils activent l'expression de **Cdx2** (Caudal type homeobox 2). Cdx2 inhibe ensuite **Oct4 et Nanog**. De plus la voie MAP kinase semble également participer à l'expression de *Cdx2* et à l'inhibition de *Nanog* dans ces cellules externes. À l'inverse, les cellules qui sont plus au centre ont une voie Hippo activée, ce qui entraîne la phosphorylation de Yap, et sa rétention dans le cytoplasme. L'ensemble aboutit à l'expression de *Nanog* et *Oct4* qui répriment l'expression de *Cdx2* (**Figure 17**). C'est ainsi que le trophectoderme et la masse cellulaire interne se différencient entre le stade 16 cellules et le stade blastocyste précoce (E3,5).

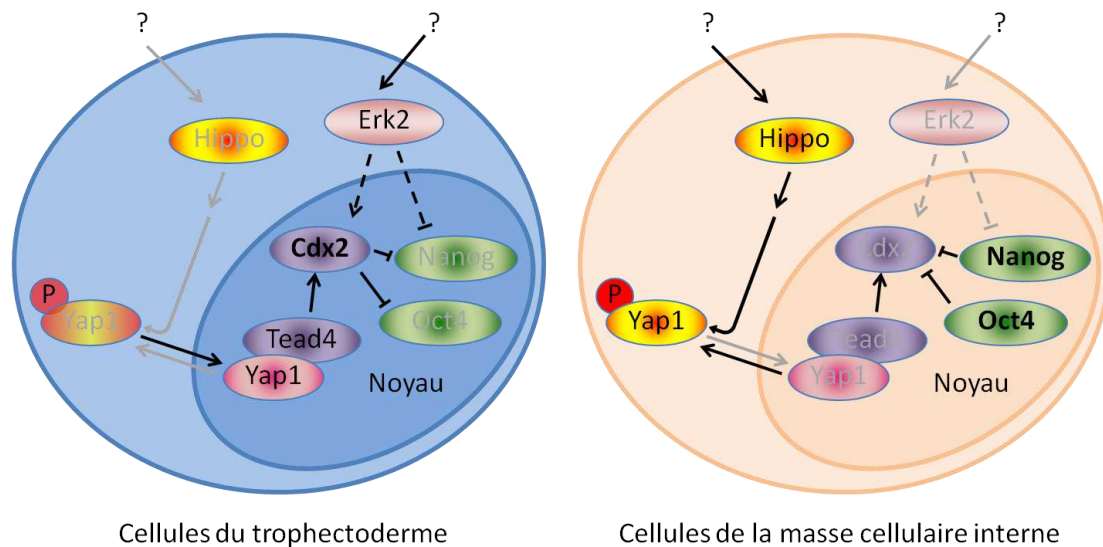


Figure 17 : Les bases moléculaires du premier lignage au sein du blastocyste

Réalisée d'après les données décrites dans (*Chen et al., 2010*).

La masse cellulaire interne se différencie ensuite en endoderme et ectoderme primitif, sous le contrôle de la voie de signalisation Fgf, qui active l'expression du facteur de transcription Gata6, marqueur de l'endoderme primitif, tandis que les cellules de l'ectoderme primitif expriment Nanog. Les mécanismes contrôlant ces destins cellulaires restent cependant très peu connus. Ils se déroulent à partir du stade 16 ou 32 cellules et sont achevés au stade blastocyste tardif (E4,5).

Eomes, codant un facteur de transcription homéotique, semble important pour conforter dans un second temps la différenciation du trophoctoderme (*Russ et al., 2000*).

Ces étapes du développement précoce dépendent également de mécanismes épigénétiques (modifications d'histones, méthylation de l'ADN, micro-ARN), qui pourraient même être en amont des mécanismes décrits ci-dessus. Les modifications épigénétiques ayant lieu au cours de ces étapes précoces ne seront pas décrites ici mais elles sont bien résumées dans la revue de (*Chen et al., 2010*).

2. L'endomètre et l'accueil du blastocyste

Pour qu'il y ait une gestation, il faut que le blastocyste puisse s'implanter au niveau de l'utérus maternel. Pour cela, l'endomètre utérin joue un rôle primordial. En effet, il doit être capable d'interagir avec le blastocyste afin d'initier son apposition et son adhésion, puis il

doit permettre l'invasion. Ces phénomènes ont lieu au cours de la phase de réceptivité (entre E4,0 et E5,0 chez la souris), pendant laquelle les cellules de l'**endomètre se décidualisent** (en changeant morphologiquement et fonctionnellement). Cependant, il est important de noter que cette phase de réceptivité a lieu à chaque cycle et qu'une partie des modifications la caractérisant a donc lieu en l'absence de fécondation et d'implantation. Par exemple, environ 4 jours après l'ovulation (ce qui correspond à la phase réceptive), un œdème stromal généralisé de l'endomètre entraîne l'obstruction de la lumière utérine, ce qui, en cas de fécondation, permettra un rapprochement entre le blastocyste et l'épithélium utérin. L'épithélium utérin dégénère ensuite de façon indépendante de la présence d'un blastocyste.

La réceptivité de l'utérus dépend principalement de signaux moléculaires induits par des **cytokines**, des **facteurs de croissance**, des **facteurs de transcription** (dont de nombreux homéotiques), des **protéines de signalisation** (morphogènes) et des **hormones**. L'ensemble de ces signaux permettent l'expression de **molécules d'adhésion** assurant l'interaction entre le blastocyste et l'utérus (*Wang and Dey, 2006*).

Les principales hormones qui contrôlent la réceptivité de l'utérus sont la **progestérone** (produite par les ovaires) et les **œstrogènes**. Leur action est médiée par leurs récepteurs ER (le récepteur de l'œstrogène) et PR (le récepteur de la progestérone), et en particulier par les isoformes ER α (*Lubahn et al., 1993*) et PR-A (*Lydon et al., 1995; Mulac-Jericevic et al., 2000*). Les études de souris invalidées suggèrent qu'ER α serait indispensable pour l'adhésion du blastocyste, mais pas pour la décidualisation de l'utérus (*Paria et al., 1999*). La progestérone est quant à elle nécessaire à l'obstruction de la lumière utérine, comme l'atteste l'absence de cette obstruction en cas d'invalidation de *Fkbp52*, une protéine co-chaperonne requise pour assurer la fonction utérine optimale du PR (*Tranguch et al., 2005*).

Parmi les cytokines, **LIF** (Leukemia Inhibitory Factor), un membre de la famille des interleukines 6, est crucial pour la préparation de l'utérus à l'implantation. Le gène *Lif* est exprimé dans les glandes utérines à E4,5 puis dans les cellules stromales entourant le blastocyste au moment de l'adhésion. Il permet donc de préparer l'utérus à l'implantation et participe à l'adhésion du blastocyste. En l'absence de LIF au niveau utérin (souris femelles *Lif*^{-/-}), le blastocyste ne s'implante pas (*Song et al., 2000; Stewart et al., 1992*).

Les gènes homéotiques **Hoxa10 et Hoxa11** codant des facteurs de transcription sont également importants pour l'implantation. Ils sont exprimés dans les cellules stromales

pendant la période de réceptivité et après l'implantation. L'invalidation de *Hoxa10* chez les femelles entraîne une hypofertilité avec une prolifération réduite des cellules stromales (Benson et al., 1996; Satokata et al., 1995), tandis que celle de *Hoxa11* entraîne une infertilité avec une absence d'expression de *Lif* au niveau utérin (Gendron et al., 1997). *Hmx3*, un autre membre de la famille *Hox* codant un facteur de transcription, semble également nécessaire puisque les blastocystes ne s'implantent pas dans un utérus *Hmx3*^{-/-}. Cependant la raison de cet échec reste mystérieuse car ce gène n'est exprimé qu'au niveau du myomètre utérin (Wang et al., 1998). *Msx1*, un autre gène homéotique, semble également important : il est exprimé au niveau utérin au cours de la période de réceptivité, et est éteint lorsque le blastocyste adhère à l'épithélium utérin. Cet extinction n'a pas lieu chez les souris *Lif*^{-/-}. Cependant, une étude plus poussée de son rôle va nécessiter la création d'une invalidation conditionnelle au niveau utérin, car les souriceaux n'ayant pas *Msx1* meurent rapidement après la naissance (Daikoku et al., 2004).

Les interactions entre l'embryon et l'utérus au cours de l'implantation activent des voies de signalisation semblables à celles ayant lieu au cours de l'embryogénèse. L'activation de ces voies se fait grâce à des morphogènes. Ainsi, les **voies hedgehog (HH), Wnt et BMP** (bone morphogenic protein) semblent jouer un rôle dans l'implantation. Les gènes codant les composants de la voie HH sont exprimés dans l'utérus : *Ihh* (Indian hedgehog), *Ptc* (Patched, le récepteur de cette voie) et les facteurs de transcription *Gli1*, *Gli2* et *Gli3* (Matsumoto et al., 2002; Takamoto et al., 2002). L'expression de *Ihh* est induite par la progestérone et atteint un pic à E4,5 dans les cellules épithéliales utérines, tandis que *Ptc*, *Gli1* et *Gli2* sont fortement exprimés dans le stroma sous-jacent. Concernant les voies Wnt et BMP, le gène *Sfrp4*, codant un antagoniste de la voie Wnt, membre de la famille des protéines sécrétées de type Frizzled (récepteur de la voie Wnt), et le gène *Noggin*, codant un anti-BMP, sont exprimés dans le stroma utérin au cours de la phase réceptive (Paria et al., 2001). *Wnt4* et *Bmp2* ne sont alors pas exprimés mais sont induits lors de l'adhésion du blastocyste, alors que l'expression des antagonistes disparaît. Ainsi, la voie HH semble intervenir dans la réceptivité de l'utérus, alors que les voies Wnt et BMP seraient plus impliquées dans l'adhésion du blastocyste et des événements post-implantatoires. De plus, *Wnt7a* est exprimé au niveau de l'épithélium utérin et son invalidation entraîne une infertilité, sans doute due à la désorganisation importante de la structure utérine observée (absence de glandes et un myomètre anormal), ainsi qu'à l'absence de l'expression de *Hoxa10* et *Hoxa11* (Parr and McMahan, 1998).

Au cours de la phase de réceptivité, l'épithélium utérin exprime aussi des facteurs de croissance, tel que **HB-EGF** (heparin-binding EGF-like growth factor). Ce facteur de croissance jouerait un rôle primordial dans l'adhésion du blastocyste grâce à l'interaction entre l'HB-EGF transmembranaire exprimé par l'épithélium utérin et ses récepteurs ErbB1 et ErbB4 exprimés par le blastocyste. De plus, cette interaction semble induire une boucle d'auto-induction en entraînant l'expression de HB-EGF par le blastocyste et les récepteurs au niveau de l'épithélium utérin (*Das et al., 1994*).

Des molécules d'adhésion sont exprimées au niveau de l'épithélium utérin lors de la phase de réceptivité : elles sont indispensables à l'implantation. Les plus importantes sont les **intégrines**, les **sélectines** (qui lient les carbohydrates), les **galectines** (famille de lectines qui ont la capacité de lier le galactose), les HSPG (heparan sulfate proteoglycans), la mucin-1 et les **cadhérines** (*Wang and Dey, 2006*). La glycoprotéine mucine 1 (Muc-1) semble ainsi jouer un rôle dans la réceptivité : en effet, elle est fortement exprimée dans l'épithélium utérin avant la phase de réceptivité mais est éteinte à E4,0 (*Braga and Gendler, 1993*). Cependant, les souris déficientes pour *Muc-1* sont fertiles, ce qui indique que son rôle n'est pas primordial (*Spicer et al., 1995*). Il faut cependant noter que certaines protéines peuvent jouer un rôle important, sans que leur absence soit pour autant responsable d'une infertilité, cette absence peut en effet causer une hypofertilité (avec une taille de portée réduite), qui n'est pas toujours recherchée ou signalée.

L'adhésion puis la pénétration du blastocyste entraîne au niveau utérin une augmentation de la perméabilité membranaire. Ce phénomène implique l'action de **prostaglandines**, qui sont synthétisées au niveau utérin par la **cyclo-oxygénase PTGS2** (pour prostaglandin-endoperoxide synthase 2, aussi dénommée COX2), une protéine exprimée dans l'épithélium utérin, là où le blastocyste adhère, et dans les cellules stromales sous-jacentes. Les souris invalidées pour *Ptgs2* sont infertiles (*Lim et al., 1997a*).

Les cellules immunitaires présentes au sein de l'utérus jouent également un rôle crucial pour l'implantation, le développement placentaire, et l'absence de rejet de l'hémi-allogreffe que constitue le fœtus (voir partie V-3). Ainsi, les **cellules natural killer utérines (uNK)** seraient essentielles au remodelage des artères spiralées utérines (*Charalambous et al., 2012*). Les **cellules dendritiques (DCs)**, pour Dendritic Cells, et en particulier les DCs exprimant le récepteur de chimiokine CXCR4, jouent également un rôle, notamment en

favorisant l'angiogénèse (*Barrientos et al., 2012*). De plus, les DCs influenceraient la prolifération et la fonction des uNK (*Karsten et al., 2009*).

3. L'implantation et le développement du placenta

L'implantation se décompose en 3 phases : l'apposition, l'adhésion et la pénétration. Pendant **l'apposition**, le trophoctoderme du blastocyste se rapproche fortement de l'épithélium bordant la lumière utérine. Au cours de **l'adhésion**, l'association entre le trophoctoderme et l'épithélium utérin est suffisamment forte pour que le blastocyste résiste à un flux de liquide (« flush ») au niveau de la lumière utérine. Cette adhésion commence le soir à E4,5 et se caractérise par une augmentation de la perméabilité vasculaire localisée au niveau du stroma, là où le blastocyste adhère. Elle se fait au niveau du trophoctoderme mural, c'est-à-dire à l'opposé de la masse cellulaire interne. De plus, l'adhésion du blastocyste entraîne la formation d'une **crypte (Figure 18)**. La **pénétration** implique une invasion du tissu utérin par l'embryon. À ces stades d'adhésion et de pénétration, la décidualisation a lieu de façon intensive. Il y a ainsi une perte de l'épithélium au niveau de la lumière utérine et les cellules « moribondes » sont phagocytées par les trophoblastes, ce qui favorise la pénétration.

Figure 18 : L'implantation chez la souris

Adapté d'après (*Nagy, 2003*).

Les cellules du trophoctoderme mural (en contact avec le tissu utérin) deviennent des **cellules trophoblastiques géantes (TGCs**, pour Trophoblast Giant Cells). Ces cellules arrêtent de se diviser mais continuent de répliquer leur ADN (endoréplication) et deviennent ainsi **polyploïdes**. À l'opposé, les cellules du trophoctoderme polaire prolifèrent dans plusieurs directions. Certaines cellules vont migrer autour de l'embryon ainsi que vers la lumière utérine, et devenir des TGCs polyploïdes (ce qui fait que l'ensemble de l'embryon est entouré de ces cellules géantes). La décidualisation est influencée et stimulée par les sécrétions de ces TGCs (*Bany and Cross, 2006*). La nature invasive de ces cellules trophoblastiques géantes semble associée à leur synthèse de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), ainsi qu'à la synthèse de métalloprotéases et de leurs inhibiteurs (*Strickland and Richards, 1992*). D'autres cellules du trophoctoderme polaire vont proliférer vers le centre du blastocyste et former **l'ectoderme extra-embryonnaire** (diploïde), poussant

ainsi les dérivés de la masse cellulaire interne vers le blastocœle. Enfin, des cellules du trophoctoderme polaire vont donner le **cône ectoplacentaire** (cellules diploïdes), entre l'ectoderme extra-embryonnaire et les cellules trophoblastiques géantes (**Figure 19**). Pendant ce temps, le sac vitellin s'est mis en place à partir de l'endoderme primitif, il s'accôle aux trophoblastes et l'ensemble forme un placenta chorio-vitellin qui permet de récupérer des nutriments à partir du sang maternel. Cependant, ces échanges sont très limités, et la mise en place du placenta chorio-allantoïdien est nécessaire pour assurer la croissance fœtale de la mi-gestation au terme.

Figure 19 : Le développement du placenta murin

Adapté d'après (*Cockburn and Rossant, 2010; Rossant and Cross, 2001; Watson and Cross, 2005*).

À E6,5-E7,5, du cône ectoplacentaire dérivent trois types de cellules : des TGCs particuliers, des spongiotrophoblastes, et des cellules à glycogène que l'on retrouvera dans la **zone jonctionnelle**. Il existe ainsi plusieurs types de TGCs avec des origines distinctes et des profils d'expression spécifiques, qui leur confèrent différents rôles (**Figure 20**). Certaines de ces TGCs (exprimant *Pl2c2*, codant la Proliférine) envahissent l'utérus au niveau des artères spiralées utérines au début de la période post-implantatoire. Ces trophoblastes péri/endovasculaires sont détectés à seulement 150-300 µm au-dessus de la couche principale de TGCs (*Adamson et al., 2002*).

Les cellules à glycogène dérivent de précurseurs présents dans la partie extérieure du cône ectoplacentaire dès E7,5. On peut les repérer grâce à leur expression spécifique de *pcdh12* (codant la protocadhérine 12) et de *Gjb3* (codant la connexine 31). Ces cellules sont caractérisées par la présence de vacuoles gorgées de glycogène, l'accumulation de glycogène s'effectuant petit à petit pour être facilement détectable à E10,5-E12,5. Entre E7,5 et E8,5, les cellules à glycogène sont à la bordure de l'espace sanguin maternel (en contact avec le sang), avec les TGCs (*Tesser et al., 2010*). Les cellules à glycogène ont également des capacités invasives. En effet, après E12,5, on détecte une invasion interstitielle de la décidue par ces cellules (qui expriment *Tpbpa*). Cela coïncide avec une **dilatation des artères spiralées** que l'on peut observer entre E10,5 et E14,5, associée à une perte de la tunique élastique et des cellules musculaires lisses. Ces modifications sont également visibles au niveau du triangle métrial (zone de l'endomètre située au-dessus du placenta, où se concentrent les artères

utérines), loin de l'invasion par des trophoblastes. Cependant, on ne sait pas quelle est la contribution des cellules à glycogène, des TGCs ou des uNK dans ce phénomène. Entre E12,5 et E16,5, les cellules à glycogène prolifèrent énormément (x80). On les retrouve majoritairement dans la zone jonctionnelle, mais une partie est retrouvée au niveau de la décidue maternelle (comme mentionnée ci-dessus). Le(s) rôle(s) de ces cellules reste(nt) à définir. Une hypothèse serait qu'elles libèrent du glucose dans le sang maternel qui irrigue le labyrinthe à la fin de la gestation, permettant ainsi d'assurer les énormes besoins fœtaux durant cette période de croissance intensive (Coan et al., 2006).

Les spongiotrophoblastes ont principalement un rôle structural (de soutien pour le labyrinthe) et endocrine (voir partie V-2). Leur nombre triple entre E12,5 et E16,5. Ils expriment de façon spécifique *Prl8a8* (*prolactin family 8, subfamily a, member 81*). La zone jonctionnelle se développe ainsi jusqu'à E16,5 puis régresse jusqu'à la naissance.

Figure 20 : Les lignages trophoblastiques et l'origine des différents types de TGCs
Adapté d'après (Simmons et al., 2007).

Les vaisseaux sanguins du labyrinthe dérivent de l'**allantoïde** (mésoderme extra-embryonnaire), vers E8. L'ectoderme extra-embryonnaire donnera les **trophoblastes chorioniques** qui seront présents au sein du **labyrinthe**. À E8,5, l'allantoïde et le chorion fusionnent au cours de l'**attachement chorio-allantoïdien**. Peu après, le chorion commence à former des villosités (E9,0), dans lesquelles se développent les vaisseaux allantoïdiens. Les trophoblastes chorioniques se différencient alors en deux types cellulaires : le **syncytiotrophoblaste** (multinucléé, dérivant de la fusion de trophoblastes), qui entoure l'endothélium du capillaire fœtal, et les **trophoblastes mononucléés** du côté du sang maternel. Le placenta murin est **hémotrichorial** car les vaisseaux fœtaux sont entourés de 2 couches de syncytiotrophoblaste et une couche de trophoblastes mononucléés. Les villosités vascularisées se développent et s'entremêlent pour former le **labyrinthe**. Le placenta chorio-allantoïdien est ainsi formé à E10,5. Contrairement à la zone jonctionnelle, le labyrinthe devient de plus en plus large et de plus en plus connecté jusqu'à la naissance (E19,5-E20,5).

Le réseau vasculaire au sein du placenta a été bien étudié (Adamson et al., 2002). Ainsi, chaque artère radiale maternelle se ramifie en 5 à 10 artères spiralées dilatées que l'on

trouve au niveau du triangle métrial peuplé de cellules uNK et de cellules déciduales. Ces **artères spiralées** convergent au niveau de la couche de TGCs et le sang maternel est vidé dans des « canaux » délimités par des trophoblastes. Au sommet de ces canaux, l'endothélium maternel est remplacé par des TGCs. Ces canaux traversent la zone jonctionnelle et conduisent le sang maternel à la base du placenta (en bas du labyrinthe). Le sang maternel circule alors dans l'espace intervilleux du labyrinthe jusqu'au côté maternel (où il repart via des sinus veineux), en contre-courant par rapport au flux sanguin des capillaires fœtaux (**Figure 21**). Ce type de **circulation à contre-courant** permet de maximiser les échanges (*Rossant and Cross, 2001; Watson and Cross, 2005*).

Figure 21 : Les circulations sanguines maternelle et fœtale à contre-courant au cours de la gestation chez la souris

Adapté d'après (*Adamson et al., 2002*).

Les TGCs et le spongiotrophoblaste produisent des hormones (voir partie V-2), des facteurs angiogéniques, tels que la proliférine (codée par le gène *Prl2c2*) et le VEGF, et des facteurs de remodelage, tels que les MMPs et l'uPA (*Rossant and Cross, 2001*).

4. Les gènes du développement placentaire

L'étude de mutants a permis de trouver des gènes importants pour le développement placentaire. Ainsi, la différenciation des TGCs est sous la dépendance du gène ***Hand1*** codant un facteur de transcription de la famille bHLH (basic Helix Loop Helix) (*Riley et al., 1998*).

La différenciation du cône ectoplacentaire et de l'ectoderme extra-embryonnaire dépend de ***Fgf4*** produit par les cellules de l'ectoderme primitif sous-jacent (*Chai et al., 1998*).

Concernant le remodelage des artères spiralées utérines, les TGCs et/ou les cellules à glycogène ont récemment été montrées comme indispensables ; en effet, induire la mort des cellules exprimant *Tpbpa* (*trophoblast specific protein alpha*) entraîne une perte de ces cellules et un remodelage altéré (avec un diamètre des artères réduit) (*Hu and Cross, 2011*). Cependant le contrôle de la différenciation de ces types cellulaires reste à élucider.

La formation des spongiotrophoblastes nécessite l'expression d'**Egfr** (*Epidermal growth factor receptor*) (Threadgill et al., 1995). Le gène *Ascl2* (*achaete-scute complex homolog-like 2*, aussi appelé *Mash2*, codant un facteur de transcription soumis à empreinte parentale de la famille des bHLH (beta Helix-loop-helix)) est également essentiel (Guillemot et al., 1994; Tanaka et al., 1997). En effet, les souris invalidées pour *Ascl2* n'ont pas de spongiotrophoblastes. D'autres gènes semblent importants pour limiter le développement de la zone jonctionnelle; en effet, les souris invalidées pour *Phlda2* (*Pleckstrin homology domain family A member 2*, un gène soumis à empreinte à expression maternelle) ou *Csf2* (*Colony stimulating factor 2*) ont un développement accru de la zone jonctionnelle (Frank et al., 2002; Robertson et al., 1999; Sferruzzi-Perri et al., 2009), soit en agissant plutôt sur les spongiotrophoblastes (*Phlda2*), soit plutôt sur les cellules à glycogènes (*Csf2*). À l'inverse, une transgénèse additive de *Phlda2* entraîne une zone jonctionnelle réduite (Tunster et al., 2010), sans altérer le nombre de cellules à glycogène qui se retrouve notamment dans le labyrinthe et dont la fonction est perturbée, ce qui semble indiquer que le microenvironnement joue un rôle dans leur capacité à stocker du glycogène.

Foxf1 et la **voie BMP** semblent essentiels au développement de l'allantoïde. Les récepteurs **Errβ** (orphan nuclear receptor β) et **Fgfr2** (fibroblast growth factor receptor 2) sont importants pour le développement des trophoblastes chorioniques. L'attachement chorio-allantoïdien est partiellement dépendant de **Vcam1** (exprimé par l'allantoïde) et de son ligand **l'intégrine α4** (exprimée par le chorion). Pour le développement des villosités, **Gcm1** est crucial et il participe également à la différenciation des trophoblastes chorioniques en syncytiotrophoblastes (Anson-Cartwright et al., 2000). Le développement des villosités et leurs vascularisations font intervenir la **voie Notch**, comme l'attestent leurs absences dans les mutants de cette voie (Duarte et al., 2004; Krebs et al., 2000).

Pour le développement du labyrinthe, de nombreux gènes ont été impliqués, avec chez les mutants, la description d'un labyrinthe sous-développé ou simplement « petit ». Ces défauts apparaissant soit très tôt au cours du développement du labyrinthe et entraînant une mort *in utero* vers E10,5-E12,5, soit plus tardivement avec une mort en fin de gestation ou périnatale. Cette mortalité est toujours liée à des échanges métaboliques insuffisants. La ressemblance entre les phénotypes des mutants d'une même voie de signalisation a permis de déterminer quelles voies sont essentielles au développement du labyrinthe : **les voies Fgf** (Xu et al., 1998), **Egf** (Threadgill et al., 1995), **Notch** (Krebs et al., 2000), **Lif** (Ware et al.,

1995), **Pdgfb** (Ohlsson *et al.*, 1999), **Wnt** (Monkley *et al.*, 1996), et celle des **MAPK** (Mitogen-activated protein kinases : MEK, Erks). En plus de ces voies de signalisation, des récepteurs nucléaires sont également cruciaux : en particulier, **les récepteurs X aux rétinoïdes** (RXR) qui peuvent se dimériser avec plusieurs partenaires tels que les **récepteurs de l'acide rétinoïque** (RARs) ou le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (**PPAR**) (Barak *et al.*, 1999; Wendling *et al.*, 1999). Arnt (Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, aussi appelé **Hif-1β**), qui se dimérise avec Hif-1α en réponse à l'hypoxie, est également essentiel au développement du labyrinthe (Kozak *et al.*, 1997). Cela a permis de mettre en évidence le rôle déterminant de la concentration en oxygène dans le développement placentaire.

Il peut également y avoir des anomalies au niveau du développement vasculaire fœtal (cependant, il faut noter qu'un développement anormal du labyrinthe entraînera forcément un développement restreint des vaisseaux qui se trouvent au sein de ces villosités peu développées). Dans le cas des mutants pour le gène *Esx1*, qui code pour un facteur de transcription homéotique, le développement des villosités semble normal, mais les vaisseaux ne s'y développent que très peu (Li *et al.*, 1997). Pourtant, ce gène est exprimé dans les trophoblastes, ce qui indiquerait que les trophoblastes envoient un signal nécessaire à la vascularisation des villosités. Ce signal reste cependant inconnu. À noter, les placentas déficients pour *Esx1* sont plus gros que les placentas contrôles, ce qui pourrait être un mécanisme de compensation permettant d'augmenter les capacités d'échanges. Des **mécanismes de compensation** de ce type pourraient être un phénomène plus général en cas d'anomalie du développement placentaire, puisqu'il est également observé dans d'autres mutants (Wu *et al.*, 2003).

Ces études soulignent également **l'importance que revêt le développement placentaire pour la croissance fœtale**. Par exemple, *JunB* (un facteur de transcription de la voie AP1) joue un rôle dans la régulation de gènes cibles impliqués dans l'implantation et le développement placentaire. La délétion homozygote de *JunB* chez la souris provoque la mort de l'embryon avec un **retard de croissance important**, sans modification apparente du potentiel prolifératif de l'embryon lui-même (Schorpp-Kistner *et al.*, 1999). Les embryons déficients pour le gène *JunB* présentent une anomalie de la répartition des cellules trophoblastiques et une forte diminution de l'expression de gènes spécifiques, indispensables à l'implantation, tels que ceux de la *Prl2c2* (*proliférine*), de la *MMP-9* et de l'*uPA*. Les

structures vasculaires du placenta sont présentes, mais les vaisseaux n'ont pas pénétré dans le trophoblaste labyrinthique. En conséquence, les échanges avec le sang maternel ne se font pas.

Les **gènes soumis à empreinte** constituent une autre catégorie de gènes particulièrement importants pour le développement placentaire et la croissance fœtale. Les gènes soumis à empreinte sont des gènes exprimés d'une manière monoallélique dépendante de l'origine parentale, grâce à des mécanismes épigénétiques qui éteignent soit l'allèle paternel, soit l'allèle maternel. Ils sont largement exprimés dans les tissus fœtaux et placentaires et sont essentiels pour le développement physiologique du placenta. En général, les gènes exprimés à partir des allèles paternels favorisent la croissance fœto-placentaire, tandis que les gènes exprimés à partir des allèles maternels limitent cette croissance. Les conséquences placentaires de défauts d'expression de ces gènes sont bien détaillées dans plusieurs revues (*Coan et al., 2005; Fowden et al., 2006, 2011; Hemberger, 2007*). Cependant, des approches bioinformatiques suggèrent que l'ensemble des gènes soumis à empreinte n'a pas encore été découvert, ni chez la souris, ni chez l'homme. Ainsi, leur recherche constitue un enjeu majeur dans la compréhension du développement placentaire et son contrôle. Une étude récente utilisant une approche à haut débit a d'ailleurs permis de découvrir de nouveaux gènes soumis à empreinte dans l'espèce humaine (*Barbaux et al., 2012*).

En conclusion, la mise en place du placenta murin est complexe, et contrôlée par de nombreux signaux issus des cellules dérivées de la masse cellulaire interne et des signaux issus de l'endomètre utérin. Le blastocyste fournit également des signaux qui vont notamment modifier les cellules déciduales, il y a donc une **véritable communication entre les deux organismes**. Le bon déroulement de ce développement est essentiel pour la génération de nouveaux individus. Les anomalies de ce développement peuvent avoir des conséquences lourdes (létalité, retard de croissance). Cependant, des mécanismes de compensation existent, c'est pourquoi les mutations de gènes clés n'induisent pas toujours une infertilité ou une létalité.

V. Les fonctions placentaires

1. Assurer la croissance fœtale

Le principal rôle du placenta est sans conteste d'assurer la croissance fœtale. Ceci se fait grâce à de nombreux échanges entre la circulation sanguine maternelle et la circulation fœtale via la barrière hémato-placentaire (**Figure 22**). Les mécanismes impliqués sont similaires entre le placenta humain et murin. La différence réside dans l'épaisseur de cette barrière placentaire : 4,4 μm pour le placenta murin à E18,5 (*Coan et al., 2004*) et 2 μm pour le placenta humain à terme. Cette différence est bien entendu liée aux nombre de couches cellulaires séparant le sang fœtal du sang maternel : 4 couches chez la souris (endothélium fœtal, deux couches de syncytiotrophoblaste, et une couche de trophoblastes mononuclées), contre 2 couches chez l'humain (endothélium fœtal et syncytiotrophoblaste). Ces échanges se font par les divers mécanismes classiques de transports membranaires. On distingue les **échanges passifs** (transport par diffusion, osmose ou transport facilité) et **actifs** (transport actif et vésiculaire), selon qu'ils nécessitent ou non un apport d'énergie.

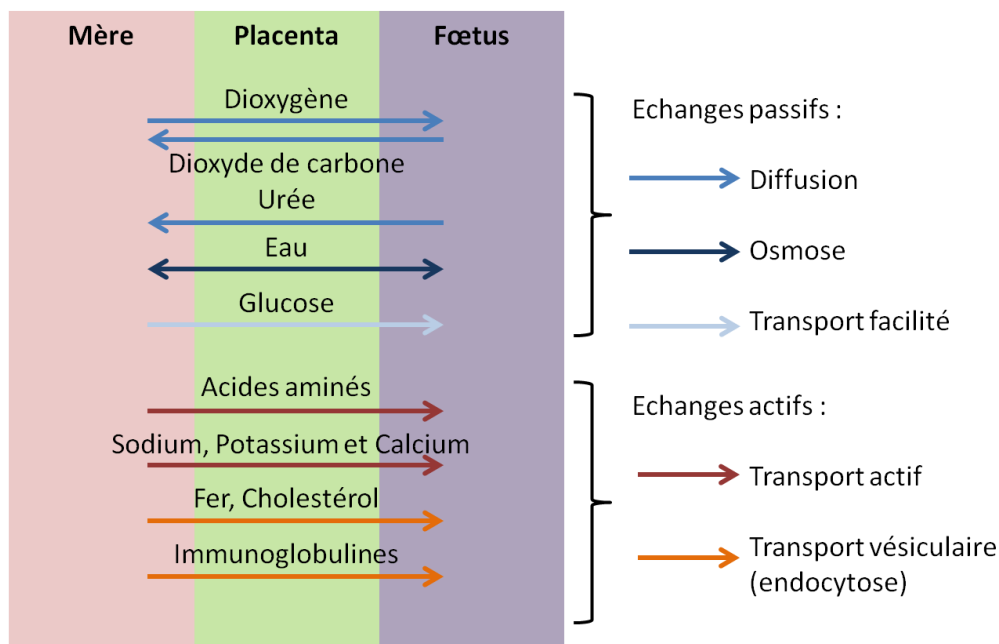


Figure 22 : Les principaux échanges fœto-maternels

Les molécules non polaires et liposolubles suivent un gradient de concentration en passant de la zone plus concentrée à la zone moins concentrée et ceci jusqu'à l'état d'équilibre,

sans consommation d'énergie : c'est le transport par **diffusion**. C'est ainsi que passe le dioxygène et le dioxyde de carbone. Le placenta joue donc le rôle de « **poumon fœtal** ». Cependant, chez l'humain, on estime qu'il est 15 fois moins efficace (à poids tissulaire équivalent) que le poumon réel.

C'est l'**osmose** qui permet la diffusion d'un solvant à travers une membrane à perméabilité sélective comme la membrane plasmique. L'**eau** fortement polaire ne peut traverser la bicouche lipidique des membranes plasmiques, mais elle peut en revanche diffuser à travers les pores de ces membranes, formés par des **aquaporines** (protéines membranaires responsables du transport de l'eau).

Enfin, parmi les échanges passifs, il y a également le **transport facilité**, c'est-à-dire qui nécessite la présence d'une molécule porteuse (une protéine canal sélective ou un transporteur). Cette protéine peut utiliser un couplage aux flux d'un type d'ion, ou simplement fonctionner par un changement de conformation lors de la fixation de la protéine à transporter (qui va entraîner la protéine de l'autre côté de la membrane plasmique). C'est ce type de transport qui permet au **D-glucose** (principale source d'énergie pour le fœtus) de passer la barrière placentaire. Chez l'humain, la glycémie fœtale est égale aux 2/3 de la glycémie maternelle, aussi est-elle fonction de cette dernière. De plus, le placenta est capable de synthétiser et de stocker du glycogène (au niveau du trophoblaste) afin d'assurer les besoins locaux en glucose (par glycogénolyse). Il faut noter que des modifications importantes du métabolisme des hydrates de carbone surviennent au cours de la grossesse, pour satisfaire notamment aux besoins du fœtus et préparer à la lactation. La grossesse est ainsi dite « diabétogène » pour la mère en raison de la diminution de la sensibilité tissulaire à l'insuline. Chez l'humain, la sensibilité tissulaire à l'insuline peut être réduite jusqu'à 80% au niveau des tissus. Cet effet s'explique partiellement par l'accroissement d'antagonistes spécifiques de l'insuline, dont le plus important est l'hormone placentaire lactogène (hPL, voir le placenta endocrine).

Le **transport actif** permet le passage de molécules à travers les membranes cellulaires contre leurs gradients de concentration, et ceci grâce à un apport d'énergie, généralement l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP). C'est ainsi que le sodium, le calcium et le potassium sont apportés au fœtus. Les peptides et les **acides aminés** passent également par transport actif et permettent ainsi au fœtus d'assurer sa propre synthèse protéique.

Enfin, certaines macromolécules passent la barrière placentaire grâce au **transport vésiculaire** (endocytose et exocytose). Cela permet notamment le transfert de protéines maternelles qui pourront être dégradées et ainsi augmenter l'apport en acide aminé. L'**endocytose** peut être sélective grâce à des récepteurs spécifiques situés sur la surface des villosités placentaires ; c'est ainsi que le **fer** (via la transferrine), le **cholestérol** et certaines **immunoglobulines** (de type IgG) arrivent au fœtus.

Les transferts placentaires concernent également **l'élimination des déchets** du métabolisme fœtal qui sont rejetés dans le sang maternel puis éliminés (urée, acide urique, créatinine). En ce sens, le placenta joue le **rôle de rein** pour le fœtus.

Ces échanges se font sous l'effet d'**hormones** et de facteurs de croissance, tels que l'hormone de croissance placentaire (PLGF, pour placental Growth Factor) et le facteur de croissance apparenté à l'insuline IGF (pour Insuline-like Growth Factor) et ne font que s'accroître au cours de la grossesse, notamment grâce à l'augmentation de la surface d'échange placentaire, qui passe de 5 m² à 28 semaines, à environ 12 m² dans le placenta humain à terme.

2. Rôle endocrine et sécrétoire

Le placenta est responsable de nombreuses sécrétion d'hormones et de facteurs de croissance. Cependant, la nature de ces sécrétions et leur origine diffèrent entre les placentas humain et murin. La sécrétion hormonale peut être orientée de façon spécifique dans la circulation maternelle et/ou la circulation fœtale. Par des effets autocrines et/ou paracrines, ces hormones jouent un rôle crucial dans l'adaptation de l'organisme maternel à la grossesse, dans le maintien de la gestation, dans la croissance et le développement du fœtus ainsi que le mécanisme de déclenchement de l'accouchement à terme. Il faut rappeler que dans l'espèce humaine, les signaux de la parturition sont encore inconnus (ils ne seront pas développés dans cette thèse).

i. La sécrétion hormonale par le placenta humain

Chez l'humain, c'est le syncytiotrophoblaste qui peut être assimilé à une volumineuse glande endocrine. Il synthétise en effet de nombreuses **hormones stéroïdes et polypeptidiques**.

Les principales hormones polypeptidiques sont l'**hCG (hormone chorionique gonadotrope humaine)**, l'**hPL (hormone lactogène placentaire**, aussi appelée hCS pour hormone chorionique somatomammotrophique) et l'**hormone de croissance placentaire (GH placentaire)**. L'hCG est sécrétée très tôt au cours de la grossesse (dès 7 jours après la fécondation) et elle permet la transformation du corps jaune ovarien cyclique en corps jaune gravidique, qui assure ainsi le maintien de la sécrétion de progestérone. Elle joue également un rôle dans la différenciation de cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste (*pour revue, Malassiné et al., 2010*). L'hPL préparerait l'organisme maternel pour la lactation en induisant la prolifération et la différenciation des cellules de la glande mammaire. La GH placentaire, une isoforme de l'hormone de croissance hypophysaire spécifiquement exprimée au niveau placentaire, aurait un rôle majeur dans la croissance fœtale et le contrôle du métabolisme maternel, en particulier en modulant la sécrétion maternelle d'IGF-1. En effet, elle est fortement sécrétée en cas de glycémie maternelle élevée, et permet le maintien d'un apport énergétique au fœtus, en inhibant notamment la captation du glucose au niveau musculaire. Le syncytiotrophoblaste produit également de la leptine, qui est connue pour ses rôles dans la stimulation de la sécrétion d'insuline, la captation du glucose et l'oxydation des acides gras. Le taux sérique maternel de leptine augmente au cours de la grossesse ; la leptine jouerait ainsi un rôle pour induire la faim chez la mère, permettant ainsi un apport calorique suffisant au fœtus (*Newbern and Freemark, 2011*).

Le syncytiotrophoblaste est également responsable de la synthèse d'hormones stéroïdes. Ainsi, il synthétise de la **progestérone** à partir du cholestérol circulant maternel, et ce, dès 6 semaines de grossesse, stade à partir duquel les enzymes de la stéroïdogénèse y sont exprimées. La progestérone joue un rôle capital dans le maintien au repos du myomètre (muscle lisse utérin), indispensable au bon déroulement de la grossesse et participe au mécanisme de la parturition (*Mesiano et al., 2011; Petraglia et al., 1998; Sfakianaki and Norwitz, 2006*). Les **œstrogènes** ont des fonctions diverses comme la stimulation de la prolifération des cellules de l'endomètre et de la différenciation des syncytiotrophoblastes. Il est cependant important de noter que contrairement aux autres organes stéroïdogéniques, le

placenta humain n'exprime pas le cytochrome P450 17A1, et ainsi ne peut convertir la progestérone en androgènes, substrats de la synthèse des œstrogènes. La synthèse d'œstrogènes par le syncytiotrophoblaste dépend donc d'un précurseur androgène, le sulfate de déhydroépiandrosterone (DHEAS), produit par les surrénales maternelle et fœtale.

ii. La sécrétion hormonale par le placenta murin

Dans le placenta murin, ce sont les cellules trophoblastiques géantes (TGCs) et les spongiotrophoblastes qui sont responsables de la synthèse hormonale. Les principales hormones polypeptidiques produites sont les **prolactines PL** (aussi appelées Placental lactogène), et les **prolactine-like PLP**. Il s'agit d'une famille de gènes qui contient 23 membres, dont 22 ne sont exprimés que dans le placenta (la 23^{ème} étant la prolactine hypophysaire). Les PL sont synthétisées par les TGCs rapidement après l'implantation (PL1) et jusqu'au terme de la gestation (PL2 à partir de la mi-gestation). Elles ont un rôle dans le développement des glandes mammaires, supportent également la production de progestérone et favorisent la production d'insuline. Les PLP peuvent être synthétisées par les TGCs (PLP-E) ou par les spongiotrophoblastes (PLP-F). Elles favorisent l'hématopoïèse (*Hu and Cross, 2010*). Les TGCs sécrètent également la **progestérone**, dont le rôle dans la parturition chez la souris est bien établi : on observe en effet une chute de cette hormone au moment de la parturition. Sa présence est indispensable au maintien de la gestation ; ainsi, son administration retarde la mise bas alors que son antagoniste (le RU486) est suffisant pour induire la délivrance (*Dudley et al., 1996*).

iii. La sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines

Le placenta (chez la souris et chez l'humain) synthétise également un grand nombre de **facteurs de croissance et de cytokines**, qui sont impliqués dans le remodelage vasculaire utérin et la croissance fœto-placentaire (*Hu and Cross, 2010; Murphy et al., 2006*). Ainsi, le placenta humain produit de l'EGF, du TGF- β , du VEGF, du PlGF, de l'interleukine 1 (IL-1), du LIF et du TNF- α (*Staun-Ram and Shalev, 2005*). Le placenta murin produit du TGF- β (*Wu et al., 2008*) et les TGCs, en particulier, synthétisent du VEGF et du PlGF. Les TGCs sécrètent également des cytokines, tels que la proliférine et l'interféron γ (IFN γ) (*Hu and Cross, 2010*).

iv. Autres types de sécrétions

Le placenta (humain, comme murin) produit également une autre famille de protéines : les **Pregnancy Specific Glycoproteins (PSG)**, qui ont un rôle important dans le remodelage vasculaire et pour la fonction immunosuppressive du placenta (*Snyder et al., 2001*). Ainsi, la PSG22 produite par les TGCs a été montrée récemment comme modulant l'angiogénèse chez la souris (*Blois et al., 2012*).

Le syncytiotrophoblaste du placenta humain, les TGCs et les spongiotrophoblastes du placenta murin expriment également la **thrombomoduline**, une protéine qui a un effet anticoagulant sur le sang maternel (*Fazel et al., 1998; Hu and Cross, 2010*).

3. Induire une tolérance immunologique

i. L'unité fœto-placentaire : une héli-allogreffe

Le fœtus et le placenta constituent pour la mère une **greffe semi-allogénique**, c'est-à-dire une greffe entre deux individus de même espèce, génétiquement différents pour moitié. L'absence de rejet du fœtus au cours de la grossesse constitue donc un paradoxe. En effet, dès la naissance, la mère rejettera toute greffe tissulaire provenant de son enfant, alors qu'elle avait accepté cette « allogreffe naturelle » pendant plusieurs mois. Pour que le fœtus ne soit pas rejeté, la mère doit développer une **tolérance**. Cette tolérance est initiée au niveau du placenta puisque **seules les cellules trophoblastiques sont au contact du système immunitaire maternel**. Elle s'appuie sur **deux mécanismes** : la faible immunogénicité du placenta et une **adaptation transitoire du système immunitaire maternel**.

La **faible immunogénicité du placenta** est établie grâce à l'expression par les trophoblastes d'une assez faible diversité de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC, un complexe de gènes codant des molécules de surface cellulaire qui sont notamment nécessaires pour la présentation des antigènes aux cellules T, **Tableau 1**), ce qui permet une reconnaissance espèce-spécifique, mais limiterait la reconnaissance individu-spécifique, et donc empêcherait un rejet.

MHC humain (chromosome 6)	MHC murin (chromosome 17)
Molécules de classe I : présentent des peptides issus de l'intérieur des cellules (peptides viraux par exemple), aux lymphocytes T CD8, et régulent les cellules NK. Très polymorphes En gras : les molécules exprimées par les trophoblastes	
Classiques (classe Ia): HLA-A, HLA-B, HLA-C Non classiques (classe Ib) : HLA-E , HLA-F, HLA-G	Classiques : H2-K , H2-D, H2-L Non classiques : H2-Q , H2-T, H2-M
Molécules de classe II : exprimées sur les cellules présentatrices d'antigènes. Elles présentent des antigènes circulants aux lymphocytes T CD4, qui vont proliférer et stimuler la production d'anticorps spécifiques de ces antigènes par des lymphocyte B. Moins polymorphe	
DP, DM, DOA, DOB, DQ, DR	H2-I-A, H2-I-E
Molécules de classe III : le système du complément	
C1 à C9, récepteurs...	

Tableau 1 : Les complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) humain et murin

Réalisé d'après (*Penn and Ilmonen, 2001; Stuart, 2001*).

ii. La tolérance immunitaire de l'unité fœto-placentaire chez l'humain

Les trophoblastes humains n'expriment **pas de molécules HLA** (HLA étant le nom donné au MHC humain) **de classe II**, ni les molécules très polymorphiques de classe I, HLA-A et HLA-B, qui seraient susceptibles d'être reconnues comme allo-antigènes par les lymphocytes T CD8 maternels. Les trophoblastes humains portent uniquement des molécules de **classe I classiques HLA-C** et non classiques (peu polymorphes) **HLA-G et HLA-E** (*Juch et al., 2012*).

Le **HLA-C** (la catégorie la moins polymorphe des molécules de classe I classiques) est exprimé par les cytotrophoblastes extravilleux mais à un faible niveau et sa stabilité semble réduite, ce qui compromettrait sa reconnaissance par les lymphocytes T. De plus, les molécules HLA-C étant des ligands de plusieurs récepteurs inhibiteurs des cellules uNK (récepteurs KIR, Killer-cell immunoglobulin-like receptor), leurs présences empêcheraient les cellules uNK de devenir cytotoxiques (*Hiby et al., 2004*).

Concernant la molécule **HLA-G**, un intérêt tout particulier lui a été donné et elle pourrait avoir plusieurs rôles fonctionnels dans la tolérance (*Hunt et al., 2006*). Ainsi, HLA-G existe sous différentes isoformes : membranaires et solubles. HLA-G intervient dans le maintien d'un statut d'immunosuppression locale mais pourrait également contribuer à l'immunomodulation du système immunitaire maternel par la sécrétion de certaines formes

solubles dans la circulation maternelle. HLA-G est le ligand de récepteurs inhibiteurs présents sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (cellules de la réponse immunitaire adaptative impliquées dans la réponse cellulaire), ainsi que sur les cellules myéloïdes et uNK (cellules de la réponse immunitaire innée) (*Le Bouteiller and Blaschitz, 1999*). L'interaction du HLA-G trophoblastique avec certains de ces récepteurs intervient sans doute dans l'absence de lyse par ces cellules effectrices (**Figure 23**). Il a été montré par exemple que la présence de HLA-G sous ses différentes formes permet au trophoblaste de ne pas être identifié par les lymphocytes T cytotoxiques CD8+. En effet, l'interaction de la molécule HLA-G1 soluble avec la molécule CD8 induit l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques activés via la voie Fas/Fas-Ligand (*Solier et al., 2002*). Cette propriété pourrait contribuer à l'élimination des cellules T CD8+ et à leur faible présence au niveau de l'interface foeto-maternelle.

Figure 23 : HLA-G et la tolérance immunitaire pendant la grossesse
Extrait de (*Hunt et al., 2005*).

iii. La tolérance immunitaire de l'unité foeto-placentaire chez la souris

Dans le placenta murin, il y a également un **répertoire de molécules du type MHC restreint** sur les cellules trophoblastiques. L'expression de ces molécules à la surface des cellules trophoblastiques murines a été étudiée récemment. Ainsi, il a été montré que les TGCs (les cellules en contact avec le système immunitaire maternel) ne présentent que les molécules de **classe I classique H2-K** à leur surface (*Madeja et al., 2011*), contrairement à la plupart des cellules nucléées qui expriment l'ensemble des molécules de classe I classiques : H2-K, H2-D et H2-L. Une étude de 2003 avait suggéré que la molécule **H2-Q** pourrait être un homologue fonctionnel de HLA-G (*Comiskey et al., 2003*), mais l'expression du messager et la présence de cette protéine à la surface des TGCs n'ont pas été détectées dans l'étude de 2011. Cependant, il existe une forme soluble de H2-Q dont le messager est exprimé dans le blastocyste préimplantatoire. Cette forme pourrait être exprimée plus tardivement par un autre type de trophoblaste que les TGCs et ainsi avoir un rôle sur les cellules uNK maternelles.

iv. Les mécanismes d'adaptation du système immunitaire maternel

L'adaptation du système immunitaire maternel s'établit selon différents mécanismes, impliquant plusieurs types cellulaires de l'immunité, tels que les **cellules uNK, les cellules dendritiques et les lymphocytes T**. Il faut bien noter qu'il s'agit d'une **adaptation locale**, puisque les défenses immunitaires des futures mères restent actives pour lutter contre les diverses infections pouvant survenir au cours de la grossesse. Cette adaptation repose notamment sur une représentation particulière des différents types de cellules immunitaires au sein de la décidue. Ainsi, chez la femme comme chez la souris, les cellules immunitaires de la décidue (du début jusqu'à la mi-gestation) sont surtout des uNK (70%) et des cellules dendritiques (DCs, 20%). Il y a très peu de lymphocytes T (environ 10%) et encore moins de lymphocytes B.

Les **cellules uNK humaines** (CD56^{bright}, CD16⁻) sont différentes des cellules NK circulantes (CD56^{dim}, CD16⁺). C'est également le cas des cellules uNK murines. En effet, elles présentent une morphologie typique de cellules NK matures, c'est-à-dire qu'elles sont caractérisées par la présence de nombreux granules cytoplasmiques contenant des enzymes cytolytiques de type perforine et granzyme, mais sur le plan fonctionnel, ces cellules uNK ont une capacité de lyse plus faible. Cette absence de cytotoxicité est sans doute liée à l'action, sur des récepteurs inhibiteurs, de molécules du MHC de classe I exprimées et éventuellement sécrétées par les trophoblastes. La forte présence des uNK au niveau de la décidue semble être sous la dépendance de la progestérone, qui induit la production d'IL-15 par les cellules stromales et les DCs. L'IL-15 permet la mobilisation des cellules NK circulantes au niveau de la décidue. Chez l'humain, les cellules uNK deviennent résidentes grâce à l'interaction de leur récepteur aux chimiokines CXCR4 qui interagit avec le ligand CXCL12 des cellules stromales et des trophoblastes endovasculaires. De plus, les uNK humaines et murines expriment des facteurs angiogéniques (VEGF, PlGF), de l'IFN γ , et des MMPs. Ainsi, les cellules uNK favoriseraient l'invasion des trophoblastes, le remodelage des artères spiralées et l'angiogénèse (*Bilinski et al., 2008; Lash et al., 2010*).

En ce qui concerne les **lymphocytes T CD8**, deux mécanismes semblent jouer pour permettre une **absence de cytotoxicité** de leur part au niveau de la décidue : une inhibition et/ou une apoptose induite, et une absence de recrutement. Ainsi, l'interaction des lymphocytes T CD8 avec la molécule HLA-G1 soluble induit leur **apoptose** (*Solier et al., 2002*) chez l'humain (il pourrait en être de même via H2-Q chez la souris), tandis que

l'interaction avec les molécules du MHC de classe I HLA-C (chez l'humain) ou H2-K (chez la souris) **inhiberait leur cytotoxicité**. À noter, chez la souris, H2-K est polymorphe, donc normalement, cette inhibition n'aurait lieu que dans le cas où le fœtus et la mère portent le même allèle. Ainsi, des expériences *in vitro* ont montré que les lymphocytes présents dans la décidue semblaient inactivés d'un point de vue fonctionnel et ne proliféraient pas suite à une stimulation allogénique (*Abadía-Molina et al., 1996*). Pour ce qui est de **l'absence de recrutement**, il a été bien montré chez la souris qu'il y avait une perte d'expression au niveau de la décidue des principales chimiokines qui attirent les lymphocytes T CD8 : CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CCL5. Cette perte d'expression est contrôlée de façon épigénétique, par la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), une marque décrite comme répressive, sur les promoteurs de ces gènes (*Nancy et al., 2012*). On ne sait pas encore si un mécanisme similaire a lieu chez l'humain, mais on sait qu'il y a moins de cellules T dans la décidue que dans l'endomètre en l'absence de grossesse (*Vassiliadou and Bulmer, 1996*).

De plus, contrairement à ce qui se passe lors d'un rejet de greffe où le mécanisme principal est dû à une activation de lymphocytes T par une reconnaissance directe des molécules du MHC étranger (où des DCs du donneur vont aller activer des lymphocytes T du receveur dans les ganglions lymphatiques), il ne semble y avoir dans le cas d'une grossesse qu'une **reconnaissance indirecte des antigènes dérivés du conceptus** (car ils sont présentés par des DCs maternelles sur des molécules du MHC de classe II maternelles au sein des ganglions lymphatiques). Cette absence de reconnaissance directe a bien été établie chez la souris. La reconnaissance indirecte, quant à elle, permet une moindre activation de lymphocytes T spécifiques des antigènes dérivés du conceptus. De plus, la présentation de ces antigènes semblent être restreinte aux antigènes circulants, car les cellules dendritiques de la décidue sont incapables de migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques. Cela signifie que la présentation des antigènes dérivés du conceptus ne se fait que par les cellules présentatrices d'antigènes qui sont résidentes des ganglions lymphatiques. Or dans le cas d'une greffe, ce sont les DCs résidentes du tissu où se fait la greffe qui sont les principaux initiateurs de la réponse immunogène et donc du rejet. Dans le cas d'une grossesse, il y a bien une réponse proliférative suite à la présentation des antigènes dérivés du conceptus par les DCs des ganglions. Toutefois, elle ne s'accompagne pas de la génération de cellules effectrices cytotoxiques, rappelant ce qui se passe en l'absence d'un signal fort de co-stimulation, où les cellules meurent ou développent un phénotype de tolérance (*Erlebacher, 2013*).

Pour ce qui est des **lymphocytes T CD4**, les études chez la souris ont permis de montrer l'existence de **lymphocytes T régulateurs** (Treg, qui expriment le facteur de transcription Foxp3) spécifiques des antigènes dérivés du conceptus (*Rowe et al., 2012*). Ces Treg pourraient apparaître dès l'accouplement, éventuellement grâce à l'interaction avec des DCs tolérogènes (favorisant un phénotype immunosuppresseur pour les cellules avec lesquelles elles interagissent), puis proliférer lors d'une seconde phase vers la mi-gestation, alors que des microvésicules portant des antigènes dérivés du conceptus seraient libérées du placenta vers la circulation maternelle (*Erlebacher, 2013; Remes Lenicov et al., 2012*). Chez l'humain, l'existence de ces microvésicules a été bien établie et des propriétés immunosuppressives leur ont été trouvées *in vitro* (*Mincheva-Nilsson and Baranov, 2010*). Chez la souris, ces Treg sont des Treg induits, générés en périphérie à partir de cellules T CD4 naïves. Cette différenciation en Treg nécessite l'élément régulateur CNS1 dans le promoteur de *Foxp3*, l'absence d'une co-stimulation et une stimulation par le TGF β (*Samstein et al., 2012*). Cet élément de régulation CNS1 se retrouve chez les mammifères euthériens, mais pas chez les marsupiaux, ce qui suggère une coévolution entre la génération de Treg périphériques et la placentation en profondeur des mammifères euthériens. Cependant le rôle de ces Treg spécifiques des antigènes dérivés du conceptus n'est pas encore déterminé. Ils pourraient être importants de différentes manières. Premièrement, ils éviteraient la prolifération de cellules T conventionnelles spécifiques des antigènes dérivés du conceptus, ce qui expliquerait l'augmentation des résorptions embryonnaires en cas de déplétion en Treg dans les croisements allogéniques, mais pas dans les croisements syngéniques. Cependant, lorsqu'il y a des fœtus allogéniques et syngéniques au sein d'une même portée, il ne semble pas y avoir une résorption spécifique des fœtus allogéniques. Cela est cohérent avec l'absence de recrutement au niveau de la décidue et suggère un rôle plus systémique de la perte de ces Treg. L'absence de Treg entraîne une inflammation systémique. Ainsi, deuxièmement, ces Treg pourraient avoir un rôle en limitant la prolifération des cellules T conventionnelles activées par les antigènes circulants dérivés du conceptus et responsables d'une inflammation systémique secondaire. Enfin, troisièmement, les Treg joueraient un rôle dans l'homéostasie immunitaire, comme ils le font en dehors de la gestation, en régulant de façon globale l'activation des cellules T, ceci expliquerait peut-être pourquoi certaines maladies auto-immunes (comme l'arthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaques) montrent une amélioration clinique notable chez les femmes enceintes (*Erlebacher, 2013*).

La régulation du **système du complément** semble également jouer un rôle important dans la tolérance immunitaire au niveau de l'interface fœto-maternelle. Ce système est un ensemble de protéines circulantes ou membranaires, principalement sécrétées par le foie. Leur rôle initialement reconnu était de compléter l'action des immunoglobulines sériques, d'où leur nom. En l'absence de ces protéines thermolabiles (qui perdent leurs qualités à une température déterminée), les immunoglobulines thermostables spécifiques sont incapables d'entraîner la lyse de leur cible. Les protéines du complément représentent environ 5 % des globulines plasmatiques. Les différentes protéines du complément sont des pro-enzymes inactives et qui sont activées en cascade par clivage. Le clivage libère une fraction ayant une activité enzymatique de protéase, et un petit fragment qui possède souvent un rôle sur les cellules inflammatoires. Le système du complément possède plusieurs fonctions importantes: la cytolyse d'une cellule ou d'un agent pathogène, l'activation du système immunitaire par les petits fragments de clivage pro-inflammatoires, l'opsonisation (processus biochimique de l'immunité innée qui facilite la phagocytose de certains agents), et le métabolisme des complexes immuns circulants grâce aux récepteurs des fragments du complément. Les principales protéines du complément sont notées de C1 à C9. Il existe deux voies principales de l'activation du complément (**Figure 24**): la voie alternative (immunité innée) et la voie classique (immunité adaptative), qui aboutissent à la formation d'une C3-convertase, point de départ de la voie effectrice commune qui détruit la cible cellulaire en formant un canal transmembranaire. Ce canal, formé par l'assemblage des protéines C5 à C9, est appelé le « complexe d'attaque membranaire », qui est en l'occurrence l'élément permettant la lyse des cellules pathogènes. **Chez la souris**, *Crry* (complement receptor-related protein) est exprimé par les trophoblastes et la décidue maternelle, et il prévient le dépôt des protéines du complément C3 et C4 sur la surface des cellules, empêchant ainsi la formation du complexe d'attaque membranaire. Les souris déficientes pour *Crry* ne peuvent pas être générées à partir d'un croisement entre des hétérozygotes *Crry*^{+/-} à cause d'un dépôt du complément C3-dépendant (alloantigène indépendant) et à l'inflammation que cela induit au niveau du placenta (*Munoz-Suano et al., 2011*). **Chez l'humain**, l'activation incontrôlée du complément est prévenue au cours des grossesses non pathologiques par trois protéines régulatrices situées à la surface des trophoblastes : DAF, MCP et CD59 (*Girardi et al., 2006*). De plus, la protéine C5a a récemment été décrite comme pouvant être un médiateur lors de la parturition humaine (*Lappas et al., 2012*).

Figure 24 : Le système du complément et sa régulation

Adapté d'après (*Bora et al., 2008*).

Il y a donc tout un ensemble de mécanismes mis en jeu pour engendrer une **tolérance immunologique locale** de l'unité fœto-placentaire. Ces mécanismes sont interconnectés, ce qui rend l'identification de leur rôle individuel difficile. Par ailleurs, ces interactions entre le trophoblaste et le système immunitaire maternel semblent également nécessaires pour la sécrétion de cytokines et de facteurs immunomodulateurs par les cellules immunitaires intra-déciduales afin de contrôler l'invasion de l'endomètre maternel par le trophoblaste, et par conséquent une placentation adéquate (*Barrientos et al., 2012; Charalambous et al., 2012; Eastabrook et al., 2008*).

4. Protéger le fœtus

Le placenta constitue une **barrière protectrice** pour le fœtus puisqu'il agit comme un filtre vis-à-vis d'un certain nombre d'agents extérieurs de type infectieux, toxiques et médicamenteux. Toutefois cette barrière n'est pas infaillible et certains agents infectieux ou substances toxiques, tels que le toxoplasme, le VIH, le CMV, ou encore des substances toxiques tels que l'alcool ou certains médicaments peuvent la traverser et entraîner diverses fœtopathies comme des anomalies de développement de certains organes ou des retards psychomoteurs à long terme (*Iqbal et al., 2012; Syme et al., 2004*). Le placenta agit également comme filtre sélectif vis à vis d'agents maternels, puisqu'il permet le passage sélectif de certains anticorps maternels (de type IgG) grâce à des récepteurs spécifiques. Dans l'espèce humaine, ces IgG protègent l'enfant par une immunité passive plusieurs mois après la naissance (*Saji et al., 1999*).

CHAPITRE DEUX

LA PREECLAMPSIE

I. Données cliniques et épidémiologiques

1. Définition et données cliniques

La **prééclampsie (PE)** est une pathologie placentaire qui se définit par une **hypertension gravidique** associée à une **protéinurie** (*Pottecher et al., 2009*). L'hypertension gravidique se définit elle-même par une pression artérielle systolique (PAS) supérieure à 140 mmHg et/ou une pression artérielle diastolique (PAD) supérieure à 90 mmHg, survenant après 20 semaines d'aménorrhée et disparaissant avant la fin de la 6^{ème} semaine du *postpartum*. La protéinurie se définit quant à elle par la présence de plus de 0,3g de protéines dans les urines obtenues en 24h. Ces définitions sont maintenant bien reconnues au niveau mondial. Les femmes ayant une hypertension chronique qui développent une protéinurie au cours de leur grossesse sont atteintes d'une prééclampsie surimposée.

Chez les patientes, la PE se manifeste par des maux de tête, des sensations visuelles anormales (mouches, points lumineux), des bourdonnements d'oreilles, des œdèmes des membres et du visage. En plus des critères cliniques la définissant, la prééclampsie s'accompagne fréquemment de thrombopénie (baisse du taux de plaquettes) et d'hémolyse aiguë (anémie par destruction des globules rouges). Les complications maternelles les plus graves sont **l'éclampsie** (définie par la survenue inattendue et brutale de convulsions), le syndrome HELLP (Haemolysis-Elevated Liver enzymes-Low Platelets count), la coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) et l'insuffisance rénale aiguë.

L'éclampsie est une crise convulsive tonico-clonique. Elle est susceptible d'apparaître à partir de la 20^{ème} semaine de grossesse, au cours du travail, ou encore pendant la première semaine après l'accouchement chez une patiente qui n'avait jamais eu de convulsions auparavant. Ces convulsions peuvent être suivies d'un épisode comateux, et de la mort. Le traitement comporte un contrôle médicamenteux à base de sulfate de magnésium (*Euser and Cipolla, 2009*). Il faut cependant noter que 15 à 40 % des cas d'éclampsies surviennent en l'absence de prééclampsie (ou du moins, s'il y en a une, elle n'a pas été préalablement détectée) (*Douglas and Redman, 1994; Mattar and Sibai, 2000*).

Le **syndrome HELLP** fait partie des syndromes vasculo-rénaux rencontrés au cours de la grossesse pouvant se révéler particulièrement dangereux en cas d'hémorragie de la délivrance (saignements utérins après l'élimination du placenta). Il peut survenir en l'absence

de prééclampsie mais y est le plus souvent associé (dans 80 à 90% des cas) (*Jebbink et al., 2012*). L'acronyme HELLP signifie « Haemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelets count » et résume bien ce syndrome qui est constitué d'une série de complications biologiques comportant une hémolyse, une élévation des enzymes hépatiques et une thrombopénie. Les altérations des marqueurs biochimiques associées à ce syndrome témoignent de la microangiopathie thrombotique, c'est-à-dire des lésions de l'endothélium des artérioles et des capillaires entraînant la formation d'agrégats plaquettaires et de thromboses (*Haram et al., 2009*).

Durant la période du *post-partum*, la pression artérielle se normalise progressivement mais des complications peuvent survenir (œdème pulmonaire, éclampsie, HELLP syndrome...), imposant une surveillance rigoureuse.

Les possibles complications fœtales sont un **retard de croissance intra-utérin (RCIU)**, défini par l'échec du fœtus à atteindre son potentiel de croissance), une thrombopénie, une **prématurité** induite, une asphyxie périnatale aiguë par hématome rétro-placentaire (accumulation de sang entre le placenta et la paroi de l'utérus), une chute brutale de la tension artérielle, une mort fœtale *in utero*.

Il est donc important de noter l'**hétérogénéité** des expressions de la maladie au sein des femmes atteintes d'une prééclampsie. Cela a progressivement amené à utiliser des critères qui définissent des sous-types de prééclampsie. Cependant, les classifications de ces sous-types ne sont pas encore acceptées de façon internationale, ce qui rend la comparaison des études parfois difficile.

On distingue ainsi les **prééclampsies sévères**. En France, une prééclampsie est considérée comme sévère si au moins l'un des critères suivants est observé : hypertension sévère (PAS > 160 mmHg et/ou PAD > 110 mmHg), atteinte rénale (avec oligurie inférieure à 500 mL/24h, créatinine supérieure à 135 µmol/L, protéinurie supérieure à 5 g/j), œdème aigu pulmonaire, barre épigastrique persistante, syndrome HELLP, éclampsie ou troubles neurologiques rebelles (troubles visuels, céphalées), thrombopénie (inférieure à 100 g/L), hématome rétro-placentaire ou retentissement fœtal (dont RCIU) (*Pottecher et al., 2009*).

On distingue également les **prééclampsies précoces**, dont le diagnostic est réalisé avant 32 semaines d'aménorrhée d'après les recommandations françaises (34 semaines dans certaines études). Cette classification artificielle n'est pas indépendante de la précédente, car

les symptômes n'allant qu'en s'aggravant à partir de leur apparition, la gravité est généralement plus importante dans les cas de PE précoces.

Le seul moyen d'enrayer définitivement les symptômes de la prééclampsie est de **retirer le placenta** et donc le fœtus. Ainsi, lorsque la pathologie devient trop grave, et/ou que le fœtus est en souffrance, l'accouchement est déclenché, ou une césarienne est réalisée en urgence. La prééclampsie est donc responsable de nombreuses **naissances prématurées**.

2. Incidence et données épidémiologiques

La prééclampsie est une pathologie placentaire répandue, qui touche environ **3 % des femmes enceintes** dans le monde, d'après les études basées sur le plus grand nombre de grossesses suivies (*Klungsoyr et al., 2012; WHO, 2005*), soit environ 20 000 femmes par an en France. L'hypertension gravidique constitue la **2^{ème} ou 3^{ème}** (selon les périodes étudiées) **cause de mortalité maternelle** en France (15 % des morts maternelles, les hémorragies étant la 1^{ère} cause avec 35% des cas). La prééclampsie (cas diagnostiqués) explique environ 30% des cas de morts maternelles suite à une hypertension gravidique (environ 10 cas chaque année) (*Benbassa et al., 2006; Saucedo et al., 2010*). Malheureusement, de nombreuses études ne distinguent pas la prééclampsie de l'éclampsie. En France, l'éclampsie représente à elle seule environ 45 % des cas de morts suite à une hypertension gravidique, sans que l'on sache vraiment si elle intervient suite à une prééclampsie ou non. Si l'on considère que la majorité des cas intervient suite à une PE, environ 75 % des cas de morts suite à une hypertension gravidique seraient alors attribuable à cette pathologie. Il est important de noter que dans les pays en voie de développement, la prééclampsie et l'éclampsie peuvent être responsables de 20 à 30 % des cas de morts maternelles (*Chelli et al., 2009; Ezugwu et al., 2009*). Ainsi, en 2000, 63 000 femmes seraient mortes suite à une prééclampsie/éclampsie dans le monde (*WHO, 2005*). Et on estime que chaque année, 40 000 à 50 000 morts maternelles sont imputables à cette pathologie (*Ghulmiyyah and Sibai, 2012*).

On estime que **25 % des cas de PE sont sévères** et 5 à 10% de ces cas de PE sévères auront des complications graves (*Sibai, 2004*). Concernant les complications maternelles citées dans le paragraphe précédant, **l'éclampsie complique environ 2 % des PE**, le syndrome HELLP environ 20 % des PE sévères (*Mehrabian et al., 2012*), la coagulation

intra-vasculaire disséminée 10 à 20 % et l'insuffisance rénale 1 à 5 % (*Bhattacharya and Campbell, 2005*).

Concernant les **complications fœtales**, on estime qu'environ **25 % des prééclampsies sont accompagnées d'un RCIU** (*Villar et al., 2006*). Pour ce qui est de la **mortalité fœtale**, celle-ci a particulièrement diminué dans les pays occidentaux grâce à la généralisation de l'induction de la naissance (induction du travail et césariennes), et à l'amélioration de la prise en charge des nouveau-nés prématurés. Ainsi, en Norvège, les déclenchements et les césariennes avant 37 semaines d'aménorrhée sont passés de 8 % entre les années 1967 et 1978 à presque 20 % entre les années 1991 et 2003 (*Basso et al., 2006*). Les délivrances par césarienne ont particulièrement augmenté en cas de prééclampsie, passant de 13% dans les années 1970 à 37% dans les années 2000. Au cours de ces 40 années, les cas de morts *in utero* ont diminué d'un facteur 10 (et le risque de morts *in utero* en cas de PE par rapport aux grossesses sans PE est passé de 4 à 1,3). Quant à la mortalité néonatale, elle a été divisée par 7 et son risque en cas de PE est passé de 2 à 1,5 (*Klungsoyr et al., 2012*). Il faut cependant noter que la Norvège est un des pays européens où la prise en charge de la femme enceinte et du nouveau-né est particulièrement efficace, ce qui se traduit par des mortalités maternelle et fœtale deux fois moindre qu'en France (*Zeitlin et al., 2008*).

Ainsi, la prise en charge médicale maternelle et néonatale fait de la prééclampsie une cause importante de prématurité induite. Environ **15 % des naissances prématurées** font ainsi suite à une prééclampsie dans les pays occidentaux (*Roberts and Lain, 2002*). La mortalité périnatale est fortement dépendante du poids de naissance et la PE serait responsable d'environ 10% des cas de mortalité périnatale (au Royaume Uni, la prééclampsie serait ainsi responsable d'environ 1 000 morts de nouveau-nés par an).

Le suivi des femmes ayant développé une prééclampsie et des enfants nés d'une prééclampsie ont aussi révélé des **conséquences à long terme**.

Concernant les mères, l'occurrence de **maladies cardiovasculaires** est plus élevée chez les femmes ayant eu une prééclampsie. Cependant, deux éléments se confondent très probablement : les femmes prédisposées à développer des maladies cardiovasculaires seraient également prédisposées à développer une prééclampsie (facteurs de risque communs) ; la prééclampsie pourrait fragiliser le système cardiovasculaire, ce qui favoriserait le développement futur de maladies cardiovasculaires. Dans tous les cas, la prééclampsie est

maintenant reconnue comme un facteur de risque pour le développement de maladies cardiovasculaires. En effet, grâce à un suivi de plus de 10 ans, il a été montré que les femmes ayant eu une prééclampsie ont 4 fois plus de risque de développer une hypertension que les femmes ayant eu une grossesse non compliquée. Leur risque d'insuffisance cardiaque est multiplié par 1,8, celui d'une attaque vasculaire cérébrale par 1,5, celui d'une embolie thrombotique par 1,6 (*Lykke et al., 2009*).

En ce sens également, avec un suivi d'environ 30 ans, il a été montré que les femmes ayant développé une prééclampsie avaient un risque 3,2 fois supérieur d'avoir une **insuffisance rénale sévère** (stade terminal) par rapport aux femmes ayant eu une (ou des) grossesse(s) non compliquée(s) (*Vikse et al., 2008*). Et dans ce cas, il semble que ce soit bien lié à la prééclampsie en elle-même et non à la co-ségrégation de facteurs prédisposant aux deux conditions (*Vikse et al., 2012*).

Concernant les enfants nés suite à une prééclampsie, il est difficile de séparer ce qui est purement dû à la prééclampsie de ce qui est lié à la naissance prématurée et/ou au petit poids de naissance. Il est bien établi que les enfants prématurés et/ou de petits poids de naissance ont un risque accru de développer un **syndrome métabolique** (association d'au moins 3 des critères suivants chez la même personne : hyperinsulinémie, hypercholestérolémie avec taux de cholestérol HDL bas, hypertension, excès de poids, hyperglycémie), avec l'idée d'une **programmation fœtale** (*Abitbol and Rodriguez, 2012; Rinaudo and Wang, 2012*). Cependant, même les enfants nés à terme d'une mère ayant développé une prééclampsie sont à risque pour différentes maladies, telles que les pathologies métaboliques, endocrines et nutritionnelles (*Wu et al., 2009*), mais il n'est pas exclu que cela soit lié à un plus petit poids de naissance. Car s'il a été montré que la plupart des enfants nés à terme d'une grossesse prééclamptique ont un poids normal pour leur âge gestationnel (*Xiong et al., 2002*), ce ne sont pas seulement sur ces cas (qui correspondent aux formes les moins graves de la maladie) qu'ont été réalisées les études à long terme.

3. Facteurs de risques

La PE est une pathologie **multifactorielle** sous-tendue par **différents facteurs de risque** (**Tableau 2**). Ceux-ci peuvent être classés en facteurs maternels, facteurs paternels, facteurs liés au couple, facteurs liés à la grossesse et facteurs liés au mode de vie.

Facteur	Risque relatif	Référence
Hypertension chronique	x 13	<i>Yanit et al., 2012</i>
Diabète	x 3,5	<i>Duckitt and Harrington, 2005</i> <i>Yanit et al., 2012</i>
Obésité	x 3-5	<i>O'Brien et al., 2003</i>
Nulliparité	x 3-5	<i>Duckitt and Harrington, 2005</i>
Age de la mère (> 40 ans)	x 2	<i>Seoud et al., 2002</i> <i>Duckitt and Harrington, 2005</i>
Antécédent familial de PE	x 2-3	<i>Esplin et al., 2001</i>
Antécédent personnel de PE	x 7-10	<i>Duckitt and Harrington, 2005</i> <i>Klungsoyr et al., 2012</i>

Tableau 2 : Les principaux facteurs de risque de la prééclampsie

i. Les facteurs de risque liés à la mère

Les femmes n'ayant jamais eu d'enfant (nullipare) sont plus à risque de développer une prééclampsie que les multipares (*Duckitt and Harrington, 2005*). En effet, **75 % des prééclampsies surviennent chez des primipares**, ce qui rend la maladie difficile à prévoir.

Une **histoire familiale de PE** est également un facteur de risque. Ainsi, si la mère d'une femme a eu une grossesse compliquée par une PE, cette femme a 3 fois plus de risque de développer une PE (*Esplin et al., 2001*).

De façon encore plus importante, un **antécédent personnel de PE** augmente très fortement le risque de développer une prééclampsie à la prochaine grossesse (*Duckitt and Harrington, 2005; Klungsoyr et al., 2012*).

Des facteurs de risque liés à la santé de la mère interviennent de façon importante. Ainsi **l'hypertension, le diabète, un indice de masse corporelle élevé** favorisent la survenue d'une prééclampsie (*Duckitt and Harrington, 2005; O'Brien et al., 2003; Yanit et al., 2012*). En outre, les femmes atteintes par des **pathologies auto-immunes**, telles que le lupus érythémateux disséminé ou le syndrome anti-phospholipides, ont un risque accru de développer une prééclampsie (*Clowse et al., 2008; Heilmann et al., 2011*). La **thrombophilie** semble également favoriser le développement d'une prééclampsie. Ainsi, une méta-analyse a montré que la mutation de Leiden du facteur V, qui est une forme de

thrombophilie génétique, est significativement associée à un risque accru de développer une PE (*Lin and August, 2005*).

L'âge de la mère est également à prendre en compte. En effet, pour les femmes de 40 ans et plus, le risque de développer une prééclampsie est plus élevé que pour les plus jeunes (*Duckitt and Harrington, 2005; Seoud et al., 2002*). Mais à l'opposé, les adolescentes (de moins de 16 ans) ont aussi un risque accru de développer une hypertension gestationnelle et donc probablement une prééclampsie (les deux conditions n'étant pas distinguées dans cette étude) (*Tsikouras et al., 2012*).

L'origine ethnique de la mère joue également un rôle, avec une incidence de la PE plus élevée chez les femmes d'origine africaine (population où les risques d'hypertension sont d'emblée plus élevés (*Cruickshank and Beevers, 1982*)), plus faible chez les femmes asiatiques et intermédiaire chez les caucasiennes (*Caughey et al., 2005*).

L'inflammation jouant un rôle important dans le développement de la PE (voir partie III-3-iv), des **infections chroniques** induisant un état d'inflammation pourraient favoriser le développement de cette pathologie (*López-Jaramillo et al., 2008*).

ii. Les facteurs de risque liés au père

Les **antécédents familiaux de PE** dans la famille du père favorisent également le développement d'une prééclampsie chez la partenaire de cet homme. Ainsi, les hommes qui sont nés d'une grossesse prééclamptique sont significativement plus à risque d'induire des grossesses prééclamptiques chez leur compagne, comparés à ceux nés d'une grossesse non compliquée (*Esplin et al., 2001; Skjaerven et al., 2005*). De même, si une femme est enceinte d'un homme qui a déjà eu une partenaire ayant développé une PE, elle a un risque accru de développer une PE à son tour (*Lie et al., 1998*).

Ces éléments indiquent que des facteurs génétiques paternels hérités par le fœtus peuvent participer au développement de la prééclampsie.

iii. Les facteurs de risque liés au couple

Concernant le couple, il a été montré que le risque de PE était supérieur si les deux membres du couple avaient des **origines ethniques différentes** (*Caughey et al., 2005*).

Par ailleurs, il a été montré que **certaines combinaisons d'allèles** maternels codant pour des récepteurs inhibiteurs des cellules Natural Killer (KIR-A) et d'allèles foetaux codant un certain type d'HLA (HLA-C2, venant du père) étaient associées à un risque accru de PE (*Hiby et al., 2004, 2010*). De plus, cette étude précise que dans différentes populations humaines, on observe une corrélation inverse entre la fréquence de ce récepteur KIR-A à l'état homozygote et la fréquence de l'allèle HLA-C2, indiquant une contre sélection de cette combinaison.

De plus, concernant les facteurs de risque liés au couple, il apparaît que, plus que l'absence de grossesse antérieure chez la mère, ce soit l'occurrence de la **première grossesse issue du couple** qui soit importante. En effet, une grande partie des prééclampsies de la seconde ou de la troisième grossesse se développent suite à un **changement de partenaire** (*Dekker and Robillard, 2007; Dekker et al., 1998; Ikedife, 1980*). Cela corrobore le fait que le risque de développer une prééclampsie après un changement de partenaire est équivalent à celui d'une primipare (*Dekker et al., 1998; Trupin et al., 1996*). Cela suggère également qu'une seconde grossesse avec le même partenaire est moins susceptible d'être compliquée d'une prééclampsie. Cela a mené à une proposition dans laquelle la prééclampsie n'aurait pas été éliminée au cours de l'évolution, car elle encouragerait la fidélité et cela aurait un impact positif pour élever les enfants au sein d'un noyau familial uni (*Chelbi et al., sous presse*). Une des hypothèses actuelles concernant ces observations est que la mère développerait une tolérance spécifique pour les alloantigènes d'origine paternelle lors de la première grossesse qui serait bénéfique aux grossesses ultérieures avec le même père (*Williams, 2012*).

De plus, différentes études, initiées en Guadeloupe, ont montré qu'une **exposition de longue durée au sperme** du futur père avant la conception avait un effet **protecteur** : l'incidence de la prééclampsie atteint en effet 40 % dans le cas d'une conception dans les 4 mois suivant la formation du couple, contre une incidence bien plus faible dans le cas d'une année de cohabitation sexuelle avant la conception (*Robillard et al., 1994*). Cette protection par l'exposition maternelle au sperme paternel a ensuite été confirmée par plusieurs études (*Einarsson et al., 2003; Kho et al., 2009; Verwoerd et al., 2002*). Il a ainsi été suggéré que le sexe oral pourrait avoir un rôle protecteur (*Koelman et al., 2000*). Cela serait médié par les antigènes paternels présents dans le liquide séminal (*Kajino et al., 1988*) et par une habitude immunologique au patrimoine génétique du père, ce qui contribuerait à permettre

à l'organisme maternel d'accepter en son sein un fœtus ayant le statut génétique et immunologique d'une héli-allogreffe. À l'opposé, le recours à un donneur de sperme pour initier une grossesse est associé à un risque accru de prééclampsie (*Kyrou et al., 2010*).

Ces différents arguments suggèrent fortement l'existence d'une composante immunologique « d'habituation », de nature non classique, puisqu'une diminution de la réaction classique de rejet du non-soi est associée à des expositions prolongées et répétées aux antigènes paternels. De ce point de vue, les mécanismes impliqués s'opposent aux réactions classiques de vaccination, où la seconde exposition induit une réponse beaucoup plus intense et rapide. Il s'agirait donc plutôt d'une **mémoire immunosuppressive** (via des Treg mémoire ?).

La prééclampsie a donc une composante immunologique indubitable et elle est considérée comme une maladie de la première grossesse, et plus récemment, de la **première grossesse d'un couple**. Cependant, il arrive qu'une femme développe une **prééclampsie lors de sa seconde grossesse avec le même partenaire**, alors qu'elle n'en avait **pas eu à sa première grossesse**. Ces cas me semblent particulièrement intéressants pour creuser les modalités contrôlant cette immunologie de la prééclampsie. En effet, une explication serait que les **deux enfants aient hérité de leur père des marqueurs antigéniques différents** (notamment les HLA exprimés par les trophoblastes). Cela suppose que le père soit hétérozygote. Cette hypothèse peut être facilement explorée grâce au génotypage HLA (en particulier, HLA-C et E) de familles présentant ce genre de cas.

iv. Les facteurs de risque liés à la grossesse

Un **intervalle long entre deux grossesses** augmente les risques de développer une PE. Le risque augmente pour chaque année comprise entre deux grossesses et lorsque cet intervalle dépasse 10 ans, le risque avoisine celui de femmes nullipares (*Skjaerven et al., 2002*).

Les **techniques d'assistance médicale à la procréation** semblent également augmenter le risque de PE (*Thomopoulos et al., 2013*). Cela pourrait être lié à l'accumulation d'altérations épigénétiques aux cours de la manipulation des gamètes et des embryons lors de la culture in vitro, qui perturberaient le développement fœto-placentaire

(Fauque et al., 2007). Cependant, l'impact des techniques d'assistance médicale à la procréation sur la grossesse semble assez faible, et il n'est pas toujours détectable (Calicchio et al., sous presse, disponible en Annexe 2; Marchand et al., 2011).

Dans le cas d'une **grossesse gémellaire**, le risque de développer une prééclampsie est multiplié par 4 (Coonrod et al., 1995). D'autres conditions, telles que les môles hydatiformes, les grossesses extra-utérines, certaines anomalies congénitales ou chromosomiques du fœtus, entraînent également une augmentation du volume placentaire et favorisent également la survenue d'une prééclampsie (Boyd et al., 1987; Dekker and Sibai, 1998; Longo et al., 2003; Roberts and Gammill, 2005; Worley et al., 2008).

v. Les facteurs de risque liés au mode de vie

Des **conditions socioéconomiques défavorables**, un faible niveau d'éducation des mères et une alimentation insuffisante ont été associés à la PE (Cerón-Mireles et al., 2001; Funai et al., 2005; López-Jaramillo et al., 2001). Cela est cohérent avec la plus grande occurrence de la prééclampsie **dans les pays en développement**. Cependant, ceci pourrait être lié aux différences ethniques. Il est possible que la pauvreté extrême et qu'un mauvais accès aux soins dans ces pays ait une influence sur le risque de PE. Cependant, ces facteurs ne font pas consensus et dans les pays occidentaux, le statut économique des patientes n'aurait pas d'influence réelle sur leur risque de développer une PE (Lawlor et al., 2005).

La **vie en haute altitude** serait un autre facteur de risque (Keyes et al., 2003; Palmer et al., 1999). Cela serait lié à l'hématocrite (pourcentage relatif du volume des cellules circulant dans le sang par rapport au volume total du sang, donc liée à la viscosité) plus élevé des femmes vivant en altitude par rapport à celles vivant au niveau de la mer. Chez les femmes enceintes, cette viscosité est encore accrue (Kametas et al., 2004). Les femmes enceintes vivant en altitude, auraient également une pression d'oxygène dans le sang réduite favorisant l'hypoxie placentaire, et ainsi l'occurrence d'anomalies du développement placentaire (Zamudio, 2003). En règle générale, une viscosité accrue du sang et une hypoxie placentaire relative sont associées à la PE (Palmer et al., 1999).

Le tabac est, quant à lui, associé à une réduction du risque de PE (Conde-Agudelo and Belizán, 2000). Une hypothèse est que le tabac ferait pencher la balance vers une fausse-

couche précoce en cas d'anomalies qui auraient pu aboutir à une prééclampsie si la mère n'avait pas fumé (la prééclampsie n'étant dans ce modèle qu'un état intermédiaire entre une grossesse réussie et un échec complet se traduisant par une fausse-couche). Cependant, il a récemment été décrit que le tabagisme induit un taux sérique plus élevé de PlGF, ce qui favoriserait un bon développement placentaire et contrebalancerait alors efficacement des prédispositions à la PE (*Llurba et al., 2013*).

4. Traitements

i. Le seul moyen curatif : retirer l'unité fœto-placentaire

Le seul moyen efficace de stopper la progression de la prééclampsie et de guérir la patiente est de **retirer le placenta et donc le fœtus**. Le défi majeur est donc de permettre à la grossesse de se poursuivre le plus longtemps possible, afin d'améliorer le pronostic pour l'enfant sans pour autant mettre la mère en danger.

Les recommandations pour interrompre la grossesse en cas de PE sont les suivantes : au delà de 36 semaines d'aménorrhée, il est conseillé de déclencher l'accouchement ou de réaliser une césarienne. Au delà de 34 semaines d'aménorrhée, il faut interrompre la grossesse si la PE est sévère. En cas de PE sévère avant 24 semaines d'aménorrhée, il faut proposer une interruption médicale de la grossesse aux parents. Entre 24 et 34 semaines d'aménorrhée, la décision d'interrompre la grossesse dépend de l'état de santé de la mère et de celui du fœtus. Ainsi, l'arrêt de la grossesse est pratiqué immédiatement si la mère présente une hypertension non contrôlée, une éclampsie, un œdème aigu du poumon, un hématome rétro-placentaire, une thrombopénie sévère ou un hématome sous-capsulaire hépatique. En cas d'insuffisance rénale d'aggravation rapide, de signes persistants d'imminence d'une éclampsie (céphalées ou troubles visuels), d'une douleur épigastrique persistante, ou d'un syndrome HELLP évolutif, la grossesse est éventuellement prolongée de 48 h afin qu'une corticothérapie anténatale puisse être réalisée pour induire une maturation pulmonaire fœtale. Des anomalies du rythme cardiaque fœtal, un retard de croissance intra-utérin sévère au delà de 32 semaines d'aménorrhée sont également des indications pour déclencher l'accouchement (*Pottecher et al., 2009*).

Lorsque l'interruption de la grossesse est décidée sans qu'il y ait une nécessité absolue d'arrêt immédiat, il est possible de déclencher l'accouchement après maturation cervicale. Il

est également recommandé de mettre rapidement en place une analgésie péri-médullaire parce qu'elle est bénéfique pour l'évolution de la pression artérielle et pour l'hémodynamique utéro-placentaire, et parce qu'elle facilite la prise en charge en cas de recours à une césarienne.

ii. Les traitements des symptômes

Afin de permettre à la grossesse de se poursuivre harmonieusement pour améliorer le pronostic fœtal, des traitements médicamenteux existent, visant principalement à faire baisser l'hypertension et prévenir et/ou contrôler la crise d'éclampsie.

Ainsi, au cours de la PE sévère, il est recommandé de **traiter l'hypertension artérielle** lorsque la pression artérielle systolique est supérieure à 160 mmHg ou la pression artérielle diastolique est supérieure à 110 mmHg. Il s'agit alors de prescrire un traitement antihypertenseur. Tous les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (sartans) sont contre-indiqués aux cours de la grossesse (car ils présentent une toxicité avérée pour l'appareil rénal et la voûte crânienne du fœtus) (*Centre de Référence sur les Agents Tératogènes, 2013*). Les antihypertenseurs de référence pour la PE sont donc des **antihypertenseurs centraux** (méthildopa), des **inhibiteurs calciques** (nifédipine ou nicardipine) et/ou des **bétabloquants** (labétalol, oxprénolol).

Le traitement antihypertenseur est principalement recommandé pour prévenir un accident vasculaire cérébral. Le but n'est pas d'optimiser la pression artérielle, mais de la réduire de 20%, de manière progressive, avec pour objectif d'atteindre une pression artérielle systolique comprise entre 140 et 160 mmHg et une pression diastolique entre 90 et 110 mmHg (*Petit et al., 2009*). En effet, une diminution trop importante de la pression artérielle est néfaste à la croissance fœtale (Von Dadelszen and Magee, 2002). Il est en effet suggéré que l'hypertension dans le cas d'une prééclampsie serait un moyen de contrebalancer une insuffisance placentaire, et de pouvoir ainsi assurer une croissance fœtale suffisante.

En cas de PE sévère, la **prévention de la crise d'éclampsie par du sulfate de magnésium (MgSO₄)** est recommandée face à l'apparition de signes neurologiques (céphalées rebelles, troubles visuels) et en l'absence de contre-indication (insuffisance rénale, maladies neuromusculaires) (*Pottecher et al., 2009*). En effet, le MgSO₄, utilisé depuis plus de 80 ans aux États-Unis par exemple, diminue de 60% le risque de faire une crise d'éclampsie (*Duley et al., 2003*). Le MgSO₄ se comporte comme un inhibiteur calcique: il

bloque les canaux calciques voltage-dépendants d'où son effet vasodilatateur (effet renversé par le chlorure de calcium). C'est le traitement de référence pour le traitement de la crise en cours et la prévention des récives. Après la dernière crise, il est conseillé de maintenir une perfusion de MgSO₄ pendant une durée de 24 heures (*Pottecher et al., 2009*).

En cas de néphropathie, un avis spécialisé est recommandé afin d'instituer une prise en charge conjointe de la grossesse (obstétricien, néphrologue, anesthésiste-réanimateur), permettant, entre autres, d'informer la patiente sur les risques personnels et fœtaux, de discuter l'indication des diurétiques et d'envisager un arrêt de la grossesse en cas d'aggravation rapide de l'insuffisance rénale (*Pottecher et al., 2009*).

iii. Les traitements préventifs

Les traitements curatifs sont donc très limités et leur efficacité modérée. C'est pourquoi d'autres stratégies ont été envisagées, visant à éviter le développement de la PE, plutôt que d'agir sur ses symptômes. Ainsi, plusieurs traitements préventifs ont été testés.

Le traitement le plus prometteur est sans conteste **l'aspirine à faible dose** (à environ 100 mg/jour). Son utilisation a été fortement débattue (*Rossi and Mullin, 2011*). Cependant, un consensus émerge. L'utilisation d'aspirine à 100 mg/jour est efficace à condition que l'administration commence tôt au cours de la grossesse (avant 16 semaines d'aménorrhée) (*Bakhti and Vaiman, 2011; Roberge et al., 2012a, 2012b*). Ces études montrent que l'aspirine fait diminuer les risques de développer une prééclampsie précoce de 90 %, et une prééclampsie sévère de 80%. De façon intéressante, il semble que l'heure de prise de l'aspirine ait un impact important sur l'efficacité de ce traitement : si l'aspirine est prise au réveil, elle n'aurait aucun effet, alors que prise au coucher, elle réduirait bien le risque de prééclampsie (*Ayala et al., 2012*).

Les **héparines de bas poids moléculaire** (HBPM) auraient également un effet bénéfique (à 1 mg/kg), en particulier lorsqu'il existe un risque thrombotique (*Kupferminc et al., 2011*), et amélioreraient la prévention en association avec de l'aspirine (*Gris et al., 2011; de Vries et al., 2012*). L'effet bénéfique de ces HBPM serait basé sur leur interférence

avec des mécanismes hémostatique et inflammatoire, contribuant ainsi à améliorer l'environnement vasculaire et endothélial. Par exemple, l'héparine réduit l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, ce qui participe à son effet anti-inflammatoire. De plus, l'héparine a été montrée comme capable d'induire l'expression de facteurs de croissance tel que le VEGF *in vitro* (Mello et al., 2005). L'effet bénéfique de l'aspirine passerait par son action anti-plaquettaire, en effet, à faible dose, l'aspirine inhibe plus spécifiquement la production de thromboxane (pro-aggrégant), sans altérer la production de prostacycline (vasodilatateur et anti-aggrégant) (Vainio et al., 1999).

Une supplémentation en calcium serait également bénéfique, en particulier dans les pays en voie de développement et pour les populations ayant une carence calcique (Patrelli et al., 2012). Cette supplémentation a été tentée car une carence calcique est un facteur de risque pour les maladies hypertensives.

Par ailleurs, les antioxydants (tels que les vitamines C et E), les donneurs d'oxide nitrique (NO) et la vitamine D, n'ont pas prouvé leur efficacité (Meher and Duley, 2007; Parrish et al., 2013; Rossi and Mullin, 2011; Thorne-Lyman and Fawzi, 2012). Ces agents ont été testés car un stress oxydatif, une diminution des taux de NO et de vitamin D sont observés en cas de prééclampsie (Aghajafari et al., 2013; Bernardi et al., 2008; Hung and Burton, 2006).

Il est cependant important de noter qu'actuellement, ces traitements préventifs sont **réservés aux patientes à risque élevé**, c'est-à-dire à celles ayant eu au moins un antécédent de PE sévère et précoce (Pottecher et al., 2009). Cela signifie que 75 % des prééclampsies ne seront pas évitées (celles se développant chez des primipares). En effet, il est impensable d'encourager toutes les primipares à prendre un traitement préventif alors que plus de 95 % d'entre elles ne seront pas concernées par la PE. Il est ainsi extrêmement important de pouvoir mieux prédire quelles femmes, parmi les nullipares, sont les plus à risque de développer une PE, afin de pouvoir leur proposer spécifiquement un traitement préventif. En ce sens, la recherche de marqueurs précoces de la PE (détectables au 1^{er} trimestre) est en plein développement.

5. Vers un diagnostic précoce ?

L'apparition des symptômes maternels de la PE est relativement tardive, par rapport à la placentation, dont des anomalies sont à l'origine du syndrome. Il semble par ailleurs que tous les traitements prescrits une fois ces symptômes apparus aient une efficacité limitée. C'est pourquoi un diagnostic plus précoce permettrait sans doute d'améliorer l'efficacité de ces traitements. Par exemple, si un marqueur sérique détectable avant 16 semaines d'aménorrhée prédisait de manière fiable l'occurrence d'une PE, on pourrait initier un traitement à l'aspirine chez les primipares. De plus, un diagnostic précoce permettrait également un meilleur suivi des femmes à risque.

En ce sens, la **recherche de marqueurs précoces de la PE** est le challenge de ces prochaines années. Ces marqueurs précoces seraient libérés dans le sang maternel suite à la mauvaise implantation/placentation qui serait associée à une érosion placentaire et/ou une libération de microparticules/facteurs produits par les trophoblastes en situation de stress. Jusqu'ici, les marqueurs les plus prometteurs sont : la protéine placentaire 13 (PP-13), la sous-unité β libre de l'hCG, des sélectines, l'inhibine A, l'hémoglobine fœtale libre (HbF), l'alpha-1-microglobuline (A1M), le PIGF et l'endogline soluble (sEng) (*Anderson et al., 2012; Masoura et al., 2012*). Les modifications de ces principaux marqueurs précoces sont synthétisées dans le **Tableau 3**.

Marqueur	Quantité relative par rapport aux femmes qui auront une grossesse normale (* PE précoce)	Semaines de grossesse au moment de la mesure (13 ⁺⁶ : 13 semaine et 6 jours)	Référence
PP-13	x 0,6	8-13	<i>Romero et al., 2008</i>
β-hCG libre	x 2	11-13 ⁺⁶	<i>Mikat et al., 2012</i>
E-sélectine	x 1,17	12-16	<i>Carty et al., 2012</i>
P-sélectine	x 2,7 x 1,17	10-14 11-13 ⁺⁶	<i>Bosio et al., 2001</i> <i>Akolekar et al., 2011</i>
Inhibine A	x 1,4 x 1,45 X 1,4	10-14 12-16 11-13 ⁺⁶	<i>Sebire et al., 2000</i> <i>Yu et al., 2011</i> <i>Poon et al., 2010</i>
Activine A	x 1,58 x 1,3	12-16 11-13 ⁺⁶	<i>Yu et al., 2011</i> <i>Poon et al., 2010</i>
PlGF	x 0,69 x 0 x 0,57* - x 0,84 x 0,58	12-16 11-14 11-13 ⁺⁶ 13-16	<i>Yu et al., 2011</i> <i>Boucoiran et al., 2013</i> <i>Foidart et al., 2010</i> <i>Shokry et al., 2010</i>
sEnd	x 1,3* x 1,11	11-13 ⁺⁶ 11 ⁺² -13 ⁺⁶	<i>Foidart et al., 2010</i> <i>Baumann et al., 2008</i>
sFlt1	x 2,52 x 1,15	13-16 11 ⁺² -13 ⁺⁶	<i>Shokry et al., 2010</i> <i>Baumann et al., 2008</i>

Tableau 3 : Les principaux marqueurs précoces du futur développement d'une PE

PP-13, la protéine placentaire 13 est une galectine (de la famille des lectines, les galectines contiennent un domaine de reconnaissance des carbohydrates qui leur permet de lier les β-galactosides) avec une activité lysophospholipase. Il a été montré que sa concentration plasmatique est plus basse chez les femmes qui vont développer une prééclampsie (d'environ 4 0%, sachant que sa concentration varie de façon plus conséquente entre 8 et 13 semaines pour des femmes qui auront une gestation normale). Ces mesures ont été réalisées sur des prélèvements obtenus entre 8 et 13 semaines de grossesse (*Akolekar et al., 2009; Romero et al., 2008*).

La sous-unité β libre de l'hCG a été montrée comme plus abondante au premier trimestre dans le sang des femmes qui vont développer une PE (*Mikat et al., 2012*). C'est également le cas de la **E-sélectine** et de la **P-sélectine** (molécules d'adhésion notamment présentes à la surface des cellules endothéliales) (*Akolekar et al., 2011; Bosio et al., 2001; Carty et al., 2012; Poon et al., 2010*).

L'inhibine A est produite par le placenta et a une concentration plasmatique plus élevée (mesures faites entre 10 et 16 semaines d'aménorrhée) chez les femmes qui vont développer une prééclampsie (*Sebire et al., 2000; Yu et al., 2011*). C'est également le cas de **l'activine A** (*Poon et al., 2010; Yu et al., 2011*).

L'hémoglobine fœtale libre (HbF) et **l'alpha-1-microglobuline (A1M)** sont également augmentées, respectivement d'un facteur 3 et 1,2, dans le sérum des femmes qui vont développer une PE (sang prélevé entre 11 et 16 semaines d'aménorrhée) (*Anderson et al., 2011*).

Le **PIGF** a une concentration plus faible dans le sang des femmes qui vont développer une PE, et ce, dès le premier trimestre. Il semble avoir une assez bonne valeur prédictive, en association avec d'autres marqueurs (*Boucoiran et al., 2013; Foidart et al., 2010; Poon et al., 2010; Shokry et al., 2010; Yu et al., 2011*). D'autres facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques ont été étudiés : ainsi, la concentration du récepteur soluble du VEGF (sFlt1) est plus élevée chez les femmes qui vont développer une PE (*Baumann et al., 2008; Shokry et al., 2010*) et celle du VEGF(165)b, un inhibiteur du VEGF, est plus élevé au 1^{er} trimestre (*Bills et al., 2009*), le VEGF libre étant, quant à lui, non détectable (*Akolekar et al., 2010*). La valeur prédictive de ces facteurs semble cependant insuffisante pour les utiliser en pratique clinique (*Akolekar et al., 2010; Jacobs et al., 2011*).

L'endogline soluble (sEng) est une glycoprotéine transmembranaire et un corécepteur du TGF β (β 1 et β 3). Il a des propriétés anti-angiogéniques. Sa concentration dans le sang des femmes enceintes au premier trimestre est plus élevée lorsque celles-ci vont développer une PE (*Baumann et al., 2008; Foidart et al., 2010*).

Il faut cependant noter que, globalement, la concentration de ces facteurs varie beaucoup entre les femmes et en fonction de la date de prélèvement (qu'elles aient par la suite une grossesse normale ou prééclampsique), et il n'existe donc pas de valeurs seuils permettant de distinguer clairement les femmes qui développeront une PE des autres.

La quantification d'ARNm circulant (correspondant à différents marqueurs tels que l'endogline, le VEGF, sFlt1) à partir du sang maternel (obtenu entre 15 et 20 semaines d'aménorrhée) est également un moyen relativement efficace de prédire la survenue d'une PE avec une détection d'environ 84% des cas pour un taux d'erreur de 5 % dans la cohorte étudiée (*Purwosunu et al., 2009*).

Des approches à haut débit sans *a priori* ont également fait leur preuve : ainsi, des échantillons de plasmas obtenus entre 14 et 16 semaines d'aménorrhée chez des femmes qui ont eu par la suite une grossesse compliquée par la PE ou une grossesse normale ont été analysés par spectrométrie de masse couplé à une chromatographie liquide à haute performance, et leur comparaison a permis d'établir un modèle prédictif basé sur 14 **métabolites**, tels que notamment la bilirubine, l'hème, les dérivés de vitamine D3 ou encore la sphingosine-1-phosphate. Ce modèle a pu être ensuite validé avec d'autres échantillons et donne une bonne prédiction (*Kenny et al., 2010*).

En plus de ces marqueurs sériques, les techniques échographiques, et en particulier le **doppler des artères utérines**, peuvent également apporter une valeur prédictive de bonne qualité au futur développement de la PE (*Carbillon, 2012; Scazzocchio et al., 2013*).

Globalement, l'apport prédictif de chacun des marqueurs est faible. Cependant, les **combinaisons** et les associer aux facteurs de risque liés à la mère permet d'atteindre de bons modèles prédictifs et de prédire jusqu'à 95% des PE précoces avec un taux de faux positif de 10% environ (*Poon et al., 2013*). Évidemment, plus ces modèles combinent de marqueurs, plus le coût augmente et moins l'utilisation en routine semble réaliste. Le progrès dépendra donc de l'optimisation de ces modèles prédictifs sur les marqueurs les plus discriminants.

II. La génétique de la prééclampsie

Comme on pouvait s'y attendre au regard du risque de PE augmenté en cas d'antécédents familiaux de PE, il y a une **génétique de la prééclampsie**. Pour en définir la part, une étude de référence a été réalisée sur la population suédoise (*Cnattingius et al., 2004*). Cette étude est basée sur 244 564 paires de sœurs/frères (62 236 paires de sœurs, 63 288 paires de frères, et 119 040 paires frère-sœur) et 701 488 grossesses issues de ces personnes. Cela a permis d'estimer à **55 % la part des facteurs génétiques dans la prééclampsie**, dont 35 % de facteurs maternels, et 20 % de facteurs fœtaux (avec une contribution équivalente des effets maternel et paternel).

Cela suggère donc l'existence de « gènes » de la prééclampsie. Ceux-ci ont été extensivement recherchés et différents **gènes de susceptibilité** ont pu être identifiés. Pour cela, plusieurs approches ont été utilisées : les études à l'échelle du génome entier, dans des

familles (liaisons avec des cas familiaux de prééclampsie) ou dans des individus sans lien de parenté, et des études d'association par des approches gènes-candidats.

1. Les études à l'échelle du génome entier

Plusieurs études génétiques à l'échelle du génome entier ont été réalisées et elles révèlent plusieurs loci de susceptibilité (**Figure 25**).

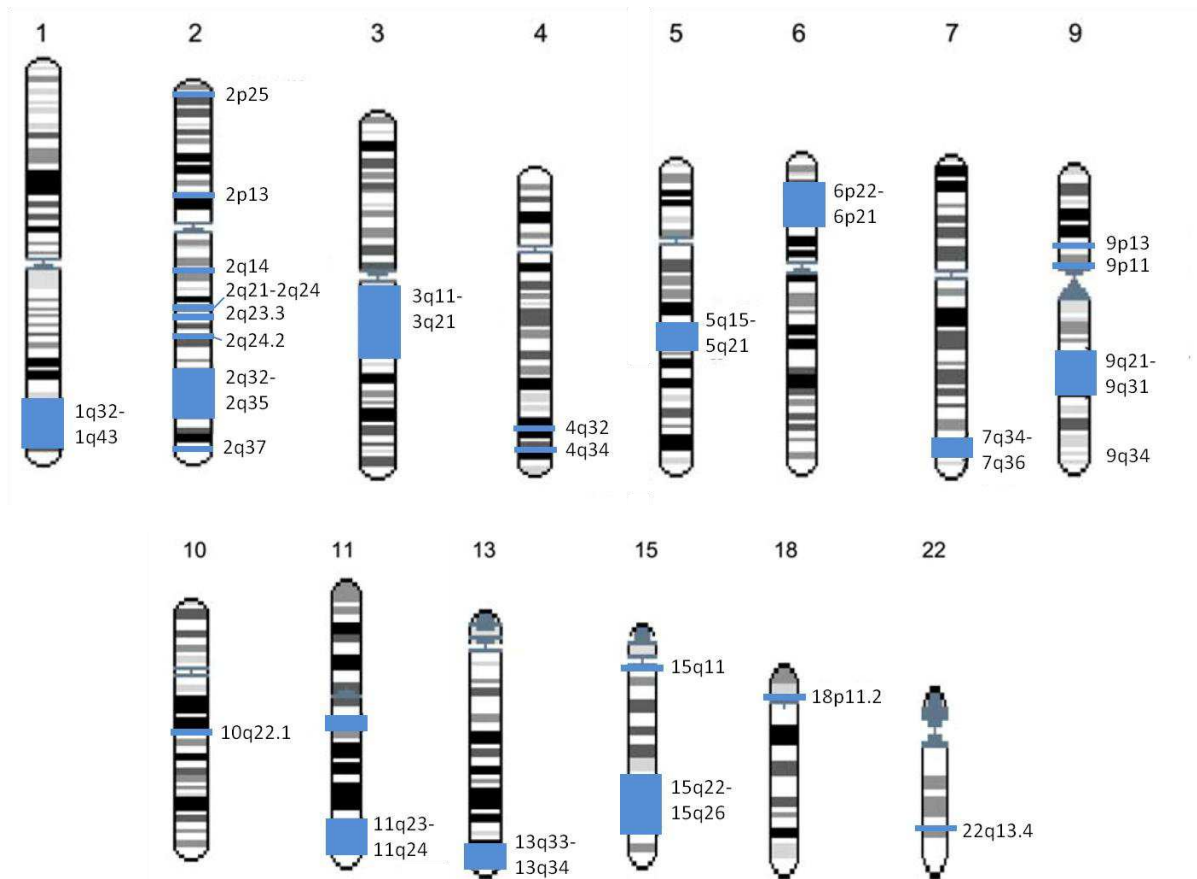


Figure 25 : Les régions chromosomiques associées à la prééclampsie.

Adapté de (*Johnson et al., 2012; Mütze et al., 2008*)

Les premières études ont été réalisées **dans des familles d'une population donnée**, afin de limiter l'hétérogénéité entre les individus, qui pourrait « noyer » le signal lié à la PE. Ainsi, un locus sur le chromosome 2 (**2p13**) a été identifié dans des familles islandaises (*Arngrímsson et al., 1999*), et a ensuite été confirmé dans une population finlandaise (*Laasanen et al., 2003*). L'étude de 1999 suggérait également un locus en **2q22** (dans un sous-ensemble des familles analysées). La localisation de nouveaux marqueurs associés à la PE sur le chromosome 2 a renforcée l'analyse de liaison réalisée à partir de familles

australiennes et néozélandaises qui avait identifié un locus en **2q23** (*Moses et al., 2000*). Il s'agit vraisemblablement du même locus, mais la faible résolution des marqueurs empêchait une localisation plus précise. À partir des mêmes familles, d'autres loci ont été décrits : sur les chromosome 5 (**5q**), sur le chromosome 11 (**11q23-24**) et le chromosome 13 (**13q**) (*Johnson et al., 2007; Moses et al., 2006*). Une autre analyse à l'échelle du génome entier à partir de familles finlandaises a révélé un nouveau locus sur le chromosome 2 (**2p25**), clairement différent de ceux trouvés dans les autres études (*Laivuori et al., 2003*). Cette étude a également trouvé un locus sur le chromosome 9 (**9p13**). Une région sur le chromosome 4 (**4q**) a également été décrite dans une étude sur des familles australiennes (*Harrison et al., 1997*). Dans des familles hollandaises, des loci sur les chromosomes 10 (**10q22**), 11 (**11q**) et 22 (**22q**) ont également été suggérés (*Lachmeijer et al., 2001; Oudejans et al., 2004*).

Cinq de ces analyses à l'échelle du génome entier ont été utilisées pour une méta-analyse (*Zintzaras et al., 2006*). Cette étude a permis d'identifier de nouveaux loci sur les chromosomes 2 (deux loci différents en **2q**), 3 (**3q**), 7 (**7q**), 9 (**9q**), 18 (**18p**).

Ensuite, avec le développement de technologies permettant une bien meilleure résolution avec les puces de polymorphismes (SNP), et la diminution du coût pour obtenir cette carte de marqueurs pour chaque individu, de nouvelles études sur des **patientes sans lien de parenté** ont été réalisées. Ainsi, 648 175 SNPs ont été génotypés chez 538 femmes prééclampsiques et 540 femmes aux grossesses normales (*Johnson et al., 2012*). Cela a permis de trouver 2 SNPs significativement associés, en **2q14.2**, situé dans une région intergénique, à 15 kb en amont du gène de l'Inhibine β (INHBB).

Ainsi, bien que ces études aient permis d'identifier des **régions associées à la prééclampsie**, elles ont rarement permis de trouver directement des gènes dont des variants prédisposeraient à la PE. Mais elles ont pu mener à certains gènes candidats à l'intérieur de ces régions, dont certains ont pu être ensuite validés. C'est par exemple le cas d'**ACVR2A en 2q22** (*Moses et al., 2006*), de **TNFSF13B en 13q** (*Fenstad et al., 2010a*) et de **STOX1 en 10q22** (*Van Dijk et al., 2005*). Ce dernier cas sera détaillé dans le chapitre 4.

2. Les études d'association de gène-candidats

À l'opposé de ces études sans *a priori*, des approches « **gènes candidats** » ont été réalisées. Ces approches se sont principalement concentrées sur les connaissances de la **physiopathologie de la PE**, et en particulier sur les voies de la coagulation et de la

fibrinolyse, sur le système rénine-angiotensine (essentielle à la régulation de la pression artérielle), le stress oxydatif, l'inflammation, l'immunité et le métabolisme des lipides. L'ensemble de ces éléments sera discuté dans la partie III. Cependant, les associations obtenues dans une population déterminée ne sont pas toujours reproductibles (*Mütze et al., 2008*). Ainsi, une méta-analyse concernant certaines de ces associations a été récemment réalisée (*Buurma et al., 2013*). Pour tous les polymorphismes associés à la PE dans au moins 2 études différentes, sur 22 variants dans 15 gènes, seuls 7 sont restés significativement associés à la PE après la méta-analyse. Ces variants se situent à proximité des gènes suivants : **ACE** (angiotensin I converting enzyme), **CTLA4** (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), **F2** (coagulation factor II, ou prothrombine), **FV** (coagulation factor V), **LPL** (lipoprotein lipase) et **SERPINE1** (Serine protéase inhibiteur E1, ou plasminogen activator inhibitor type 1). De façon notable, la plupart de ces variants sont aussi associés à un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires, cela confirme ainsi l'idée que la prééclampsie et les maladies cardiovasculaires partagent des facteurs génétiques de prédisposition. Les associations perdues dans cette méta-analyse concernent notamment des gènes du système rénine-angiotensine (**AGT** ou **SERPINA8**, codant l'angiotensinogène, et **AT1R**, codant le récepteur de type 1 à l'angiotensine II), et le **gène NOS3** (codant la NO synthase endothéliale). Une autre méta-analyse plus récente et centrée sur **NOS3** montre qu'un des 2 polymorphismes décrits est bien associé à la prééclampsie (*Dai et al., 2013*).

Cependant, il est important de noter que si ces associations ne sont pas confirmées, cela peut être dû à des divergences en fonction des populations étudiées, et ces variants pourraient alors être des marqueurs spécifiques de prédisposition dans certaines populations.

Certaines associations n'ayant pas encore été reproduites, il faudra attendre de nouvelles études pour les valider. C'est par exemple le cas pour des polymorphismes des gènes **ACVR2A** (activin receptor type 2), **COMT** (Catechol-O-methyltransferase), **SERPINA3**, **HLA-G**, **CCR5** (chemokine receptor 5), et des gènes codant des protéines régulatrices du complément telles que **MCP** (membrane cofactor protein) et **CFI** (complement factor I) (*Chelbi et al., 2012; Gurdol et al., 2012; Lim et al., 2010; Qing et al., 2011; Roten et al., 2009; Salmon et al., 2011; Zhang et al., 2012*).

Globalement, il y a donc tout un ensemble de polymorphismes dans différents gènes qui peuvent favoriser le développement d'une prééclampsie, mais il ne s'agit clairement pas d'une maladie monogénique à hérédité Mendélienne. Ainsi, la prééclampsie est une

pathologie complexe, dans laquelle des **facteurs génétiques et environnementaux** interviennent de façon indépendante et combinée.

3. Perspectives concernant la génétique de la prééclampsie

Il faut noter que toutes les études menées ayant pour but de déterminer des marqueurs génétiques de la prééclampsie se sont concentrées sur le **génotype maternel**. Or le placenta est centrale dans cette pathologie, et il serait sans doute **plus approprié d'utiliser l'ADN génomique du placenta ou de l'enfant**, afin d'éviter une dilution des données informatives. Ces approches sont principalement réalisées dans une optique diagnostique, d'où l'intérêt d'avoir des marqueurs maternels, mais l'étude du génome fœtal pourrait également servir au diagnostic **d'un risque pour le couple** : les marqueurs trouvés pourraient être cherché chez la mère et chez le père, ou dans un futur proche à partir de **l'ADN fœtal circulant** (*Tsui and Lo, 2012*). De plus, les données obtenues au cours de ma thèse suggèrent que la prééclampsie peut être induite par des facteurs purement paternels (développement du syndrome chez des souris sauvages croisées avec des mâles transgéniques pour STOX1). Il est donc essentiel **d'intégrer les marqueurs génétiques de l'enfant pour les futures études d'association/liaison**.

III. Physiopathologie de la prééclampsie

1. Le placenta, l'organe dont les défauts sont à l'origine de la prééclampsie

Il est bien établi que **le placenta est à l'origine de la prééclampsie**. En effet, son implication est démontrée par le développement de la PE exclusivement en cas de grossesse, par la résolution des symptômes suite à l'ablation du placenta, par la survenue possible de la pathologie en l'absence de fœtus (grossesse molaire) et par des cas rapportés de grossesses où le placenta n'avait pas été évacué correctement suite à l'accouchement et où une prééclampsie survenait alors et ne se résolvait pas suite au retrait du fœtus (dans des cas de grossesse extra-utérine) (*Marcus and Quattlebaum, 1959; Shembrey and Noble, 1995*).

La **placentation est une étape critique** permettant la mise en place d'un organe transitoire essentiel au bon déroulement de la grossesse. Le placenta assure en effet la tolérance immunologique, permettant le contact de deux individus génétiquement différents, et protège le fœtus des agressions extérieures. Par des sécrétions hormonales spécifiques, il prépare l'organisme maternel à l'acceptation de l'embryon et le maintient dans un état favorable au développement et à la croissance du fœtus. Il est également le garant de la croissance embryonnaire puis fœtale via l'apport en oxygène et nutriments, et l'élimination des déchets, grâce à la circulation fœto-maternelle (voir Chapitre Un).

Au vu de l'importance fonctionnelle de cet organe, on comprend aisément que des anomalies de sa morphogénèse puissent avoir des conséquences sur la croissance fœtale. En revanche, il est plus difficile de comprendre **comment un défaut de placentation peut induire l'apparition de symptômes au niveau de l'organisme maternel.**

Pendant très longtemps, cela n'a pas été compris. Une hypothèse de plus en plus étayée a émergé au cours des années 90, avec l'idée d'un **modèle en 2 étapes** : une **1^{ère} étape** (phase présymptomatique) pendant laquelle survient un **défaut de placentation**, notamment responsable d'un **stress oxydatif**, puis une **2^{ème} étape** (phase symptomatique) au cours de laquelle la mère développe une **réaction inflammatoire systémique** impliquant des **lésions de l'endothélium** vasculaire, des **thromboses** et une **activation du système rénine-angiotensine-aldostérone**, l'ensemble conduisant à une réduction de la perfusion de tous les organes et à une défaillance multi-viscérale potentielle (*Roberts and Gammill, 2005*).

2. Première étape : une placentation défectueuse

L'existence de **défauts de placentation** en cas de prééclampsie est étayée par des analyses anatomopathologiques et histologiques des placentas obtenus après l'accouchement.

Ainsi, les placentas prééclamptiques présentent des **lésions placentaires ischémiques** (liées à une diminution ou un arrêt temporaire de la vascularisation). Ces lésions peuvent être des athéroses, des infarctus plus ou moins volumineux, et des rétrécissements scléreux des artérioles (*Khong, 1991; Nessmann and Larroche, 2001; De Wolf et al., 1975*). L'athérose est une lésion des artères caractérisée par des dépôts intra-épithéliaux d'immunoglobulines (entraînant une infiltration de lymphocytes T et de macrophages) et par une nécrose fibrinoïde de la paroi. Cette lésion peut entraîner une réduction considérable de la lumière vasculaire

voire une oblitération (thrombose) altérant le débit utéro-placentaire (*Meekins et al., 1994a*). Ces lésions d'athérose sont à l'origine des diverses lésions placentaires observées : les lésions d'ischémie-hypoxie villositaire, les infarctus, les lésions typiques de nécrose ischémique, l'hématome rétroplacentaire, les chorioangiomes et la thrombose sous-choriale massive (*Khong, 1991*). L'ensemble de ces lésions peut être responsable d'une altération des échanges fœto-placentaires et donc induire un retard de croissance intra-utérin. Ces lésions placentaires sont inconstantes et impliquent un pourcentage variable du volume placentaire.

Des analyses plus fines montrent que la PE est liée à une **placentation sous-optimale**. Des biopsies effectuées au niveau du lit placentaire de patientes prééclampsiques révèlent une invasion cytotrophoblastique trop superficielle. Ainsi, si dans des placentas issus de grossesses non compliquées, 100 % des artères spiralées déciduales et 76 % des artères myométriales sont remodelées, seules 44 % des artères déciduales et 18 % des artères myométriales le sont dans le cas d'une prééclampsie (*Meekins et al., 1994b*). Les anomalies structurelles qui entraînent les lésions placentaires sont donc situées au niveau du lit placentaire (*Brosens, 1964; Lyall, 2002*). Certains vaisseaux ne sont donc pas remodelés, et lorsqu'ils le sont, le remodelage ne dépasse pas la limite muqueuse de l'utérus, alors que dans la grossesse normale ces modifications s'étendent jusqu'au premier tiers du myomètre. Les artères utéro-placentaires ont conservé une média vasoréactive ainsi qu'une limitante élastique interne, ce qui témoigne du maintien d'un certain degré de contractilité. Il y a donc un **défaut de remodelage des artères spiralées utérines** par les cytotrophoblastes extravilloux (**Figure 26**). Ce défaut de remodelage des artères utérines spiralées, dû à une **invasion trop superficielle**, entraîne une **augmentation de la résistance vasculaire et la réduction de la perfusion utéro-placentaire** ainsi que les lésions secondaires telles que l'athérose et les ischémies placentaires (*Marcotelles, 2010; Meekins et al., 1994b*). Ces observations sont cohérentes avec les anomalies de résistance et de pulsatilité détectées par doppler des artères utérines à la fin du premier trimestre chez les femmes qui vont par la suite développer une prééclampsie (*Carbillon, 2012*).

Figure 26 : Le défaut de remodelage des artères spiralées utérines en cas de prééclampsie

Adapté de (*Kaufmann et al., 2003*).

Cependant, les causes de ce défaut de placentation restent mystérieuses. Et elles sont d'autant plus difficiles à élucider que le matériel biologique accessible (placentas à terme) est un tissu où causes et conséquences de la pathologie sont indiscernables. Ainsi, les observations qui y sont faites doivent être interprétées avec prudence.

Il semble que **les cytotrophoblastes extravilleux (CEV) constituent les cellules clés de la physiopathologie de la prééclampsie**. Et d'un point de vue moléculaire, les CEV des placentas prééclamptiques présentent un **déficit quantitatif et fonctionnel**.

Concernant le déficit quantitatif, il pourrait être expliqué par une destruction des cellules trophoblastiques par le système immunitaire maternel, due à un **défaut d'immunotolérance**. En ce sens, il a été observé l'induction de la mort de cellules trophoblastiques par des macrophages maternels en cas de PE (*Petsas et al., 2012*). De plus, l'expression de HLA-G par le trophoblaste est diminuée dans la PE (*Le Bouteiller et al., 2003*), cela pourrait limiter la protection des trophoblastes de l'attaque par les cellules uNK au niveau du site d'implantation (*Moffett-King, 2002*). Enfin, le risque accru de PE observé avec certaines combinaisons alléliques de KIR/HLA-C supporte également cette hypothèse. En effet, ce sont les femmes ayant deux allèles KIR-A, dont les cellules uNK ne présentent pas de récepteurs activateurs liant l'HLA-C2, qui ont un risque accru de PE, en cas de présentation d'HLA-C2 par les trophoblastes. Ces résultats suggèrent un rôle des cellules uNK dans l'allo-reconnaissance des antigènes paternels, et dans l'induction d'une immunotolérance (impliquant peut-être les cellules utérines Natural Killer et/ou les lymphocytes T régulateurs).

Concernant le défaut qualitatif, les **molécules d'adhésion** impliquées dans la migration de CEV, dans leur ancrage et dans leur migration au sein de l'endomètre maternel sont modifiées (*Zhou et al., 1993*). Par exemple, les CEV expriment uniquement des intégrines épithéliales ($\alpha3\beta4$, $\alpha6\beta4$) et interstitielles ($\alpha5\beta1$). Les études montrent que les CEV prolifèrent, mais **perdent leur capacité invasive**. Il a notamment été montré que les CEV de placentas prééclamptiques surexprimaient MUC1, et que cette surexpression avait un impact négatif sur les capacités invasives de ces cellules (*Shyu et al., 2011*). Ce défaut d'invasion se traduit également par une altération de l'expression des gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Par exemple, la MMP-9 est moins exprimée par les CEV en cas de PE (*Lim et al., 1997b*). Il semble également qu'il y ait un **défaut de différenciation en CEV endovasculaires**. Ils n'expriment pas les marqueurs de cellules endothéliales telles que

les molécules d'adhésion de type vasculaire VCAM-1 et PECAM-1 ou les intégrines $\alpha\beta 5$ et $\alpha\beta 3$, caractéristiques de l'endothélium. De même, la VE-cadhérine, marqueur des cellules endothéliales activées n'est pas exprimée (Zhou *et al.*, 1997b). Il a été suggéré que le déficit quantitatif et fonctionnel des CEV participe au défaut de remodelage des artères et au maintien de la paroi musculaire à haute résistance sur les artères utérines spiralées (Kaufmann *et al.*, 2003). Ceci occasionnerait un **défait de perfusion placentaire** avec une **hypoxie** et un **stress oxydatif** (Hung and Burton, 2006; Hung *et al.*, 2001). Le rôle de l'hypoxie dans l'apparition du syndrome prééclampsique est cohérent avec l'aspect ischémique des placentas prééclampsiques qui suggère également la présence de cette hypoxie placentaire. Au niveau moléculaire cette idée est soutenue par les **concentrations élevées des facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2** observées dans les placentas prééclampsiques (Rajakumar *et al.*, 2003). De plus, l'hypoxie pourrait entretenir les anomalies de différenciation des CEV ou les aggraver. En effet, le phénotype des CEV *in vivo* dans la PE est similaire au phénotype des CEV non différenciés obtenus *in vitro* en condition hypoxique. Le maintien d'une situation hypoxique va avoir pour conséquence le maintien d'un profil d'expression génique inadéquat perturbant le signal de différenciation des CEV interstitiels en CEV invasifs et altérant donc l'invasion. Par exemple, la surexpression de HIF-1 active la transcription de plusieurs gènes, dont celui codant le TGF- β . Cette surexpression du TGF- β inhibe l'invasion trophoblastique (Caniggia *et al.*, 1999, 2000). Le niveau inadéquat de HIF-1 et les défauts de placentation couplés au stress oxydatif seraient donc responsables des lésions d'ischémie placentaire observées en anatomopathologie. **Une question clé demeure : lequel de ces mécanismes (l'hypoxie placentaire et le défaut de différenciation des CEV) précède l'autre ?**

Il faut en ce sens noter que des facteurs trophoblastiques (notamment le VEGF, le PlGF, et l'hCG) sont directement impliqués dans des processus d'angiogénèse utérine et de remodelage des vaisseaux utérins indépendamment de l'invasion de la paroi des vaisseaux par la cellule trophoblastique. Ainsi, ce sont peut-être des anomalies au niveau de ces facteurs qui causent une hypoxie responsable du défaut de différenciation des CEV et ainsi le défaut de remodelage des artères spiralées par les CEV endovasculaires.

3. Deuxième étape : le syndrome maternel

Le syndrome maternel serait le résultat d'une **réponse adaptative, visant à augmenter la perfusion** placentaire pour palier l'hypoxie et la détresse fœtale, mais son

exagération chez certaines femmes engendrerait les signes cliniques de la prééclampsie. Ainsi, en présence d'un défaut d'invasion des artères utérines spiralées par les CEV, qui implique un flux sanguin insuffisant, les cellules du placenta (et/ou du fœtus) sécrèteraient des agents vasoactifs visant à assurer un flux sanguin placentaire adéquat mais suscitant chez certaines mères une réponse hypertensive. Si cette hypertension est trop forte, les autres organes seraient également endommagés, d'où la défaillance multi-viscérale parfois associée (*Redman et al., 1999*). Ainsi, la maladie serait d'abord localisée au niveau utéro-placentaire puis elle se généraliserait suite à l'hypoxie et à l'augmentation du stress oxydatif qui stimuleraient la libération de **facteurs solubles, de nano et microparticules et de débris syncytiotrophoblastiques dans la circulation maternelle** (*Savaj and Vaziri, 2012*). Ces différents facteurs solubles induiraient alors une **dysfonction endothéliale généralisée** et une **réaction inflammatoire excessive** de l'organisme maternel. La maladie devenue systémique s'auto-entretiendrait ensuite aboutissant à l'apparition des symptômes.

La description du syndrome maternel et de ses causes a été subdivisée en plusieurs parties pour en faciliter la compréhension, cependant ces aspects sont interconnectés.

i. La dysfonction endothéliale et le déséquilibre des facteurs vasoactifs

Les signes cliniques de la PE peuvent donner des indications concernant les anomalies sous-jacentes. L'hypertension artérielle et la protéinurie indiquent ainsi une **augmentation de la résistance périphérique vasculaire maternelle avec vasoconstriction** et une **augmentation de la perméabilité endothéliale**. La protéinurie observée en cas de prééclampsie est due à une **endothéliose rénale**, une anomalie spécifique de la prééclampsie, qui engendre une augmentation de la perméabilité glomérulaire (*Fisher et al., 1981*).

Ainsi, des anomalies au niveau des facteurs vasoactifs ont été recherchées. Une **augmentation des taux de molécules vasoconstrictrices**, telles que les endothélines et le thromboxane A₂, et une **réduction des molécules vasodilatatrices**, comme le NO et les prostacyclines ont été observés chez les patientes prééclamptiques (*Bernardi et al., 2008; Chavarría et al., 2003; Slowinski et al., 2002*). Les patientes prééclamptiques présentent également une réactivité accrue à l'angiotensine II favorisant la vasoconstriction et l'augmentation de la perméabilité (*Doering et al., 1998*).

On observe ainsi un **déplacement d'une production endothéliale à prédominance vasodilatatrice et anti-thrombotique à une activation endothéliale à prédominance**

vasoconstrictrice et pro-thrombotique. Cette vasoconstriction prolongée entraîne des lésions, une souffrance endothéliale et un accroissement de la perméabilité capillaire, d'où les symptômes cliniques.

Mais comment peut-on expliquer la dissémination du stress placentaire vers une souffrance endothéliale maternelle ? Quels sont les stimuli initiateurs du syndrome maternel ?

Concernant la sensibilité accrue des patientes prééclamptiques à l'angiotensine II, elle pourrait s'expliquer par la surexpression par les placentas pathologiques du récepteur à la bradykinine (B2), qui peut s'hétérodimériser avec le récepteur de type I de l'angiotensine II (AT1R), augmentant ainsi la réponse (*Quitterer et al., 2004*).

Des expériences ont également montré que le sérum de patientes prééclamptiques est capable d'induire des perturbations biochimiques *in vitro* sur un endothélium sain. Ce sérum réduit ainsi la prolifération des cellules épithéliales, stimule la production de fibronectine et de Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), augmente l'accumulation de triglycérides et réduit la production des molécules vasodilatatrices dérivées de l'endothélium comme le NO et les prostacyclines (*Roberts et al., 1991*). De nombreux laboratoires ont depuis essayé d'identifier les **facteurs circulants responsables de cette dysfonction endothéliale**.

Ainsi, les cellules placentaires, en situation d'hypoxie, augmenteraient leur production de facteurs sécrétés actifs sur l'endothélium vasculaire maternel. On sait par exemple que le complexe **HIF-1** peut augmenter la production de **l'endothéline 1**, un puissant vasoconstricteur, et **réduire la synthèse du NO** vasodilatateur (*Tipoe et al., 2006*), ce qui contribuerait à l'élévation de la pression sanguine et à l'activation de la voie de coagulation. L'hypoxie régule aussi la production et la libération de facteurs angiogéniques par les trophoblastes. La production de **VEGF** est ainsi augmentée alors que celle du **PIGF** est diminuée par l'hypoxie (*Munaut et al., 2008*), ce qui, combiné à la **réduction des prostacyclines et du NO**, entraîne le ralentissement de la croissance placentaire et diminue la vasodilatation.

Les **facteurs angiogéniques sFLT-1 et endogline (ENG)** ont également été décrits comme jouant un rôle prépondérant dans la physiopathologie de la PE. Des expériences montrent que l'hypoxie placentaire induit leur production en excès, et qu'ils sont alors sécrétés dans la circulation maternelle. Ces deux molécules sont d'ailleurs détectées précocement dans le sérum des femmes prééclamptiques (*Maynard et al., 2005; Venkatesha et al., 2006*).

La protéine **sFLT-1** est une protéine **anti-angiogénique** endogène principalement produite par le placenta qui agit en **neutralisant les protéines pro-angiogéniques VEGF et PlGF**. De façon cohérente, les femmes atteintes de PE présentent une faible fraction de PlGF et de VEGF sériques libres. Le VEGF est important non seulement pour la régulation de la pression sanguine, mais aussi pour le maintien de l'intégrité de la barrière de filtration glomérulaire. C'est un facteur angiogénique qui participe également à la sécrétion de NO et de prostacyclines vasodilatatrices de l'endothélium, suggérant son rôle dans la diminution du tonus vasculaire et la pression artérielle (*Brockelsby et al., 2000*). Par conséquent, il a été émis l'hypothèse que l'excès de sFLT-1 sécrété par le placenta en PE conduit à un dysfonctionnement endothélial, à l'hypertension artérielle et à la protéinurie par son action antagoniste sur le VEGF et le PlGF.

L'**Endogline (ENG)** est un **corécepteur des facteurs de croissance de la famille du TGF- β** , exprimé sur la membrane des cellules endothéliales, et qui joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité du système vasculaire. Des investigations plus poussées ont révélé que la région extracellulaire de la protéine ENG est libérée dans la circulation maternelle via un clivage par la MMP-14 (*Kaitu'u-Lino et al., 2012*). Cette ENG soluble circule en très grandes quantités chez les femmes présentant des formes graves de PE.

Ainsi, chez les patientes prééclamptiques, le VEGF, le PlGF et certains facteurs de la famille du TGF- β sont détournés des vaisseaux maternels. Par exemple, la séquestration du TGF- β 1 par la forme soluble de l'ENG empêche sa fixation à ses récepteurs et, par conséquent altère sa signalisation en aval, affaiblissant ainsi l'activation de l'eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase, codé par *NOS3*) et la vasodilatation (*Venkatesha et al., 2006*). En réponse, la tension artérielle de la mère augmente, induisant une augmentation du flux sanguin vers le placenta.

ii. La coagulopathie

La thrombopénie souvent observée chez les patientes témoigne d'une activation et d'une agrégation plaquettaire. D'un point de vue biochimique, on observe une augmentation des taux plasmatiques de fibronectine, du facteur de Von Willebrand et de la thrombomoduline (*Chavarría et al., 2002; Nadar et al., 2004*). Il y a également des **anomalies du rapport prostacycline/thromboxane A2** qui favorisent l'agrégation,

l'activation plaquettaire et la vasoconstriction (*Wang et al., 1992*). La coagulopathie est donc la conséquence d'une **expression anormale de facteurs pro-coagulants**.

iii. Le stress oxydatif et le métabolisme des lipides

La réduction de l'oxygénation placentaire induit également un **stress oxydatif avec la production d'espèces réactives de l'oxygène** (ROS, reactive oxygen species) et de **lipoperoxydes toxiques**, en particulier pour les cellules endothéliales.

Le stress oxydatif induit **l'augmentation de l'apoptose** ou mort cellulaire programmée permettant ainsi la **libération de fragments de microvillosités du syncytiotrophoblaste**. La production de **radicaux libres** est un processus habituel dans l'unité fœto-placentaire, laquelle s'en prémunit grâce à des systèmes enzymatiques placentaires présents dès le 1^{er} trimestre de la gestation. Mais chez les femmes prééclamptiques, on observe une **diminution des taux circulants d'agents anti-radicalaires** tels que l'ascorbate et la vitamine E, ce qui, associé à une augmentation des taux plasmatiques de TNF α et d'acide urique, favorise le stress oxydatif et les lésions cellulaires (*Kharb, 2000*). Par conséquent, la libération dans la circulation maternelle de fragments cellulaires, dont la toxicité sur les cellules endothéliales est connue, augmente.

Les lipoperoxydes exercent une action particulièrement **toxique**, d'autant plus que les patientes prééclamptiques présentent une hyperlipidémie (*Lorentzen and Henriksen, 1998*). On observe chez ces patientes une accumulation intracellulaire de triglycérides et un taux sérique de lipides supérieur, ce qui exerce **un effet négatif sur la libération de prostacyclines** par les cellules endothéliales. Comme le sang intervilloux contient beaucoup plus d'acides gras polyinsaturés et de thromboxane A2 que le sang maternel périphérique, il s'établit donc un **déséquilibre entre la production de prostacyclines qui diminue et de thromboxane qui augmente**, ce qui altère le rapport prostacycline/thromboxane A2 normalement favorable à la vasodilatation.

Une **approche protéomique** a également permis de montrer une augmentation des **Apolipoprotéines A-II, C-I et E** en cas de PE (*Auer et al., 2010*). Les Apolipoprotéines interviennent dans le transport des lipides. Dans une autre approche protéomique indépendante, la présence d'**Apolipoprotéine A-I** en quantité supérieure a été détectée chez les femmes prééclamptiques par rapport à des femmes dont la grossesse n'était pas

compliquée (*Zhang et al., 2011*). Dans la même étude, les auteurs ont pu montrer une augmentation de la production de cette protéine dans des cellules de choriocarcinome (JAR) soumises à des conditions hypoxiques.

iv. L'inflammation

La grossesse normale est classiquement accompagnée d'une activation modérée de la réponse inflammatoire, secondaire à la libération placentaire normale de débris trophoblastiques. En cas de PE, cette **réponse inflammatoire** est bien plus marquée, comme en témoigne **l'augmentation de certaines cytokines** (TNF α , IL-6) qui atteignent des niveaux similaires à ceux rencontrés lors d'infections sévères (*Bachour et al., 2008*). La sécrétion par le placenta pourrait participer directement à l'augmentation des taux sériques observés. En effet, le **placenta libère des cytokines pro-inflammatoires** telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF (*Lockwood et al., 2008*).

Des **fragments de syncytiotrophoblastes** (débris) sont présents dans la circulation des femmes enceintes dont la grossesse se déroule normalement, mais en cas de PE, leur quantité est bien supérieure, et ils auraient également des **activités pro-inflammatoire et anti-angiogénique** supérieures (*Tannetta et al., 2013*). Ces fragments ont récemment été montrés transcriptionnellement et traductionnellement actifs et produiraient notamment du sFLT1 (*Rajakumar et al., 2012*). Ces débris circulants ont pour conséquence l'augmentation des stimuli inflammatoires, et pourraient ainsi favoriser de façon indirecte la sécrétion de cytokines. Leur liaison aux monocytes et aux neutrophiles induit en effet la libération de TNF α , de l'IL-1 et de l'IL-2 et de radicaux superoxydes qui vont agir sur l'endothélium vasculaire maternel (*Sargent et al., 2006*).

L'augmentation des marqueurs de l'inflammation et de la dysfonction endothéliale est déjà détectable avant l'apparition des symptômes de la PE (*López-Jaramillo et al., 2008*).

v. L'immunité

Il semble qu'il existe également un lien entre immunité et activation endothéliale. On détecte une réponse inflammatoire centrée sur l'endothélium et son interaction avec les leucocytes, mais également une **activation des neutrophiles, des lymphocytes, des monocytes et du complément**. La décidue contient de nombreuses cellules qui, une fois activées, relâchent des médiateurs altérant les cellules endothéliales. Certains polynucléaires

neutrophiles activés libèrent des élastases qui détruisent l'endothélium. Les cellules endothéliales altérées peuvent en retour augmenter leur adhésion avec les cellules de la réponse inflammatoire et vont favoriser la libération de cytokines (*Lyall et al., 1994*). Cette adhésion endothéliale est favorisée par la production de molécules telle que la **E-sélectine qui augmente et favorise l'activation des globules blancs**. Cette interaction entre cellules endothéliales anormales et leucocytes, ne s'effectuerait que dans la circulation maternelle. Aucune de ces interactions n'a été retrouvée dans le plasma fœtal (*Lyall et al., 1995*). Les polynucléaires activés sont une autre source de radicaux libres liés à l'oxygène, ce qui entraîne également la production de cytokines. Une étude a mis en évidence dans le sérum de femmes prééclamptiques des taux élevés de chimiokines (IL-8, MP-1) et de collagénase 1 produits par des monocytes activés et par l'endothélium vasculaire altéré (*Kauma et al., 2002*). Les approches protéomiques ont également permis de montrer la **diminution de plusieurs composants du complément (C4a, CB, C7, C1r)** chez les femmes prééclamptiques (*Auer et al., 2010; Zhang et al., 2011*). Pour C4a, l'hypoxie mime cet effet (diminution) sur un modèle cellulaire (*Zhang et al., 2011*). La dérégulation du système du complément a également été confirmée au niveau placentaire, notamment avec une augmentation de la protéine C4d, et une augmentation des ARNm correspondant aux protéines régulatrices du complément CD55 et CD59 (*Buurma et al., 2012*).

Par ailleurs, on observe une augmentation des concentrations circulantes **d'auto-anticorps contre les récepteurs de type IA de l'angiotensine II**, ce qui témoigne également d'une immunité altérée chez les patientes prééclamptiques (*Zhou et al., 2008a, 2008b*). Ces anticorps circulants, en plus de leur **effet vasoconstricteur**, pourraient favoriser le **stress oxydatif, l'inflammation et les anomalies de la coagulation**, observés chez les femmes ayant une PE. En effet, des travaux ont montré que ces auto-anticorps peuvent stimuler la NADPH oxydase des trophoblastes et des cellules vasculaires musculaires lisses, stimulation qui serait alors une source importante d'espèce réactives de l'oxygène (*Dechend et al., 2003*). Ces anticorps participeraient également à la production de sFLT-1 (*Zhou et al., 2008a*).

CHAPITRE TROIS

LES MODELES D'ETUDE DE LA PREECLAMPSIE

Les altérations d'implantation/placentation conduisant au développement d'une prééclampsie se produisent au cours du premier trimestre de grossesse. Or, à ce stade, il est très difficile d'accéder au tissu d'intérêt (le placenta) dans l'espèce humaine, sauf dans le cas d'une interruption volontaire de grossesse (IVG), ou bien dans le cadre d'une biopsie de tissu trophoblastique, prélèvement invasif induisant un risque de fausse-couche important. De plus, les tissus issus d'IVG, s'ils correspondent au bon timing, sont d'une aide relative, car on ne peut pas déterminer ceux qui auraient engendré une prééclampsie de ceux tout à fait normaux (ou en tout cas, pas de manière efficace et facilement réalisable). C'est pourquoi les **modèles d'études sont essentiels**. Ceux-ci peuvent être **cellulaires** (pour étudier la physiologie de la cellule trophoblastique, par exemple) ou **animaux** (afin de mieux appréhender les interactions entre le placenta et l'organisme maternel, par exemple).

I. Les modèles cellulaires

1. Les trophoblastes isolés à partir de placenta

À partir d'un placenta à terme (issu d'une grossesse normale ou prééclamptique), il est possible de **disséquer les villosités** et de **purifier les trophoblastes**. Ces trophoblastes villositaires peuvent être isolés grâce à un protocole mis au point dans les années 1980 basé sur une digestion par de la trypsine suivie d'une purification sur un gradient de Percoll, et qui permet d'avoir une purification proche de 80 % (*Kliman et al., 1986*). Une optimisation de ces cultures primaires a pu être réalisée grâce à l'utilisation de billes magnétiques qui ont ensuite permis d'obtenir un enrichissement d'environ 90 % (*Douglas and King, 1989*). De façon spontanée, **ces cellules établissent un syncytium** en culture. Elles sont donc intéressantes pour étudier les mécanismes de régulation de la fusion et de la libération de fragments de syncytium. Ainsi, il a été montré que l'apoptose induite par la perte du potentiel de la membrane mitochondriale était concomitante à une libération accrue de ces fragments de syncytium et que les vitamines anti-oxydantes C et E prévenaient ce phénomène, tout en inhibant la fusion des trophoblastes (*Tannetta et al., 2008*).

Cependant, **ces cellules purifiées ne prolifèrent pas** en culture, et donc on ne peut les garder en survie que quelques jours. Cela rend donc leur utilisation limitée.

2. Les lignées de chorio-carcinome humain

Du point de vue de la pratique expérimentale, il est indispensable de disposer de lignées de **cellules qui puissent proliférer**, tout en arborant des propriétés des cellules d'intérêt, c'est-à-dire des trophoblastes. Pour cela, les **lignées cellulaires de choriocarcinome** constituent l'outil le plus classiquement utilisé en placentologie, en particulier les lignées BeWo, JEG-3 et JAR (**Tableau 4**). Toutes trois expriment la **cyrokératine 7 (KRT7)**, un **marqueur des trophoblastes**. Elles sont utilisées depuis une trentaine d'années, d'où une littérature relativement abondante. Comme la plupart des lignées cancéreuses, ces lignées ont un **caryotype anormal paratriploïde XXY** (*Poaty et al., 2012*).

i. Les cellules BeWo

Les cellules **BeWo** ont été isolées à partir d'une **métastase cérébrale d'un choriocarcinome** (*Pattillo et al., 1968*). Il s'agirait plutôt d'un modèle de **trophoblaste vilieux**. Elles constituent un bon modèle pour étudier la fonction endocrine du placenta puisqu'elles sécrètent de l'hCG, de l'hPL, de la progestérone et des œstrogènes (*Pattillo et al., 1968*). Elles sont **capables de fusionner et de former un syncytium sous l'action d'AMPc** (adénosine mono-phosphate cyclique), grâce à l'activation du facteur de transcription GCM1 qui va alors induire l'expression de la syncytine 1 (*Knerr et al., 2005*).

ii. Les cellules JEG-3

Les cellules **JEG-3** viennent de la **même métastase cérébrale** que les BeWo mais avec des conditions de dérivation différentes (*Kohler et al., 1971*). Ces cellules synthétisent également l'hCG. Elles expriment divers marqueurs de trophoblaste comme KRT7, HLA-G et CD9. Elles ont principalement été utilisées **pour étudier l'invasion et la migration** (*Hannan et al., 2010*). Elles peuvent être transfectées saument, par exemple pour étudier l'impact d'un facteur de transcription (voir Chapitre 4, partie III-3-ii).

iii. Les cellules JAR

Les cellules **JAR** ont été dérivées d'une **tumeur placentaire** (*Pattillo et al., 1971*). Ces cellules **n'expriment pas HLA-G**. Comme les JEG-3, elles sont utilisées **pour étudier l'invasion** (*Hannan et al., 2010*).

3. Les lignées dérivées de cytotrophoblastes

Plus récemment, des **lignées ont été établies à partir de cytotrophoblastes issus de placentas du premier trimestre de grossesse** (obtenus suite à des interruptions volontaires de grossesse). Ces cytotrophoblastes purifiés ont été immortalisés grâce à la transfection de l'antigène T du SV40. Toutes les lignées existantes ne seront pas détaillées, mais on peut en trouver une description dans plusieurs revues (*Hannan et al., 2010; Sullivan, 2004*).

i. HTR8/Svneo

La **lignée HTR8/Svneo (Tableau 4)** exprime l'hCG. Sa prolifération et sa sécrétion de l'activateur du plasminogène sont inhibées par le TGF β (*Graham et al., 1993*). Ces cellules présentent un phénotype de **cytotrophoblastes endovasculaires** lorsqu'elles sont cultivées sur du Matrigel (*Highet et al., 2012*). Elles sont également utilisées pour étudier la fonction de certains micro-ARN et leur impact sur la survie, la migration et l'invasion (*Bai et al., 2012; Luo et al., 2012*).

ii. SGHPL

Les lignées SGHPL (**Tableau 4**) expriment l'hCG et l'hPL. Elles ont des capacités de **phagocytose** (*Choy and Manyonda, 1998*). Elles ont également la capacité de réaliser une **invasion interstitielle et endovasculaire** (*Cartwright et al., 2002*). L'addition de plasma de femmes prééclamptiques dans leur milieu de culture altère leur capacité invasive (*Harris et al., 2009b*). Dans cette lignée, une régulation de l'expression du récepteur de l'angiotensine de type I par le TGF- β a été montrée (*Tower et al., 2005*).

Globalement, ces lignées, ainsi que celles dérivées de choriocarcinome, présentent toutes certains aspects des cellules trophoblastiques, mais sans être vraiment représentatives d'un sous-type de trophoblastes (villeux, interstitiels, endovasculaires...), car il y a toujours des marqueurs manquants ou au contraire anormalement présents.

Cellules	Types	Caractéristiques	Utilisation principale
JEG-3	Choriocarcinome	Phénotype de cytotrophoblastes extravilleux, expriment HLA-G, prolifération sans inhibition de contact	Invasion, migration
JAR	Choriocarcinome	Phénotype de cytotrophoblastes extravilleux, n'expriment pas HLA-G, prolifération sans inhibition de contact	Invasion, migration
BeWo	Choriocarcinome	Syncytialisation sous l'action de la forskoline	Syncytialisation
HTR8/Svneo	Trophoblastes de 1 ^{er} trimestre immortalisés	Expriment l'hCG, des MMP, l'uPA, peuvent former des structures capillaires si cultivées sur Matrigel	Prolifération, invasion, migration
SGHPL	Trophoblastes de 1 ^{er} trimestre immortalisés	Expriment HLA-G et diverses intégrines	Prolifération, invasion, migration

Tableau 4 : Les lignées cellulaires modèles de trophoblastes

4. Les trophoblastes dérivées de cellules souches humaines

Une lignée de **cellules souches embryonnaires humaines** a été dérivée pour la première fois en 1998 (*Thomson et al., 1998*). Et contrairement à ce qui se passe avec les cellules souches embryonnaires de souris, ces cellules **peuvent donner des trophoblastes**. En effet, l'extinction par transgénése de gènes de pluripotence (tels que *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*) entraîne la synthèse d'hCG et de GCM1 dans ces cellules (*Matin et al., 2004*). La culture de ces cellules souches **dans du Matrigel et en présence de BMP4** (Bone Morphogenetic Protein 4) entraîne l'expression de marqueurs trophoblastiques et la sécrétion d'hormone placentaire (*Xu et al., 2002*). Ces cellules traitées au BMP4 sont également **capables de donner des syncytia exprimant l'hCG** quand elles sont ensemencées à une faible densité. Comme les trophoblastes primaires dérivés de placenta du premier trimestre, les cellules trophoblastiques dérivées de cellules souches sont **moins invasives en conditions hypoxiques** qu'en conditions standards (20 % d'O₂) (*Udayashankar et al., 2011*).

Des **cellules du trophoctoderme de blastocystes de souris** peuvent être cultivées indéfiniment en présence de FGF-4 et de TGF- β (*Erlebacher et al., 2004; Tanaka et al.,*

1998). En revanche, cela ne fonctionne **pas à partir de blastocystes humains**, indiquant probablement l'importance d'autres facteurs, restant pour l'instant non identifiés.

Récemment, des **cellules progénitrices de trophoblastes** ont été isolées à partir de **chorion du premier trimestre** (*Genbacev et al., 2011*). Elles peuvent se différencier en cytotrophoblastes et en syncytiotrophoblastes. Elles constituent donc un modèle prometteur.

5. Limites des modèles cellulaires

Les modèles cellulaires **ne rendent pas compte de la placentation**, car celle-ci dépend de **nombreuses interactions avec l'environnement utérin**, notamment les cellules déciduales, les cellules uNK, les macrophages et les cellules des vaisseaux (endothéliales et musculaires). Et même si des co-cultures de cellules déciduales et de cellules trophoblastiques ont été étudiées (*Hannan et al., 2010*), cela reste une vision très simplifiée de ce qui se passe réellement au sein de l'organe complexe qu'est le placenta. C'est pourquoi les **modèles animaux sont essentiels**.

II. Les modèles murins

Cette partie de ma thèse a fait l'objet d'une publication (revue) disponible en annexe 1 (*Doridot et al., 2012*).

La PE semble restreinte à l'espèce humaine (ceci étant sans doute lié à la spécificité humaine concernant l'invasion profonde des trophoblastes humains dans le myomètre maternel, qui serait indispensable pour assurer les besoins accrus du cerveau fœtal humain), ce qui signifie qu'**aucun modèle animal spontané** n'existe. Pourtant, des modèles animaux sont **nécessaires** pour obtenir des pistes ou des réponses quant à la **physiopathologie** de la PE, puisqu'ils permettent d'explorer tous les stades du développement placentaire. Les modèles animaux sont également essentiels pour explorer de nouvelles pistes thérapeutiques. De nombreux efforts pour créer des modèles induits ont donc été entrepris.

1. **Modèle murin : un bon modèle pour étudier les pathologies placentaires ?**

Les rongeurs constituent un modèle de choix pour étudier les pathologies placentaires : en effet, comme dans l'espèce humaine, ils développent un **placenta discoïde d'origines maternelle et fœtale, de type hémochorial** (sang maternel directement au contact du trophoblaste). Le placenta humain est de type monochorial (une seule couche de cellules entre sang maternel et fœtal), tandis que le placenta murin est trichorial (**Figure 26**), cependant il semble que le sang maternel puisse accéder à la bicouche de syncytiotrophoblaste chez la souris (*Georgiades et al., 2002*). Le placenta murin possède une structure spécifique : le labyrinthe (où se font les échanges fœto-placentaires), qui pourrait être considéré comme homologue de l'espace intervilloux du placenta humain.

Figure 27 : Les placentas humain et murin

Adapté de (*Maltepe et al., 2010*).

Il faut ainsi être **conscient des différences anatomiques** réelles entre placentas murin et humain, qui constituent une limite du modèle murin pour l'étude de la placentation, et en particulier pour les mécanismes d'invasion. Il est cependant à noter que des arguments issus de données cliniques et de modèles murins tendent à distinguer les anomalies d'invasion et la prééclampsie (l'invasion superficielle observée ne serait qu'une conséquence de mécanismes plus précoces) : i) une pression artérielle plus élevée au premier trimestre (avant l'invasion profonde des artères utérines) est observée chez les femmes qui développeront par la suite une prééclampsie (*Poon et al., 2011*) ; ii) chez la souris, lorsque le remodelage des artères spiralées utérines est altéré, on n'observe pas d'hypoxie placentaire, ni de symptômes prééclamptiques, ce qui indique que ce défaut de remodelage n'est pas suffisant pour induire la pathologie (*Leno-Durán et al., 2010*). Donc, globalement, le **modèle murin pourrait apporter de nouvelles pistes sur la physiopathologie de la prééclampsie**.

En ce sens, de **nombreuses tentatives** pour obtenir de bons modèles de PE chez la souris et le rat ont été tentés. Seuls les **modèles obtenus chez la souris** seront décrits, afin de pouvoir avoir une **approche comparative**.

Il faut rester prudent sur l'extrapolation des données obtenues chez la souris à l'humain, à cause de quelques différences clés (chez la souris par exemple, l'invasion est plus

superficielle, le remodelage des artères utérines se fait indépendamment d'une invasion par des trophoblastes, le placenta ne sécrète pas d'hormone équivalente à l'hCG). Cependant, le **modèle murin s'est avéré utile** dans la découverte de gènes important pour la placentation murine, qui ont ensuite été validés comme essentiels dans la placentation humaine. C'est par exemple le cas des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RXR) et de PPAR γ , d'abord décrits chez la souris, et dont le rôle est maintenant bien établi dans l'espèce humaine (*Tarrade et al., 2001a, 2001b*). Les modèles murins peuvent donc apporter de **nouvelles pistes concernant la physiopathologie de la PE**, qui pourront ensuite être explorées chez l'humain. De plus, la disponibilité de bons modèles murins de PE serait extrêmement utile pour **tester de nouvelles approches thérapeutiques**, ce qui demeure quasiment impraticables chez la femme enceinte.

2. Les différents modèles de prééclampsie obtenus chez la souris

Les différents modèles se sont **basés sur l'altération d'éléments clés de la physiopathologie de la placentation et de la PE** : les équilibres de substances vasoactives (avec en particulier sFlt1), l'hypertension chronique et le système rénine/angiotensine, l'immunité et l'auto-immunité, l'hypoxie, et les gènes soumis à empreinte parentale.

i. La surexpression de sFlt1

Pour les substances vasoconstrictrices, **sFlt1 (le récepteur soluble du VEGF)** a été exprimé dans le trophoblaste murin (grâce à l'infection lentivirale de blastocystes) et cela a engendré l'apparition d'une hypertension modérée (+ 20 mmHg pour la pression systolique) et d'une protéinurie ($\times 1,42$) (*Kumasawa et al., 2011*). Cependant, l'infection adénovirale de souris induisant l'expression de sFlt1 (non restreinte au placenta) entraîne les mêmes anomalies (*Bergmann et al., 2010*), indiquant que ce mécanisme peut être indépendant de la gestation. Dans ces modèles, les utilisations du VEGF, du PlGF (Placental Growth Factor) ou de la pravastatine se sont révélées des traitements efficaces pour prévenir les symptômes.

ii. Les régulateurs de l'hypertension

L'hypertension est un facteur de risque de prééclampsie. Le **système rénine-angiotensine** joue un rôle clé dans le contrôle de la pression artérielle. Ainsi, il a été ciblé pour créer un modèle de PE : des femelles transgéniques exprimant l'angiotensinogène humaine ont été accouplées avec des mâles transgéniques exprimant la rénine humaine, les souris gestantes ont montré une élévation transitoire de leur pression artérielle en fin de gestation (+ 56 mmHg), une protéinurie ($\times 6,8$) ainsi qu'une augmentation de la taille des glomérules (*Takimoto et al., 1996*). Il est intéressant de noter que le croisement réciproque n'a pas d'effet sur la pression artérielle. Des femelles doubles transgéniques exprimant à la fois la rénine et l'angiotensine humaines constituent une variante de ce modèle, avec une hypertension chronique (+ 30 mmHg) augmentant d'environ 20 mmHg pendant la gestation et une protéinurie gestationnelle (*Falcao et al., 2009a*). Ceci indique que la part de la gestation dans l'augmentation de la pression artérielle du 1^{er} modèle (femelle exprimant l'angiotensinogène \times mâle exprimant la rénine) n'est que d'environ 20 mmHg.

La pression artérielle est également régulée par la Corine, une protéase cardiaque activant le peptide natriurétique atrial (ANP), qui est une hormone cardiaque régulant la pression artérielle et l'homéostasie du sodium. Les **souris déficientes pour la Corine** ont une hypertension chronique et leur pression artérielle augmente encore au cours de la gestation. En réalisant une transgénèse sur ce modèle KO (KO/Tg) permettant une expression de la Corine spécifiquement au niveau cardiaque, l'hypertension chronique disparaît, mais l'hypertension gestationnelle perdure (+ 20 mmHg). Cette hypertension gestationnelle est accompagnée d'une protéinurie ($\times 2$) équivalente chez les souris KO et KO/Tg (*Cui et al., 2012*). Des anomalies rénales sont également observées (endothéliose). Les souris déficientes pour l'ANP présentent le même phénotype que les KO Corine.

La **lignée murine BPH/5** constitue un modèle similaire avec une faible **hypertension chronique** (+ 20 mmHg par rapport aux souris C57BL/6). En effet, pendant la gestation, sa pression artérielle augmente (+ 25 mmHg) et une protéinurie apparaît, accompagnée d'une glomérulosclérose (*Davissou et al., 2002*). Dans ce dernier modèle, l'implication des espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été proposée (*Hoffmann et al., 2008*), supportée par l'efficacité d'un traitement au Tempol, ou 4-hydroxy-2,2,6,6-tetraméthyl-piperidinoxyl, qui mime l'activité de la superoxyde dismutase (SOD).

iii. L'immunité innée et l'auto-immunité

Du point de vue immunologique, plusieurs modèles de PE existent : certains impliquent l'immunité innée (avec le système du complément et les Toll Like Receptor, TLR) ou l'auto-immunité (avec l'injection d'auto-anticorps).

Concernant l'immunité innée, le **croisement CBA/J × DBA2** constitue le modèle historique. Les souris CBA/J croisées avec des mâles DBA/2 (*Ahmed et al., 2010*) présentent une résorption embryonnaire importante (30 % contre 8 % pour les croisements CBA/J × BALB/c contrôles), une protéinurie et une endothéliose rénale (accompagnée de dépôts de fibrine). Ces souris ne développent **pas d'hypertension gestationnelle**, mais montrent une sensibilité accrue à l'angiotensine II avec une augmentation de la pression artérielle de 20 mmHg plus élevée que celle des souris contrôles traitées de la même façon (injection d'angiotensine II, 3 µmol/kg). La pravastatine et le VEGF ont également montré leur efficacité thérapeutique dans ce modèle (*Ahmed et al., 2010*). De façon intéressante, ce modèle est le seul à ne montrer un phénotype qu'à la première gestation (les gestations suivantes étant normales), ceci étant sans doute lié aux interactions immunologiques entre ces 2 lignées. En ce sens, une activation précoce du complément (C3) a été montrée à l'interface fœto-maternelle dans ce modèle (*Qing et al., 2011*) comme ayant un rôle clé dans l'induction des symptômes, puisque l'utilisation d'un inhibiteur du complément (CR2-Crry) de façon précoce empêche l'apparition de ceux-ci.

Les **souris invalidées (KO) pour C1q** constituent un autre argument quant au rôle clé du complément : en effet, elles sont aussi un modèle de PE (*Singh et al., 2011*). Ces souris KO pour C1q développent pendant la gestation une hypertension (+ 17,5 mmHg), une protéinurie (× 8,4), une endothéliose rénale (avec dépôts de fibrine) ainsi qu'une augmentation de sFlt1 plasmatique et une augmentation de la mort embryonnaire. La pravastatine empêche l'apparition de ces symptômes.

Concernant les TLR, **l'activation du TLR3** chez des souris gestantes induit une hypertension (+ 48 mmHg, effet visible uniquement pendant la gestation) et une protéinurie (× 1,8) (*Chatterjee et al., 2011*). Cet effet est plus marqué si les souris sont déficientes pour l'interleukine 10.

En ce qui concerne l'auto-immunité, il a été montré qu'il était possible d'induire un phénotype de type prééclampsique chez la souris gestante en **injectant des**

immunoglobulines (IgG) issues de patientes prééclamptiques (*Zhou et al., 2008b*), et en particulier avec leurs **auto-anticorps ciblant le récepteur de l'angiotensine II de type IA** (AT1). Les souris gestantes ayant reçu cette injection développent une hypertension (+ 35 mmHg) et une protéinurie ($\times 3,1$), ainsi qu'une endothéliose rénale. Ces symptômes sont évités grâce à un traitement au losartan (un antagoniste d'AT1). Cependant, l'injection de ces auto-anticorps à des souris non gestantes entraîne également une hypertension (+ 30 mmHg) et une augmentation de la protéinurie (non significative).

iv. **Comt et l'hypoxie**

COMT est une enzyme responsable de la synthèse du 2-méthyl-oestradiol (2-ME) à partir de l'œstradiol, un inhibiteur de HIF-1 α (le facteur de transcription qui induit la transcription de gènes cibles en réponse à l'hypoxie). **Les souris déficientes pour Comt** développent une hypertension (+ 15 mmHg) et une protéinurie gestationnelle ($\times 1,6$), accompagnées d'une endothéliose rénale (*Kanasaki et al., 2008*). Ce modèle serait basé sur une réactivité accrue du placenta face à l'hypoxie, induisant des défauts d'invasion et de vascularisation. L'administration de 2-ME traite efficacement ces souris. Il faut noter que dans ce modèle, il y a également un retard de croissance des fœtus. Récemment, le sildenafil, un vasodilatateur, a été donné à ces souris et a permis aux fœtus de retrouver un poids de naissance normal (*Stanley et al., 2012*).

v. **Les gènes soumis à empreinte parentale**

Selon l'hypothèse de Jennifer Marshall-Graves (*Graves, 1998*), des gènes soumis à empreinte parentale pourraient être impliqués dans la physiopathologie de la PE (avec expression de l'allèle d'origine maternelle).

Le gène *p57kip2* est un gène soumis à empreinte (à expression maternelle), qui code un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes (appelé Cdkn1c) et régule ainsi la prolifération cellulaire. **Les souris gestantes *p57kip2*+/-** (croisées avec des mâles *p57kip2*+/-) développent une hypertension gestationnelle (+ 38 mmHg) et une protéinurie ($\times 5$), ainsi qu'une endothéliose rénale accompagnée de dépôts de fibrine (*Kanayama et al., 2002*). Cependant, les résultats obtenus dans cette étude n'ont pas été reproduit par une équipe indépendante, celle-ci suggérant une influence importante de l'environnement (stress, nourriture) (*Falcao et al., 2009b*).

3. Bilan

La comparaison de l'ensemble de ces modèles est résumée dans la **Figure 28** en ce qui concerne les variations de pression artérielle (par rapport à la pression artérielle précédant la gestation) et celles de la protéinurie (par rapport à celle de souris contrôle). Il faut noter que selon les études, les méthodes pour mesurer ces critères diffèrent.

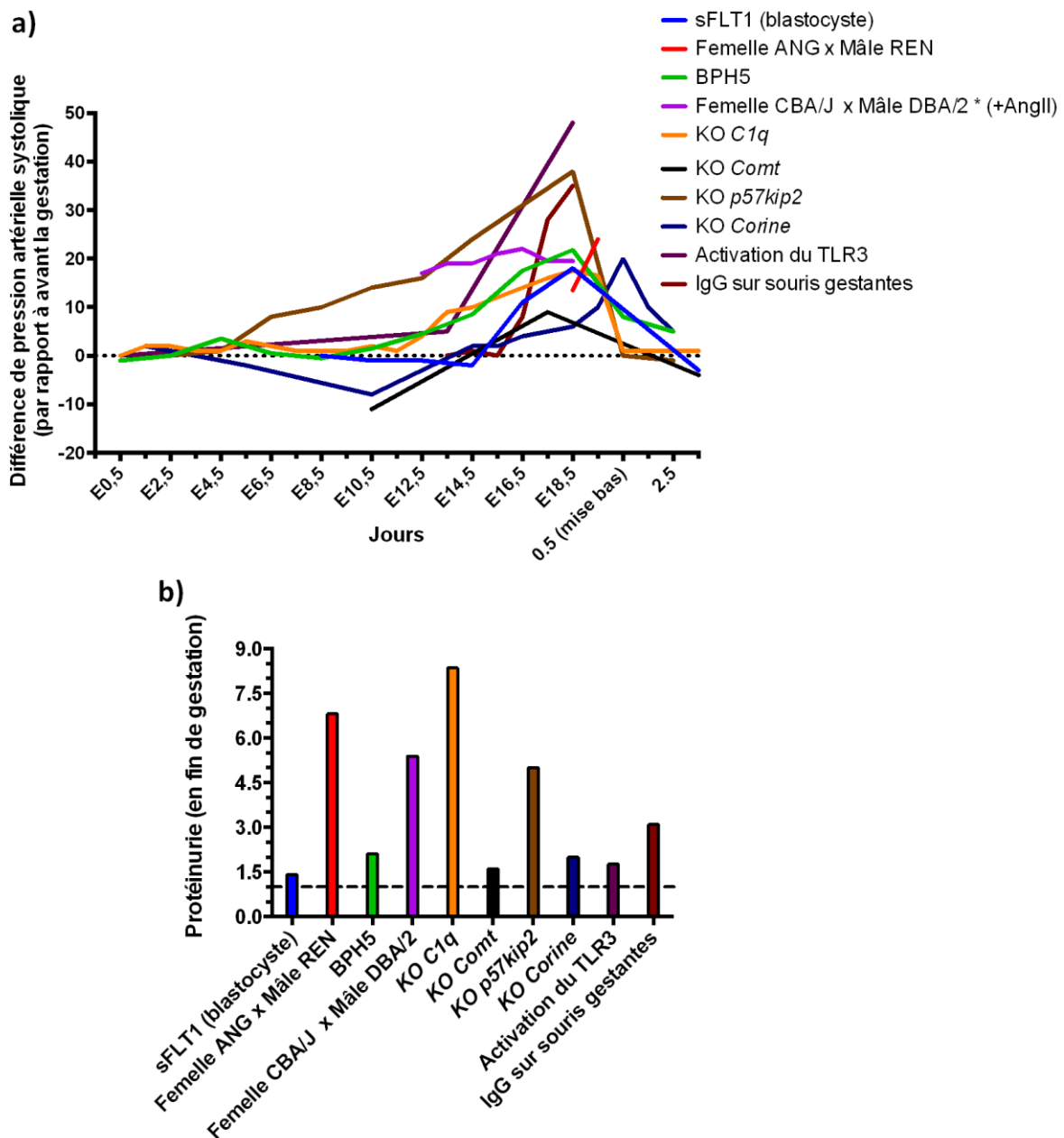


Figure 28 : Les symptômes de prééclampsie dans les différents modèles murins

a) Les différences de pression artérielle systolique (par rapport à la pression artérielle mesurée avant la gestation)

b) La protéinurie en fin de gestation (---- : la protéinurie de souris contrôle en fin de gestation)

Globalement, l'ensemble de ces modèles animaux développe un **syndrome prééclamptique de type modéré** avec une hypertension assez faible, et une **apparition des symptômes plutôt tardives**.

CHAPITRE QUATRE

LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION

STOX1

I. Sa découverte

1. L'identification d'une région liée à la prééclampsie et soumise à un effet de l'origine parentale

En 2001, une étude de liaison a été réalisée : elle est basée sur le génotypage de 293 marqueurs, répartis sur l'ensemble du génome, dans 67 familles hollandaises avec des paires de sœurs affectées par une prééclampsie, une éclampsie ou un syndrome HELLP (*Lachmeijer et al., 2001*). En se concentrant sur 38 de ces familles sans syndrome HELLP, l'analyse a suggéré une liaison avec le bras long du chromosome 10 (10q).

Une analyse plus précise réalisée sur 24 de ces familles a permis de confirmer la présence d'un locus de susceptibilité en 10q22.1 (*Oudejans et al., 2004*). De façon intéressante, l'analyse des haplotypes a révélé un **effet de l'origine parentale** : ce sont les allèles d'origine maternelle qui ségrègent avec la pathologie dans ces familles.

Cette **héritabilité matrilinéaire** suggère l'implication de gènes soumis à empreinte. L'idée que les gènes soumis à empreinte pouvaient être impliqués dans la prééclampsie avait déjà été décrite (*Graves, 1998*) et un modèle de transmission prenant en compte cet effet de l'origine parentale est illustré **Figure 29**.

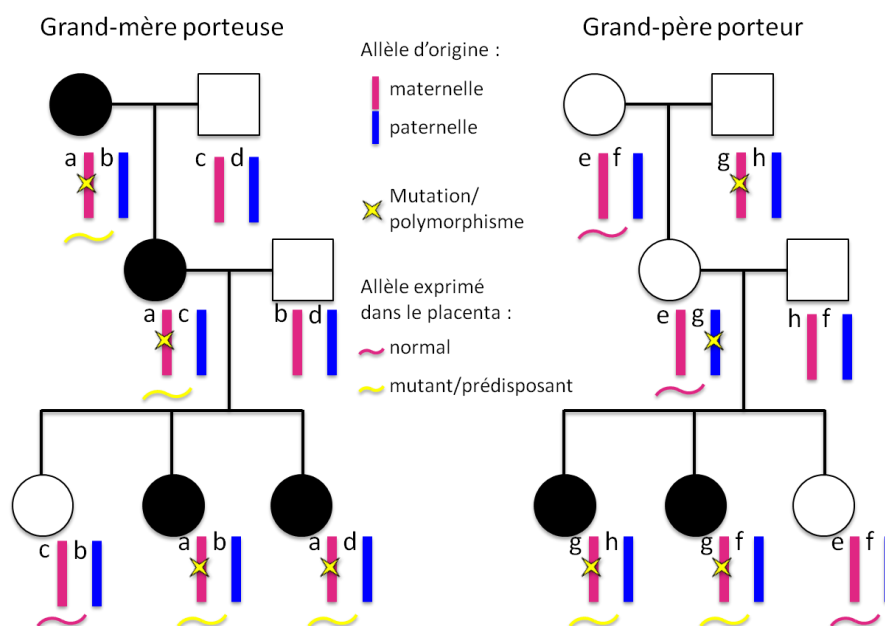


Figure 29 : Modèle d'héritabilité épigénétique et génétique de la prééclampsie

2. **STOX1, un gène soumis à empreinte**

Les auteurs se sont ensuite concentrés sur les gènes présents dans cette région de 11,7 Mb. Ils ont ainsi séquencé 17 gènes appartenant à cette région dans 8 familles de sœurs prééclamptiques, nées d'une grossesse prééclamptique ou compliquée par une hypertension gestationnelle et pour lesquelles ils avaient **l'ADN des 3 générations** (grand-mère, mères et enfants). Ils ont ainsi trouvé 55 variations chez les sœurs prééclamptiques. Cela leur a permis de mieux définir la région liée à la pathologie : un fragment de 444 kb. Il faut cependant noter que cette région constitue un lieu où les recombinaisons sont fréquentes (hot spot), il y a donc une grande variété d'allèles au sein d'une même population.

Ils ont également déterminé quels gènes parmi ces 17 pourraient être **soumis à empreinte**, ils ont recherché les gènes dont l'expression était faible ou nulle dans des môles hydatiformes (anomalie rare où un ovocyte sans matériel génétique maternel est fécondé par un ou deux spermatozoïdes, dans lesquelles les gènes à expression maternelle ne doivent donc pas être transcrits).

Cela a mené à l'identification d'une **modification de séquence héritée dans l'exon 2 d'un gène soumis à empreinte : STOX1**, pour *Storkhead box 1* (*Van Dijk et al., 2005*). Ce gène est adjacent mais à l'extérieur de la région de 444 kb identifiée. La modification de séquence trouvée (T>C) est responsable de la substitution d'un acide aminé tyrosine en histidine (Y153H) et ségrège avec la pathologie dans 7 des 8 familles. Cette modification de séquence existe également chez des femmes ayant eu des grossesses normales (32 femmes contrôles génotypées) avec une prévalence de l'allèle C de 50 %. Il s'agit donc d'un **polymorphisme (SNP) commun** dans les populations hollandaises.

Il semble également y avoir un biais de la transmission de cet allèle aux enfants (ce qui est cohérent avec une expression placentaire de l'allèle d'origine maternelle exclusivement) : dans les 12 cas rapportés de grossesses prééclamptiques où l'ADN de l'enfant était disponible, la mutation a été retrouvée chez l'enfant (donc transmis par la mère), alors que dans les grossesses normales au sein de ces mêmes familles, la mutation était présente chez l'enfant mais transmise par le père dans deux cas sur trois, ce qui suggère une pénétrance incomplète. Cependant, il faut noter que ce dernier cas (allèle mutant transmis par la mère puis grossesse normale) correspond à une seconde grossesse et que la mère avait reçu un traitement préventif à base d'aspirine à faible dose et d'héparine de bas poids moléculaire. La

transmission matrilinéaire a également été confirmée dans les 24 familles de sœurs (chaque fois que l'allèle n'était pas partagé entre les 2 sœurs, l'origine paternelle a pu être montrée).

3. **STOX1 : un facteur de transcription**

Dans cette étude, le gène *STOX1* a été montré comme exprimé dans le placenta. Suite à un **épissage alternatif**, **3 protéines sont générées** : les isoformes A, B et C (989, 227 et 169 acides aminés respectivement) (**Figure 30**). L'exon 2 (portant le SNP) est présent dans toutes ces isoformes.

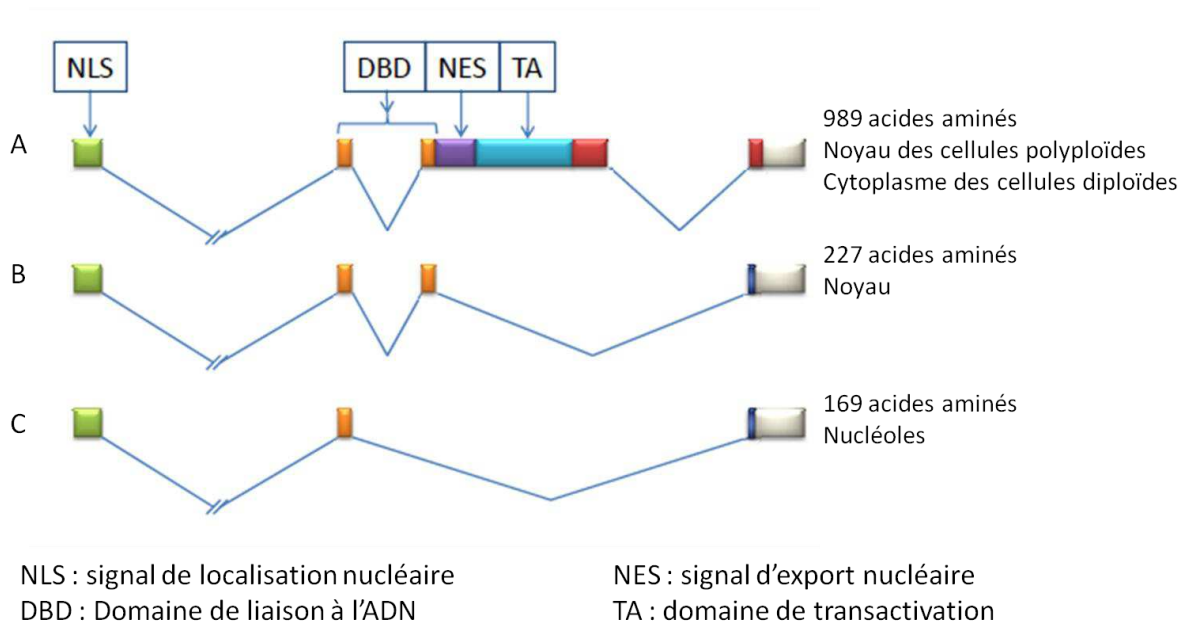


Figure 30 : Les différentes isoformes de STOX1

Adapté d'après (*Rigourd et al., 2009*).

L'analyse de la structure secondaire prédit un domaine de **liaison à l'ADN de type 'winged helix'** de 87 acides aminés. Ce type de domaine est également présent dans les facteurs de transcription de la famille FOX, et l'alignement de ces différents domaines révèle d'ailleurs une grande similarité dans leur organisation (**Figure 31a**). La présence et la position d'acides aminés contrôlant la stabilité du domaine et influençant la liaison à l'ADN sont conservées dans les 2 familles de protéines. *STOX1* est donc **apparenté à la famille des facteurs de transcription FOX**. De plus, l'alignement avec les homologues de *STOX1* dans les autres espèces montre que **l'acide aminé 153 est assez fortement conservé** (soit une

tyrosine, soit une phénylalanine) (**Figure 31b**). Ainsi, cette mutation est prédite comme délétère selon les critères de conservation.

Figure 31 : STOX1 est apparenté à la famille des facteurs FOX et son domaine de liaison à l'ADN est très conservé

A) Alignement du domaine winged helix des facteurs FOX et de STOX1

En gris : les acides aminés hydrophobes qui sont importants pour la liaison à l'ADN.

En noir : motif spécifique des protéines de la famille FOX.

B) Conservation du domaine winged helix de STOX1

En rouge : la position 153

Des **signaux de localisation (NLS) et d'export nucléaire (NES)** sont également prédits dans les exons 1 et 3, respectivement (**Figure 30**). Ces signaux pourraient contrôler la localisation nucléaire ou cytoplasmique de STOX1, comme c'est le cas pour les protéines FOX. La transfection des isoformes (recombinantes fluorescentes) dans une lignée cellulaire de trophoblaste extra-villeux (SGHPL-5) a montré la localisation exclusivement nucléaire des isoformes B et C (de façon cohérente avec l'absence de signal d'export dans ces isoformes) et une **localisation soit nucléaire, soit cytoplasmique de l'isoforme A**. L'expression nucléaire de STOX1A semble être restreinte aux cellules polyploïdes, qui se forment spontanément dans cette lignée cellulaire.

Cette étude a donc révélé un **nouveau gène dont la fonction était inconnue**, qui **pourrait intervenir dans la physiopathologie** de la prééclampsie.

II. Sa remise en cause

L'implication de STOX1 dans la prééclampsie a été remise en cause de deux manières : d'abord parce que **l'association entre Y153H et la prééclampsie n'a pas été retrouvée** dans des études indépendantes, et ensuite parce que son **statut de gène soumis à empreinte a été discuté**.

1. **STOX1 et la prééclampsie : association génétique ?**

Une fois le variant Y153H identifié, des études de plus grande ampleur ont cherché à confirmer une association entre la variation de séquence nucléotidique (allèle C pour H153 et allèle T pour Y153) et la prééclampsie.

Ainsi, dans la **population finlandaise**, 245 femmes ayant eu une prééclampsie et 357 contrôles (dont les caractéristiques étaient similaires) ont été génotypées (*Kivinen et al., 2007*). Il n'y a **pas d'association** avec le polymorphisme C (présent à une fréquence de 32%) et la pathologie.

De plus, l'**expression de STOX1** a été évaluée dans des **placentas prééclampsiques et normaux** obtenus à la fin de la grossesse dans plusieurs études indépendantes et cela n'a **pas révélé de différence** (*Iglesias-Platas et al., 2007; Kivinen et al., 2007*). Nous avons obtenu des résultats similaires au sein de notre équipe (non publiés).

Dans la **population hollandaise**, 149 femmes ayant eu une prééclampsie et 154 contrôles ont également été génotypées. La **fréquence des deux allèles est équivalente** dans les 2 cas, avec une fréquence de l'allèle C à environ 65 %. De plus, la distribution allélique correspond à l'équilibre de Hardy-Weinberg (*Berends et al., 2007*). Cela confirme qu'il s'agit d'un **polymorphisme très commun** dans la population hollandaise. Ceci est également confirmé dans d'autres populations. Et dans les populations asiatiques, la fréquence de l'allèle C est même supérieure à celle de l'allèle T (environ de 80%, *dbSNP, NCBI*).

Dans l'étude de Berends et al., la **transmission de l'allèle C** à l'enfant à l'issue de la grossesse compliquée (d'une prééclampsie ou d'un retard de croissance intra-utérin) a aussi été étudiée : elle est de 81 % dans les 42 familles étudiées. Dans le cas où la mère était hétérozygote pour ce polymorphisme (10 cas), l'allèle C était transmis dans 70 % des cas, contre les 50 % attendus pour une transmission mendélienne. Cette différence n'est cependant pas significative (le nombre de cas étant particulièrement faible). Dans le cas où la grand-mère avait également eu une complication de la grossesse (PE, RCIU, hypertension gravidique) et était hétérozygote, l'allèle C avait été transmis dans 8 cas sur 12 (soit 67 %). Si l'on prend en compte la transmission par les grands-mères et les mères dont la grossesse a été compliquée, on observe un biais significatif de la transmission ($p = 0,03$). Cela indique que **dans les familles avec une forte susceptibilité génétique à la prééclampsie, l'allèle C est bien transmis plus fréquemment dans les cas pathologiques.**

Globalement, le polymorphisme identifié n'a pas pu être confirmé comme un SNP de susceptibilité dans l'ensemble des populations, sauf peut-être quand une composante génétique forte est prise en considération.

2. Le statut d'empreinte de *STOX1*

L'identification de *STOX1* en tant que gène lié à la prééclampsie a largement été basée sur son statut de gène soumis à empreinte. **L'absence d'expression de ce gène dans des môles hydatiformes** constitue un argument en ce sens mais des méthodes plus précises existent pour **vérifier l'expression mono-allélique dépendante de l'origine parentale**. Ainsi, des polymorphismes codants ont été séquencés à partir d'ARNm issus de placentas de premier trimestre (*Iglesias-Platas et al., 2007*). Cela a révélé **une expression bi-allélique (Figure 32)**. Cependant, on peut remarquer que les pics obtenus pour le séquençage de l'ADNc au niveau de ce polymorphisme n'ont pas la même taille (contrairement à ce qui est observé pour l'ADN génomique) : cela suggère une **expression inégale entre les 2 allèles**. Cela pourrait être dû à une différence de l'expression des 2 allèles dans toutes les cellules, ou à l'absence d'expression d'un des deux allèles dans certaines cellules.

Figure 32 : L'expression bi-allélique de *STOX1* dans le placenta

Adapté d'après (*Iglesias-Platas et al., 2007*).

Comme certains gènes qui sont soumis à empreinte chez l'homme le sont aussi chez la souris, les auteurs ont étudié l'éventuelle expression mono-allélique de *Stox1* chez la souris. Là encore, ils ont trouvé une expression bi-allélique au niveau du placenta.

De plus, les gènes soumis à empreinte présentent généralement une **région différenciellement méthylée** entre les deux allèles. Les auteurs ont donc regardé l'état de méthylation d'un **ilot CpG s'étendant de part et d'autre de l'exon 1** de *STOX1*. Ils ont ainsi montré que ces CpG n'étaient pas méthylés, et qu'il n'y avait donc **pas de différence de méthylation entre les 2 allèles**. Cependant, il existe **un autre ilot CpG au sein de l'intron 1** (qui fait 50 kb), dont la méthylation n'a pas été étudiée.

Ainsi, ce travail, qui ne confirme pas l'implication de *STOX1* mais dont les résultats ne prouvent clairement pas formellement son absence de rôle dans la physiopathologie de la

prééclampsie, a été publié dans Nature Genetics en 2007 avec le titre très péremptoire « *STOX1* is not imprinted and is not likely to be involved in preeclampsia ». **Cela a fortement freiné les recherches sur ce gène** et sa possible implication dans la physiopathologie de la prééclampsie.

III. Sa difficile réhabilitation

1. **STOX1 serait soumis à empreinte uniquement dans les cytotrophoblastes extravilleux des colonnes (ou certains d'entre eux)**

En 2008, une étude à l'échelle du génome entier a cherché à détecter les gènes dont **l'expression à partir des deux allèles n'était pas équivalente** dans des cellules lymphoblastoïdes (*Cheung et al., 2008*). *STOX1* est un des gènes qu'ils ont trouvés. De plus, ils ont montré que l'écart d'expression entre les 2 allèles était très semblable entre des jumeaux monozygotiques, suggérant que cette différence est contrôlée par les polymorphismes présents dans chacun des allèles. Cela a relancé l'idée d'une expression mono-allélique possible dans certains types cellulaires. De plus, une étude des régions méthylées de façon différente selon les tissus, réalisée chez la souris, a révélé l'existence d'un **îlot CpG dans l'intron 3 du gène *Stox1* murin qui est hypométhylé dans le sperme et hyperméthylé dans le rein et le cerveau** (*Suzuki et al., 2007*). Cette étude a ainsi relancé l'idée d'une possible méthylation différentielle entre les 2 allèles d'un même tissu.

Une analyse détaillée de la **méthylation de l'îlot CpG présent dans l'intron 1 de *STOX1*** a donc été réalisée dans une lignée cellulaire de trophoblaste extra-villeux (SGHPL-5) et différents échantillons issus de placentas (Van Dijk et al., 2010). Dans ces cellules, une **méthylation différentielle entre les 2 allèles** (dissociable grâce à un polymorphisme G ou T présent dans cet îlot CpG) **a pu être détectée**. Il faut cependant noter que l'on est loin d'avoir un allèle méthylé dans 100 % des cas, puisque l'allèle T est méthylé dans environ 20 % des cellules, alors que l'autre allèle n'est jamais méthylé. **L'allèle T méthylé a été montré comme celui étant le moins exprimé** (20 % de moins). De plus, dans ces cellules, l'allèle T correspond à l'allèle permettant d'exprimer *STOX1* 153H. La méthylation a alors été étudiée dans des échantillons de placentas de premier trimestre. Aucune différence de méthylation des allèles n'a pu être détectée au sein d'un même placenta. Cependant, les placentas porteurs de

l'allèle STOX1 153H présentent une méthylation plus importante que ceux étant homozygotes pour l'allèle STOX1 153Y. Face à ce résultat, la même analyse a été réalisée sur une **sous-population de cellules du placenta : les trophoblastes extravilleux des colonnes** (à qui les cellules SGHPL-5 ressemblent). Une **méthylation différentielle a alors été détectée** : 10 à 30 % d'un des allèles est méthylé, tandis que l'autre allèle est non méthylé. De façon intéressante, **ce n'est pas toujours l'allèle T qui est méthylé**, cela dépend des placentas. Et dans quelques cas, il a été possible de déterminer **l'origine parentale de l'allèle méthylé** et il s'agissait toujours de **l'allèle paternel**.

Il faut tout de même noter que l'observation d'une méthylation différentielle dans ce type cellulaire n'a pas été accompagnée d'une étude de l'expression et **qu'on ne sait donc pas si il y a ou non une expression purement mono-allélique dépendante de l'origine parentale** (c'est d'ailleurs peu probable vu que l'allèle paternel n'est pas méthylé dans 100 % des cas).

Il est pourtant possible qu'à l'intérieur de ces trophoblastes extra-villeux des colonnes, il existe plusieurs populations, dont une serait constituée des cellules où l'allèle paternel est méthylé, et qui n'exprimerait que l'allèle maternel. Il faut également noter la situation particulière des môles hydatiformes, où apparemment les deux allèles paternels ne sont pas en mesure d'exprimer STOX1 ; l'étude de la méthylation à partir de ce type de matériel n'a pas été publiée.

2. L'expression de STOX1 au 1^{er} trimestre

Dans une étude récente, des **biopsies ont été réalisées au cours du premier trimestre** et le suivi des grossesses a permis de déterminer à posteriori quels échantillons correspondaient aux **futures grossesses normales ou prééclampsiques** (*Founds et al., 2009*). Ce matériel, très précieux, a été analysé par une **approche transcriptomique**, sur des puces Affymetrix. À partir des données disponibles en ligne (GSE12767), on peut extraire les **données correspondant à STOX1** (2 tags). Pour l'un de ces tags (229278-at), il y a un **signal plus important** pour les biopsies correspondant aux futures prééclampsies par rapport aux autres biopsies ($\times 2,11$, $p=0.01$). Quant au 2^{ème} tag, il n'y a pas de différence. Cela pourrait s'expliquer par une différence d'isoformes reconnues. Malheureusement, la séquence reconnue par ces tags n'est disponible que pour l'un d'entre eux (229278-at, qui interroge à la

fois l'isoforme A et B) car l'autre Tag n'existe plus sur les puces Affymetrix, et je n'ai pas réussi à trouver la séquence ciblée.

Ces résultats ont été obtenus sans à priori sur STOX1, de façon indépendante d'une éventuelle susceptibilité génétique. C'est donc un **argument solide pour indiquer un rôle potentiel de STOX1 dans l'établissement de la prééclampsie.**

3. Les études visant à comprendre la fonction de STOX1 et sa pertinence vis à vis de la prééclampsie

i. STOX1, la prolifération et l'invasion

Une étude mêlant des **approches *in vivo* et *ex vivo*** ont permis de mettre en évidence un rôle de STOX1 dans le **contrôle de la différenciation des trophoblastes extravilloux des colonnes d'un phénotype prolifératif vers un phénotype invasif** (*Van Dijk et al., 2010a*). Ainsi, il a été montré que **STOX1 régule de façon négative l'invasion** des trophoblastes et maintient leur prolifération dans des cellules SGHPL-5 et dans des explants villositaires. Ce contrôle se fait par l'intermédiaire du gène CTNNA3 (codant la protéine α -T-caténine d'adhésion cellulaire), qui est directement induit par STOX1A. Cette induction est plus forte avec la forme 153H de STOX1 qu'avec la forme 153Y, indiquant que **ce polymorphisme engendre un gain de fonction** au niveau de cette protéine.

De plus, dans cette étude, les auteurs ont montré que, comme pour les protéines de la famille FOX, **l'activité de STOX1 était régulée par la phosphorylation** : la forme phosphorylée (au niveau de la sérine 647) étant localisée dans le cytoplasme et dégradée par le protéasome (suite à une ubiquitination), et la forme non phosphorylée étant dans le noyau et responsable de l'activation de gène cible.

STOX1 est donc un **régulateur important pour la différenciation des trophoblastes extravilloux**, dont la transition épithélio-mésenchymateuse est essentielle pour une placentation optimale.

ii. Impact de la surexpression de STOX1 dans un modèle cellulaire

Dans notre équipe, nous avons décidé d'étudier l'impact de STOX1 sans à priori par une **approche haut débit**. Pour cela, nous avons créé **une lignée cellulaire en transfectant**

stablement *STOX1* (sous le contrôle d'un promoteur CMV) dans des cellules JEG-3 (*Rigourd et al., 2008*). Cette lignée se nomme **AA6** et nous avons également obtenu une **lignée contrôle** transfectée stablement avec le vecteur vide nommé **BD3**. À partir d'ARN extraits de ces 2 lignées, une **analyse transcriptomique** a été réalisée avec des puces Affymetrix permettant d'évaluer le niveau d'expression de 53 000 transcrits. 22 980 transcrits étaient exprimés à un niveau suffisant pour être analysés. 1840 transcrits sont 2 fois plus abondants dans les cellules AA6 par rapport aux cellules BD3, tandis que 1018 le sont 2 fois moins.

Par **clustering fonctionnel**, l'analyse des gènes modifiés révèle une **surreprésentation des facteurs de transcription**, en particulier ceux à doigt de zinc. Il est donc difficile dans cette lignée stable de dissocier les gènes directement modifiés par *STOX1* de ceux modifiés indirectement via d'autres facteurs de transcription.

Les données transcriptomiques obtenues à partir de ces cellules ont ensuite été **comparées à celles obtenues suite à la comparaison de placentas normaux et prééclamptiques**. Cette comparaison a permis de montrer une **corrélation très significative** entre les modifications observées dans ces deux études (**Figure 33**). Cet effet est spécifique puisqu'on ne retrouve pas de corrélation avec des données comparant des placentas à terme et placentas du second trimestre.

Parmi les gènes modifiés, il y a l'hCG ($\times 2,25$ pour le peptide A et $\times 3,23$ pour le B), qui est également augmentée en cas de prééclampsie, l'endogline ($\times 2,23$), la syncytine (ERVW1, $\times 2,03$), GCM1 ($\div 3,4$), qui est également diminué dans les placentas prééclamptiques (*Chen et al., 2004*). **Ces gènes sont particulièrement pertinents** concernant le développement placentaire et la physiopathologie de la prééclampsie, comme cela a pu être montré dans les chapitres précédents.

Ces résultats ont été confortés par une analyse de corrélation indépendante entre nos données transcriptomiques et celles issues de la comparaison de tissus décidual de grossesses compliquée par une prééclampsie avec retard de croissance et de grossesses normales (*Fenstad et al., 2010b*).

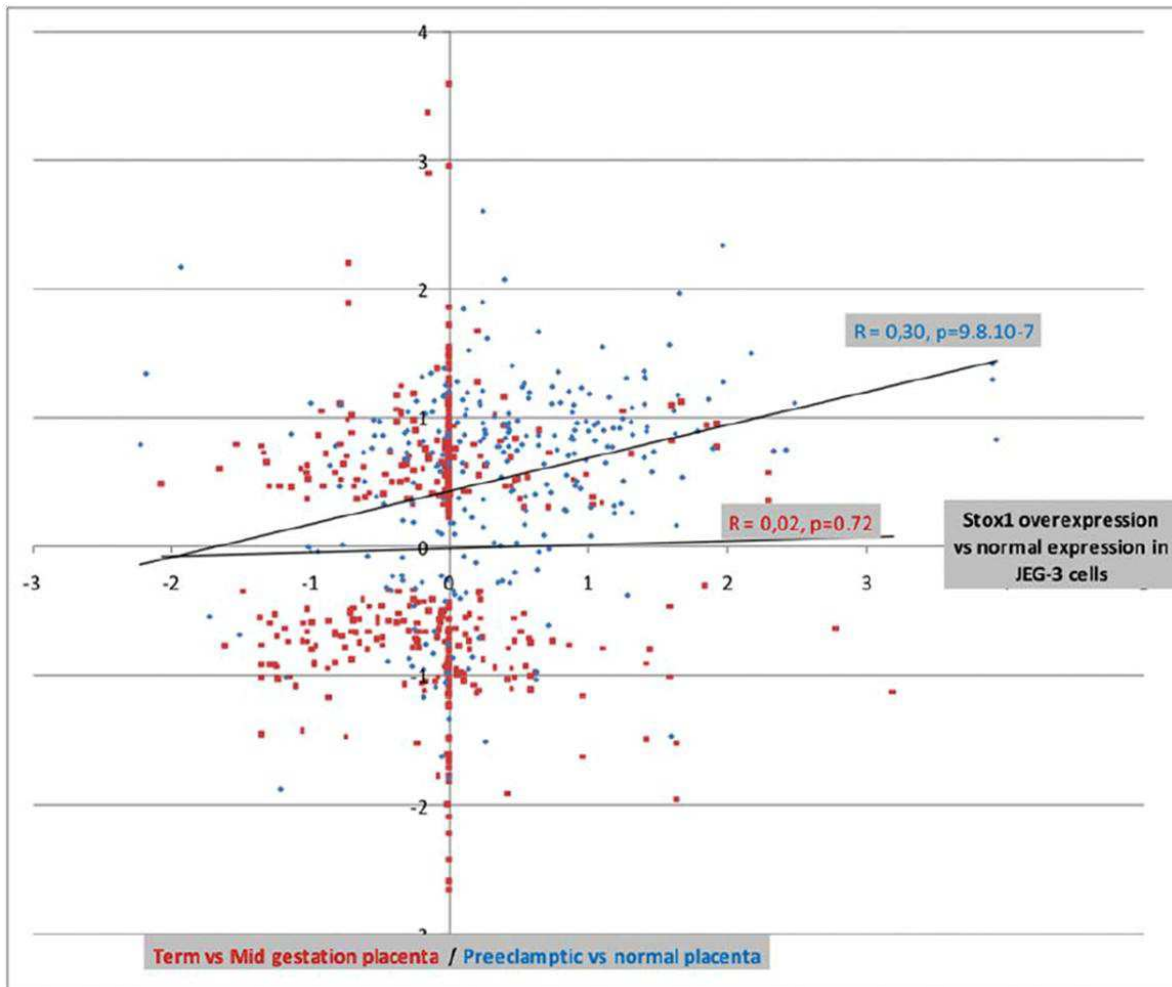


Figure 33 : Corrélation entre les modifications transcriptomiques des cellules surexprimant STOX1 et des placentas prééclamptiques

Chaque point correspond à un gène. Sa position sur l'axe horizontal dépend de son rapport d'induction (>0) ou de répression (<0) dans les cellules surexprimant STOX1 par rapport aux cellules contrôles ; et sa position sur l'axe vertical dépend de son rapport d'induction/répression dans une autre étude : les placentas prééclamptiques par rapport à des placentas normaux (**en rouge**) ou les placentas à terme par rapport à des placentas du second trimestre (**en bleu**). Des régressions linéaires ont été réalisées pour comparer l'effet de la surexpression de STOX1 aux autres études.

Extrait de (*Rigourd et al., 2008*).

En conclusion, **STOX1 est un gène qui mérite une meilleure investigation** de son implication dans la physiologie placentaire et la physiopathologie de la prééclampsie.

RESULTATS

La partie « résultats » comprend les articles (en préparation ou publié) centrés sur l'étude de STOX1. Cependant, j'ai également mené de petits projets sur les facteurs à doigts de zinc dans les pathologies placentaires et sur la régulation du microARN mir34a dans les pathologies placentaires. Ces résultats sont présentés sous forme d'articles en annexe (Annexes 3 et 4).

J'ai également collaboré à d'autres études et revue, les publications correspondantes (2 revues et 2 articles acceptés) sont dans la partie « Annexes » (Annexes 1 et 2 pour les revues, Annexes 5 et 6 pour les articles).

ARTICLE 1

LES SYMPTOMES DE PREECLAMPSIE INDUITS PAR L'EXPRESSION FOETO- PLACENTAIRE DE STOX1 SONT PREVENUS PAR L'ASPIRINE

**(Accepté pour publication dans Hypertension
en janvier 2013 et publié en mars 2013)**

A mon arrivée dans le laboratoire, les données sur STOX1 étaient principalement celles de transcriptomiques obtenues dans les cellules JEG-3 surexprimant STOX1. La transgénèse additive dans des souris FVB/N était en cours et les premières souris à analyser ont été disponibles à la fin de mon stage de master (M2). A ce moment là, il s'agissait de la première lignée, appelé 13. Nous avons commencé par vérifier l'expression du transgène dans différents tissus, dont le placenta. Et malgré le contrôle de l'expression du transgène par un promoteur CMV ubiquitaire, STOX1 (humain) n'était pas exprimé de la même manière dans tous les tissus. Cela peut s'expliquer par l'état de la chromatine qui diffère entre les tissus. L'expression la plus élevée a été observée dans le placenta. Une seconde lignée appelée 42 a ensuite été obtenue. La différence d'expression entre les tissus était équivalente à celle observée avec la lignée 13, mais l'expression du transgène était bien plus élevée dans cette lignée. Une 3^{ème} lignée a également été obtenu, mais elle contenait de multiple point d'insertion et lorsque nous avons obtenu une sous lignée stable (avec un point d'insertion unique), l'analyse de l'expression a montré que cette sous lignée était très proche de la lignée 13, donc nous n'avons pas été plus loin dans le phénotypage. En effet, 2 lignées indépendantes suffisent pour écarter l'hypothèse d'un effet d'insertion.

Pour caractériser le phénotype de ces souris, nous avons commencé par regarder l'impact sur le poids fœtal ; en effet, nous pensions que STOX1 aurait un impact sur le développement placentaire et que cela se traduirait par un retard de croissance. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence une diminution du poids des fœtus dans les croisements transgéniques.

Nous avons alors décidé de mesurer la pression artérielle au cours de la gestation ainsi que la protéinurie. Pour cela, nous avons dû apprendre à mesurer la pression artérielle chez la souris avec un système tail-cuff autour de la queue (équivalent du brassard utilisé chez l'humain). Malgré mes craintes, ceci ne s'est pas révélé si compliqué. Cependant, cela a pris beaucoup de temps, car il fallait habituer quotidiennement chaque souris pendant quelques jours avant la mise en accouplement, puis attendre qu'un accouplement survienne tout en continuant les mesures quotidiennes, et réaliser des mesures chaque jour de la gestation et jusqu'à quelques jours après la mise bas. Quant à la prise d'urine, elle a été tentée chaque jours (nous avons réussi à obtenir de l'urine environ un jours sur deux) et nous avons ensuite poolé les échantillons de façon à avoir 3 points : début de gestation (entre E1,5 et E7,5), milieu de gestation (entre E8,5 et E13,5) et fin de gestation (E14,5 à E18,5). Les résultats obtenus ont permis de démontrer que ces souris constituaient un modèle de prééclampsie, avec une hypertension sévère très précoce et une protéinurie détectée dès la mi-gestation. Ces

mesures ont été réalisées pour tous les types de croisements pour la lignée 13 (mères transgéniques et pères sauvages, l'inverse, ou les deux parents transgéniques). Le phénotype était toujours le même. Cependant, afin de simplifier le message, et éliminer l'impact du transgène sur l'organisme maternel, nous nous sommes ensuite concentré sur des mères sauvages croisées avec des mâles transgéniques. Cela permet en effet de limiter l'expression du transgène à l'unité foeto-placentaire et ainsi, de s'assurer que les variations de phénotype maternel viennent bien de cette unité et non d'une variation de réponse d'un organisme transgénique à l'état de grossesse.

Afin de mieux caractériser le phénotype, nous avons réalisé l'étude histologique de reins de souris gestantes et révélé des anomalies, telles qu'une hypertrophie glomérulaire et des dépôts de fibrine. L'analyse histologique placentaire a également été réalisée, notamment la comparaison de taille des 2 régions principales du placenta murin : labyrinthe et zone jonctionnelle. Nous n'avons pas pu détecter de différences à ce niveau. Cependant, une petite diminution des zones riches en glycogène est observée dans les placentas transgéniques.

Ce travail a été soumis à de nombreuses reprises. Initialement, les données présentées ici dans l'article 2 (sur le phénotype fœtal et les données de transcriptomique de placentas transgéniques) en faisaient partie. Sur les conseils/demandes des reviewers, l'article initial a été scindé en deux et l'analyse phénotypique a été complétée par la mesure par Elisa de facteurs pro-angiogéniques dans le plasma des souris prééclamptiques. L'hypertension a également été confirmée par des mesures invasives intra-carotidiennes (grâce à une collaboration avec Véronique Baudrie à l'HEGP), mais ces mesures sont réalisées sous anesthésie, ce qui change l'hémodynamique sanguine, et ne permet pas de percevoir la sévérité de l'hypertension comme nous avons pu l'observer sur souris vigiles.

En conclusion, ce premier article présente le modèle.

Résumé

Dans cet article, nous avons caractérisé le phénotype de souris sauvages croisées avec des mâles transgéniques exprimant la version humaine de *STOX1* sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire. Ainsi, l'expression de *STOX1* est restreinte à l'unité foeto-placentaire.

Nous avons suivi la pression artérielle quotidiennement, de quelques jours avant l'accouplement à quelques jours suivant la mise bas, pour 36 souris par une méthode non invasive de détection des pressions systolique et diastolique au niveau de la queue. Cela représente environ 5 000 mesures indépendantes. De l'urine a également été récupéré à plusieurs reprises au cours de la gestation.

Cela nous a permis de montrer que ces souris sauvages gestantes développent au cours de leur gestation une hypertension sévère, et une protéinurie. Ces symptômes apparaissent de façon précoce, en particulier pour la pression artérielle qui est augmenté dès E3.5-E4.5. Ces souris constituent donc un nouveau modèle de prééclampsie sévère et précoce. De plus, nous avons observé des anomalies que l'on trouve également chez les patientes : une fibrose rénale, une élévation des taux sériques de facteurs pro-angiogéniques (le récepteur soluble du VEGF et l'endogline soluble). Au niveau placentaire, nous avons pu montrer une diminution des zones riches en glycogènes (contenant les cellules à glycogène).

Nous avons également traitées ses souris avec de l'aspirine à faible dose dans l'eau de boisson et avons pu montré que cela prévient l'apparition de l'hypertension gestationnelle et améliore de façon importante la protéinurie et la fibrose rénale.

En conclusion, nous avons obtenu et caractérisé un modèle de prééclampsie sévère, le seul existant montrant un phénotype hypertensif très marqué et très précoce. Ce modèle est un outil puissant pour découvrir de nouvelles voies impliquées dans la physiopathologie de la prééclampsie, tester des approches thérapeutiques innovantes et explorer les mécanismes responsables des conséquences à long terme de la prééclampsie.

Preeclampsia-Like Symptoms Induced in Mice by Fetoplacental Expression of *STOX1* Are Reversed by Aspirin Treatment

Ludivine Doridot, Bruno Passet, Céline Méhats, Virginie Rigourd, Sandrine Barbaux, Aurélien Ducat, Françoise Mondon, Marthe Vilotte, Johann Castille, Michelle Breuiller-Fouché, Nathalie Daniel, Fabienne le Provost, Anne-Laure Bauchet, Véronique Baudrie, Alexandre Hertig, Christophe Buffat, Umberto Simeoni, Guy Germain, Jean-Luc Vilotte, Daniel Vaiman

See Editorial Commentary, pp 561–563

Abstract—Preeclampsia (PE) is a common human-specific pregnancy disorder defined by hypertension and proteinuria during gestation and responsible for maternal and fetal morbimortality. *STOX1*, encoding a transcription factor, was the first gene associated with PE as identified by positional cloning approaches. Its overexpression in choriocarcinoma cells mimics the transcriptional consequences of PE in the human placenta. Here, we created transgenic mouse strains overexpressing human *STOX1*. Wild-type female mice crossed with transgenic male mice reproduce accurately the symptoms of severe PE: gestational hypertension, proteinuria, and elevated plasma levels of soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin. Placental and kidney histology were altered. Symptoms were prevented or alleviated by aspirin treatment. *STOX1*-overexpressing mice constitute a unique model for studying PE, allow testing therapeutic approaches, and assessing the long-term effects of the preeclamptic syndrome. (*Hypertension*. 2013;61:662-668.) • [Online Data Supplement](#)

Key Words: hypertension ■ mouse model ■ preeclampsia ■ proteinuria ■ *STOX1*

Preeclampsia (PE) is a pervasive complication of human pregnancy characterized by a gestational hypertension associated with proteinuria occurring from midgestation.¹ Worldwide, this syndrome affects ≈5% of pregnant women and is a leading cause of maternal mortality, especially in low- and middle-income countries^{2,3}; it is also a direct cause of iatrogenic prematurity,⁴ because the only definitive therapeutic act is the extraction of the fetoplacental unit.

STOX1 is a transcription factor belonging to the enlarged Forkhead Box gene family that has been associated with PE,⁵ able to modulate trophoblast proliferation and migration.⁶ *STOX1* is maternally expressed in a specific cell type of the placenta, column extravillous trophoblasts.⁷ Overexpression of *STOX1* in human choriocarcinoma cells induces transcription alterations that mimic those of preeclamptic placentas.^{8,9} Founds et al¹⁰ showed in a transcriptomic analysis that *STOX1* is overexpressed ($\times 2.1$; $P=0.013$) during the first trimester in pregnancies that will have a preeclamptic outcome.

In the present work, we generated mice overexpressing human *STOX1*. Wild-type (WT) female mice crossed with transgenic males overexpressing *STOX1* have a severe gestational hypertension, proteinuria, an increased plasma level of soluble antiangiogenic factors, as well as kidney and placenta histological alterations. We also demonstrate a beneficial effect of low-dose aspirin treatment on the maternal symptoms. Hence, *STOX1*-overexpressing mice constitute a unique model for studying severe PE.

Methods

More details of the methods are provided in the online-only Data Supplement.

Animals and Transgenesis and Aspirin Treatment

The complete open reading frame (ORF) of the human *STOX1* (A isoform) cDNA was used to generate transgenic animals.¹¹ The number of copies of the transgene was assessed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) from the mouse DNA relative to a single-copy

Received July 26, 2012; first decision November 25, 2012; revision accepted January 5, 2013.

From INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France (L.D., C.M., V.R., S.B., A.D., F.M., M.B.-F., D.V.); CNRS UMRS 8104, Paris, France (L.D., C.M., V.R., S.B., A.D., F.M., M.B.-F., D.V.); Université Paris Descartes, Paris, France (L.D., C.M., V.R., S.B., A.D., F.M., M.B.-F., D.V.); INRA UMR1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, Jouy-en-Josas, France (B.P., M.V., J.C., F.I.P., J.L.V.); Lactarium d'Ile de France, Institut de Puériculture et de Périnatalogie, Paris, France (V.R.); INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy en Josas, France (N.D.); CEA, I2BM, MIRCen, Fontenay aux Roses, France (A.-L.B., G.G.); Paris-Centre de recherche Cardiovasculaire, INSERM U970, Hôpital Georges Pompidou, Paris, France (V.B.); Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), UMR S702, Paris, France (A.H.); Aix-Marseille Université, URMIT, Unité Mixte de Recherche 6236, Marseille, France (C.B.); APHM, Hôpital Conception, Laboratoire de Biologie Moléculaire, Marseille, France (C.B.); and APHM, Hôpital de la Conception, Service de Médecine Néonatale, Marseille, France (U.S.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://hyper.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.202994/-DC1>.

Correspondence to Daniel Vaiman, INSERM U1016-CNRS UMR8104, 24 rue du Fg St Jacques, Paris 75014, France. E-mail daniel.vaiman@inserm.fr
© 2013 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.202994

gene. Transmission analysis through generations showed that there was a single locus of insertion on the 3 strains that were analyzed.

Animals (FVB/N) were bred in the animal facility of INRA (Institut National de Recherche Agronomique, Jouy en Josas, France) in a controlled environment (light/dark cycle, temperature, free access to food and water). Blood collection and urine collection, blood pressure (BP) measurements kidney perfusion and aspirin supplementation in the drinking water were performed according to standardized protocols (see Methods in the online-only Data Supplement).

RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcriptase PCR Conditions

Total RNA from collected tissues was extracted and quantified by spectrophotometry. Quality of the RNA was systematically verified by Bioanalyzer and RIN to be consistently >8. After reverse transcription, quantitative reverse transcriptase PCR was performed. The efficiency of the PCR was checked for every primer couple and estimated (Methods in the online-only Data Supplement). The Ct values were normalized by the Ct values obtained for the murine succinate dehydrogenase subunit A (*Sdha*) used as a normalizing gene and shown previously to be stable and highly normalizing in the placenta.¹² All primers are presented in Table S1 in the online-only Data Supplement.

BP Measurements

BP was measured repeatedly in the tail artery in mice before, during, and after pregnancy (for a total of ≈ 35 consecutive days). Measurements were performed using a computerized, noninvasive tail-cuff plethysmography method (Letica 5001; Bioseb), using thermostatically warmed restrainers designed for mice and adapted to the size of the animal. This system uses volume-pressure recording technology to detect changes in tail volume that corresponds to systolic and diastolic pressures during each measurement cycle. Unanesthetized mice previously accustomed during 1 week to the manipulation (systolic BP stabilized) were placed in plastic holders. The protocol consisted of at least 6 satisfactory measurements daily, meaning without detectable movement of the mice. Thirty-six gestations were followed, which represents >5000 independent BP measurements by 2 independent researchers (systolic, diastolic, and median always displayed a highly similar profile). In addition, invasive measures were performed on 14 WT mice mated with WT or transgenic males at the end of gestation (14.5–17.5 days postcoitum [dpc]). The catheter was inserted into the left common carotid artery under xylazine/ketamine anesthesia. Mice were kept on a heating pad during experimentation. BP was recorded and analyzed from continuous measurements using the BIOPAC MP36 system. The extraction of the systolic BP started when cardiovascular parameters were stabilized.

Assessment of Albumin/Creatinine Ratio

Urine samples were collected daily during gestation and were pooled at early (1–5 dpc), middle (9–12 dpc), and late (15–18 dpc) gestation times separately for each mice. Albumin/creatinine ratio was measured in these urine specimens using the ELISA kit of Exocell (Philadelphia, PA).

sFlt1 and sEng Plasmatic Concentration Assessment

ELISAs were used to determine the concentration of soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) and soluble endoglin (sEng) in mouse plasma with commercial kits (R&D Systems).

Histological Analysis

Placentas and kidneys were sampled from 10 transgenic and WT mice (after heart perfusion by 20 mL of PBS in the case of kidneys). Antifibrin immunostaining of slides from paraffin-embedded kidneys was performed using the anti-human fibrinogen at 1/400 from Dako (A0080) and the LSAB revelation system (Dako, K0679) according to the manufacturer's instructions (standard conditions). Placental histology was performed after hematoxylin–eosin staining or periodic acid–schiff (PAS) staining. The number of vacuolated foci present in the labyrinth was counted after hematoxylin–eosin staining. A grade of 1 to 5 was given according to the level of PAS intensity, and the PAS-positive areas were measured in the labyrinth.

Statistical Analysis

During this study, parametric tests were used using ANOVA, followed by post hoc Dunnett *t* tests for comparison with controls. The StatistXL add-in of Excel was systematically used. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Generation of STOX1 Transgenic Mice

Three independent transgenic lines (called TgSTOX13, TgSTOX34, and TgSTOX42) were generated by introducing the human *STOX1A* ORF (complete isoform) under the control of a ubiquitously expressed promoter (the cytomegalovirus promoter). TgSTOX13 and TgSTOX42 strains contain a unique copy that was transmitted in a Mendelian fashion. Because the expression level of TgSTOX34 was very similar to that of TgSTOX13, we focused our attention on the TgSTOX13 and TgSTOX42 strains.

The expression levels of human and mouse *STOX1* were tested by quantitative reverse transcriptase PCR in the maternal kidney, liver, brain, and placenta of pregnant TgSTOX13 and TgSTOX42 females, as well as in the testis and spermatozoa of transgenic males of both strains, using species-specific primers (Table); *hSTOX1* expression was comparatively higher in placental tissue than in any other tissue or spermatozoa. Quantitative reverse transcriptase PCR efficiency was maximal for mouse and human *STOX*, allowing to suggest that the placental expression level of the human *hSTOX1* was roughly similar to that of *mStox1* in TgSTOX13 transgenic mice (Table) and ≈ 13 -fold higher in TgSTOX42. In the other tissues tested (kidney, brain, testis, and liver), the transgene expression level was lower than that of the endogenous gene but always higher in TgSTOX42 than in TgSTOX13 (Table). Because there is a unique transgene insertion in both strains (as tested by quantitative PCR), we assume that the difference in the expression level was strictly regulated by the genomic position of this insertion. In transgenic placentas from WT \times TgSTOX42 crosses, where

Table. Expression of the Endogenous *Stox1* Gene and STOX1 Transgene in Mice in Various Tissues

Mice	Placenta	Kidney	Liver	Brain	Testis	Spermatozoa
WT (endogenous <i>Stox1</i>)*	3000 \pm 57	178 \pm 4.3	92 \pm 2.1	1646 \pm 96	882 \pm 19	358 \pm 14
TgSTOX13*	2400 \pm 90	1.0 \pm 0.05	4.2 \pm 0.15	1.9 \pm 0.04	1646 \pm 140	66 \pm 4.7
TgSTOX42*	38 088 \pm 5540	12 \pm 4.6	38.2 \pm 11	1384 \pm 100	7304 \pm 2066	3755 \pm 1195

WT indicates wild type.

*Arbitrary units, the kidney expression in TgSTOX13 mice was set to 1 and served as a reference for the expression of the transgene. The values of the endogenous *Stox1* are corrected by the Ct values of the *sdha* gene, giving a rough indication of the relative expression of the endogenous *Stox1* compared with the transgene.

the transgene expression is the highest, the endogenous gene was overexpressed 4-fold ($P=2 \times 10^{-11}$ by Student test compared with WT x WT crosses).

STOX1 Transgenic Mice Develop a Strong Gestational Hypertension, Proteinuria, and Present an Increased Level of Circulating sFlt1 and sEng

WT females were crossed with males of 3 genotypes (WT, TgSTOX13, or TgSTOX42) to ensure that the transgene expression would be restricted to the fetoplacental unit. BP was monitored daily in the various crosses (Figure 1A). An increase in BP during gestation was observed in all cases of crosses involving transgenic males. The BP curves reached a plateau in both transgenic crosses around embryonic day 10.5, until days 14.5 to 15.5, when the BP tends to increase again by an additional 15 to 20 mmHg. The maximal increase reached ≈ 80 mmHg from a normal pressure of ≈ 116 mmHg (Figure 1A). BP returned to normal rapidly (in ≈ 48 hours) after parturition. In addition, we carried out measurements by catheterization of one of the carotid at late gestation times, and consistently with human BP data under anesthesia,¹³ the

increase in mice carrying transgenic fetuses was present, albeit reduced; the BP was 12 mm Hg more elevated in the transgenic crosses ($P=0.008$; Figure S1).

Proteinuria was evaluated as a ratio between albumin and creatinine (Figure 1B). After individual normalization, we observed an increase in the albumin/creatinine ratio, which comprised between ≈ 1.7 - and 1.9-fold at midgestation ($P=0.02$ and 0.03 for TgSTOX13 and tgSTOX42, respectively) and between ≈ 1.8 - and 3.8-fold at late gestation points ($P=0.026$ and 0.002, respectively), in females crossed with transgenic males compared with control crosses.

sFlt1, considered as a biomarker for PE in the human disease,¹⁴⁻¹⁶ was monitored (Figure 2A). The average concentration in the plasma of pregnant mice was 2075 pg/mL when TgSTOX13 males have fathered and 2455 pg/mL when crossed with TgSTOX42 males, an increase of 1.9- and 2.3-fold compared with control (1076 pg/mL), respectively ($P=0.02$ and 0.03). sEng was also measured in the plasma (Figure 2B), and it was found to be increased in the crosses involving TgSTOX13 ($\times 2.0$; $P=0.04$) and TgSTOX42 males ($\times 2.3$; $P=0.01$) compared with crosses with WT males.

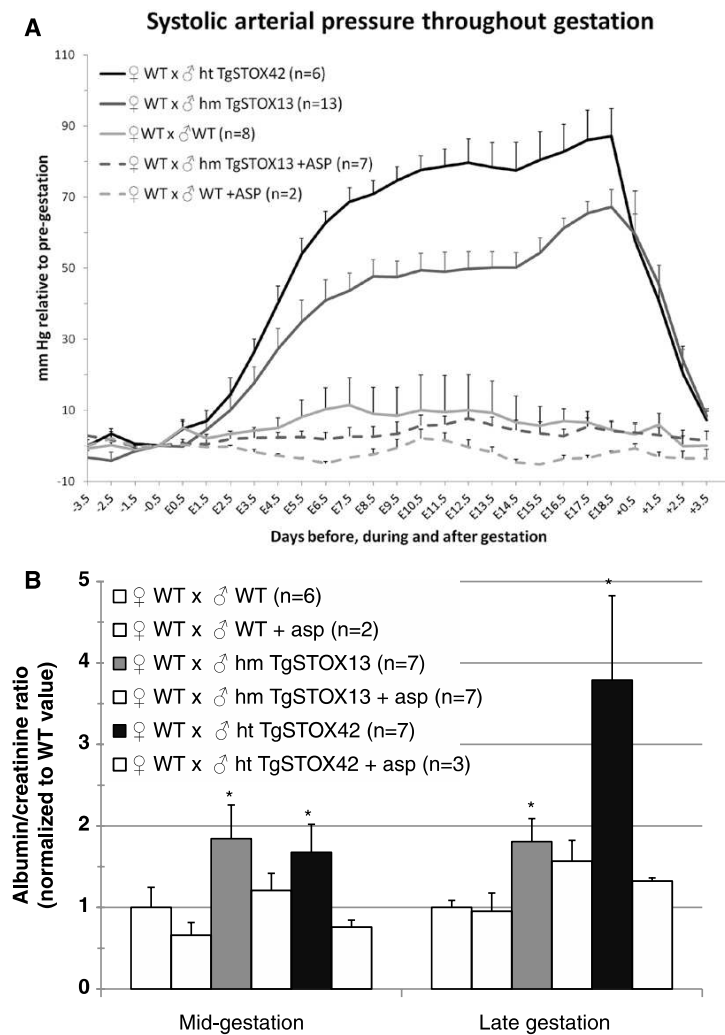


Figure 1. Hypertension, elevated albumin/creatinine ratio in wild-type (WT) females crossed with STOX1 transgenic males. **A**, Systolic arterial pressure is represented for pregnant mice after the indicated crosses, treated or not with aspirin (ASP). The values were obtained daily, and the curves were smoothed on 3 consecutive days. Mice overexpressing STOX1 in the fetoplacental units display a strong gestational hypertension, increased by up to 80 mmHg in the TgSTOX42 strain. Two or 3 days postpartum, blood pressure goes back to normal. **B**, Albumin/creatinine ratio (ACR) in the various crosses with or without ASP treatment. The values were normalized for each mouse to the ACR value measured at the beginning of gestation; the value obtained for WT mice was taken as a reference and set to 1. The ACR of females crossed with transgenic males was significantly different from the ACR of females crossed with WT at midgestation and late gestation times, whereas ASP treatment brought back the ACR to values not significantly different from those of controls. *Significant comparisons with the control after ANOVA and Dunnett test.

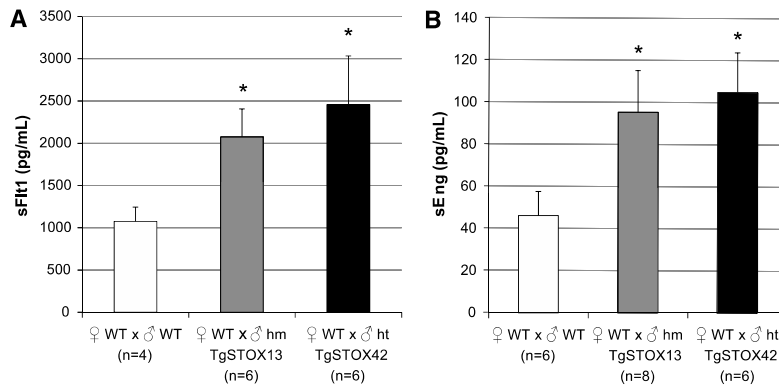


Figure 2. Increased plasmatic soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) and soluble endoglin (sEng) concentrations in wild-type (WT) females crossed with STOX1 transgenic males. sFlt1 (A) and sEng (B) concentrations were elevated in the plasma of pregnant mice (16.5 dpc) carrying transgenic fetuses compared with those carrying WT. hm refers to homozygous transgenic, and ht refers to hemizygous transgenic animals. Statistical analysis was performed by ANOVA, followed post hoc by a Dunnett test (* $P < 0.05$).

WT Females Carrying Transgenic Fetuses Have Kidney Anomalies That Are Characteristic of PE

In the kidneys of females crossed with TgSTOX13 mice, glomerular changes were observed: first, a glomerular tuft swelling with expansion of the capillary wall, up to the point that the tuft could occasionally make contact with the Bowman's capsule; second, we observed a slight increase in the glomerular cellularity (42.3 ± 10.1 in TgSTOX13 and 48.1 ± 11.9 in TgSTOX42 versus 34.0 ± 11.8 in WT; Figure 3A; $P = 3.4 \times 10^{-3}$ and $P = 6.4 \times 10^{-7}$, respectively) attributable to a mild mesangial cell proliferation. Immunohistochemistry revealed subendothelial fibrin deposition, with a predominant peripheral pattern. These changes are strongly reminiscent of the renal pathology observed in human PE^{17–19} and could not be observed in the kidneys of WT pregnant mice crossed with WT males (Figure 3B, top and middle photographs). No major abnormality was found in the tubulointerstitial compartment, or in the larger vessels, in either group.

Aspirin Treatment Efficiently Improves the Maternal Phenotype

WT females crossed with TgSTOX13 or TgSTOX42 males were treated with aspirin at low doses in the drinking water during the whole gestation. As a control, WT pregnant females received aspirin all along their pregnancy after a cross with WT males. Aspirin completely prevented the onset of hypertension and brought the albumin/creatinine ratio to normal values at midgestation and late gestation times (Figures 1A and 1B). Fibrin immunolabeling of the kidneys showed that the deposit was considerably reduced in aspirin-treated WT females crossed with TgSTOX13 or TgSTOX42 males, compared with nontreated females (Figure 3B).

STOX1 Transgenic Placentas Present Structural Alterations

The anatomic alterations of hemizygous TgSTOX13 and TgSTOX42 (validated as transgenic by PCR) placentas were studied by histology (Figure S2). No difference was observed in gross morphology at 16.5 dpc, such as in the ratio between the labyrinth and the junctional zone. Because deregulated imprinted gene expression is known to alter glycogen trophoblast location, we counted the number of vacuolated foci, graded the PAS staining, specific of glycoproteins, and measured the surface of PAS area in the

labyrinth. Although in hemizygous TgSTOX13 placentas no significant difference was detected compared with measures in WT placentas, in hemizygous TgSTOX42 placentas a significant diminution of vacuolated foci in the labyrinth, as well as PAS grade and PAS area (Figure 4A–4C), was consistently observed.

Litter Size Is Affected by the Transgene

Litter size seemed to be linked to the genotypes of the males used in crosses (Figure S3; $P = 0.0016$ by 1-factor ANOVA), with $8.4 (\pm 2.0)$ pups on average in WT crosses. In crosses with TgSTOX13 males, the litter size was reduced to $6.9 (\pm 3.4)$; $P = 0.048$). Consistent with the higher transgene expression in TgSTOX42, the litter size was reduced to $6.0 (\pm 2.6)$, $P = 0.001$ in crosses involving a TgSTOX42 male. When aspirin was given to females during gestation, the litter size was $7.8 (\pm 2.4)$ and $9.3 (\pm 3.1)$ in crosses involving TgSTOX13 and TgSTOX42 males, respectively. In the latter case, this was significantly different from nontreated crosses ($P = 0.022$), showing that the drug was able to correct the reduced litter size phenotype.

Discussion

Herein, we show that mice overexpressing STOX1 in the embryo–fetoplacental unit reproduce in extenso and without further manipulation the major features of PE: proteinuria and hypertension. A peculiarity of the present mouse model of PE is the intensity of the gestational hypertension, which reaches values corresponding to severe human PE at the end of gestation. The lower difference in BP observed under anesthesia compared with vigil animals may presumably be explained by a relaxing effect of the anesthesia, moderating as well the BP level. We also observed an elevation of both sFlt1 and sEng, key antiangiogenic factors of PE. These mice also harbored PE-specific kidney alterations.

In summary, a unique transcription factor (STOX1) expressed in the fetoplacental unit is sufficient to trigger PE-like symptoms in WT females in a dose-dependent manner (illustrated by the more or less severe phenotype observed in crosses involving TgSTOX13 or TgSTOX42 males). Although the involvement of STOX1 in human PE was debated after its discovery,²⁰ the present study confirms a growing corpus of evidence indicating an actual contribution of STOX1 to the preeclamptic phenotype.

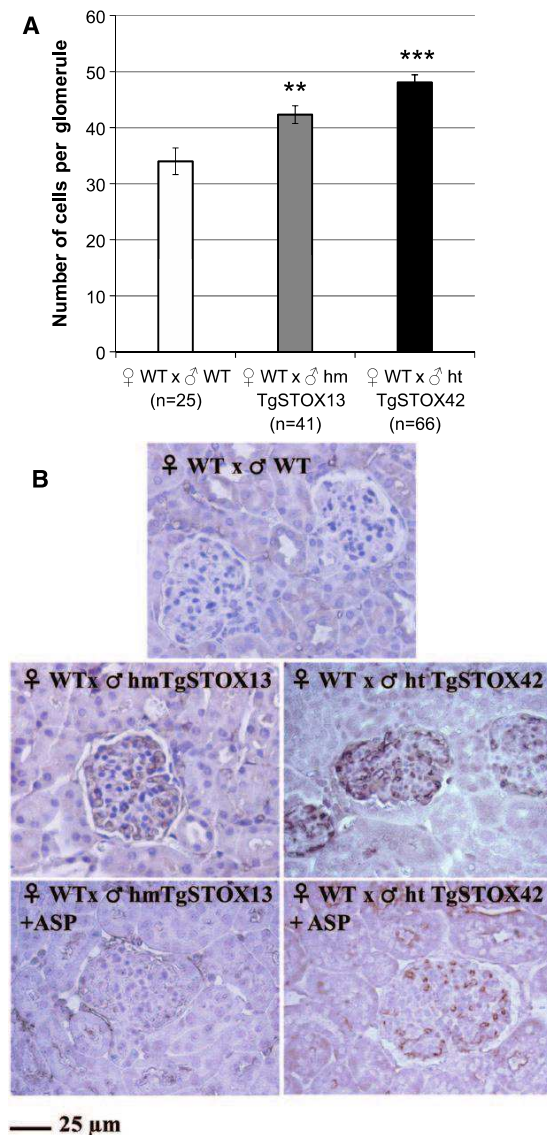


Figure 3. Histological kidney alterations in wild-type (WT) females crossed with transgenic males at 16.5 days postcoitum (dpc). **A**, The glomerular size and the number of cells were significantly augmented in the glomeruli of mothers (WT) when the fetuses/placentas were transgenic. We also observed a reduction in the endothelial fenestrae (** $P < 0.01$, see text). **B**, Antifibrin immunohistochemistry (with hematoxylin–eosin counterstain, scale bar=25 μ m) revealed a strong labeling (in brown) of the glomeruli from females crossed with transgenic animals, whereas those from females crossed with WT males were completely free of this labeling. TgSTOX42 kidneys were overall more strongly labeled. Under aspirin treatment (+ASP), the intensity of the labeling was dramatically reduced.

Rodent models of PE have been considered very important for studying PE pathophysiological mechanisms. Various models of reduced uterine perfusion were generated by inducing placental ischemia, administration of angiotensin antagonists, proinflammatory drugs, or vasoconstrictive agents or by using the BPH/5 hypertensive mouse strain²¹ and crosses

between the CBA \times DBA strains.²² Gene manipulations have also been used, such as gene inactivation experiments for *p57Kip2* or *Comt*^{23,24} additive transgenesis of antiangiogenic factors, such as *s-ftl*,²⁵ or transgenesis leading to manipulation of the renin/angiotensin system.²⁶ In the handful of existing mouse models of PE, gestational hypertension is mild,²⁷ far below the one of our model and far below what is observed in severe PE in women. Furthermore, we observed that the principal maternal symptom, gestational hypertension, seems very early, from 3.5 dpc. In humans, it has been shown that PE can exceptionally occur very early with a complete phenotypic profile before 15 weeks of gestation,²⁸ whereas in general symptoms are reported to appear from midgestation (21–22 weeks) at the earliest. The occurrence of the maternal hypertension at the very beginning of gestation in our model suggests that soluble substances produced by the blastocyst, the embryo, or even from the ejaculate may initiate the maternal preeclamptic phenotype. It is interesting to compare hypertension curves obtained here with those of most studies^{24,25} that show a raise during the last 5 days of gestation or so. This increase is also visible in our model, but is superimposed on a highly elevated BP triggered by gestation. In sum, our model cumulates presumably the effects of an early message from the embryo–fetoplacental unit to the mother systems controlling BP (endothelial system and kidney) and the effect of an increased placental/fetal demand occurring at the end of gestation, when the rhythm of weight gain is the highest for the fetuses, this effect being the one reproduced in most mouse models of PE.

Under anesthesia, the difference in BP measurement between the control pregnant mice and the ones crossed with transgenic males was present, albeit less pronounced than on vigil animals. This is completely consistent with recent human data showing that under anesthesia there is a steep drop in maternal BP but much more elevated in preeclamptic women than normotensive pregnant women (–10% in normotensive versus –30% in preeclamptic women).¹³ This suggests that BP variations in our model are very close to what is observed in human clinics.

To the best of our knowledge, we demonstrate here for the first time, in a mouse model, that an aspirin treatment at low doses administered in drinking water from the beginning of gestation is efficient for preventing the maternal syndrome. In humans, it seems that a major issue is the timing of aspirin administration: after 16 weeks of gestation it has no effect at all.²⁹ A consensus tends nevertheless to emerge, with the idea that aspirin is quite efficient when administered early (before the end of the first trimester of pregnancy).^{29–33} Aspirin at low doses may change the hemodynamic properties of the blood thus preventing blood clotting, an issue that is sometimes associated with disseminated intravascular coagulation in severe PE with HELLP (hemolysis, elevated liver enzyme, low platelet count) syndrome.³⁴

Unexpectedly, mild anomalies of mature placenta (decrease of glycogen trophoblast surface) were only observed in crosses with TgSTOX42 males. Although we did not perform earlier histological examination of developing placenta, focusing on spiral artery invasion for instance, the observation that hypertension occurs before the formation of a placenta indicates that the mechanisms underlying the observed phenotype cannot be

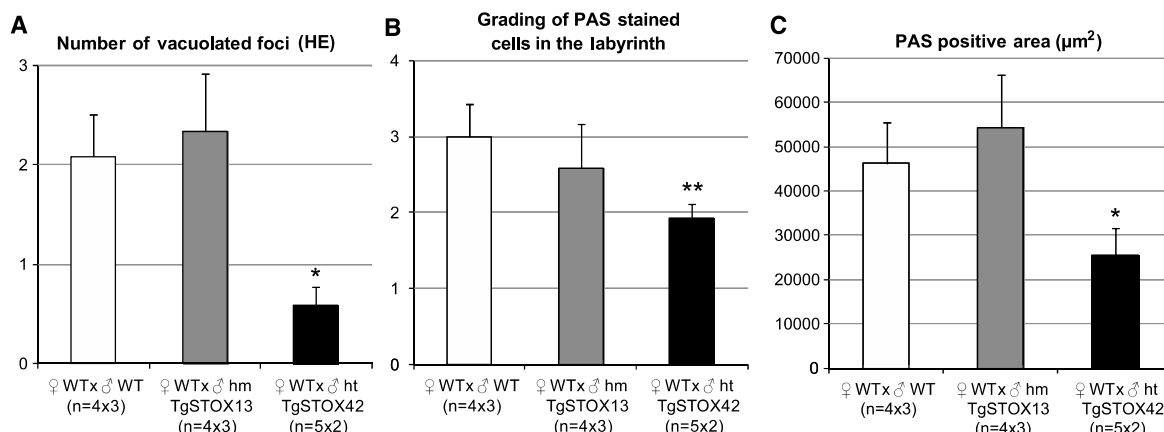


Figure 4. Reduced vacuolated foci (A), PAS staining (B), and PAS area (C) in hemizygous TgSTOX42 placentas at 16.5 dpc. Indexes of glycogen trophoblast mislocation were measured in the labyrinthic zone using vacuolated aspects of the foci under hematoxylin–eosin (HE) coloration and PAS staining (Figure S2; see Methods section). Several placentas from different crosses were used: 6 placentas from 3 different crosses for ♀WTx♂WT, ♀ WTx♂ ht TgSTOX13, and ♀ WTx♂ ht TgSTOX42. Consistently, numeration of vacuolated foci (B), PAS grade (C), and PAS area (D) were significantly decreased in the labyrinth in hemizygous TgSTOX42 placentas.

fully explained by placentation defects. This opens the possibility that different causes of PE may explain the grade of severity of PE symptoms in humans, as well as the early or late onset of the disease.

Imprinted genes and, among them, the paradigmatic *Igf2*, are known to have a crucial role in placental and fetal growth.³⁵ In particular, *Igf2* inactivation leads to a lack of glycogen cells.³⁶ The observed defaults in glycogen trophoblasts in hemizygous TgSTOX42 placenta may be related to the fact that *STOX1* is an imprinted gene in humans and could thus regulate the other members of the imprinted gene network.³⁷

Perspectives

The mouse model presented here can help in the understanding of severe PE, for which until now very few experimental alternatives to the direct study of the patients are available. These mice provide the community working on PE with a tool applicable for cognitive (understanding PE pathogenesis) as well as applied (drug screening) usage, and even potentially deciphering how these drugs act.

Acknowledgments

Dr Guillermina Girardi is warmly acknowledged for her help and advices for studying kidney histology and preparing the slides. Emma Walton is acknowledged for her advice concerning the manuscript.

Sources of Funding

This work was supported by INSERM.

Disclosures

None.

References

- Sibai BM. Thrombophilia and severe preeclampsia: time to screen and treat in future pregnancies? *Hypertension*. 2005;46:1252–1253.
- Firoz T, Sanghvi H, Merialdi M, von Dadelszen P. Pre-eclampsia in low and middle income countries. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25:537–548.
- Goldenberg RL, McClure EM, Macguire ER, Kamath BD, Jobe AH. Lessons for low-income regions following the reduction in

- hypertension-related maternal mortality in high-income countries. *Int J Gynaecol Obstet*. 2011;113:91–95.
- Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371:75–84.
- van Dijk M, Mulders J, Poutsma A, Könst AA, Lachmeijer AM, Dekker GA, Blankenstein MA, Oudejans CB. Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet*. 2005;37:514–519.
- van Dijk M, van Bezu J, van Abel D, Dunk C, Blankenstein MA, Oudejans CB, Lye SJ. The STOX1 genotype associated with pre-eclampsia leads to a reduction of trophoblast invasion by alpha-T-catenin upregulation. *Hum Mol Genet*. 2010;19:2658–2667.
- van Dijk M, Drewlo S, Oudejans CB. Differential methylation of STOX1 in human placenta. *Epigenetics*. 2010;5:736–742.
- Rigourd V, Chauvet C, Chelbi ST, Rebouret R, Mondon F, Letourneur F, Mignot TM, Barbaux S, Vaiman D. STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PLoS ONE*. 2008;3:e3905.
- Fenstad MH, Johnson MP, Løset M, Mundal SB, Roten LT, Eide IP, Bjørge L, Sande RK, Johansson AK, Dyer TD, Forsmo S, Blangero J, Moses EK, Austgulen R. STOX2 but not STOX1 is differentially expressed in decidua from pre-eclamptic women: data from the Second Nord-Trøndelag Health Study. *Mol Hum Reprod*. 2010;16:960–968.
- Founds SA, Conley YP, Lyons-Weiler JF, Jeyabalan A, Hogge WA, Conrad KP. Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. *Placenta*. 2009;30:15–24.
- Vilotte JL, Soulier S, Stinnakre MG, Massoud M, Mercier JC. Efficient tissue-specific expression of bovine alpha-lactalbumin in transgenic mice. *Eur J Biochem*. 1989;186:43–48.
- Meller M, Vadachkoria S, Luthy DA, Williams MA. Evaluation of house-keeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta*. 2005;26:601–607.
- Vricella LK, Louis JM, Mercer BM, Bolden N. Epidural-associated hypotension is more common among severely preeclamptic patients in labor. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207:335.e1–335.e7.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003;111:649–658.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350:672–683.
- Hu YC, Wang PH, Yeh S, Wang RS, Xie C, Xu Q, Zhou X, Chao HT, Tsai MY, Chang C. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:11209–11214.
- Gaber LW, Spargo BH, Lindheimer MD. Renal pathology in pre-eclampsia. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1994;8:443–468.

18. Fogo AB. *Renal Diseases in Pregnancy*. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
19. Fiaschi E, Naccarato R. The histopathology of the kidney in toxemia. Serial renal biopsies during pregnancy, puerperium and several years post-partum. Light and electron microscopic and immunofluorescent studies. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat*. 1968;345:299–309.
20. Iglesias-Platas I, Monk D, Jebbink J, Buimer M, Boer K, van der Post J, Hills F, Apostolidou S, Ris-Stalpers C, Stanier P, Moore GE. STOX1 is not imprinted and is not likely to be involved in preeclampsia. *Nat Genet*. 2007;39:279–280; author reply 280.
21. Davison RL, Hoffmann DS, Butz GM, Aldape G, Schlager G, Merrill DC, Sethi S, Weiss RM, Bates JN. Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension*. 2002;39(2 Pt 2):337–342.
22. Ahmed A, Singh J, Khan Y, Seshan SV, Girardi G. A new mouse model to explore therapies for preeclampsia. *PLoS ONE*. 2010;5:e13663.
23. Kanayama N, Takahashi K, Matsuura T, Sugimura M, Kobayashi T, Moniwa N, Tomita M, Nakayama K. Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol Hum Reprod*. 2002;8:1129–1135.
24. Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, Parry S, Augustin HG, Gattone VH, Folkman J, Strauss JF, Kalluri R. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature*. 2008;453:1117–1121.
25. Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:1451–1455.
26. Falcao S, Stoyanova E, Cloutier G, Maurice RL, Gutkowska J, Lavoie JL. Mice overexpressing both human angiotensinogen and human renin as a model of superimposed preeclampsia on chronic hypertension. *Hypertension*. 2009;54:1401–1407.
27. Balta O, Boztosun A, Deveci K, Gulturk S, Ekici F, Kaya A, Cetin A, Cetin M. Reduced uterine perfusion pressure model is not successful to mimic severe preeclampsia. *Placenta*. 2011;32:675–680.
28. Imasawa T, Nishiwaki T, Nishimura M, Shikama N, Matsumura R, Nagai M, Soyama A, Koike K, Kitamura H, Joh K. A case of “pure” preeclampsia with nephrotic syndrome before 15 weeks of gestation in a patient whose renal biopsy showed glomerular capillary endotheliosis. *Am J Kidney Dis*. 2006;48:495–501.
29. Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, Forest JC, Giguère Y. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2010;116(2 Pt 1):402–414.
30. Beaufils M, Uzan S, Donsimoni R, Colau JC. Prevention of pre-eclampsia by early antiplatelet therapy. *Lancet*. 1985;1:840–842.
31. Wallenburg HC, Dekker GA, Makovitz JW, Rotmans P. Low-dose aspirin prevents pregnancy-induced hypertension and pre-eclampsia in angiotensin-sensitive primigravidae. *Lancet*. 1986;1:1–3.
32. Bakhti A, Vaiman D. Prevention of gravidic endothelial hypertension by aspirin treatment administered from the 8th week of gestation. *Hypertens Res*. 2011;34:1116–1120.
33. Roberge S, Giguère Y, Villa P, Nicolaidis K, Vainio M, Forest JC, von Dadelzen P, Vaiman D, Tapp S, Bujold E. Early administration of low-dose aspirin for the prevention of severe and mild preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Perinatol*. 2012;29:551–556.
34. Mercer BM, Crocker LG, Pierce WF, Sibai BM. Clinical characteristics and outcome of twin gestation complicated by preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;168:1467–1473.
35. Constância M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. 2002;417:945–948.
36. Lopez MF, Dikkes P, Zurakowski D, Villa-Komaroff L. Insulin-like growth factor II affects the appearance and glycogen content of glycogen cells in the murine placenta. *Endocrinology*. 1996;137:2100–2108.
37. Varrault A, Gueydan C, Delalbre A, Bellmann A, Houssami S, Aknin C, Severac D, Chotard L, Kahli M, Le Digarcher A, Pavlidis P, Journot L. Zc1 regulates an imprinted gene network critically involved in the control of embryonic growth. *Dev Cell*. 2006;11:711–722.

Novelty and Significance

What Is New?

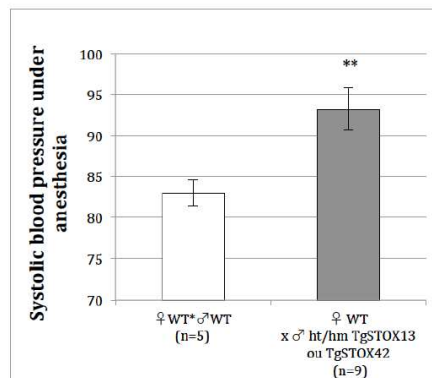
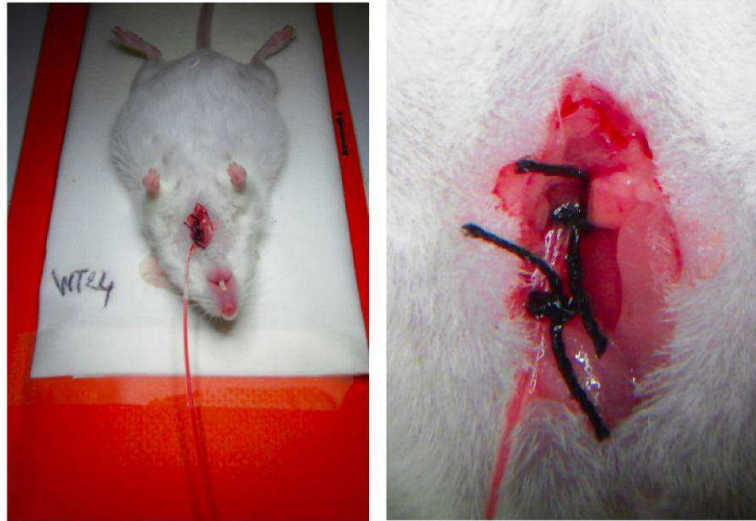
- The first mouse model of severe preeclampsia
- Strong clues to prove a role of STOX1 in preeclampsia

What Is Relevant?

- Aspirin treatment is efficient to revert the syndrome.
- The mice are easy to breed and can be distributed to the researchers interested in preeclampsia or more generally in hypertension.

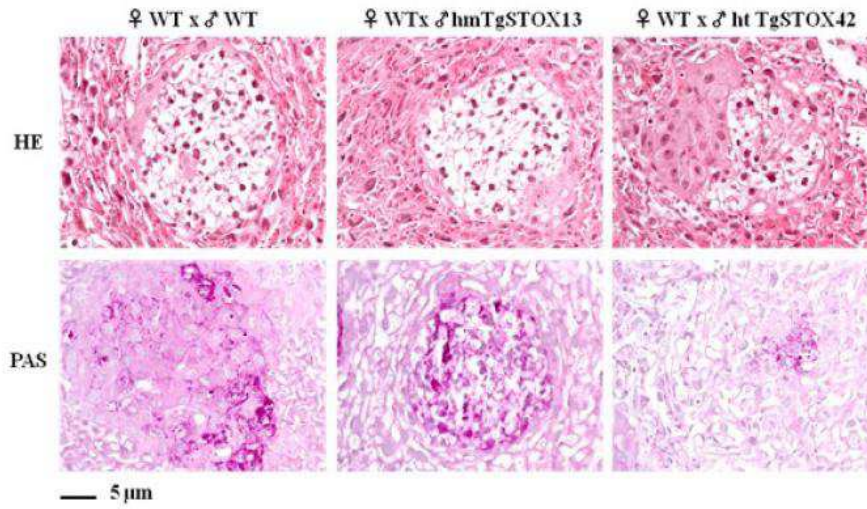
Summary

Mice carrying transgenic embryos overexpressing the human version of the STOX1 transcription factor develop all the symptoms of severe preeclampsia. Aspirin at low doses in the drinking water efficiently corrects these symptoms. This work proves that STOX1 is an important actor in preeclampsia and suggests that the mice generated during this project are an interesting model for understanding some aspects of preeclampsia pathogenesis and testing drugs.

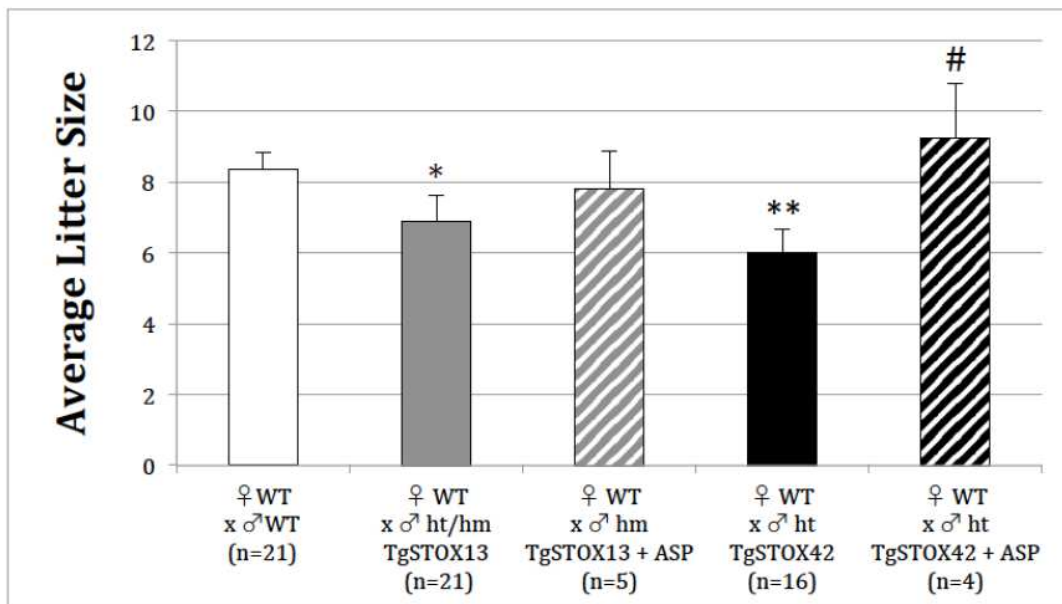


Supplementary Figure S1: Invasive measurement of blood pressure under anesthesia. The mice at the end of gestation (14.5 to 17.5 dpc) were anesthetized, kept on a heating pad, and a catheter was inserted into the carotid as shown in the picture. Blood Pressure was recorded and analyzed from continuous measurements using BIOPAC MP36 system. The extraction of the Systolic Blood Pressure started when cardiovascular parameters were stable, and appeared more elevated in mice crosses with transgenic males.

Figure S2 : Placental phenotype



Placental histology analysed by hematoxylin–eosin (HE) and Periodic Acid-Schiff stainings. These pictures are representative of the analyzed placentas (4-5 placentas from 2-3 independent crosses).



Supplementary Figure S3: Litter size is reduced in crosses involving transgenic males. When aspirin was given to the mothers during gestation (hatched bars), the litter size was closer to controls, with a significant p value for the crosses involving TgSTOX42 males ($p = 0.035$ between with and without treatment, represented by a # symbol). * for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.01$.

ARTICLE 2

**LA SUREXPRESSIION DE STOX1
DANS L'UNITE FOETO-
PLACENTAIRE INDUIT UNE
FONCTION PLACENTAIRE ALTEREE
AINSI QU'UNE SURCROISSANCE
FOETALE**

(en préparation)

Au cours des premiers mois suivant l'obtention de souris transgénique et pendant le phénotypage des souris gestantes, de nombreux croisements (pas seulement les croisements de mères sauvages avec des pères transgénique présentés dans l'article 1) et nombreuses dissections à E16,5 ont été réalisées. A chaque fois, le poids des fœtus et des placentas a été mesuré.

De plus, des ARN ont été extraits des différents placentas et ont servis à réaliser une étude transcriptomique et des RT-PCR quantitative sur des marqueurs des différents compartiments du placenta murin afin d'en évaluer la fonction.

L'ensemble de ces résultats est regroupé dans cet article 2, qui se focalise donc sur le phénotype fœtal et placentaire.

Cet article sera soumis d'ici peu à Placenta ou Plos One quasiment en l'état.

Résumé

Dans cet article, nous avons été plus loin dans la caractérisation du phénotype de souris gestantes portant des fœtus transgéniques exprimant la version humaine de *STOX1*.

Nous nous sommes particulièrement concentrés sur les altérations fœtales et placentaires. Pour cela, nous avons sacrifiés des souris en fin de gestation (E16.5) et avons pesé les placentas et les fœtus. Nous avons également réalisé une analyse transcriptomique des placentas.

Nous avons ainsi pu montrer une dichotomie selon l'origine maternelle ou paternelle du transgène. En effet, il semble que les fœtus aient un poids plus important, mais uniquement dans les cas où le transgène est transmis par le père. Cela suggère fortement une implication des gènes soumis à empreinte qui contrôle l'équilibre entre ressources allouées par la mère pour la croissance fœtale et sauvegarde de l'organisme maternel, selon la théorie du conflit parental. L'aspirine tend à améliorer ce déséquilibre et en particulier, augmente le rapport poids fœtal/poids placentaire, qui reflète l'efficacité placentaire.

Au niveau placentaire, nous avons pu mettre en évidence des anomalies au niveau de l'expression de gènes normalement exprimés dans les cellules à glycogène, avec une expression supérieure dans les placentas transgéniques. Ceci contraste avec les observations histologiques qui révélaient une diminution des zones riches en glycogène, et pourrait suggérer un phénomène de compensation ou une fonction altérée de ces cellules qui ne stockeraient plus de glycogène et seraient donc indétectables en histologie.

Enfin, une analyse transcriptomique comparant des placentas sauvages et des placentas transgénique révèle une activation de voies impliquées dans l'immunité et l'autoimmunité (en particulier, une altération de gènes des cellules NK et du système du complément).

Ces derniers éléments pourraient faire un lien entre les altérations placentaires et le syndrome maternel, et ainsi, permettre de mieux comprendre comment l'expression de *STOX1* au niveau de l'unité fœto-placentaire peut induire un syndrome prééclampsique.

Overexpression of *STOX1* in the feto-placental unit leads to an altered placental function, accompanied with fetal overgrowth

Doridot et al.

Abstract

Introduction

Preeclampsia (PE) is a pervasive complication of human pregnancy characterized by a gestational hypertension associated with proteinuria occurring from mid-gestation (Sibai et al., 2005). Worldwide, this syndrome affects ~5% of pregnant women, and is a leading cause of maternal mortality, especially in low and middle income countries (Firoz et al., 2011; Goldenberg et al., 2011); it is also a direct cause of iatrogenic prematurity hence a strong neonatal morbidity and mortality (Goldenberg et al., 2008), since the only definitive therapeutic act is the extraction of the feto-placental unit.

From positional cloning approaches and epidemiological studies, it is now well-established that there is a genetic component in preeclampsia, with an heritability close to 50% (Cnattingius et al., 2004). In addition ~10 genomic regions linked to the syndrome have been found in humans (Zintzaras et al., 2006). Several genes involved in the pathophysiology have in fact been identified by these genetic approaches, such as *STOX1* in 2005 (van Dijk et al., 2005) and *TNFRSF13B* in 2010 (Fenstad et al., 2010a).

Following the discovery of *STOX1* (a transcription factor belonging to the enlarged Forkhead Box gene family) in 2005, identified by positional cloning as associated with preeclampsia (van Dijk et al., 2005), recent studies showed that the Y153H variant modifies its effect, especially affecting the alpha-catenin pathway, with strong biological consequences on trophoblast proliferation and migration (van Dijk et al., 2010a). Furthermore, *STOX1* is maternally expressed in a specific cell type of the placenta, column extravillous trophoblasts (van Dijk et al., 2010b), consistent with theoretical considerations suggesting that preeclampsia genes could be imprinted (Graves, 1998). Overexpression of the transcription factor *STOX1* in human choriocarcinoma cells induces transcription alterations that mimic those of preeclamptic placentas, as shown by two independent teams (Fenstad et al., 2010b; Rigourd et al., 2008).

We recently developed a model of transgenic mice overexpressing STOX1. We obtained two independent murine lines, called TgSTOX13 and TgSTOX42, with a difference in the level of expression of the transgene (the transgene is expressed in placentas around 13 times more in TgSTOX42, compared to TgSTOX13, in which the expression is comparable to those of the endogenous *Stox1*). Both lines gave the same phenotype: when WT female mice were crossed with transgenic males, they developed a severe gestational hypertension, proteinuria and displayed kidney histological anomalies reminiscent of those from human patient (Doridot et al., 2013). Low dose aspirin treatment displayed a remarkable efficiency in this model.

In the present work, we looked at the impact of this preeclamptic syndrome on the fetuses. We showed an overgrowth of the fetuses in all the cases where the father brought the transgene. We analysed the expression of key placental markers for glycogen cells, trophoblast cells from the labyrinth and spongiotrophoblaste cells, and it revealed strong alteration, in particular for the expression of glycogens cells markers. We also performed a transcriptomic analysis of the transgenic placentas, to obtain some ideas about the cause to this overgrowth and/or the maternal syndrome development.

Methods

Animals and Transgenesis

The complete ORF of the human STOX1 (A isoform) cDNA was cloned in the pCMX vector as described previously (Rigourd et al., 2008). The vector-free insert used for micro-injection was gel-purified after enzymatic digestion by *SpeI* and *SfiI*, according to classical protocols. The preparation was diluted in Tris-HCl pH 7.9-EDTA (10-0.1) medium at a final concentration of 2 ng/μl and microinjected into the pronuclei of FVB/N mouse eggs. Transgenic mice were identified by PCR of their genomic DNA extracted from tail biopsies, as previously described (Vilotte et al., 1989). Transgene-specific amplification was performed using the GoTaq Flexi DNA polymerase kit (Promega), an hybridization temperature of 62°C, an elongation time of 30s and 40 amplification cycles. The number of copies of the transgene was assessed by qPCR from the mouse DNA relative to a single copy gene.

Animals (FVB/N) were bred in the animal facility of INRA (Jouy en Josas, France) in a controlled environment (light/dark cycle, temperature, free access to food and water). After mating with males of specific genotypes, females were inspected daily for vaginal plugs; detection of a vaginal plug in the morning was designated as day 0.5 of pregnancy (E0.5 or 0.5 dpc). Litter sizes were systematically recorded immediately after birth. Some mice (42 with placentas of different genotypes, either all WT, or some transgenic, or all transgenic) were sacrificed at E16.5 and different tissues (placenta, kidneys, liver) were collected for RNA extraction and/or histological analysis according to classical protocols. The numbers of fetuses, as well as placental and fetal weights, were also recorded in these cases. For weight analysis, the abnormal small litter (≤ 2) were not taken into account (it concerned 7 litters).

RNA extraction and Quantitative RT-PCR conditions

Total RNA from collected tissues was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions, treated with RNase-free DNase, and quantified by spectrophotometry. Reverse transcription (RT) was carried out according to a standardized protocol. Briefly, 4 µg of total DNase-treated RNA was reverse transcribed in a volume of 25 µL at 39°C using the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers during 1 hour. Quantitative RT-PCR was carried out using the LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science) in accordance with the manufacturer's instructions. The reaction was performed in a Light-Cycler 480 Thermocycler (Roche Applied Science). Primers were designed for the coding sequences of the different genes using the PRIMER3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>) and aligned with basic local alignment search tool software (BLAST) to avoid nonspecific annealing. Samples were submitted to cycling according to the following PCR program: 95°C for 5 min followed by 45 cycles of 3 temperature steps (94°C for 10 s, 58°C for 15 s, and 72°C for 15 s). Finally, samples were submitted to a progressive temperature elevation (from 65 to 99°C at 0.1°C/s), resulting in a melting curve, enabling to check the PCR products homogeneity. In addition, amplification products were systematically controlled by agarose gel electrophoresis. The threshold cycle number (Ct) values were collected with the LightCycler480 software (Roche Applied Science) in the exponential phase of the PCR reaction. These Cts were normalized by the Ct values obtained for the murine succinate dehydrogenase subunit A (*Sdha*) and the cyclophilin A (*CycloA*) used as normalising genes.

For expression evaluation of genes belonging to different placental compartments, an index was created for every compartment by computing a geometric mean of Ct values of *Prl8a8*, *Tpbpa* and *Prl3b1* for the junctional zone, *Gjb3* and *Pcdh12* for Glycogen cells and *Gcm1*, *SynA* and *Flk1* for the trophoblast cells of the labyrinth (Tunster et al., 2012), after normalization by a geometric mean of Ct values for *Sdha* and *CycloA*. All primers are presented as Supplemental Table 1.

Name	Forward	Reverse
<i>sdha</i> (murine)	CTTGAATGAGGCTGACTGTG	ATCACATAAGCTGGTCCTGT
<i>CycloA</i> (murine)	GTCAACCCACCGTGTCTT	CTGCTGCTTTTGGAACTTTGT
STOX1 (human)	TCCAGTGCAAATGAATCCAA	TCTTTAATCAGCGTTCCCAGA
<i>Stox1</i> (murine)	AACACCTTGAAGGGACAGAGAA	ATCCAAAATGGCGGAATTAGTA
<i>Prl8a8</i> (murine)	CCTGCATGTATGGCAGAAAA	CCCTTATTTGGGGGATTTGT
<i>Prl3b1</i> (murine)	AGTGTCAAACCTACTTGTCTGGG	CACACGTTGGTATAGGCTTTCA
<i>Tpbpa</i> (murine)	TGAAGAGCTGAACCACTGGA	CTTGCAAGTTCAGCATCCAAC
<i>Gjb3</i> (murine)	GGGGCTCTCCATCAGACATA	ACCTGCTAGCCACACTTGCT
<i>Pcdh12</i> (murine)	AAGCAGAACCTGACCTGGAA	GTGAGGGGCAATGACAATCT
<i>Flk1</i> (murine)	GGCGGTGGTGACAGTATCTT	GTCAGTACAGAGGCGATGA
<i>Gcm1</i> (murine)	AGCCTGTGTTGAGCAGACCT	TGTCGTCCGAGCTGTAGATG
<i>SynA</i> (murine)	CTCCAGGAGGCTAACTCTTCC	TCCGGGCTGAGTACATGATTC

Supplemental table 1 : Primers for qPCR analysis

Aspirin treatment

Aspirin treatment was administered as described by Bulckaen and co-workers (Bulckaen et al., 2008). Briefly, aspirin was added in the drinking water (30 µg/ml, Lysine acetylsalicylate Aspegic™), from E0,5 to E16,5 (the treatment was stopped before delivery in order to avoid abnormal bleeding during labor). The drinking water was replaced every day, and showed that the transgenic mice drank

the same quantity of water than the controls. This low quantity was administered to obtain an amount similar to that prescribed in clinical practice, i.e., around 200 mg/day, see for instance (Bakhti and Vaiman, 2011).

Microarray analysis of transgenic and WT placentas

RNA quality was verified by Agilent bioanalyser 2100 and checked to have a RNA Integrity Number (RIN) systematically higher than 8. Microarray analysis was performed starting from total RNA of four pools (two pools of three transgenic placentas from three independent crosses of homozygous TgSTOX13 parents and two pools of three placentas from three WT crosses). The cDNA synthesis, labelling hybridization on Nimblegen mouse arrays (alignment MM8, 25208 transcripts interrogated with three 60-mer probes per transcript) were carried out at the Genomics and Transcriptomic platform of the Cochin Institute (data available as GSE32660 record, in GeoDatasets). Deregulated genes were identified either by the occurrence of a statistically significant t-test, or by a systematic one-way difference between pools of transgenic versus non-transgenic placentas, or by a threshold of variation above 1.5-fold. Clustering was carried out using DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) with the Gene Functional Classification tool and the Pathway tool. Pathways and categories were considered significant with a Benjamini < 0.05 for the pathways analysis and according to thresholds defined as in (Buffat et al., 2007) for the Gene Functional Classification.

Statistical analysis

During this study, non-parametric approaches were used using Mann-Whitney tests as well as ANOVA followed by post-hoc Student-Newman-Keul t-tests for relative expression analysis of placental compartments, or post hoc Dunnett test for foetus weights. Chi2 contingency tests were performed for analyzing the groups of genes identified by the transcriptome analysis. The StatistXL add-in of Excel™ was systematically used. p values below 0.05 were considered significant.

Results

Foetus and placental weights are increased in crosses involving transgenic males

We wished to investigate the fetoplacental effects of the transgene, in various crosses where the origin of the transgene can be maternal, paternal or both in order to take into account possible effects of genomic imprinting.

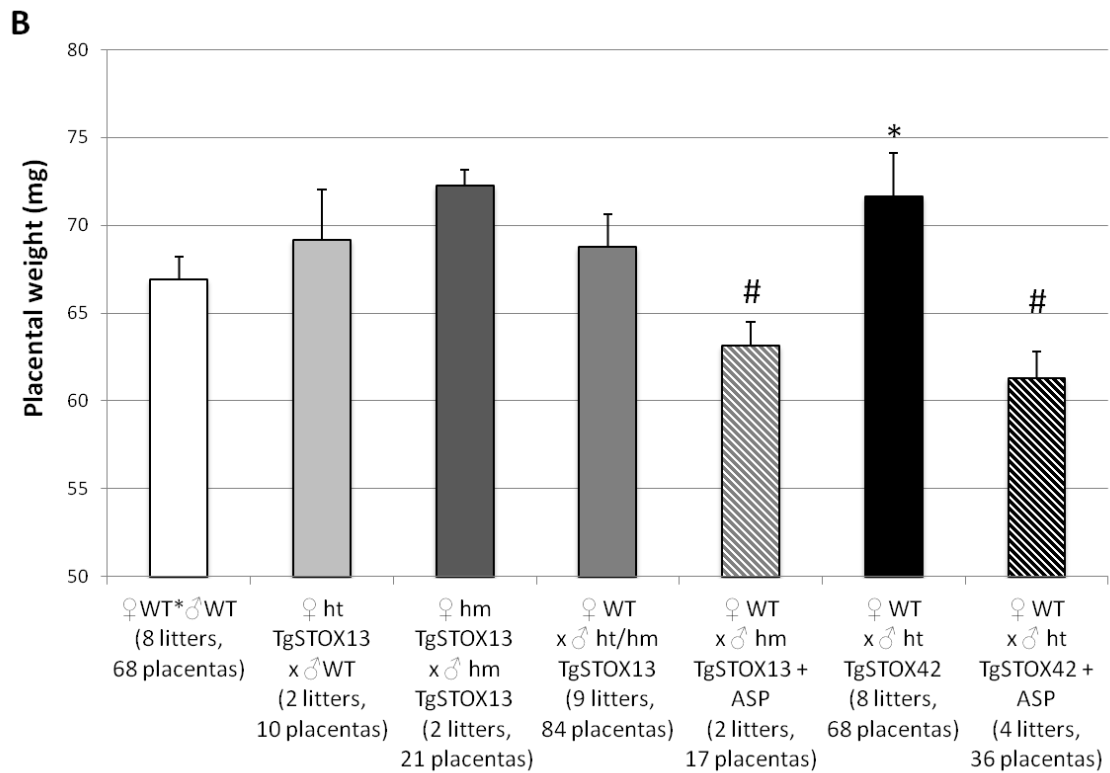
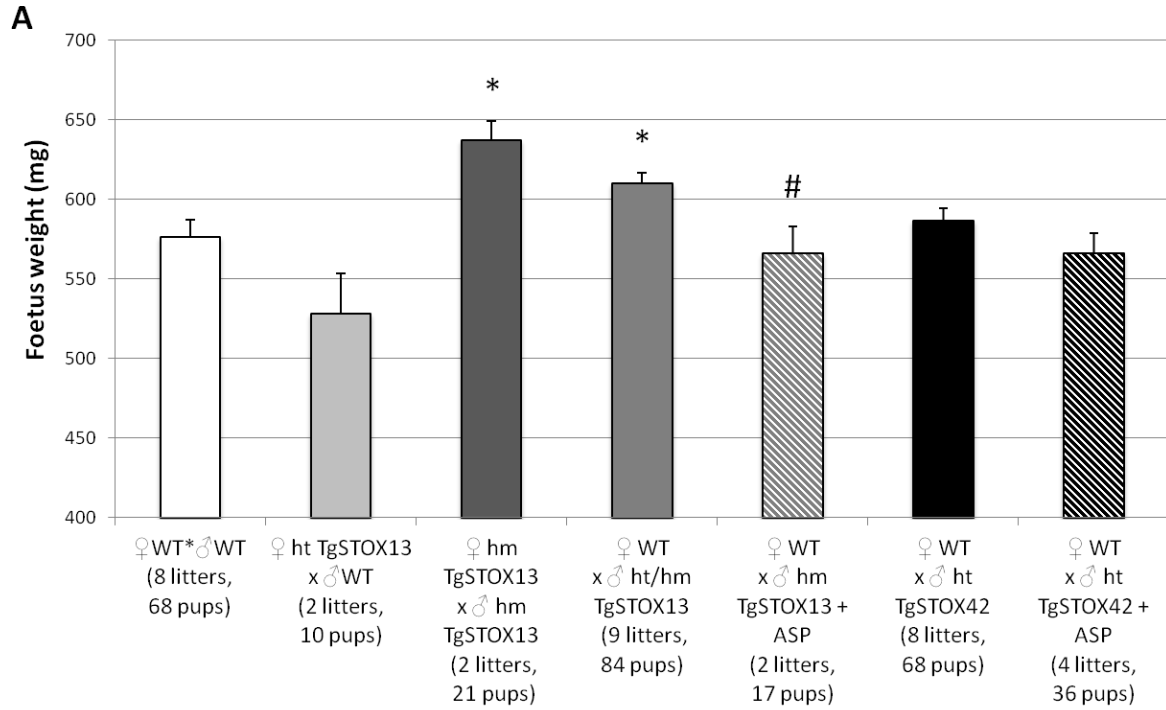
Forty-two pregnant females were sacrificed at 16.5 days of gestation and each fetus and each placenta were weighed. We didn't take into account the abnormal small litters (≤ 2), as it could impact the fetus and placental weight, independently of the genotype. In the thirty-five remaining litters (with ≥ 5 fetuses), we did not observe a decrease of individual fetus weight when litter size increases (as tested by a correlation between litter size and mean fetus weight, which didn't give a significant R). In TgSTOX13 crosses, we observed a ~7% increase of the average weight of the offspring (Figure 1A), compared to wild type offspring, but exclusively when the transgene was brought by the spermatozoa (paternal genome). For

crosses with TgSTOX42 males, we did not observe a significant weight increase of the fetuses. Aspirin treatment sets back the fetus weight to normal in crosses involving TgSTOX13 males (Figure 1A).

Concerning the placental weight, we showed a significant increase (~7%) in crosses with TgSTOX42 males (Figure 1B), but it didn't reach significance in crosses involving TgSTOX13 mice (there is also a ~8% increase in ♀^{hm} TgSTOX13 x ♂^{hm} TgSTOX13 crosses, and a direct student-test in comparison to WT gives $p=3.74 \times 10^{-2}$, but after correction for multiple testing with ANOVA, $p>0,05$). Aspirin treatment decreases placental weight in both crosses involving transgenic males (Figure 1B). In ♀^{WT} x ♂^{ht} TgSTOX42 crosses, the placental weight is even significantly reduced (by 8%) compared to WT placentas ($p=3.12 \times 10^{-2}$ with post-hoc Dunnett test).

We also looked at the ratio of fetus and placental weights, as it is a reflect of placental efficiency (Coan et al., 2010). We could observe a decrease (of 7-8%) of this ratio in crosses involving transgenic males (Figure 1C), which is significant in ♀^{WT} x ♂^{ht} TgSTOX42 crosses (there is also a decrease in ♀^{hm} TgSTOX13 x ♂^{hm} TgSTOX13 crosses, and a direct student-test in comparison to WT gives $p=3.05 \times 10^{-2}$, but after correction for multiple testing with ANOVA, $p>0,05$). Aspirin treatment significantly improves this ratio in both crosses involving transgenic males (Figure 1C).

To note, when a litter contained both transgenic and non-transgenic animals (WT females x Heterozygous males, each fetus genotyped individually), there was no significant difference in the weights of the fetuses or the placenta inside the litter. This was substantiated by a transcriptomic analysis of transgenic versus non-transgenic placentas of the same litter, where we did not find strong expression variations (data not shown), indicating that environmental conditions tend to homogenize the gene expression profile between transgenic and non-transgenic placentas in the uterine horns.



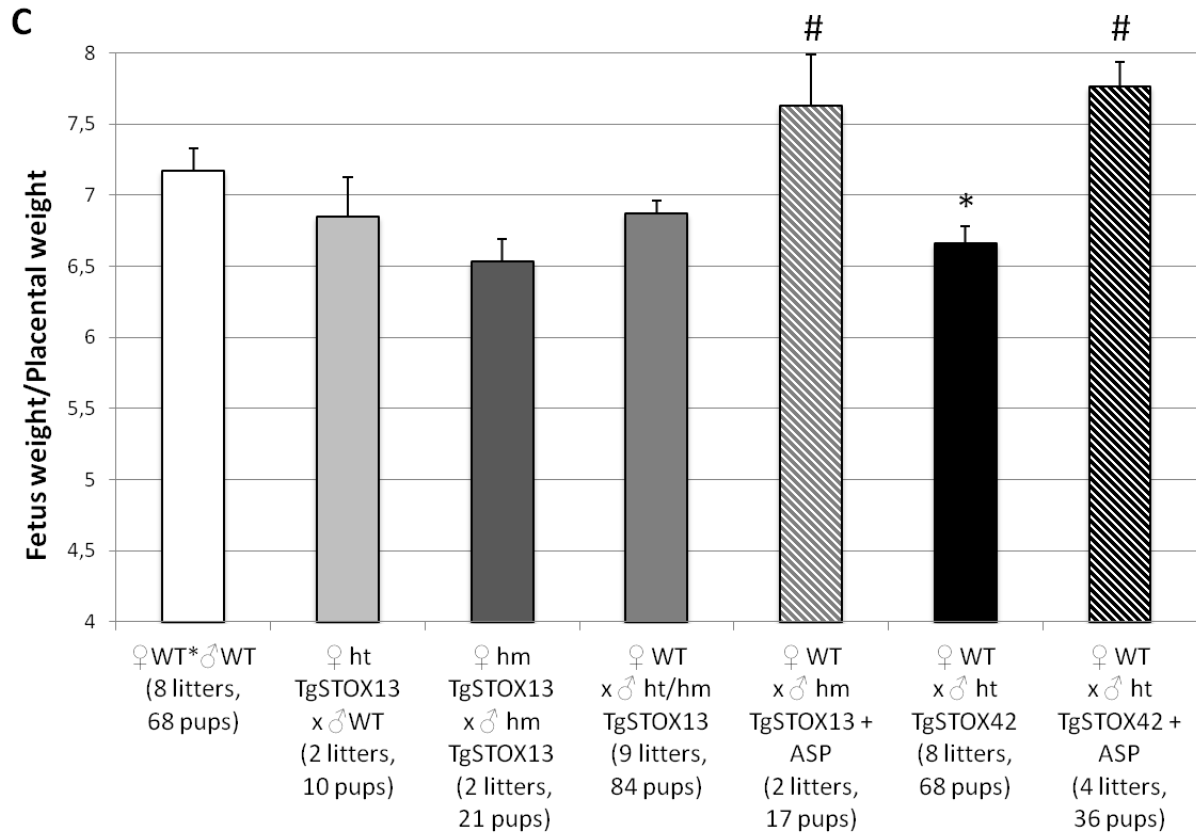


Figure 1: Fetus and placental weights are increased in crosses involving transgenic males

- A) Fetus weight in different crosses. The offspring weight was increased only when TgSTOX13 father transmitted the transgene (as tested by ANOVA, $p=8.31 \times 10^{-5}$, and relative to WT fetuses following post-hoc Dunnett tests: $p = 1.22 \times 10^{-2}$ and 1.82×10^{-2} for ♀hm TgSTOX13 x ♂hm TgSTOX13 and ♀WT x ♂ht/hm TgSTOX13 crosses, respectively). In the cases of aspirin treatment, the comparison was done between the crosses with or without aspirin (# symbol). For those involving TgSTOX13 males, the difference was significant ($p= 7.98 \times 10^{-3}$, by Student t-test).
- B) Placental weight in different crosses (ANOVA, $p=2.54 \times 10^{-2}$). The placental weight was increased in ♀WT x ♂ ht TgSTOX42 ($p=4.32 \times 10^{-2}$ relative to WT fetuses following post-hoc Dunnett tests). In the cases of aspirin treatment, the comparison was done between the crosses with or without aspirin (# symbol, $p=2.03 \times 10^{-2}$ and $p=1.56 \times 10^{-6}$ by Student-t tests for crosses involving TgSTOX13 and TgSTOX42, respectively).
- C) Fetus weight/placental weight ratio in different crosses (ANOVA, $p=2.77 \times 10^{-2}$). The ratio was reduced in ♀WT x ♂ ht TgSTOX42 ($p=4.51 \times 10^{-2}$ relative to WT ratio following post-hoc Dunnett tests). In the cases of aspirin treatment, the comparison was done between the crosses with or without aspirin (# symbol, $p=4.95 \times 10^{-3}$ and $p=1.08 \times 10^{-6}$ by Student-t tests for crosses involving TgSTOX13 and TgSTOX42, respectively).
- for $p < 0.05$.

STOX1 transgenic placentas present altered expression of genes important for glycogen cells

No difference was observed in gross morphology at 16.5 dpc, such as in the ratio between the labyrinth and the junctional zone. We did not detect any anatomical alterations in hemizygous TgSTOX13 placentas, whereas in hemizygous TgSTOX42 placentas, there was a significant diminution of vacuolated foci in the labyrinth, as well as the purple area after Periodic Acid-Schiff staining, these two characteristics being specific to glycogen cells foci (Doridot et al., 2013).

To evaluate the relative importance of these cells inside normal and transgenic placentas according to the origin of the transgene, we studied by quantitative RT-PCR a series of genes that marks different subpopulations of cells inside the placenta (Figure 2): *Prl8a8*, *Tpbpa* and *Prl3b1* for the junctional zone, *Gjb3* and *Pcdh12* as markers of Glycogen cells and *Gcm1*, *SynA* and *Flk1* as markers of the labyrinth cells (Tunster et al., 2012). We used the gene expression levels to generate an index based on the geometric mean of the Ct values for each cellular subtype (see Methods). The expression of junctional markers was much higher (~60-fold) than that of the two other placental compartments analyzed in the WT (Figure 2 A-C). In contrast with the histological observations of transgenic placentas, we saw a systematic expression increase of markers of glycogen cells relative to those of the labyrinth and junctional zone in tissues from all the crosses involving transgenic parents (Figure 2D-E). The Glycogen cells/Labyrinth ratio was moderate when the transgene originates from TgSTOX13 females (x 2.23 fold), or TgSTOX42 males (x 2.08 fold) whilst it was very strong when the transgene originates from TgSTOX13 males (x 6.49 fold in the crosses with heterozygous TgSTOX13 males, x 4.79 when the cross involved homozygous males and females).

Low-doses of aspirin in the drinking water tend to set the ratio of expression calculated between Glycogen cells and Labyrinth closer to normal values, but without correcting it completely. These ratios pass from 6.49 to 3.07 fold in the female WT crossed with TgSTOX13 males and from 2.08 to 1.84 when the WT females were crossed with TgSTOX42 males, without and with aspirin, respectively.

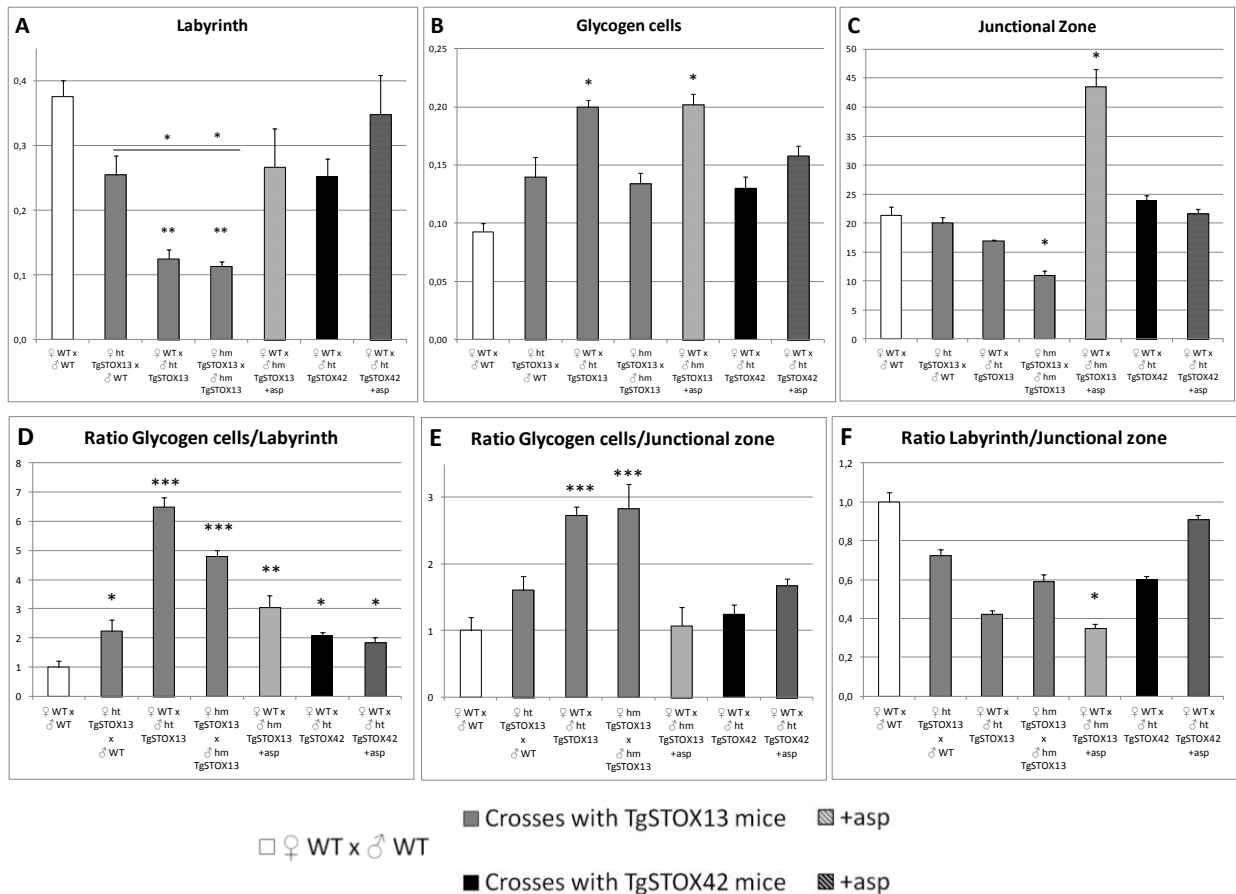


Figure 2: An excess of glycogen cells markers expression compared to the other placental compartments is revealed by quantitative assessment of markers from the three major structures of the transgenic placentas at 16.5 dpc.

Indexes of gene expression (see Methods) were computed by the geometric mean of Cts after qRT-PCR for genes expressed in the labyrinth (A), glycogen cells (B) and in the junctional zone (C), normalized by two reporter genes. Several placentas from different crosses were used: 6 placentas from 3 different crosses for WT x WT, WT x ht TgSTOX13 and hm TgSTOX13 x hm TgSTOX13; 7 placentas from 2 different crosses for ht TgSTOX13 x WT, 6 placentas from 2 different crosses for WT x hm TgSTOX13 +ASP and WT x ht TgSTOX42; 8 placentas from 3 different crosses for ♀ WT x ♂ ht TgSTOX42 +ASP. The crosses involved various combinations making it possible to compare the effects of the transgene origin, as well as the effects of the aspirin treatment. The upper panel shows that in the presence of the transgene, there is overall a decrease in the labyrinth (A, either expression or size or both) and a systematic increase in the glycogen cell compartment (B). The effects on the junctional zone are more complex (C). The lower panel tests the ratios of the different compartments (D-F). It shows a systematic increase of Glycogen cells (number and/or expression) relative to the Labyrinth (D) and to the junctional zone (E). This is particularly apparent when the transgene originates from the male in the TgSTOX13 strain. * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

The placental transcriptome of STOX1 transgenic mice reveals activation of immune and autoimmune cascades.

In an attempt to understand the key metabolic pathways that differ between WT and TgSTOX13 placentas, we carried out a transcriptomic analysis starting with biological replicates from 3 TgSTOX13 (homozygous x homozygous) and 3 control crosses. At the threshold of 1.5, 1572 transcripts were more elevated in transgenic placentas (6.1% of the genes present on the microarray), and 1985 were reduced (7.7%, Figure 3). We proceeded to a functional clustering using the DAVID Web tool from the NIH (Da Wei Huang and Lempicki, 2008). This functional clustering in KEGG pathways yielded six statistically significant groups after correction for multiple testing: Systemic lupus erythematosus ($p = 3.2 \cdot 10^{-4}$), Graft-versus-host disease ($p = 2.9 \cdot 10^{-3}$), Type I diabetes mellitus ($p = 2.9 \cdot 10^{-3}$), Viral myocarditis ($p = 3.1 \cdot 10^{-3}$), Allograft rejection ($p = 1.2 \cdot 10^{-2}$), and Cell adhesion molecules ($p = 3.7 \cdot 10^{-2}$). Four out of six of these groups encompass genes involved in immunity or autoimmunity.

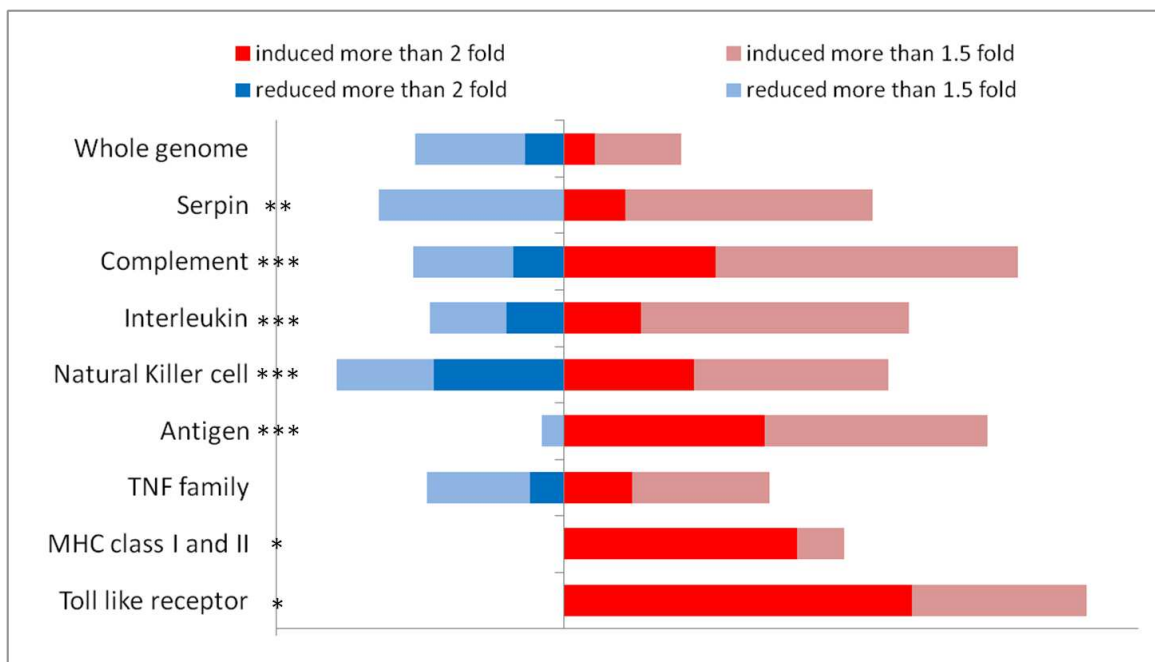


Figure 3: Enrichment of genes involved in some specific function

Graphical representation of percentage of genes modified in the whole genome (transgenic placentas compared to wild type placenta), or genes found by key words.

Enrichment significance was tested by χ^2 compared to whole genome.

From this observation we examined subsets of genes involved in specific immune functions in our transcriptomic dataset: Natural Killer cells, Surface antigens, Complement function, Interleukin, MHC class I and II, Toll like receptors and TNF (See Table 2 and Supplemental Figure 1). Modified genes defined by these keywords were statistically overrepresented except for the TNF family, compared to the expected values calculated from the global transcriptome (i.e. 6.1% and 7.7% of up and down-regulated genes respectively, Table 1). As an example, for complement function, among 38

transcripts, 9 were increased more than 1.5 fold in transgenic placentas, i.e. 23.6%, while 3 were reduced, i.e. 7.9% ($p = 3.8 \cdot 10^{-5}$). Among these modified genes C1qa, C1qb and C1qc were increased 1.8, 2.9 and 2.5 fold respectively. Cfi, Cfp and Cfh were induced 3.6, 1.8 and 1.4 fold respectively. C5ar1 and C3ar1 mRNAs were increased ~2 fold in transgenic placentas.

Following previous work suggesting a great importance of Serine Protease Inhibitors in placental diseases (Chelbi et al., 2007, 2012), we also observed that SERPIN genes were overrepresented amongst the modified genes ($p=3.4 \cdot 10^{-3}$). Among them, angiotensinogen, the initial precursor of angiotensin (*SerpinA8*) mRNA was twice as abundant in transgenic placentas as in normal placentas.

Table 1: Transcriptomic analysis of transgenic placentas (♀ hm TgSTOX13 x ♂ hm TgSTOX13) compared to wild type placentas : selection of modified genes in key functions for placentation and immunity

p value : enrichment significance (tested by χ^2 compared to whole genome)
 Bold characters correspond to genes modified more than two-fold

Serpin ($p=3.42 \times 10^{-03}$)				Complement function ($p=3.79 \times 10^{-05}$)			
Serpina3a	0.54	Serpinb1a	2.35	C7	0.45	Cfi	3.59
Serpina3n	0.56	Agt	2.04	C4bp	0.51	C1qb	2.86
Serpina3c	0.58	Serpina10	1.87	Hc	0.59	C1qc	2.48
Serpina3f	0.58	Serpina1c	1.85			C5ar1	1.98
Serpinb5	0.58	Serpina1a	1.85			C3ar1	1.90
Serpina3m	0.64	Serpind1	1.73			C1rl	1.82
		Serpinb10	1.65			Cfp	1.80
		Serpinb6c	1.62			C1qa	1.77
		Serpina1e	1.54			C6	1.51
		Serpini1	1.52	Interleukin ($p=5.55 \times 10^{-06}$)			
Natural Killer Cell ($p=9.14 \times 10^{-04}$)				Il13ra2	0.33	Il1b	3.30
Klri2	0.38	Klra2	4.57	Il1rapl2	0.41	Il1f9	3.28
Klrc1	0.41	Fcgr1	2.55	Il15ra	0.46	Il23r	3.06
Klra18	0.44	Fcgr2b	2.31	Il15ra	0.52	Il10ra	2.02
Klra7	0.46	Fcgr3	2.04	Il17f	0.55	Il20ra	1.94
Klra19	0.54	Klrd1	1.88	Il22	0.64	Il17e	1.83
Klrc2	0.57	Cd244	1.79	Il17a	0.65	Il1f6	1.77
Klrb1c	0.58	Fcer1g	1.66			Il18rap	1.71
		Nkg7	1.58			Il1rl1	1.65
		Skiv2l	1.56			Il5ra	1.63
		Fcgrt	1.55			Sigirr	1.62
Antigen ($p=1.14 \times 10^{-11}$)						Il12rb2	1.61
Cd164l2	0.47	Cd300e	3.78			Il17rd	1.61
Cd300lg	0.62	Cd177	3.61			Il23a	1.60
		Cd209a	2.47			Il1r2	1.60
		Cd300lf	2.30			Il2rb	1.58
		Cd300lb	2.26			Il1rl2	1.57
		Cd74	2.24			Il1a	1.55
		Cd52	2.24	MHC class I and II ($p=1.84 \times 10^{-2}$)			
		Cd180	2.17			H2-DMb2	3.22
		Cd72	2.12			H2-Q8	3.15
		Cd200r1	1.99			H2-M9	2.74
		Cd6	1.98			H2-M2	2.13
		Cd86	1.97			H2-Aa	2.03
		Cd207	1.93			H2-Q5	1.88
		Cd276	1.92	Toll Like receptor ($p=1.07 \times 10^{-2}$)			
		Cd28	1.88			Tlr8	4.23541
		Cd244	1.79			Tlr3	2.48639
		Cd96	1.69			Tlr7	1.61245
		Cd200r2	1.67	TNF family ($p=3.61 \times 10^{-1}$)			
		Cd83	1.65	Tnfrsf25	0.40	Tnf	2.94
		Cd84	1.59	C1qtnf4	0.52	Tnfsf8	2.80
		Cd209d	1.52	C1qtnf5	0.63	C1qtnf6	1.77
		Cd48	1.51	Tnfsf13b	0.66	Arts1	1.72
						Tnfsf4	1.69
						Tnfrsf7	1.54
underexpressed gene		overexpressed gene		underexpressed gene		overexpressed gene	

Discussion

Herein, we observed an impact of STOX1 overexpression on fetal growth, associated with mild anomalies of placental structure, with an altered expression of markers corresponding to glycogen cells. In the placenta we observed an altered gene expression profile, with a strong activation of immune and autoimmune cascades and pathways.

The question of the comparative value of rodent models of preeclampsia is permanent because of the known differences of rodent versus human placentation (such as shallow trophoblastic invasion, short gestation (for recent reviews, see (McCarthy et al., 2011; Sunderland et al., 2011)), but their input has been considered very important for studying preeclampsia pathophysiological mechanisms.

On the fetal side, we noticed an overgrowth of the fetuses when the transgene was transmitted through the male genome. The discrepancy between the weights of the fetuses according to the sense of the crosses, could be explained by the existence of an earlier activation of the paternal genome after fertilization (Mungall et al., 2003). When an imprinted gene is abnormally transcribed as in rare human imprinting syndromes (Beckwith-Wiedeman,(Choufani et al., 2010)), or in the Large Offspring Syndrome (LOS) in cloned cattle (Sinclair et al., 2000; Young et al., 1998), it has developmental effects (overgrowth) in the long run. STOX1 has been found owing to its imprinted status (van Dijk et al., 2005, 2010b). Therefore, its uchronic (too early) and/or excessive expression when expressed by the paternal genome in the transgenic crosses leads to a fetal overgrowth. Imprinted genes and among them the paradigmatic *Igf2* are known to have a crucial role in placental and foetal growth (Constância et al., 2002). In rodent placenta, glycogen cells are thought to contribute to enable a strong weight increase at the end of gestation. According to the literature, the number of glycogen cells increases 80-fold between 12.5 dpc and 16.5 dpc in normal placentas, and decreases at the end of gestation (18.5 dpc) (Coan et al., 2006). To note, the KO of *Igf2* leads to the disruption of glycogen cells development (Lopez et al., 1996), and is associated to IUGR. Similarly, due to the inhibitory effect of H19 on *Igf2* expression, the placenta of H19(-/-) mice have more and larger glycogen cells than WT mice (Esquiliano et al., 2009). We found that STOX1 overexpression leads to an enhanced expression level of their genes, but histologically, a decrease is observed. Taken together, these results suggest an altered function of these cells, which are maybe not less numerous, but not detectable with the classical histological analysis because of lacks of vacuolated aspect and of glycogen storage. This probably contribute to the observed increased fetal weight. Interestingly, the effect of the transgene on the fetoplacental phenotype was not dose-dependent and aspirin treatment only marginally sets back this phenotype towards a normal state. This questions the direct link between maternal phenotype and placental defects.

We also observed an increase of placental weight, which could be a compensation effect for the displayed placental insufficiency, as it is commonly observed (Coan et al., 2010). Aspirin

treatment greatly improves the placental efficiency, with a limitation of fetal growth, probably helping to attend an optimal balance between fetal genetic drive for growth and the maternal ability to provide nutrients through the placenta.

The transcriptome alterations of the STOX1 transgenic placentas suggest that the secretome of the embryo-foeto-placental unit is modified by STOX1. Our transcriptomic analysis provides an unexpected link between STOX1 overexpression and autoimmunity/immune pathways. This gives mechanistic clues on how the defects potentially induce a hypertensive state in the mother. In our transcriptome, systematic lupus erythematosus (SLE) achieved the most significant statistical score amongst the pathways encompassing enriched genes after analysis with DAVID or with Genomatix. A recent study made a clear link between preeclampsia and gene variants of the complement regulatory network (Salmon et al., 2011) in patients with SLE and anti-phospholipid syndrome, two pathologies inducing an increased risk of preeclampsia. Consistent with this study, we revealed a strong deregulation of genes involved in complement cascades (*Cfi* mRNA was increased by 3.6 fold in STOX1 transgenic placentas). The induction of C1q could be a first step towards a hyperactivation of the classical complement pathway, as soon as antibody-antigen complexes are present in the female genital tract, even in congenic mouse strains because of minor histocompatibility alleles carried by the Y chromosome of the paternal genome. In a very recent study, it was showed that C1q^{-/-} mice develop preeclampsia syndrome on a mild mode concerning the hypertension (Singh et al., 2011). Together this data suggest that any deregulation of complement components has deleterious effect on pregnancy. This has already been observed for C3 for which placental and embryo developmental defects are observable in knock-out mice as well as by hyperactivation of the C3 pathway (Chow et al., 2009; Girardi et al., 2006). In parallel, the induction of C5ar and C3ar in the placenta indicates that recruited inflammatory cells will be hyperresponsive to induction by complement-derived products, in particular C5a. This is materialized by the induction of pro-inflammatory cytokine genes (TNF, IL1a and Il1b, induced 3, 3.3 and 1.6 fold, respectively). Our results strengthen the idea of a pivotal role of the complement cascade in pregnancy defects, and in particular in preeclampsia. To the best of our knowledge, our data establish for the first time, a relation between STOX1 and immunomodulation, thus providing a rationale to the links of this gene with preeclampsia. We propose a hypothetical model (see Figure 4) in which early secretome modifications from the embryo-foeto-placental unit trigger the import of immunoreactive substances (such as complement components) to the maternal blood flow, target endothelial cells and the kidney, responsible for the maternal phenotype.

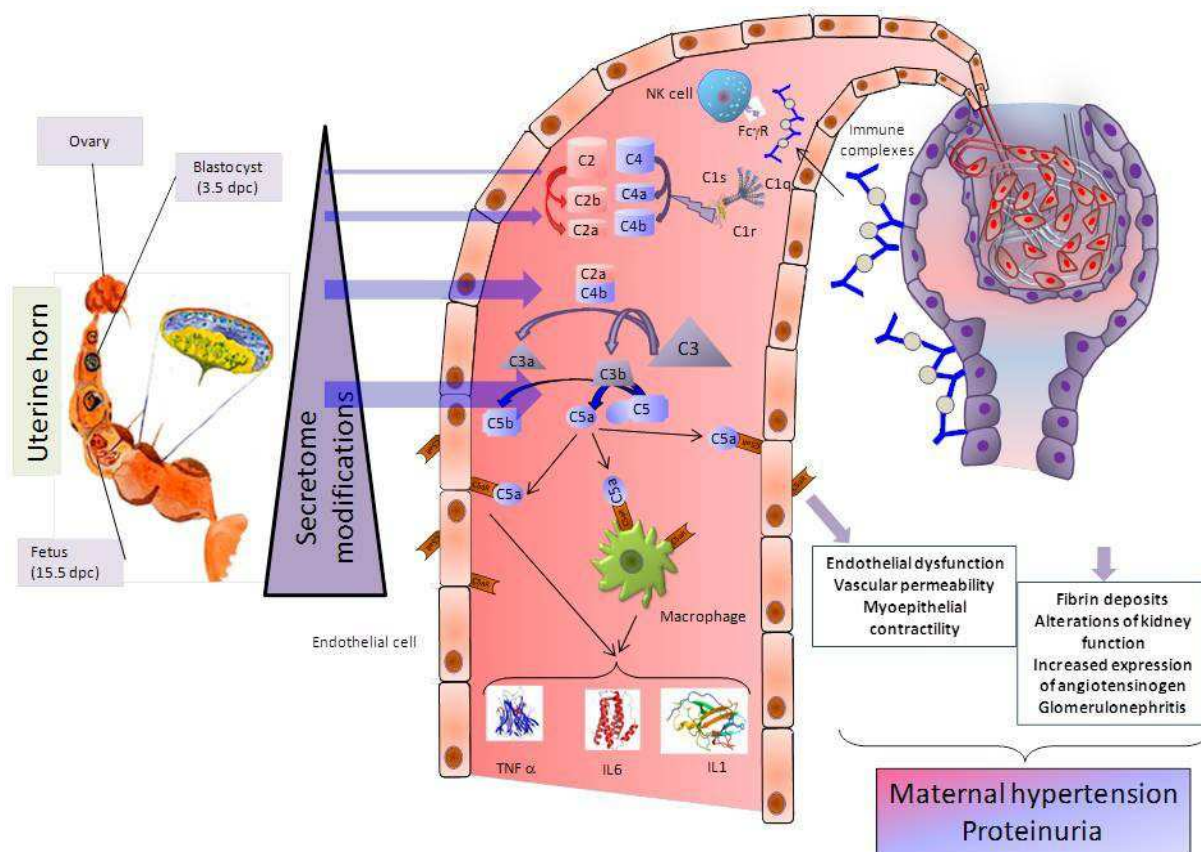


Figure 4: A hypothetical model for the origin of the maternal preeclampsia-like syndrome through soluble factors originating from the embryo-placento-foetal unit.

This schematic vision shows putative causes of the gestational hypertension and proteinuria in WT mice crossed with STOX1 transgenic males. The placental transcriptome suggests an activation of complement pathways, leading to the production of inflammatory cytokines. The origin is the embryo-foeto-placental unit, or maybe material of paternal origin present in the female genital tract after fertilization. This could trigger a non-adaptative immune response following the generation of immune complexes possibly encompassing minor antigens of male origin at very early times post-coïtum. The early release of these components in the blood flow could induce the observed defects in the kidney structure and alter renal function. Both the renal and endothelial alterations could be at the origin of the maternal syndrome.

References

- Bakhti, A., and Vaiman, D. (2011). Prevention of gravidic endothelial hypertension by aspirin treatment administered from the 8th week of gestation. *Hypertens. Res.* 34, 1116–1120.
- Buffat, C., Mondon, F., Rigourd, V., Boubred, F., Bessières, B., Fayol, L., Feuerstein, J.-M., Gamarre, M., Jammes, H., Rebourcet, R., et al. (2007). A hierarchical analysis of transcriptome alterations in intrauterine growth restriction (IUGR) reveals common pathophysiological pathways in mammals. *J. Pathol.* 213, 337–346.
- Bulckaen, H., Prévost, G., Boulanger, E., Robitaille, G., Roquet, V., Gaxatte, C., Garçon, G., Corman, B., Gosset, P., Shirali, P., et al. (2008). Low-dose aspirin prevents age-related endothelial dysfunction in a mouse model of physiological aging. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H1562–1570.
- Chelbi, S.T., Mondon, F., Jammes, H., Buffat, C., Mignot, T.-M., Tost, J., Busato, F., Gut, I.,

Rebourcet, R., Laissue, P., et al. (2007). Expressional and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia. *Hypertension* 49, 76–83.

Chelbi, S.T., Wilson, M.L., Veillard, A.-C., Ingles, S.A., Zhang, J., Mondon, F., Gascoin-Lachambre, G., Doridot, L., Mignot, T.-M., Rebourcet, R., et al. (2012). Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA3 expression and its association with placental diseases. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1968–1978.

Choufani, S., Shuman, C., and Weksberg, R. (2010). Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C, 343–354.

Chow, W.-N., Lee, Y.-L., Wong, P.-C., Chung, M.-K., Lee, K.-F., and Yeung, W.S.-B. (2009). Complement 3 deficiency impairs early pregnancy in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 76, 647–655.

Cnattingius, S., Reilly, M., Pawitan, Y., and Lichtenstein, P. (2004). Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *Am. J. Med. Genet. A* 130A, 365–371.

Coan, P.M., Conroy, N., Burton, G.J., and Ferguson-Smith, A.C. (2006). Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev. Dyn.* 235, 3280–3294.

Coan, P.M., Vaughan, O.R., Sekita, Y., Finn, S.L., Burton, G.J., Constancia, M., and Fowden, A.L. (2010). Adaptations in placental phenotype support fetal growth during undernutrition of pregnant mice. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 527–538.

Constância, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., Stewart, F., Kelsey, G., Fowden, A., Sibley, C., et al. (2002). Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 417, 945–948.

Van Dijk, M., Mulders, J., Poutsma, A., Könst, A.A.M., Lachmeijer, A.M.A., Dekker, G.A., Blankenstein, M.A., and Oudejans, C.B.M. (2005). Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat. Genet.* 37, 514–519.

Van Dijk, M., van Bezu, J., van Abel, D., Dunk, C., Blankenstein, M.A., Oudejans, C.B.M., and Lye, S.J. (2010a). The STOX1 genotype associated with pre-eclampsia leads to a reduction of trophoblast invasion by alpha-T-catenin upregulation. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2658–2667.

Van Dijk, M., Drewlo, S., and Oudejans, C.B.M. (2010b). Differential methylation of STOX1 in human placenta. *Epigenetics* 5, 736–742.

Doridot, L., Passet, B., Méhats, C., Rigourd, V., Barboux, S., Ducat, A., Mondon, F., Vilotte, M., Castille, J., Breuiller-Fouché, M., et al. (2013). Preeclampsia-Like Symptoms Induced in Mice by Fetoplacental Expression of STOX1 Are Reversed by Aspirin Treatment. *Hypertension* 61, 662–668.

Esquiliano, D.R., Guo, W., Liang, L., Dikkes, P., and Lopez, M.F. (2009). Placental glycogen stores are increased in mice with H19 null mutations but not in those with insulin or IGF type 1 receptor mutations. *Placenta* 30, 693–699.

Fenstad, M.H., Johnson, M.P., Roten, L.T., Aas, P.A., Forsmo, S., Klepper, K., East, C.E., Abraham, L.J., Blangero, J., Brennecke, S.P., et al. (2010a). Genetic and molecular functional characterization of variants within TNFSF13B, a positional candidate preeclampsia susceptibility gene on 13q. *PLoS ONE* 5.

Fenstad, M.H., Johnson, M.P., Løset, M., Mundal, S.B., Roten, L.T., Eide, I.P., Bjørge, L., Sande, R.K., Johansson, A.K., Dyer, T.D., et al. (2010b). STOX2 but not STOX1 is differentially expressed in decidua from pre-eclamptic women: data from the Second Nord-Trøndelag Health Study. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 960–968.

Firoz, T., Sanghvi, H., Merialdi, M., and von Dadelszen, P. (2011). Pre-eclampsia in low and middle income countries. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25, 537–548.

Girardi, G., Bulla, R., Salmon, J.E., and Tedesco, F. (2006). The complement system in the pathophysiology of pregnancy. *Mol. Immunol.* 43, 68–77.

Goldenberg, R.L., Culhane, J.F., Iams, J.D., and Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 371, 75–84.

Goldenberg, R.L., McClure, E.M., Macguire, E.R., Kamath, B.D., and Jobe, A.H. (2011). Lessons for low-income regions following the reduction in hypertension-related maternal mortality in

high-income countries. *Int J Gynaecol Obstet* 113, 91–95.

Graves, J.A. (1998). Genomic imprinting, development and disease--is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene? *Reprod. Fertil. Dev.* 10, 23–29.

Lopez, M.F., Dikkes, P., Zurakowski, D., and Villa-Komaroff, L. (1996). Insulin-like growth factor II affects the appearance and glycogen content of glycogen cells in the murine placenta. *Endocrinology* 137, 2100–2108.

McCarthy, F.P., Kingdom, J.C., Kenny, L.C., and Walsh, S.K. (2011). Animal models of preeclampsia; uses and limitations. *Placenta* 32, 413–419.

Mungall, A.J., Palmer, S.A., Sims, S.K., Edwards, C.A., Ashurst, J.L., Wilming, L., Jones, M.C., Horton, R., Hunt, S.E., Scott, C.E., et al. (2003). The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 425, 805–811.

Rigourd, V., Chauvet, C., Chelbi, S.T., Rebouret, R., Mondon, F., Letourneur, F., Mignot, T.M., Barbaux, S., and Vaiman, D. (2008). STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PloS One* 3, e3905.

Salmon, J.E., Heuser, C., Triebwasser, M., Liszewski, M.K., Kavanagh, D., Roumenina, L., Branch, D.W., Goodship, T., Fremieux-Bacchi, V., and Atkinson, J.P. (2011). Mutations in complement regulatory proteins predispose to preeclampsia: a genetic analysis of the PROMISSE cohort. *PLoS Med.* 8, e1001013.

Sibai, B., Dekker, G., and Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet* 365, 785–799.

Sinclair, K.D., Young, L.E., Wilmut, I., and McEvoy, T.G. (2000). In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Hum. Reprod.* 15 Suppl 5, 68–86.

Singh, J., Ahmed, A., and Girardi, G. (2011). Role of complement component C1q in the onset of preeclampsia in mice. *Hypertension* 58, 716–724.

Sunderland, N., Hennessy, A., and Makris, A. (2011). Animal models of pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 65, 533–541.

Tunster, S.J., Van de Pette, M., and John, R.M. (2012). Impact of genetic background on placental glycogen storage in mice. *Placenta* 33, 124–127.

Vilotte, J.L., Soulier, S., Stinnakre, M.G., Massoud, M., and Mercier, J.C. (1989). Efficient tissue-specific expression of bovine alpha-lactalbumin in transgenic mice. *Eur. J. Biochem.* 186, 43–48.

Da Wei Huang, B.T.S., and Lempicki, R.A. (2008). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4, 44–57.

Young, L.E., Sinclair, K.D., and Wilmut, I. (1998). Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.* 3, 155–163.

Zintzaras, E., Kitsios, G., Harrison, G.A., Laivuori, H., Kivinen, K., Kere, J., Messinis, I., Stefanidis, I., and Ioannidis, J.P.A. (2006). Heterogeneity-based genome search meta-analysis for preeclampsia. *Hum. Genet.* 120, 360–370.

ARTICLE 3

LA FONCTION CARDIOVASCULAIRE DANS UN MODELE MURIN DE PREECLAMPSIE

(en préparation)

Suite à un congrès à Hambourg où j'ai eu la chance de présenter le modèle (décrit dans l'article 1) et les données transcriptomiques décrites dans l'article 2, nous avons rencontré le Dr Ralf Dechend, un médecin et chercheur allemand travaillant sur la prééclampsie et le système cardio-vasculaire. Il était très intéressé par notre modèle et nous a invité à venir en parler devant son équipe à Berlin. Nous y sommes donc allés en juillet 2012. Lors de l'exposé de nos résultats, il nous a été recommandé de peser les cœurs de nos souris prééclamptiques car une telle hypertension devrait induire une hypertrophie cardiaque.

Nous avons donc suivi ce conseil. Cependant, à chaque dissection, nous réalisons une perfusion via une injection intracardiaque de PBS afin d'éliminer les globules rouges du rein, étape nécessaire pour les analyses histologiques ultérieures. Ainsi, les cœurs sont particulièrement abimés lors de cette étape. De plus, l'hypertrophie cardiaque est généralement estimée par une augmentation du rapport poids du cœur sur poids de l'animal. Or avec des souris gestantes, le poids varie énormément en fonction du nombre de fœtus, rendant cette normalisation impossible. Nous avons tenté d'utiliser la longueur du tibia comme facteur de normalisation, mais cela s'est révélé inutile, la mesure n'étant pas suffisamment précise, et cette longueur variant très peu entre les individus.

Pour toutes ces raisons, la mesure directe du poids cardiaque ne permet pas de bien estimer si oui ou non il y a une hypertrophie cardiaque chez ces souris prééclamptiques. J'ai donc utilisé une autre approche : la recherche de marqueurs ARNm d'hypertrophie cardiaque. En effet, après chaque dissection, une partie du cœur a servi à extraire les ARN, tandis qu'une autre partie a été fixée pour de futures analyses histologiques. Au vu des résultats intéressants obtenus, nous avons décidé d'aller plus loin dans la caractérisation de la fonction cardiaque et vasculaire des souris prééclamptiques.

Concernant la fonction cardiaque, des analyses histologiques vont être réalisées, afin de détecter une éventuelle fibrose (visible après une coloration au Trichrome Masson). Il pourrait également être envisagé de compléter ces données par une mesure échographique, ce qui permettrait de mieux estimer l'épaisseur du tissu cardiaque, ainsi que l'éventuelle diminution de la lumière ventriculaire. Cependant, ceci ne pourra être réalisé que sur des souris « propres » (vis à vis du statut sanitaire), or elles ne le sont pas pour l'instant, mais un transfert d'embryon est en cours. Cette mesure échographique ne sera donc faite que si le papier ne passe pas sans cette analyse fine.

Concernant la fonction vasculaire, cela rejoint le projet d'une autre doctorante du laboratoire : Rosamaria Calicchio. En effet, Rosa travaille sur l'impact du sérum de femmes prééclamptiques sur des cellules endothéliales. Pour cela, elles utilisent notamment des cellules Huvec. Avec l'obtention de ce modèle murin de prééclampsie, nous avons pensé qu'il serait adéquat de regarder l'état des cellules endothéliales maternelles à la fin de la gestation. En effet, ces cellules sont au contact du sérum altéré par la pathologie tout au long de la grossesse. Rosa a donc mis au point un protocole pour purifier les cellules endothéliales à partir du muscle de souris. Pour étudier l'état de ces cellules, nous réaliserons une étude transcriptomique sur ces cellules purifiées.

De plus, Rosa a également quelques données sur l'impact de sérum de souris contrôles et prééclamptiques sur des cellules endothéliales murines (SVEC). Ces données pourront également être intégrées dans cet article.

Cet article n'est donc pas encore tout à fait prêt pour la soumission. D'autres cœurs seront pesés, en espérant atteindre des différences significatives. Des analyses histologiques vont être réalisées. L'analyse transcriptomique va bientôt être initiée, car l'ensemble des ARNm de cellules endothéliales purifiées a été extrait.

Toutefois, je pense que cet article pourra être soumis dans 2-4 mois.

Résumé

Dans cet article, nous nous sommes concentré sur la fonction cardiovasculaire de souris sauvages croisées avec des mâles transgéniques exprimant la version humaine de *STOX1* (ci après nommées « souris prééclamptiques »).

Pour cela, nous avons sacrifié des souris prééclamptiques et contrôles en fin de gestation (E16.5-E17.5), pesé leurs cœurs et isolé leurs cellules endothéliales à partir de muscles. Les ARN des cœurs et ceux des cellules endothéliales purifiées ont été extraits afin de réaliser des analyses d'expression.

Nous avons ainsi pu montré que les souris prééclamptiques montraient des marques d'hypertrophie cardiaque, telles qu'une activation locale du système rénine/angiotensine (au niveau ARNm) et une augmentation de l'expression de l'Endothéline-1.

De plus, nous avons validé la méthode de purification des cellules endothéliales à partir de muscles en montrant que les cellules purifiées expriment bien plus les marqueurs de cellules endothéliales que les cellules totales ou les cellules non purifiées.

Une analyse transcriptomique sur les ARN des cellules endothéliales purifiées va être lancée d'ici peu de temps et viendra compléter cette étude avant la soumission.

CARDIOVASCULAR FUNCTION IN A MICE MODEL OF SEVERE PREECLAMPSIA

Doridot L[#], Calicchio R[#], ... , Vaiman D.

[#] These two authors contributed equally to this study.

Abstract

Introduction

Preeclampsia (PE) is a complication of human pregnancy characterized by a gestational hypertension associated with proteinuria occurring from mid-gestation (Sibai, Dekker, and Kupferminc 2005). Worldwide, this syndrome affects ~5% of pregnant women, and is a leading cause of maternal mortality, especially in low and middle income countries (Firoz et al. 2011; Goldenberg et al. 2011); it is also a direct cause of iatrogenic prematurity hence a strong neonatal morbidity and mortality (Goldenberg et al. 2008), since the only definitive therapeutic act is the extraction of the feto-placental unit.

Endothelial dysfunction is a well-described characteristic of preeclampsia (Laresgoiti-Servitje and Gomez-Lopez 2012), and it was recently showed that women affected by preeclampsia have also cardiac dysfunction, notably with cardiac hypertrophy (Karen Melchiorre et al. 2012; K Melchiorre et al. 2013). These dysfunctions during the pregnancy could be a stress with long term effect and could thus partly explained the epidemiological data that state an increased risk of cardiovascular diseases later in life in women, who had a pregnancy complicated by preeclampsia (Lykke et al. 2009).

By a positional cloning approach, STOX1 (a transcription factor belonging to the enlarged Forkhead Box gene family) has been identified (Y153H variant) and proposed to be involved in the pathophysiology of preeclampsia (Marie van Dijk et al. 2005). The Y153H variant modifies its effect, especially affecting the alpha-catenin pathway, with strong biological consequences on trophoblast proliferation and migration (Marie van Dijk et al. 2010). Furthermore, STOX1 is maternally expressed in a specific cell type of the placenta, column extravillous trophoblasts (M. van Dijk, Drewlo, and Oudejans 2010), consistent with

theoretical considerations suggesting that preeclampsia genes could be imprinted (Graves 1998). Overexpression of the transcription factor *STOX1* in human choriocarcinoma cells induces transcription alterations that mimic those of preeclamptic placentas, as shown by two independent teams (Fenstad et al. 2010, 1; Rigourd et al. 2008, 1).

We recently developed a model of transgenic mice overexpressing *STOX1*. We obtained two independent murine lines, called TgSTOX13 and TgSTOX42, with a difference in the level of expression of the transgene (the transgene is expressed in placentas around 13 times more in TgSTOX42, compared to TgSTOX13, in which the expression is comparable to those of the endogenous *Stox1*). Both lines gave the same phenotype: when WT female mice were crossed with transgenic males, they developed a severe gestational hypertension, proteinuria and displayed kidney histological anomalies reminiscent of those from human patient (Doridot et al. 2013).

In the present work, we looked at the cardiovascular function in this murine model of severe preeclampsia. We analysed the expression of markers for cardiac hypertrophy and found them increased in mice crossed with transgenic mice. We also purified endothelial cells and used them for a transcriptomic analysis.

Methods

Animals

The animals used are FVN/N WT mice and transgenic mice expressing the human *STOX1* under the control of the cytomegalovirus promoter, described in (Doridot et al. 2013).

Animals (FVB/N) were bred in the animal facility of INRA (Jouy en Josas, France) in a controlled environment (light/dark cycle, temperature, free access to food and water). After mating with males of specific genotypes, WT females were inspected daily for vaginal plugs; detection of a vaginal plug in the morning was designated as day 0.5 of pregnancy (E0.5 or 0.5 dpc). Litter sizes were systematically recorded immediately after birth. X mice (of different crosses) were sacrificed at the end of gestation (E16.5-E17.5) and their heart was weighted and collected (half was kept in PFA for histological analysis, half was placed in Trizol for RNA extraction). Muscles were also collected for endothelial cells purification.

RNA extraction and Quantitative RT-PCR conditions

Total RNA from collected tissues was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions, treated with RNase-free DNase, and quantified by spectrophotometry. Reverse transcription (RT) was carried out according to a standardized protocol. Briefly, 4 µg of total DNase-treated RNA was reverse transcribed in a volume of 25 µL at 39°C using the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers during 1 hour.

Quantitative RT-PCR was carried out using the LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science) in accordance with the manufacturer's instructions. The reaction was performed in a Light-Cycler 480 Thermocycler (Roche Applied Science). Primers were designed for the coding sequences of the different genes using the PRIMER3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>) and aligned with basic local alignment search tool software (BLAST) to avoid nonspecific annealing. Samples were submitted to cycling according to the following PCR program: 95°C for 5 min followed by 45 cycles of 3 temperature steps (94°C for 10 s, 58°C for 15 s, and 72°C for 15 s). Finally, samples were submitted to a progressive temperature elevation (from 65 to 99°C at 0.1°C/s), resulting in a melting curve, enabling to check the PCR products homogeneity. In addition, amplification products were systematically controlled by agarose gel electrophoresis.

The threshold cycle number (Ct) values were collected with the LightCycler480 software (Roche Applied Science) in the exponential phase of the PCR reaction. These Ct values were normalized by the Ct values obtained for the murine succinate dehydrogenase subunit A (*Sdha*) and the cyclophilin A (*CycloA*) used as normalising genes.

All primers are presented as Supplemental Table 1.

Name	Forward	Reverse
<i>sdha</i> (murine)	CTTGAATGAGGCTGACTGTG	ATCACATAAGCTGGTCCTGT
<i>CycloA</i> (murine)	GTCAACCCACCGTGTCTT	CTGCTGTCTTTGGAACCTTGT
<i>Agt</i>	TCTCCTTTACCACAACAAGAGCA	CTTCTCATTCACAGGGGAGGT
<i>Agtr1a</i>	AACAGCTTGGTGGTGATCGTC	CATAGCGGTATAGACAGCCCA
<i>Ace</i>	AGGTTGGGCTACTCCAGGAC	GGTGAGTTGTTGTCTGGCTTC
<i>Ace2</i>	GCAGATGGCTACAACATAACCG	CCTCCTCACATAGGCATGAAGA
<i>Endothelin-1</i>	TTCCCGTGATCTTCTCTCTGC	CTGCACTCCATTCTCAGCTCC
<i>Vwf</i>		
<i>Cd31</i>		
<i>Vcam</i>		
<i>Cdh5</i>		

Supplemental table 1 : Primers for qPCR analysis

Endothelial cells purification

Muscles (from forelegs, hind legs and back) were rapidly dissected with the removing of fat and connective tissue after the sacrifice. Then the tissues were thoroughly cut until a smooth mixture is obtained and incubate in 6mL of PBS-CaCl₂ (2mM) solution with 4,5 U of collagenase B and 7,2 U of Dispase II at 37°C for 40 min, with a step of homogenization in the middle. The reaction is then stop by adding 500 µL of Fetal Calf Serum (FBS). This is then put on a 70 µm filter, in order to collect the dissociated cells. A small part of these cells are collected, centrifuged and resuspended in Trizol Reagent for analysis as "total cells". These cells are then centrifuged and resuspend in 1mL of PBS-0,1% FBS-2mM EDTA and incubated on previously precoated beads (with Cd31 antibody), with agitation at 4°C for 20

min. The unbounded cells are then collected, centrifuged and resuspended in Trizol reagent for RNA extraction. The bounded cells are collected directly with Trizol reagent.

Microarray analysis of endothelial cells purified from pregnant normal and preeclamptic mice

RNA quality would be verified by Agilent bioanalyser 2100 and checked to have a RNA Integrity Number (RIN) systematically higher than 8. Microarray analysis would be performed starting from total RNA of 9 individual samples (three from normal pregnant mice, 3 from mice crossed with TgSTOX13 and 3 from mice crossed with TgSTOX42). The cDNA synthesis, labelling hybridization on Nimblegen mouse arrays (alignment MM8, 25208 transcripts interrogated with three 60-mer probes per transcript) would be carried out at the Genomics and Transcriptomic platform of the Cochin Institute (data would be available in GeoDatasets). Deregulated genes would be identified either by the occurrence of a statistically significant t-test, or by a systematic one-way difference between cells from preeclamptic versus normal pregnant mice, and with a threshold of variation above 1.5-fold. Clustering would be carried out using DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) with the Gene Functional Classification tool and the Pathway tool. Pathways and categories would be considered significant with a Benjamini < 0.05 for the pathways analysis and according to thresholds defined as in (Buffat et al. 2007) for the Gene Functional Classification.

Statistical analysis

During this study, one-way Student Tests were used for relative expression analysis using the deltaCt values. Chi2 contingency tests were performed for analyzing the groups of genes identified by the transcriptome analysis. The StatistXL add-in of Excel™ was systematically used. p values below 0.05 were considered significant.

Results

Heart weight in pregnant mice crossed with WT male or STOX1 transgenic mice

Given the strong hypertension that the pregnant WT mice developed when they are crossed with transgenic males (Doridot et al. 2013), we postulate that they could also display heart hypertrophy. To investigate this hypothesis, we sacrificed mice crossed with WT or transgenic males at the end of gestation, when the hypertension is the most severe and weighted their heart (**Figure 1**). We can observe a slight increase but it is not significant. It is important to note that we can not normalize to the individual animal weight because the pregnant mouse weight is importantly dependent of the number of fetuses the mouse is

carrying, especially at the end of gestation (where the weight of the fetuses can represent one third of the total weight of the pregnant mouse).

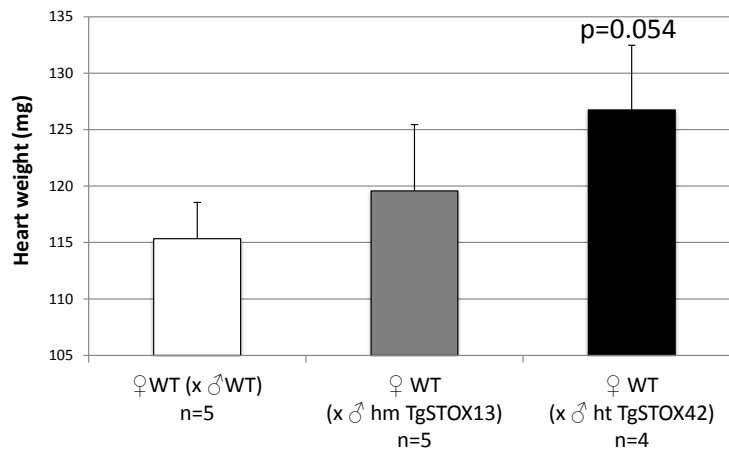


Figure 1: Heart Weight at the end of gestation of control and preeclamptic mice
Pregnant mice crossed with WT males (n=5) or transgenic TgSTOX13 (n=5) or TgSTOX42 (n=4) males were sacrificed at the end of gestation (E16.5-E17.5) and their hearts were weighed.

Altered Renin-Angiotensin system in heart from preeclamptic mice

The direct weighing of the heart from pregnant mice cannot be optimally normalized by the animal weight, so we decided to address the possible presence of a heart hypertrophy by assessing the presence of molecular markers of this condition.

Thus, we measured the mRNA expression of markers from the renin/angiotensin system (RAS), which is described as locally activated in case of heart hypertrophy (Barauna et al. 2008). We could show a significant increase of Angiotensinogen (Agt, which is the precursor of Angiotensin), Angiotensin type I receptor (Agtr1a), Angiotensinogen converting enzyme (Ace) and Ace2 mRNA in mice crossed with transgenic mice compared to those crossed with WT males (**Figure 2**).

For Agt, its expression is increased 2.9 and 4.6 fold in mice crossed with TgSTOX13 and TgSTOX42 males, respectively (p=0.05 by one-way Student-Test comparing control mice with all preeclamptic mice). Agtr1a expression is augmented 3.7 and 23.2 fold in mice crossed with TgSTOX13 and TgSTOX42 males, respectively (p=0.03 by one-way Student-Test comparing control mice with all preeclamptic mice, and p=0.02 by one-way Student-Test comparing control mice with mice crossed with TgSTOX42 males). The expression for Ace increased by 1.7 and 8.2 fold in mice crossed with TgSTOX13 and TgSTOX42 males, respectively (p=0.04 by one-way Student-Test comparing control mice with all preeclamptic

mice, and $p=0.01$ by one-way Student-Test comparing control mice with mice crossed with TgSTOX42 males). Finally, *Ace2* expression is augmented 3.7 and 9.2 fold in mice crossed with TgSTOX13 and TgSTOX42 males, respectively ($p=0.04$ by one-way Student-Test comparing control mice with all preeclamptic mice).

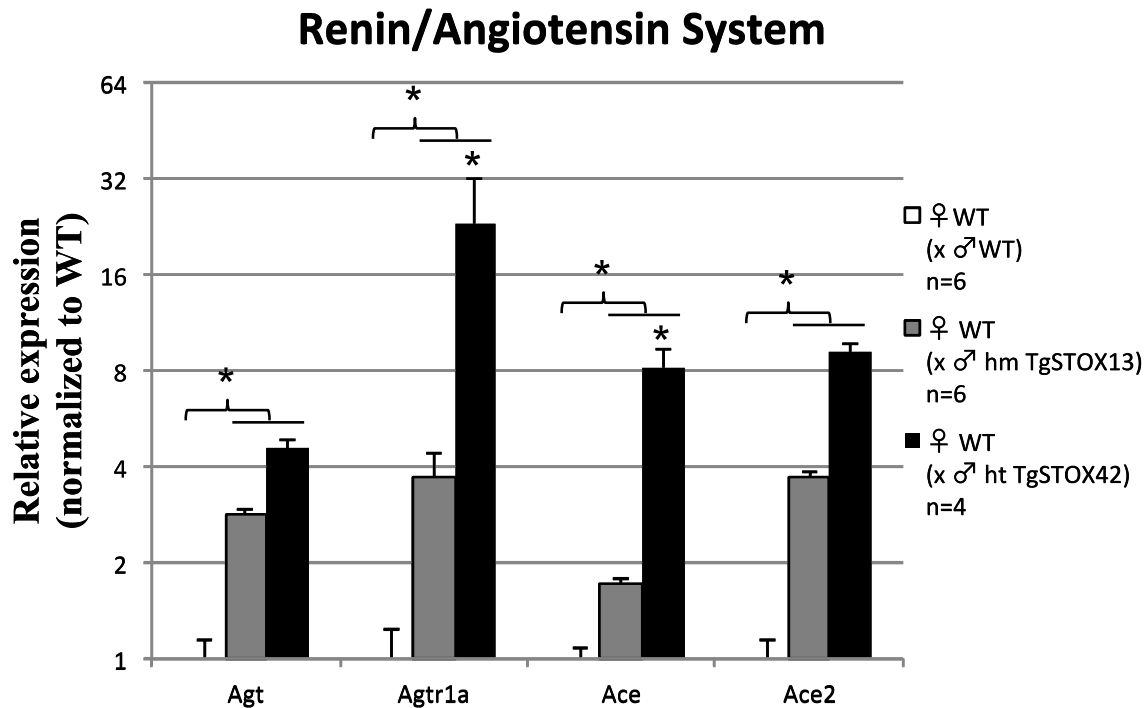


Figure 2: Relative expression of genes from Renin/Angiotensin System in the heart from control pregnant mice and preeclamptic mice

Hearts were retrieved at the end of gestation (E16.5-E17.5) from mice crossed with wild type male (control, white bars, $n=6$) or crossed with transgenic males (preeclamptic gestation, grey and black bars). The transgenic males are from two independent lines and expressed human STOX1: TgSTOX13 (moderate transgene expression) and TgSTOX42 (high transgene expression). The preeclamptic phenotype for mice crossed with TgSTOX42 is more severe than the one observed for TgSTOX13 crosses. The Ct were normalized by those obtained for two reference genes, *Sdha* and *CyclophilinA*, and the expressions for the control gestation were then arbitrary set to one. * for $p<0,05$.

We also measure Endothelin-1 expression in the heart from these pregnant mice (**Figure 3**), as it is also involved in cardiac hypertrophy induced by aging (Ceylan-Isik et al. 2013), and induced by Angiotensin II (Fujita et al. 2013). We observed an increase by 2.9 and 19.2 fold in mice crossed with TgSTOX13 and TgSTOX42 males, respectively ($p=0.04$ by one-way Student-Test comparing control mice with all preeclamptic mice, and $p=0.02$ by one-way Student-Test comparing control mice with mice crossed with TgSTOX42 males).

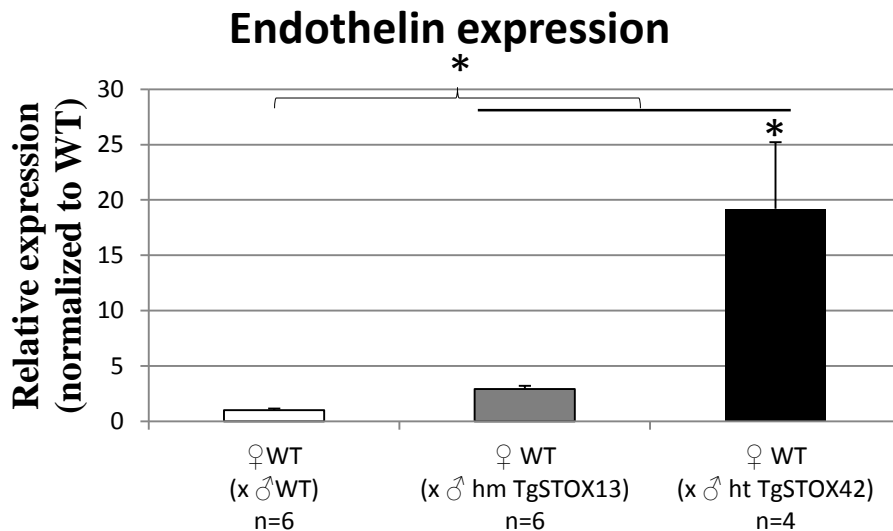


Figure 3: Relative expression of Endothelin-1 in the heart from control pregnant mice and preeclamptic mice

Hearts were retrieved at the end of gestation (E16.5-E17.5) from mice crossed with wild type male (control, white bars, n=6) or crossed with transgenic males (preeclamptic gestation, grey and black bars). The transgenic males are from two independent lines and expressed human STOX1: TgSTOX13 (moderate transgene expression) and TgSTOX42 (high transgene expression). The preeclamptic phenotype for mice crossed with TgSTOX42 is more severe than the one observed for TgSTOX13 crosses. The Ct were normalized by those obtained for two reference genes, *Sdha* and *CyclophilinA*, and the expressions for the control gestation were then arbitrary set to one. * for p<0,05.

To note, we can systematically observed a bigger increase of these genes expressions in crosses involving TgSTOX42 males, compared to TgSTOX13 males. This is coherent with the previous observation of a more severe preeclamptic phenotype in TgSTOX42 crosses.

Endothelial cell isolation

In order to better understand how the preeclamptic syndrome in this mice model impact the endothelium, we initiate endothelial cells purification to analyze them by a transcriptomic approach. First, we validated our method by measuring endothelial markers expression in our purified cells (**Figure 4**). We can thus showed that the purified cells have a superior expression of Von Willebrand factor (Vwf), Cd31, Vascular cell adhesion molecule-1 (Vcam) and cadherin 5 (Cdh5), compared to total cells, and that these expression is greatly reduced in the unbounded cells. These data strongly suggest that the purification method is working.

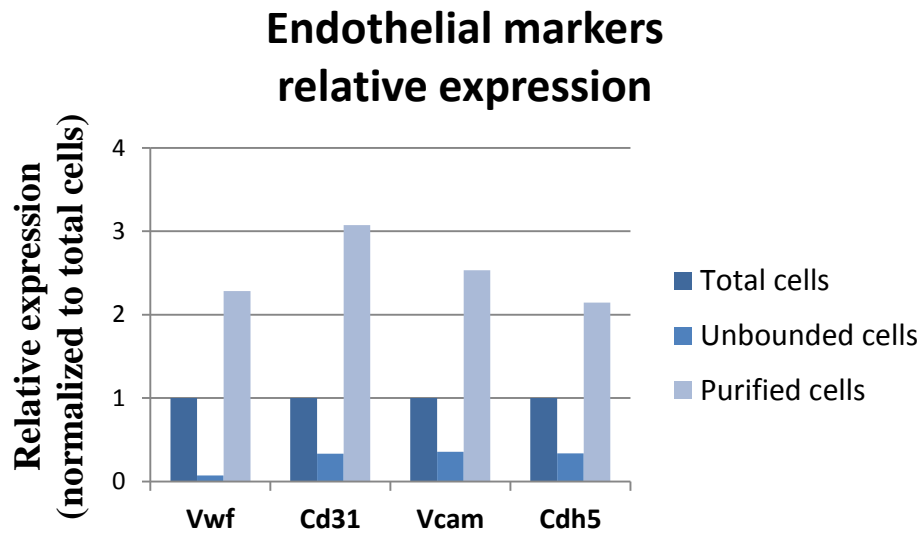


Figure 4: Endothelial cells purification

Endothelial cells were purified on Cd31 coated beads following muscle dissection and digestion by collagenase/dispase. The relative expressions of endothelial markers were assessed by qRT-PCR on different fraction of cells (normalized by sdha expression, and the observed expression in total cells was arbitrary set to one).

Transcriptomic profile of endothelial cells from preeclamptic mice

Coming soon...

Discussion

To sum up, we showed that our mice model of preeclampsia showed hallmarks of cardiac hypertrophy.

It is clearly demonstrated that altered renin-angiotensin system (RAS) can participate to cardiac hypertrophy, as it is observed in chronic kidney disease patients (Raizada et al. 2012). Resistance training-induced cardiac hypertrophy is thus characterized by upregulation of AT1R gene (Barauna et al. 2008). In return, RAS inhibition can reverse advanced cardiac remodeling in aging spontaneously hypertensive rats (Ito et al. 2007). Endothelin-1 (ET-1) is also involved in cardiac hypertrophy induced by aging (Ceylan-Isik et al. 2013). It is induced by Angiotensin II (Fujita et al. 2013). Here we showed that several genes from the RAS system and ET-1 are increased in mice crossed with transgenic male, which induced a preeclamptic syndrome following fetoplacental STOX1 expression.

To complete this study, we could perform histochemistry to assess heart fibrosis, as it is also typical of pathological cardiac hypertrophy.

All these data reinforce the usefulness of this animal model to study various aspect of preeclampsia and suggest that it could be a really interesting tool to assess long term effect of preeclampsia, notably on heart and endothelial cells.

References

- Barauna, Valerio G, Flávio C Magalhaes, Jose E Krieger, and Edilamar M Oliveira. 2008. "AT1 Receptor Participates in the Cardiac Hypertrophy Induced by Resistance Training in Rats." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295 (2) (August): R381–387.
- Buffat, C, F Mondon, V Rigourd, F Boubred, B Bessières, L Fayol, J-M Feuerstein, et al. 2007. "A Hierarchical Analysis of Transcriptome Alterations in Intrauterine Growth Restriction (IUGR) Reveals Common Pathophysiological Pathways in Mammals." *The Journal of Pathology* 213 (3) (November): 337–346.
- Ceylan-Isik, Asli F, Maolong Dong, Yingmei Zhang, Feng Dong, Subat Turdi, Sreejayan Nair, Masashi Yanagisawa, and Jun Ren. 2013. "Cardiomyocyte-specific Deletion of Endothelin Receptor A Rescues Aging-associated Cardiac Hypertrophy and Contractile Dysfunction: Role of Autophagy." *Basic Research in Cardiology* 108 (2) (March): 335.
- Van Dijk, M., S. Drewlo, and C. B. M. Oudejans. 2010. "Differential Methylation of STOX1 in Human Placenta." *Epigenetics* 5 (8): 736–742.
- Van Dijk, Marie, Jan van Bezu, Daan van Abel, Caroline Dunk, Marinus A Blankenstein, Cees B M Oudejans, and Stephen J Lye. 2010. "The STOX1 Genotype Associated with Pre-eclampsia Leads to a Reduction of Trophoblast Invasion by alpha-T-catenin Upregulation." *Human Molecular Genetics* 19 (13) (July 1): 2658–2667.
- Van Dijk, Marie, Joyce Mulders, Ankie Poutsma, Andrea A M Könst, Augusta M A Lachmeijer, Gustaaf A Dekker, Marinus A Blankenstein, and Cees B M Oudejans. 2005. "Maternal Segregation of the Dutch Preeclampsia Locus at 10q22 with a New Member of the Winged Helix Gene Family." *Nature Genetics* 37 (5) (May): 514–519.
- Doridot, Ludivine, Bruno Passet, Céline Méhats, Virginie Rigourd, Sandrine Barbaux, Aurélien Ducat, Françoise Mondon, et al. 2013. "Preeclampsia-Like Symptoms Induced in Mice by Fetoplacental Expression of STOX1 Are Reversed by Aspirin Treatment." *Hypertension* 61 (3) (March): 662–668.
- Fenstad, M H, M P Johnson, M Løset, S B Mundal, L T Roten, I P Eide, L Bjørge, et al. 2010. "STOX2 but Not STOX1 Is Differentially Expressed in Decidua from Pre-eclamptic Women: Data from the Second Nord-Trøndelag Health Study." *Molecular Human Reproduction* 16 (12) (December): 960–968.
- Firoz, Tabassum, Harshad Sanghvi, Mario Merialdi, and Peter von Dadelszen. 2011. "Pre-eclampsia in Low and Middle Income Countries." *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* 25 (4) (August): 537–548.
- Fujita, Shuichi, Naoshi Shimojo, Fumio Terasaki, Kaoru Otsuka, Noriko Hosotani, Yuka Kohda, Takao Tanaka, et al. 2013. "Atrial Natriuretic Peptide Exerts Protective Action Against Angiotensin II-induced Cardiac Remodeling by Attenuating Inflammation via Endothelin-1/endothelin Receptor A Cascade." *Heart and Vessels* (January 1).
- Goldenberg, Robert L, Jennifer F Culhane, Jay D Iams, and Roberto Romero. 2008. "Epidemiology and Causes of Preterm Birth." *Lancet* 371 (9606) (January 5): 75–84.
- Goldenberg, Robert L, Elizabeth M McClure, Emily R Macguire, Beena D Kamath, and Alan H Jobe. 2011. "Lessons for Low-income Regions Following the Reduction in Hypertension-related Maternal Mortality in High-income Countries." *International Journal of Gynaecology and*

Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics 113 (2) (May): 91–95.

- Graves, J A. 1998. “Genomic Imprinting, Development and Disease--is Pre-eclampsia Caused by a Maternally Imprinted Gene?” *Reproduction, Fertility, and Development* 10 (1): 23–29.
- Ito, Norihisa, Mitsuru Ohishi, Koichi Yamamoto, Yuji Tatara, Atsushi Shiota, Norihiro Hayashi, Norio Komai, Yoshihiro Yanagitani, Hiromi Rakugi, and Toshio Ogihara. 2007. “Renin-angiotensin Inhibition Reverses Advanced Cardiac Remodeling in Aging Spontaneously Hypertensive Rats.” *American Journal of Hypertension* 20 (7) (July): 792–799.
- Laresgoiti-Servitje, Estibalitz, and Nardhy Gomez-Lopez. 2012. “The Pathophysiology of Preeclampsia Involves Altered Levels of Angiogenic Factors Promoted by Hypoxia and Autoantibody-mediated Mechanisms.” *Biology of Reproduction* 87 (2) (August): 36.
- Lykke, Jacob A, Jens Langhoff-Roos, Baha M Sibai, Edmund F Funai, Elizabeth W Triche, and Michael J Paidas. 2009. “Hypertensive Pregnancy Disorders and Subsequent Cardiovascular Morbidity and Type 2 Diabetes Mellitus in the Mother.” *Hypertension* 53 (6) (June): 944–951.
- Melchiorre, K, G Sutherland, R Sharma, M Nanni, and B Thilaganathan. 2013. “Mid-gestational Maternal Cardiovascular Profile in Preterm and Term Pre-eclampsia: a Prospective Study.” *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 120 (4) (March): 496–504.
- Melchiorre, Karen, George Ross Sutherland, Ingrid Watt-Coote, Marco Liberati, and Baskaran Thilaganathan. 2012. “Severe Myocardial Impairment and Chamber Dysfunction in Preterm Preeclampsia.” *Hypertension in Pregnancy: Official Journal of the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* 31 (4): 454–471.
- Raizada, Veena, Dustin Hillerson, Jaya Sheela Amaram, and Betty Skipper. 2012. “Angiotensin II-mediated Left Ventricular Abnormalities in Chronic Kidney Disease.” *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research* 60 (5) (June): 785–791.
- Rigourd, V., C. Chauvet, S. T. Chelbi, R. Rebourcet, F. Mondon, F. Letourneur, T. M. Mignot, S. Barboux, and D. Vaiman. 2008. “STOX1 Overexpression in Choriocarcinoma Cells Mimics Transcriptional Alterations Observed in Preeclamptic Placentas.” *PloS One* 3 (12): e3905.
- Sibai, Baha, Gus Dekker, and Michael Kupferminc. 2005. “Pre-eclampsia.” *Lancet* 365 (9461) (March 26): 785–799.

ARTICLE 4

STOX1 EST RESPONSABLE D'UNE FONCTION MITOCHONDRIALE ALTEREE DANS LES CELLULES TROPHOBLASTIQUES

(en préparation)

Les précédents articles traitent des souris obtenues. Cependant, une question clé demeure : comment STOX1 induit-il le syndrome maternel ? Pour y répondre, il nous a semblé important d'étudier la fonction de STOX1 de façon plus précise. Ceci a été réalisé dans un modèle cellulaire : les cellules de choriocarcinome JEG-3 transfectées stablement avec un vecteur permettant l'expression de STOX1 (voir Chapitre 4-III-3-ii de l'introduction). En effet, il est plus aisé d'étudier les mécanismes par lesquels agit STOX1 dans des cellules, plutôt que dans un organisme complet, dans lequel les interactions entre les différents types cellulaires compliquent la compréhension de l'effet d'un facteur.

L'analyse phénotypique des cellules surexprimant STOX1 (HighSTOX1) avait débuté au cours de mon stage de M2, pendant lequel j'avais regardé s'il y avait des différences de prolifération, d'invasion et de résistance à différents stressés entre les cellules surexprimant STOX1 et leur contrôle (cellules JEG-3 stablement transfecté avec un vecteur vide). Les résultats obtenus alors ont notamment révélé une différence en réponse à un stress oxydatif (H₂O₂), avec une mortalité supérieure des cellules HighSTOX1.

Ensuite, Daniel a rencontré Laurent Chatre (lors des auditions pour le concours CR2 du CNRS). Laurent a mis au point une méthode originale pour étudier la réplication et la transcription mitochondriales. Une collaboration fructueuse s'est alors initiée pour étudier la fonction mitochondriale des cellules HighSTOX1, dont la déficience pouvait expliquer la susceptibilité accrue au stress oxydatif.

Les résultats obtenus au cours de cette collaboration sont décrits sous forme d'article ci-dessous. Ce travail est déjà bien abouti. Nous sommes actuellement en train de renforcer ces données par des analyses complémentaires (Western Blot visant à confirmer les données d'immunohistochimie et mesures des espèces réactives de l'oxygène et du monoxyde d'azote visant à confirmer le profil suggéré par la mesure des protéines carbonylées et nitrosylées).

Ce travail sera soumis très prochainement à Nature Communication (d'ici un mois environ).

Résumé

Dans cette étude, nous avons voulu mieux comprendre ce que faisait STOX1 dans les cellules trophoblastiques. Pour cela, nous nous sommes particulièrement intéressés à notre modèle cellulaire surexprimant STOX1 (cellules JEG-3 stablement transfectées par un plasmide pCMX-STOX1A). Les données obtenues grâce à l'approche transcriptomique ont montrées une altération de l'expression de gènes impliqués dans la gestion des radicaux libres et du stress oxydatif, et en particulier, les gènes codant des protéines pro-oxydantes sont uprégulés, tandis que ceux codant des anti-oxydantes sont plutôt diminués.

Nous avons donc étudié ces paramètres dans des cellules contrôles (JEG-3 transfecté stablement avec un plasmide vide) et celles surexprimant STOX1, dans des conditions variables de pression partielle en oxygène (20 % et 2 % d'O₂), puisque les trophoblastes sont soumis à des variations de cette pression partielle au cours de la grossesse physiologique.

Globalement, cela a permis de mettre en évidence une incapacité des cellules surexprimant STOX1 à répondre de façon adéquate à des variations de pression en oxygène. En effet, les différences observées dans les cellules contrôles entre 2 et 20 % d'O₂ ne sont pas retrouvées dans les cellules surexprimant STOX1. Dans certains cas (notamment en ce qui concerne les taux de protéines carbonylées et nitrosylées, reflet des espèces réactives de l'oxygène -ROS- et de l'azote -RNS-, respectivement), les cellules surexprimant STOX1 arborent même des profils (entre 2 et 20 % d'O₂) opposés à ceux des cellules contrôles.

Ces résultats sont confortés par des analyses *in vivo* à partir de placentas murins de souris contrôles et « prééclamptiques » (femelles sauvages croisées avec des mâles transgéniques TgSTOX42, exprimant de façon ubiquitaire STOX1 humain). En particulier, on peut observer dans ces placentas un profil pour les protéines carbonylées et nitrosylées similaire à ce qui était observé dans les cellules contrôles et surexprimant STOX1 à 2 % d'O₂, suggérant ainsi que les placentas de ces souris seraient plutôt dans des conditions hypoxiques.

En conclusion, cette étude apporte une voie d'action de STOX1 qui pourrait expliquer son implication dans la physiopathologie de la prééclampsie. En effet, si des cellules trophoblastiques expriment beaucoup de STOX1 au début de la grossesse, elles pourraient ne pas bien répondre à l'augmentation de la pression partielle en oxygène à la fin du premier trimestre et cela perturberait ainsi la placentation et induirait le phénotype maternel prééclamptique.

STOX1 STRONGLY IMPACTS FREE RADICAL EQUILIBRIUM AND MITOCHONDRIAL HOMEOSTASIS: A POSSIBLE BASIS FOR PREECLAMPSIA SYMPTOMS DRIVEN BY STOX1 OVEREXPRESSION

Introduction

Preeclampsia is a pervasive, human-specific, disease of pregnancy, affecting 2-8% of women mostly at their first gestation ¹. It is estimated to be responsible of 50,000 maternal deaths worldwide ². This syndrome is clinically defined by a *de novo* hypertension (over 140 mm Hg systolic blood pressure and over 90 mmHg diastolic blood pressure, generally occurring from mid-gestation, but sometimes much later near term) and proteinuria (over 300 mg/day of protein in the urine). The disease is considered as finding its origin in a placental defect ³. In normal gestations, uterine arteries are deeply invaded by extra-villous cytotrophoblasts, which substitute to adjacent endothelial cells, and ultimately adopt themselves an endothelial phenotype, constituting a sheath of fetal cells, rooting up to the first third of the myometrium. This normally triggers a dramatic remodeling of these arteries, enlarging them and rendering them more passive in terms of contractile properties. In preeclamptic gestations, it is widely believed that early placental defects lead to placental ischaemia, and that maternal uterine arteries are not colonized as deeply as in normal gestations, leading to insufficient or irregular blood flow to the foetus ^{3,4}. It is thought that these irregularities may create transitory local hypoxic/hyperoxic changes to which the syncytiotrophoblast will answer by producing vasoactive substances, and will be exceedingly eroded towards the maternal circulation ⁵. This debris, as well as micro-particles ⁷ would contribute to the maternal systemic endothelial injury ⁸ by releasing or carrying antiangiogenic factors (sFLT-1 and sENG being the most frequently quoted), that may decrease the concentration of proangiogenic factors (VEGF and PlGF being the most frequently quoted). One important component of the preeclamptic disease appears to be oxidative stress ⁹; Oxygen free radicals and Reactive Oxygen Species (ROS) results necessarily from aerobic respiration and encompass free radicals (superoxide, nitric oxide, and hydroxyls) as well as other highly reactive molecules. One major source of oxidative stress in the placenta appears to be placental mitochondria ¹⁰, where lipid peroxidation has been shown to be highly increased in mitochondrial isolated from preeclamptic placentas ¹¹, and counterbalanced by expression of the antioxidant superoxid dismutases (SOD).

Recently, we have shown that the overexpression of the STOX1 transcription factor ¹² is able to induce a preeclampsia-like status to choriocarcinoma JEG-3 cells, used as proxies for trophoblast cells ^{13, 14}, as well as in an in-vivo model of transgenic mice ^{15, 16}. When wild-type females carry

embryos that are transgenic, they develop a very strong hypertension and proteinuria, present with an excess of sFlt1 and sEng in their plasma, have reduced litters. The reasons why STOX1 is able to bend mice physiology towards preeclampsia is ill-understood.

In the present study, we wished to gain insight into the reasons why an excess of STOX1 has deleterious effects; to this aim, and based upon transcriptomic results that showed that JEG-3 cells overexpressing STOX1 display deregulation of genes involved in free radical metabolism and oxidative stress, we characterized extensively the JEG-3 cells overexpressing STOX1 in terms of mitochondrial function, including oxidative stress and free radical production, and demonstrate that STOX1 is a major coordinator of mitochondrial physiology. Some key observations are comforted in the mouse transgenic placentas, giving potential clues to explain the preeclamptic phenotype through a massive alteration of mitochondrial function.

Methods

Cell Culture and hypoxia

The JEG-3 cell line is a conventionally used model of trophoblast cells {Kohler et al. 1971}. Modified JEG-3 cells (BD3, stably transfected with an empty pCMX vector, and AA6, stably transfected with a pCMX-STOX1A vector) {Rigourd, 2008} were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium Glutamax (Life Technologies) supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum (Life Technologies), 1% penicillin/streptomycin and 1% of genetycin, at 37°C in the presence of 5% CO₂.

To analyze the effect of hypoxia on gene expression, cells were seeded in 60 mm diameter glass dishes, in which sterile glass slides were previously positioned. The following day, they were placed in a Lwoff chamber at 37°C and exposed to an oxygen-depleted atmosphere (2% O₂, 5% CO₂) or maintained as control at 37°C in humidified normal atmosphere (20% O₂ – 5% CO₂) for 24h. Cells were then harvested by centrifugation for DNA extraction, or using TRIzol Reagent (Invitrogen) for RNA extraction or fixed 30 min in PFA 2%.

DNA and RNA extraction, Quantitative PCR and RT-PCR Conditions

DNA was extracted under standard procedures {Mondon et al. 2005}. Briefly, samples were first digested with proteinase K and SDS. Phenol-chloroform extractions were followed by alcohol precipitation of genomic DNA which was subsequently dissolved in water overnight. Gel electrophoresis and OD measurement (NanoDrop 1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE) were performed to quantify the genomic DNA and check for its integrity.

Reverse transcription was carried out according to a standardized protocol (Mondon et al. 2005). Briefly, 2 µg of total DNase-treated RNA was reverse transcribed in a volume of 25 µL at 39°C using the Superscript reverse transcriptase (Invitrogen) during 1 hour.

Quantitative RT-PCR et quantitative PCR on extracted DNA was carried out in duplicates and were performed with the LightCycler® 480 SYBR Green I Master containing FastStart Taq DNA Polymerase, 1 mM of each primer and 2 µL of cDNA (10 times diluted after the reverse

transcription) or 200 ng of DNA. The reaction was performed in a LightCycler 480 Instrument II, a plate-based thermal block cycler (Roche). Primers are listed in Supplementary Table 1. We used the PCR program: 95°C for 5 min followed by 45 cycles of 3 temperature steps (95°C for 10 s, 58°C for 15 s, and 72°C for 15 s). Finally, samples were submitted to a progressive temperature elevation (from 65 to 99°C at 0.1°C/s), resulting in a fusion curve, enabling to check the PCR products homogeneity. In addition, amplification products were systematically controlled by agarose gel electrophoresis. The threshold cycle number (Ct) values were collected with the LightCycler software (Roche) in the exponential phase of the PCR reaction. These Ct values were normalized by the Ct values obtained for the succinate dehydrogenase subunit A (SDHA) for RT-qPCR and by 18S nuclear gene used as normalizing genes.

18S (nuclear normalizing gene) for mtDNA content estimation		
12S (mitochondrial gene) for mtDNA content estimation		
SDHA (for mRNA normalization)		
16S (mitochondrial RNA)		
Cox1 (mitochondrial RNA)		
ATP6 (mitochondrial RNA)		
CytB (mitochondrial RNA)		

Supplemental table 1: Primers for qPCR analysis

Transcriptomic

RNA with a RIN > 8 was purified from cell cultures and utilized at the Cochin Institute Genom'IC platform. Briefly, 5 micrograms of cDNA of AA6 (HighSTOX1) and BD3 (Controls) clones were hybridized to Nimblegene human expression arrays. Each of the 24,000 cDNAs present on the array is interrogated by three 60-mer probes. Labeling for hybridization scanning and data normalization were performed by the Cochin Institute platform, which provided the final data. Standard quality control procedures were performed and validated (available upon request).

Immunocytochemistry and signal quantification

Animals, immunohistochemistry and signal quantification

The animals used are FVN/N WT mice and transgenic mice expressing the human STOX1 under the control of the cytomegalovirus promoter (TgSTOX42), described in (Doridot et al. 2013).

Animals (FVB/N) were bred in the animal facility of INRA (Jouy en Josas, France) in a controlled environment (light/dark cycle, temperature, free access to food and water). After mating with males of specific genotypes (WT or TgSTOX42), WT females were inspected daily for vaginal plugs; detection of a vaginal plug in the morning was designated as day 0.5 of pregnancy (E0.5 or 0.5 dpc). 6 mice (2 WT crossed with WT male and 4 WT crossed with TgSTOX42 male) were sacrificed at the end of gestation (E16.5) and their placentas were

retrieved for histological analysis. One or two placentas from each mouse were analyzed by immunostaining on slides from paraffin-embedded placentas (5 μ m).

Results

1. An enhanced transcriptomic analysis of STOX1 overexpression confirms strong alterations of oxidative stress regulators in choriocarcinoma JEG-3 cells

AA6 cells (JEG-3 cells overexpressing STOX1 under the control of the CMV promoter) are called here 'HighSTOX1' and BD3 cells (transfected with a control plasmid, as described previously {Rigourd, 2008} are called 'Control'). A transcriptomic analysis was carried out comparing these two cell types using long oligonucleotides microarrays (Nimblegen) that are sensitive enough to detect over 95% of the transcripts. Overall, amongst the detected modified genes there was a very strong correlation with the data of the first experiment carried out using Affymetrix microarrays (data not shown). In addition reliable information on extended gene families became available. Genes of oxidative stress and free radical management were strongly altered by STOX1 overexpression such as SOD2, GSTT, Peroxyredoxin (**Figure 1**). In particular, we could observe an increase in pro-oxydant gene, whereas anti-oxydant ones were rather reduced. These alterations led us to focus on free radical metabolism in choriocarcinoma cells.

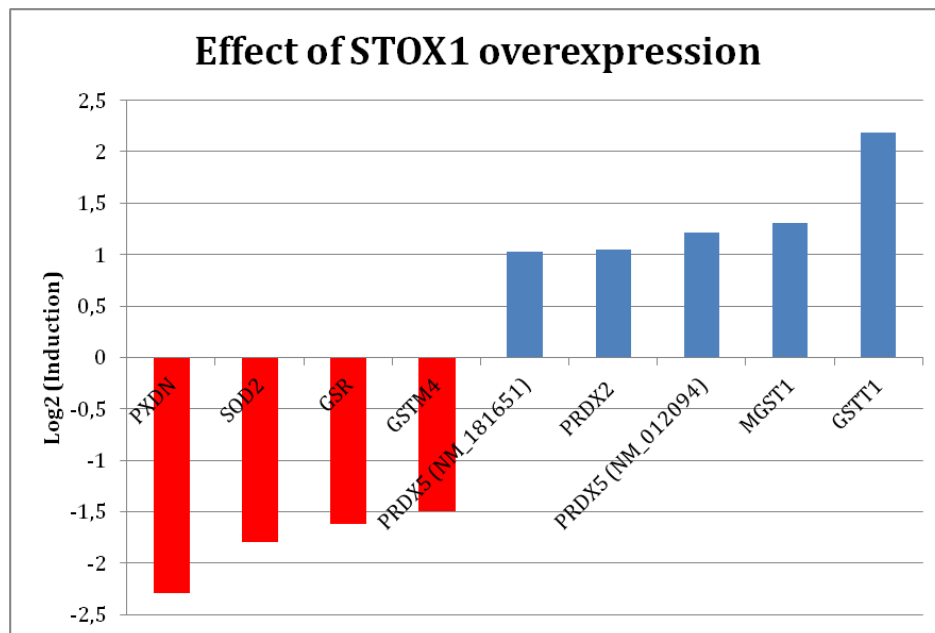


Figure 1: Modified genes in cells overexpressing STOX1 involved in free radicals management

2. Markers of oxidative stress are strongly modified in choriocarcinoma cells overexpressing STOX1.

Given the well-documented importance of oxygen pressure in placental development and function, HighSTOX1 and control cells were grown either in 'normoxic' or in 'hypoxic' conditions in order to analyze the potential links between oxygen pressure and STOX1 overexpression. 'Normoxia' and 'Hypoxia' refer to 20% and 2% oxygen, respectively, which is not supposed to reflect the true physiological status of the placenta, where early oxygen pressure is estimated at 1.5-2% while at late time points it is estimated around 10%. Confocal microscopy was used on three independent experiments for each cell line after immunofluorescence using antibodies directed against nitrosylated or carbonylated proteins. These modifications are endpoints of exposure to RNS or ROS (Reactive Nitrogen Species or Reactive Oxygen Species, respectively). We observed that STOX1 overexpression leads to a completely opposite production of these two types of protein modifications (**Figure 2**). Namely, in Control cells, the level of carbonylated proteins is ~tenfold more elevated in 'hypoxia' than in 'normoxia'. On the contrary, nitrosylated proteins are at a very low level at 2% O₂ and considerably more abundant at 20%. Strikingly, under STOX1 overexpression, we obtained a completely symmetrical image. This suggests that the balance between the two types of free radicals (Oxygen species on the one hand, and Nitrogen species on the other hand) is inverted when STOX1 is overexpressed in the cells.

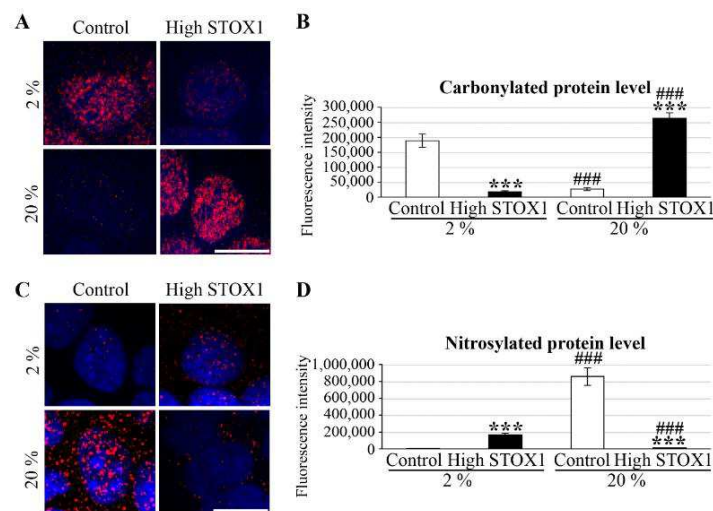


Figure 2: Immunocytochemistry and quantification of carbonylated and nitrosylated proteins in control and HighSTOX1 cells at 2 and 20% of O₂.

- A. Immunocytochemistry with XXX antibody
 - B. Quantification of carbonylated proteins per cell in the different conditions
 - C. Immunocytochemistry with anti-nitrotyrosin antibody
 - D. Quantification of nitrosylated proteins per cell in the different conditions
- *** p<0,001 by XXX test between Control cells and HighSTOX1 cells at the same O₂ level
 ### p<0,001 by XXX test between 2 and 20 % O₂ in the same cell type

Since free radical metabolism is strongly dependent on mitochondrial function we moved to a thorough exploration of mitochondrial physiology by the analysis of several markers of their metabolism.

3. Mitochondrial mass, mitochondrial DNA content and structure are affected by STOX1 overexpression

In the cell, mitochondria constitute a dynamic network strongly interconnected to filamentous actin and actively moving inside the cytoplasm. In a first series of experiments, the outer membrane mitochondrial marker TOM22 was utilized to estimate mitochondrial mass (**Figure 3**).

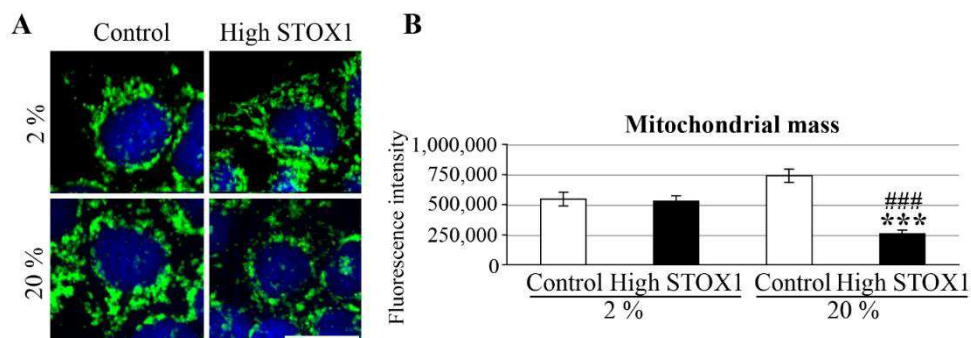


Figure 3: Immunocytochemistry and quantification of TOM22, a mitochondrial marker, in control and HighSTOX1 cells at 2 and 20% of O₂.

A. Immunocytochemistry with anti-TOM22 antibody

B. Quantification of TOM22 protein per cell in the different conditions

*** p<0,001 by XXX test between Control cells and HighSTOX1 cells at the same O₂ level

p<0,001 by XXX test between 2 and 20 % O₂ in the same cell type

No significant difference could be observed whatever the condition for Control cells. By contrast, High STOX1 cells had a decreased mitochondrial mass relative to control in normoxic conditions, but not at 2% O₂. In these cells, the overall mitochondrial mass was less high at 20% O₂ than at 2% O₂. These observations were independently confirmed by labeling with Mitotracker™ (**Supplementary Figure 1A and 1B**).

By quantitative PCR (**Figure 4A**), we assessed the mitochondrial DNA (mtDNA) content of the cells. We observed that Oxygen pressure had no effect on the mtDNA content in control cells. At 2% O₂, the mtDNA content was about halved in HighSTOX1 cells. Altogether, this suggests that despite the decreased mitochondrial mass observed in HighSTOX1 cells in 'normoxia', the amount of DNA per mitochondria is increased in this condition. Reciprocally, in 'hypoxia', the mtDNA content was diminished in HighSTOX1 cells and the mitochondrial mass was overall unchanged, meaning that the mitochondria have less copies of mtDNA.

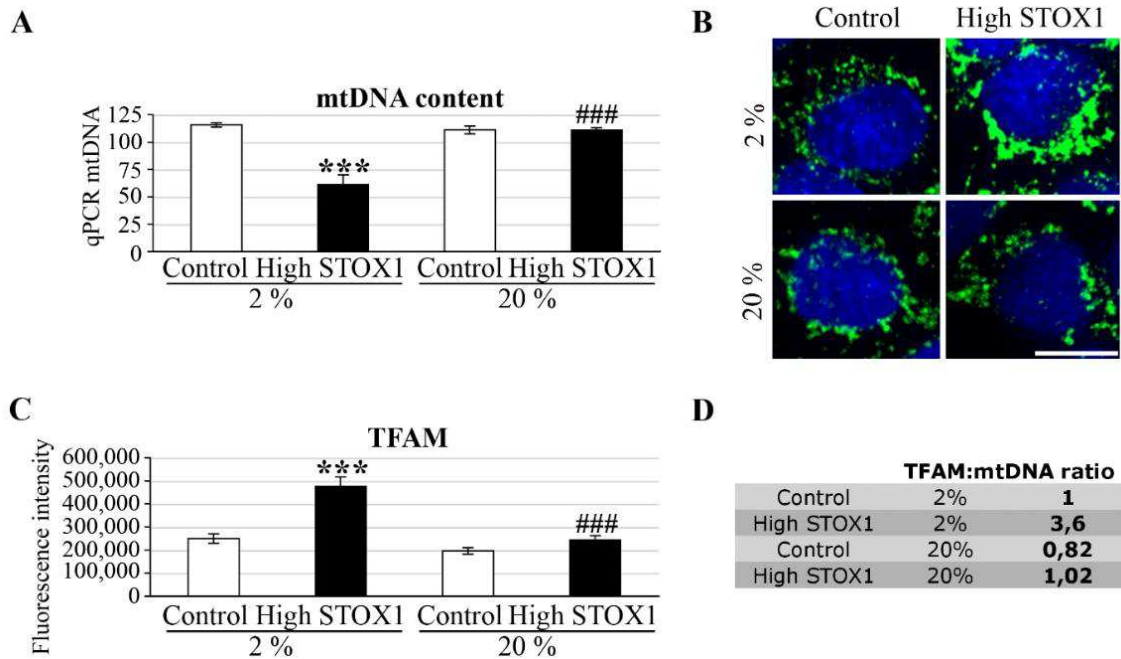


Figure 4: Mitochondrial DNA and TFAM immunocytochemistry and quantification in control and HighSTOX1 cells at 2 and 20% of O₂.

- A. Mitochondrial DNA content assessed by quantitative PCR normalized by a unique nuclear gene
 - B. TFAM immunocytochemistry in the different conditions
 - C. TFAM quantification per cell in the different conditions
 - D. TFAM under mtDNA ratio relative to the one of control cells at 2% O₂
- *** p<0,001 by XXX test between Control cells and HighSTOX1 cells at the same O₂ level
 ### p<0,001 by XXX test between 2 and 20 % O₂ in the same cell type

To evaluate the structure of the mitochondrial DNA, we analyzed TFAM by immunofluorescence (**Figure 4B-C**). TFAM notably plays the role of a ‘histone’-like protein for mitochondrial DNA {}. There was a significant augmentation of TFAM in HighSTOX1 cells at low oxygen pressure. By contrast, at 20% O₂ this was unchanged consistently with the expression values in the microarray. In order to get a quantitative estimation of this observation, we analyzed the ratio between TFAM and the mitochondrial DNA, and observed that the major modification was at 2% O₂, with High STOX1 cells, where this ratio was estimated at 3.6 fold (the ratios in all the other situations being close to 1, from 0.82 to 1.02, the reference ratio being given by Control cells in hypoxia, Figure 4D). In sum, it appears that HighSTOX1 cells have less mtDNA in hypoxic conditions, but that this DNA is highly coated by TFAM. Since TFAM is also operative in transcription {}, it suggests a possible increase of transcriptional activity.

4. Alterations of mitochondrial dynamics and mitochondrial function with STOX1 overexpression

Mitochondrial dynamics was estimated through the evaluation of transcription/replication activity using antibodies directed against POLG (POLRMT, mitochondrial-specific RNA polymerase), and a novel validated approach based on specific fluorescent probes (mREP and mTRANS) evaluating ongoing replication and transcription {Chatre, 2013}(Supplemental Figure 2). In this series of experiments we showed that hypoxia has effects exclusively on POLG expression, the protein being in this case very strongly down-regulated (XXX fold, p value) in controls as in HighSTOX1 cells. In control cells, the mTRANS marker is not modified by oxygen pressure, indicating that the low level in POLG in 'hypoxia' is not a limit for the overall transcription level. In HighSTOX1 cells, there is a ~15% higher level of mTRANS in 'normoxia'. To further analyze mitochondrial transcription, several markers of mitochondrial function and activity (16S RNA, Cytochrome Oxidase I, ATP6, CytB) were evaluated by qRT PCR without identifying strong differences, albeit some of these modifications were indeed highly statistically significant, such as a systematic decrease of 16S, COX1, CytB and ATP6 in 'normoxia' for HighSTOX1 cells, this difference being significant at 2% O₂ for COX1. Nevertheless these differences never depart by more than 10% from the control cells.

More striking differences were observed when we decided to tackle with the mitochondrial dynamics inside the cells. Specifically, DRP1 a pivotal factor for mitochondrial fusion was considerably decreased in HighSTOX1 cells exposed to 'normoxia' (Figure 5A-B). When high concentration of oxygen is compared to low concentration, control cells display a highly elevated level of DRP1 (Figure 5A-B). Conversely, HighSTOX1 cells do not show this difference, and display an opposite profile (XX fold, p<XXX). This may be related to the capability of normal trophoblast cells to cope differentially with increasing oxygen pressure in the course of normal gestation, this adaptation being altered when STOX1 level is high.

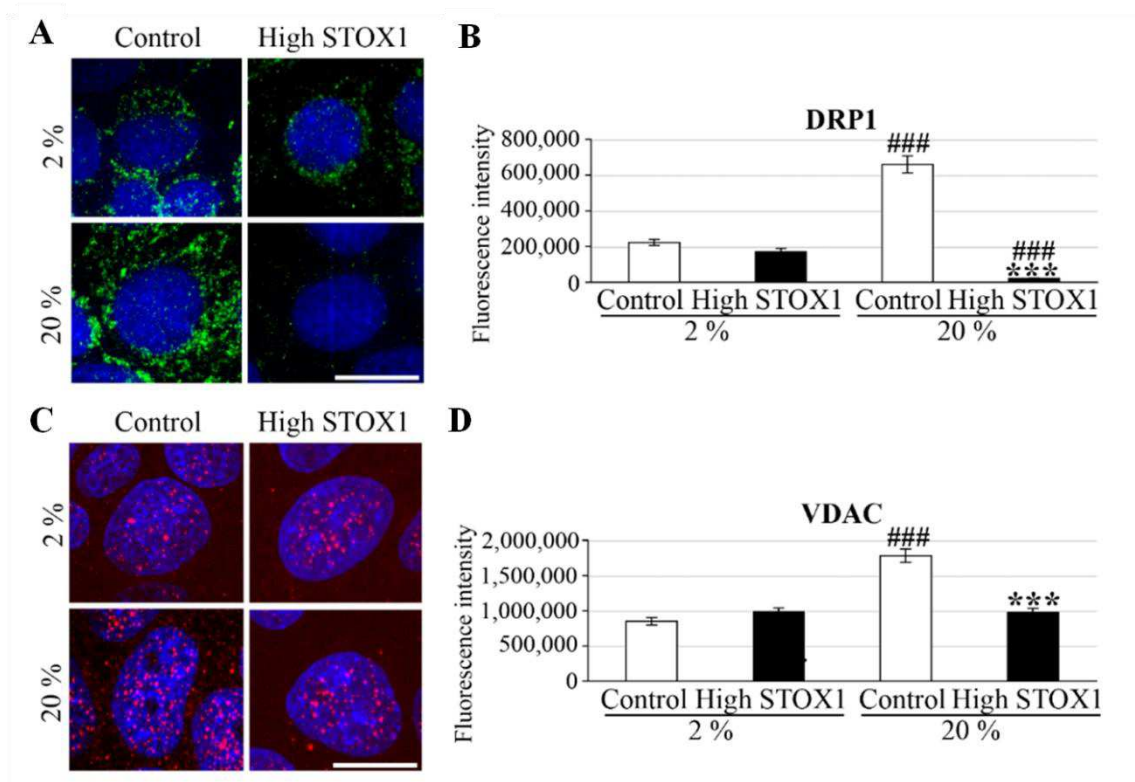


Figure 5: DRP1 and VDAC immunocytochemistry and quantification in control and HighSTOX1 cells at 2 and 20% of O₂.

- A. Immunocytochemistry with anti-DRP1 antibody
- B. DRP1 quantification per cell in the different conditions
- C. Immunocytochemistry with anti-VDAC antibody
- D. VDAC quantification per cell in the different conditions

*** p<0,001 by XXX test between Control cells and HighSTOX1 cells at the same O₂ level

p<0,001 by XXX test between 2 and 20 % O₂ in the same cell type

Mitochondrial function was further tested by evaluating the level of VDAC, an outer membrane mitochondrial specific channel acting as a flagship channel for survival and cell death signals important for mitochondria-cytoplasm metabolic exchanges, energy production, calcium signaling and caspase activation leading to apoptosis {Shoshan-Barmatz, 2012} (Figure 5C-D). In control cells, the level of VDAC is increased ~2 fold at 20% O₂. This increase is absent in High STOX1 cells.

To further characterize mitochondrial activity, TMRE (a positively charged dye that accumulates in active mitochondria and decreases in inactive mitochondria) was used to estimate the membrane potential of the mitochondria (Figure 6). We observed a lower TMRE signal in HighSTOX1 cells compared to Control cells at 20% (about 30% less). Conversely, at 2% O₂, there was a much higher TMRE signal in High STOX1 cells than in control cells (about 2.2 fold more).

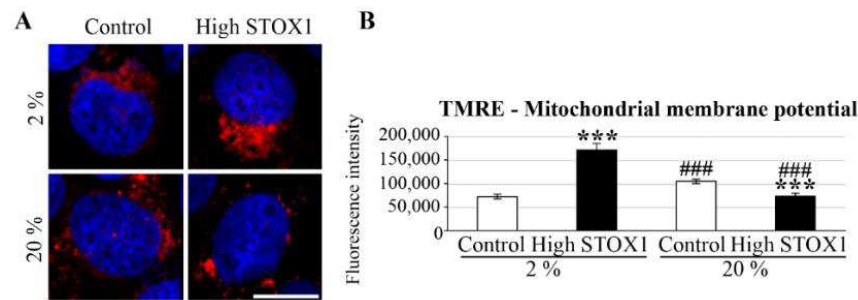


Figure 6: TMRE staining and quantification in control and HighSTOX1 cells at 2 and 20% of O₂.

A. TMRE staining (TMRE is a positively charged dye that accumulates in active mitochondria)

B. TMRE quantification per cell in the different conditions

*** p<0,001 by XXX test between Control cells and HighSTOX1 cells at the same O₂ level

p<0,001 by XXX test between 2 and 20 % O₂ in the same cell type

In Control cells, both TMRE and VDAC markers were significantly higher at 20% O₂ than at 2% O₂. This is not the case in HighSTOX1 cells; in fact for TMRE, it is even the contrary that is observed. This suggests that when cells are exposed to a higher oxygen pressure (which may correspond to the second part of pregnancy in mammals), then, cells overexpressing STOX1 are not able to adapt their mitochondrial function to an Oxygen-enriched environment. This is consistent with a chronic defect in dealing with increasing oxygen pressure which may lead to an inadequate care of free radicals when STOX1 is highly expressed.

In parallel we sought variations in O₂ consumption and respiratory capabilities of the cells, without identifying significant differences (data not shown).

5. *In vivo* analyses of free radicals and mitochondria in preeclamptic mice

We then wished to observe potential alterations of free radical equilibrium in the placentas of mice in non pathogenic crosses (♀WT x ♂WT) and in crosses where preeclampsia is induced (♀WT x ♂TgSTOX42). Crosses with TgSTOX42 male were used since the corresponding mothers display the stronger preeclamptic phenotype {Doridot, 2013}. Four WT placentas from two crosses and 7 placentas from four crosses carried out with TgSTOX42 mice were analyzed at 16.5 dpc, by immunofluorescence labeling for their content in carbonylated and nitrosylated proteins (indicative of ROS and RNS, respectively), and this for four placental regions, namely Labyrinth, Glycogen cells, Spongiotrophoblasts and Maternal cells (**Figure 7**).

The comparison between the studied compartments didn't show any difference in term of carbonylated proteins (**Figure 7A**). By contrast, Nitrosylated proteins amounts (**Figure 7B**) were different in transgenic crosses, as assessed by ANOVA (p<0.0021) followed by Post-Hoc Student-Newman-Keuls tests, that showed that Maternal cells differ from all the other compartments,

Labyrinth, Glycogen cells and Syncytiotrophoblast cells ($p=0.022$, 0.002 and 0.008 , respectively). This was true as well for non-transgenic crosses, albeit the level of nitrosylated proteins was much lower. In this case, the ANOVA test yielded a $p = 3.6 \cdot 10^{-7}$; again this difference was totally attributable to maternal cells that differed from Labyrinth, Glycogen cells and Syncytiotrophoblast cells ($p = 3.9 \cdot 10^{-7}$, $8.8 \cdot 10^{-7}$ and $1.5 \cdot 10^{-6}$, respectively).

Besides these differences, the most striking observation was between the two types of crosses that showed a plain reciprocal behavior of nitrosylated and carbonylated proteins. Carbonylated proteins (**Figure 7A**) were almost exclusively present in WT crosses and practically absent in transgenic crosses. By contrast, Nitrosylated proteins (**Figure 7B**) were at very low levels in WT crosses and extremely abundant in transgenic placentas. This drastic opposition was completely reminiscent of the behavior of the JEG-3 cells at low oxygen pressure (**Figure 2**).

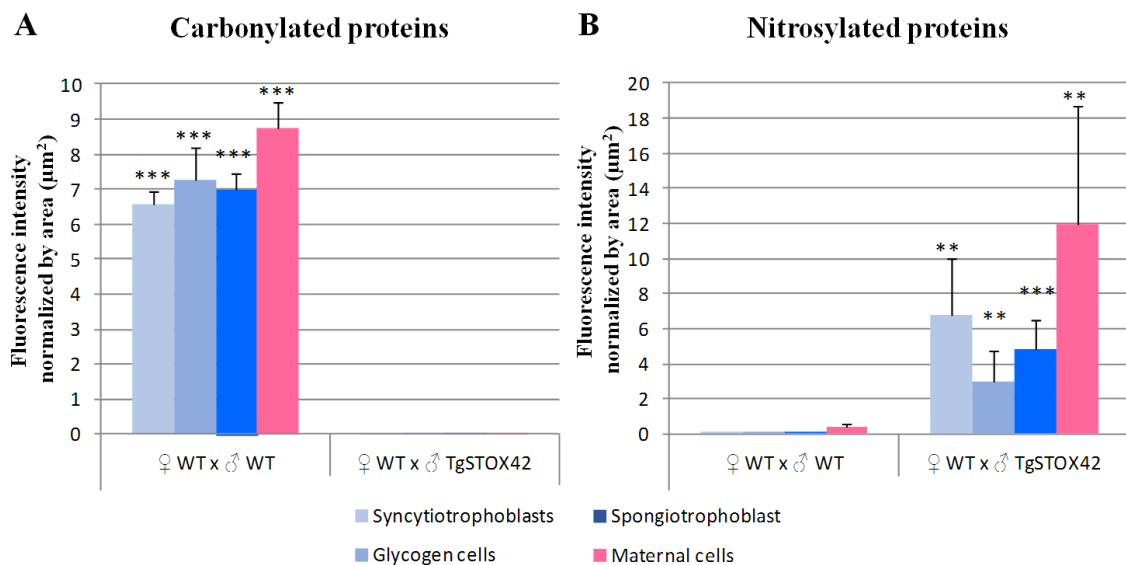


Figure 7: Carbonylated and nitrosylated protein quantity assessed in different murine placental compartments in physiological and preeclamptic gestation.

A. Carbonylated proteins quantification per μm^2

B. Nitrosylated proteins quantification per μm^2

♀WT x ♂WT : physiological gestation ; ♀WT x ♂TgSTOX42 : pathological gestation (preeclampsia)

** $p<0,01$ and *** $p<0,001$ by Post-Hoc Student-Newman-Keuls tests of pathological condition compared to physiological one.

We further analyze mitochondrial dynamics in transgenic and WT placentas using TOM22 and F-actin labeling. Some differences were found indicating a mild increase in mitochondrial mass in transgenic placentas for syncytiotrophoblasts and spongiotrophoblasts (**Supplementary Figure 3**).

Discussion

In the present study, we discovered for the first time strong links between the novel transcription factor STOX1, on the one hand, and free radical generation and mitochondrial function on the other hand. STOX1 overexpression in the mouse placenta mimics preeclampsia, a multifactorial human disease of pregnancy {Doridot, 2013; Palei, 2013}. Additionally, involvement of STOX1 in neurological diseases, especially Alzheimer's disease, has been documented {van Abel, 2012, van Dijk, 2010}. One commonality between these two extremely different pathologies may be the existence of defects in the management of oxidative stress and of free radicals {Markesbery, 1997; Smith, 2003} that could contribute to neuron death in Alzheimer's disease and to placental dysfunction in preeclampsia.

Herein, a transcriptomic analysis of STOX1 overexpressing cells revealed that many major actors of free radical scavenging were altered, such as for instance MnSOD (SOD2), peroxyredoxin and glutathione synthetases. Since much of the free radical scavenging connect with mitochondrial function {Sun, 2003; Poyton, 2009}, this prompted us to thoroughly analyze mitochondrial function and structure by a variety of methods including a recently developed approach of quantitative immunofluorescence {Chatre, 2012; Chatre, 2013}, in conditions of 'normoxia' and 'hypoxia' (20% and 2% O₂, respectively). A view of the alterations that characterize the cells are presented as a Principal Component Analysis on **Figure 8**. The initial variables were the quantitative fluorescence data for all the studied proteins and probes. The two first axes represented more than 40% of the overall variation. Along those, the different categories of cells were straightforwardly separated. Given the knowledge on the variables, the horizontal axis (22.8% of the variance) tends to oppose high ROS levels versus high RNS levels, while the vertical axis (17.2% of the variance) tends to oppose 'normoxia' versus 'hypoxia'. A possible interpretation would be that overall, Control cells in hypoxia present features that are intermediate between normoxic and hypoxic HighSTOX1 cells, suggesting that HighSTOX1 overall induce modifications similar to a hypoxic state of the cells. In the literature, it is reported that hypoxia increases oxidative stress in general {Dirmeier, 2002} and specifically in the placental context {Burton, 2004; Jauniaux, 2006; Kimura, 2013}.

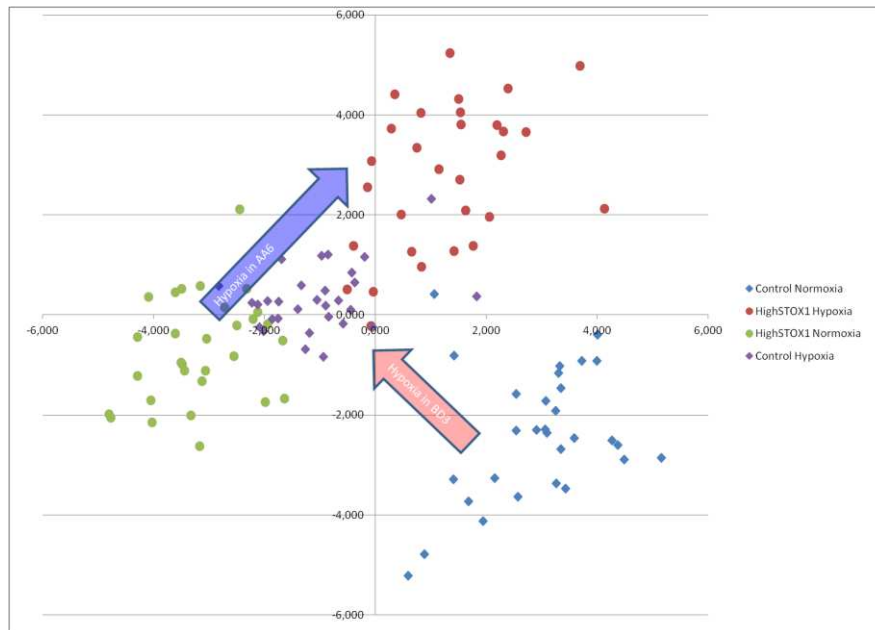


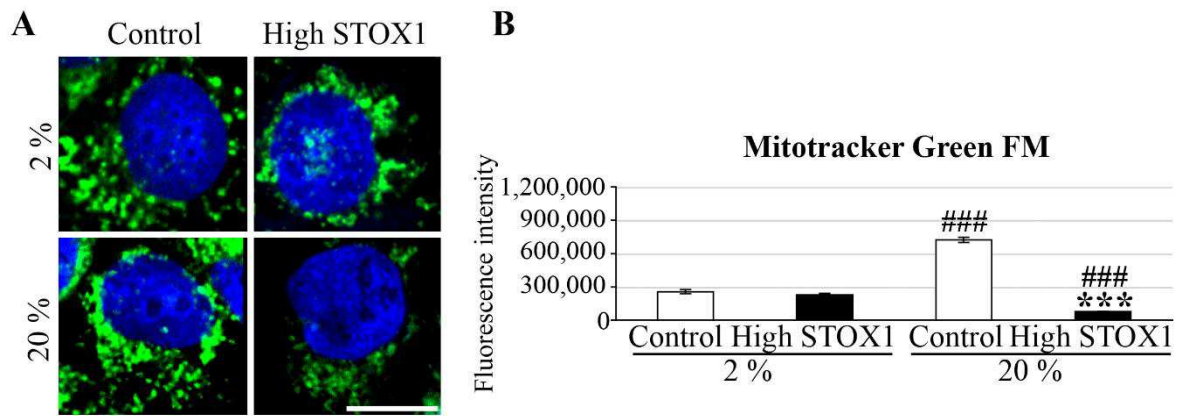
Figure 8: Principal Component Analysis on all the fluorescence data

The major discrepancy observed between control and HighSTOX1 cells was in terms of free radicals, and made a strong difference between ROS presence (materialized by the amount of carbonylated proteins {Dirmeyer, 2004; Lounifi, 2013}) and RNS presence (materialized by the amount of nitrosylated proteins). In the major part of the literature, little interest was awarded between the two types of free radicals that are generally treated as a whole {Powers, 2011; Lamb, 2011; Fransen, 2012; Domann, 2013}. Here, and for the first time to our knowledge, we show that a specific transcription factor induces discrepant O_2 -dependent consequences on ROS and RNS production, at the cell level, and most interestingly in a complex organ, the murine placenta, where up to now, RNS had never been analyzed (Figure 7). This may suggest that free radicals produced by the respiratory chain are directly used to nitrosylate proteins when STOX1 is present at a high level, while this reaction almost does not occur when STOX1 is present at a low level, then free radicals are used to carbonylate proteins. In the cells, nitrosylated proteins could also be observed in controls at high oxygen pressure. This may seem paradoxical, since the placental studies were performed near term and thus at a relatively high oxygen pressure (around 10-12% ppO₂). However, it is difficult to extrapolate directly data obtained in an established cell line to a complex organ such as the placenta. In addition, the cells were cultivated at 20% O₂, a 'hyperoxic' state compared to the term placenta. It remains nevertheless very clear that in presence of STOX1 the ROS/RNS balance is severely perturbed.

This study provides thus an idea of how STOX1 can induce a preeclamptic phenotype. Interestingly, a recent study showed that aspirin could improve mitochondrial function (Kamble et al. 2013), which is coherent with the efficiency of this molecule in our murine model of preeclampsia.

References

1. Sibai BM. Thrombophilia and severe preeclampsia: time to screen and treat in future pregnancies? *Hypertension*. 2005;46(6):1252-1253.
2. Broughton Pipkin F. Risk factors for preeclampsia. *N Engl J Med*. 2001;344(12):925-926.
3. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*. 2003;69(1):1-7.
4. Lazdam M, Davis EF, Lewandowski AJ, Worton SA, Kenworthy Y, Kelly B, Leeson P. Prevention of vascular dysfunction after preeclampsia: a potential long-term outcome measure and an emerging goal for treatment. *J Pregnancy*. 2012;2012:704146.
5. Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res*. 2002;90(12):1274-1281.
6. Heazell AE, Moll SJ, Jones CJ, Baker PN, Crocker IP. Formation of syncytial knots is increased by hyperoxia, hypoxia and reactive oxygen species. *Placenta*. 2007;28 Suppl A:S33-40.
7. Gardiner C, Tannetta DS, Simms CA, Harrison P, Redman CW, Sargent IL. Syncytiotrophoblast microvesicles released from pre-eclampsia placentae exhibit increased tissue factor activity. *PLoS One*. 2011;6(10):e26313.
8. Rajakumar A, Cerdeira AS, Rana S, Zsengeller Z, Edmunds L, Jeyabalan A, Hubel CA, Stillman IE, Parikh SM, Karumanchi SA. Transcriptionally active syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Hypertension*. 2012;59(2):256-264.
9. Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet*. 1999;354(9181):788-789.
10. Shibata E, Nanri H, Ejima K, Araki M, Fukuda J, Yoshimura K, Toki N, Ikeda M, Kashimura M. Enhancement of mitochondrial oxidative stress and up-regulation of antioxidant protein peroxiredoxin III/SP-22 in the mitochondria of human pre-eclamptic placentae. *Placenta*. 2003;24(6):698-705.
11. Wang Y, Walsh SW. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta*. 1998;19(8):581-586.
12. van Dijk M, Mulders J, Poutsma A, Konst AA, Lachmeijer AM, Dekker GA, Blankenstein MA, Oudejans CB. Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet*. 2005;37(5):514-519.
13. Rigourd V, Chauvet C, Chelbi ST, Rebourcet R, Mondon F, Letourneur F, Mignot TM, Barbaux S, Vaiman D. STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PLoS ONE*. 2008;3(12):e3905.
14. Rigourd V, Chelbi S, Chauvet C, Rebourcet R, Barbaux S, Bessieres B, Mondon F, Mignot TM, Danan JL, Vaiman D. Re-evaluation of the role of STOX1 transcription factor in placental development and preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2009.
15. Doridot L, Mehats C, Vaiman D. [Comparative analysis of mice models for preeclampsia]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2012;61(3):234-238.
16. Doridot L, Passet B, Mehats C, Rigourd V, Barbaux S, Ducat A, Mondon F, Vilotte M, Castille J, Breuiller-Fouche M, Daniel N, le Provost F, Bauchet AL, Baudrie V, Hertig A, Buffat C, Simeoni U, Germain G, Vilotte JL, Vaiman D. Preeclampsia-Like Symptoms Induced in Mice by Fetoplacental Expression of STOX1 Are Reversed by Aspirin Treatment. *Hypertension*. 2013;61:662-668.



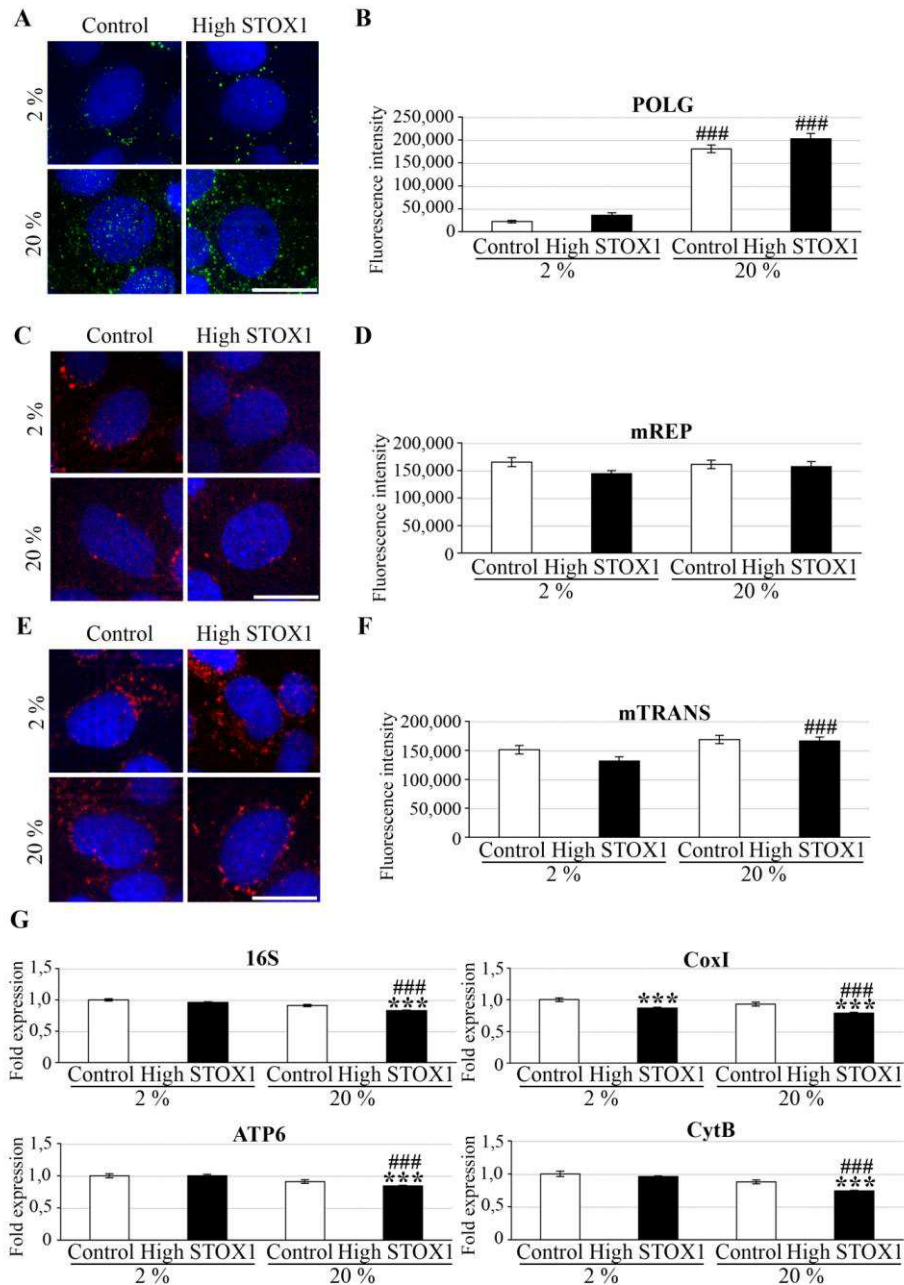
Supplementary Figure 1: Mitotracker staining and quantification, in control and HighSTOX1 cells at 2 and 20% of O₂.

A. Mitotracker staining in the different conditions

B. Mitotracker Quantification in the different conditions

*** p<0,001 by XXX test between Control cells and HighSTOX1 cells at the same O₂ level

p<0,001 by XXX test between 2 and 20 % O₂ in the same cell type



Supplementary Figure 2: Mitochondrial replication and transcription, in control and HighSTOX1 cells at 2 and 20% of O₂.

- A. POLG immunocytochemistry in the different conditions
- B. POLG quantification in the different conditions
- C. mREP staining (probe detecting replication) in the different conditions
- D. mREP quantification in the different conditions
- E. mTRANS staining (probe detecting transcription) in the different conditions
- F. mTRANS quantification in the different conditions
- G. RT-qPCR on mitochondrial transcripts (16S, Cox1, ATP6 and CytB) normalized by SDHA expression in the different conditions

*** p<0,001 by XXX test between Control cells and HighSTOX1 cells at the same O₂ level

p<0,001 by XXX test between 2 and 20 % O₂ in the same cell type

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Bilan des principaux résultats obtenus

L'aboutissement principal de ce travail de thèse est sans conteste **l'obtention du premier modèle murin de prééclampsie sévère**. Cependant, la difficulté que nous avons rencontrée pour faire publier ce travail (un an et demi entre la première soumission et l'acceptation) a grandement ralenti notre exploration des causes du syndrome chez ces souris.

En résumé, nous avons obtenu **deux lignées indépendantes** de souris transgéniques (avec un fonds génétique FVB/N) **surexprimant STOX1 humain** : la lignée TgSTOX13, qui exprime le transgène à un niveau comparable au *Stox1* murin endogène, et la lignée TgSTOX42, qui l'exprime 13 fois plus. Lorsque des souris femelles non-transgéniques sont croisées avec des mâles transgéniques (ce qui permet la restriction de l'expression du transgène à la sphère fœto-maternelle), elles développent **un syndrome prééclamptique sévère** : au cours de la gestation, elles présentent une hypertension sévère (Pression Artérielle Systolique > 160 mmHg) et une protéinurie. De plus, on observe des anomalies histologiques marquées au niveau du rein, notamment avec des dépôts de fibrine caractéristiques de la prééclampsie. On observe également une élévation de **marqueurs sériques de la prééclampsie spécifiquement impliqués dans l'angiogénèse** (les récepteurs solubles du VEGF et de l'Endogline, respectivement **sFlt1 et sEng**). Les modifications physiopathologiques observées chez les souris surexprimant STOX1 étant semblables à celles de la prééclampsie humaine, il est fort probable que des mécanismes à l'origine de l'établissement de ce syndrome soient communs. Ce modèle est donc à notre connaissance le seul modèle de prééclampsie sévère chez les rongeurs, et constitue un atout unique pour **déchiffrer de nouvelles voies impliquées dans la physiopathologie de la prééclampsie**, et pour **tester de nouvelles approches thérapeutiques**.

En allant plus loin dans la caractérisation phénotypique de ces souris prééclamptiques, nous avons mis en évidence des **marqueurs d'hypertrophie cardiaque**, ce qui est cohérent avec la forte hypertension détectée. Les résultats sur les cellules endothéliales apporteront sans aucun doute une meilleure appréciation de l'altération cardio-vasculaire.

Concernant l'impact de la **surexpression de STOX1 sur les fœtus** et en particulier leur croissance, il serait particulièrement intéressant **d'explorer les gènes soumis à empreinte** et ce, de manière dynamique. En effet, nous avons pu observer une différence en fonction du sens du croisement (père ou mère transgénique) avec une surcroissance foetale

uniquement lorsque le transgène est d'origine paternelle. Ceci suggère que STOX1 pourrait réguler d'autres gènes soumis à empreinte et que son expression précoce lors de l'activation du génôme paternel au stade zygote (qui a lieu avant celle du génôme maternelle) (*Adenot et al., 1997*) pourrait initier une cascade de dérégulation sur le réseau des gènes soumis à empreinte (ces gènes fonctionnent en effet de façon non indépendante au sein d'un réseau interconnecté (*Fauque et al., 2010*)) avec pour conséquence **un déséquilibre de la balance entre les besoins fœtaux et leur limitation pour la préservation l'organisme maternelle.**

Enfin, nous avons cherché à **mieux comprendre ce que faisait STOX1 dans les cellules trophoblastiques**, grâce à l'utilisation du **modèle cellulaire** développé au cours de la thèse de Virginie Rigourd : des cellules JEG-3 stablement transfectées avec un vecteur pCMX-STOX1A. Nous avons ainsi mis en évidence un **déséquilibre très marqué des radicaux libres** (de l'oxygène et de l'azote), ainsi qu'une **modification de la structure et de l'activité mitochondriale** en sein de ces cellules. En étudiant ces cellules dans différents contextes de pression partielle en oxygène (2% O₂ et 20 % O₂), ce qui ressort de façon répétée, c'est que les cellules surexprimant STOX1 ne présentent pas le même profil entre 2% et 20% d' O₂ que les cellules contrôles, et parfois même arborent un profil opposé. Ceci suggère **une incapacité de ces cellules surexprimant STOX1 à répondre de façon adéquate à une pression en oxygène élevée**. De plus, les **altérations des radicaux libres** sont également retrouvées *in vivo* **dans des placentas de souris prééclampsiques**. Cela pourrait être le mécanisme ou un des mécanismes par lequel/lesquels STOX1 induit un phénotype prééclampsique dans ces souris.

II. Le modèle murin STOX1

1. Comprendre comment le syndrome se développe dans nos souris

Dans le modèle murin que nous avons développé, on peut constater que **l'apparition du syndrome est très précoce**. En effet, l'hypertension apparaît **dès 4 jours après l'accouplement**, et la protéinurie (estimée via le rapport albumine/créatinine) est déjà significativement augmentée à la mi-gestation (E8,5-E12,5). De part cette précocité et la sévérité de l'hypertension, notre modèle est vraiment unique. Chez la femme, la prééclampsie se développe la plupart du temps tardivement, et dans les cas les plus précoces au cours du 2nd trimestre de grossesse. On pourrait y voir une dissociation de la pathologie humaine et du

syndrome murin, mais ce n'est pas forcément le cas. En effet, il faut prendre en compte 2 éléments : 1) les femmes qui vont développer une prééclampsie ont une pression artérielle au cours du 1^{er} trimestre plus élevée que les femmes qui auront une grossesse normale, indiquant ainsi probablement la mise en place du syndrome au cours de ce 1^{er} trimestre ; 2) la prééclampsie peut apparaître exceptionnellement de façon très précoce avec un cas décrit avant 15 semaines d'aménorrhée (*Imasawa et al., 2006*). **Ce modèle murin constitue donc plutôt le cas extrême de la pathologie avec un développement très précoce.**

Ces éléments remettent en cause le modèle selon lequel c'est le défaut d'invasion des artères spiralées utérines qui est responsable du syndrome maternel, puisque ce remodelage ne se termine qu'à la fin du 1^{er} trimestre. Ce modèle avait déjà été discuté suite à l'observation d'une absence d'hypertension en cas d'absence de remodelage des artères spiralée utérine chez la souris (*Croy et al., 2011*).

Dans notre modèle murin, l'apparition précoce de l'hypertension artérielle au cours de la gestation (avant l'implantation) suggère **un impact du blastocyste et/ou du liquide séminal**. Une seconde élévation de la pression artérielle est visible en fin de gestation. Ainsi, dans ce modèle, il pourrait y avoir un message précoce de l'unité fœto-placentaire et/ou du sperme dans un contexte de gestation vers l'organisme maternelle contrôlant l'hypertension précoce, suivi d'une aggravation due à l'augmentation de la demande fœtale en fin de gestation.

Ces hypothèses peuvent être explorées par diverses approches, telles que l'analyse transcriptomique de blastocystes transgéniques, l'implantation de blastocystes transgéniques dans des receveuses sauvages (pas d'accouplement, donc pas d'effet du sperme) ou l'utilisation de mâles transgéniques STOX1 vasectomisés (test de l'effet du liquide séminal).

Concernant les **facteurs responsables du syndrome maternel**, une **analyse protéomique** et un **profil cytokinique** pourrait être réalisés sur le sérum de souris sauvages croisées avec des mâles transgéniques (« souris prééclampsique » pour la suite de cette discussion), à différents moments de la gestation. Afin de confirmer que des facteurs circulants sont bien à l'origine du syndrome, du plasma de souris prééclampsiques pourrait être injecté à des souris sauvages, gestantes ou non.

Ces **analyses des facteurs circulants** pourront être réalisées de façon longitudinale afin de trouver de **nouveaux marqueurs précoces**, qui pourront être de bons candidats pour un diagnostic précoce.

L'analyse transcriptomique de placentas transgéniques et sauvages (à E16,5, Article 2) a révélée la dérégulation de voies impliquées dans l'immunité et l'auto-immunité. Il semble donc particulièrement intéressant de regarder ce qui se passe d'un point de vue de l'immunité au cours du développement placentaire au niveau utérin. En particulier, il faudrait **rechercher s'il y a une altération du dialogue entre les trophoblastes et les cellules immunitaires** (uNK, Treg) au niveau de la décidue, et ce, de façon dynamique au cours de la mise en place du placenta.

2. Tester des thérapeutiques innovantes

Le modèle murin que nous avons développé se prête particulièrement bien au test de thérapeutiques. En effet, les souris sauvages développent les symptômes prééclamptiques à chaque gestation si elles sont croisées avec un mâle transgénique. Nous avons ainsi pu montrer qu'un traitement dès le jour de la conception et tout au long de la gestation avec de **l'aspirine à faible dose était très efficace**, puisqu'aucune hypertension gestationnelle n'était observée en cas de traitement, tandis que les autres symptômes (protéinurie, dépôt de fibrine au niveau des glomérules rénaux) étaient grandement améliorés.

Ce modèle pourrait donc servir à **améliorer les traitements disponibles et à en tester de nouveaux.** Ainsi, l'aspirine à faible dose pourrait n'être administré qu'en début de gestation, pendant la phase d'organogénèse du placenta, et l'on pourrait ainsi voir si un traitement précoce est suffisant. De même pour les autres traitements, si un traitement sur l'ensemble de la gestation fonctionne, deux périodes d'administration pourraient être alors comparées : du début à la mi-gestation et de la mi-gestation à la fin de la gestation. Cela permettrait de trouver **des traitements permettant de prévenir les symptômes et/ou de les faire disparaître après leur apparition** (ce qui constitue sans doute le graal, puisqu'on pourrait ne traiter que les patientes qui le nécessitent, contrairement aux traitements préventifs).

Les traitements qui pourraient être testés peuvent être classés en 5 catégories : les antiagrégants plaquettaires, les anti-hypertenseurs, les vasodilatateurs, les statines (anti-

cholestérolémiant) et les immuno-modulateurs. Ainsi, le clopidogrel, un **antiagrégant plaquettaire** agissant en bloquant un récepteur à l'ADP de la membrane des plaquettes, pourrait être testé, puisqu'il est utile pour prévenir les lésions rénales d'ischémie/reperfusion chez la souris (*Hu et al., 2011*). Concernant les **anti-hypertenseurs**, ceux qui sont actuellement évalués (hydralazine et hydrochlorothiazide) pour la prééclampsie pourraient être testés afin de renforcer les données cliniques en cours d'obtention, et apporter des informations sur les mécanismes d'action. Ainsi, l'hydralazine améliorerait les taux de NO maternel (*Teran et al., 2012*), cela pourrait être facilement évalué chez la souris. Pour les **vasodilatateurs**, la prostacycline constitue un bon candidat puisque de récentes données suggèrent son effet bénéfique possible dans la prééclampsie (*Yamamoto et al., 2010*). De plus, des inhibiteurs de la prostaglandine G2 et donc de son métabolite, la prostacycline, tel que le Tylenol (acétaminophène), sont associés à un risque accru de prééclampsie (*Rebordosa et al., 2010*). L'effet de donneurs de NO pourra également être examiné, puisqu'il est bien démontré que le niveau sérique de NO est diminué en cas de prééclampsie (*Dai et al., 2013*). En ce qui est des **traitements anti-cholestérolémiants**, la pravastatine a été utilisée et a montré une bonne efficacité dans les autres modèles murins de prééclampsie (*Ahmed et al., 2010; Kumasawa et al., 2011; Singh et al., 2011*), tandis que des données obtenues sur des cellules endothéliales suggèrent un potentiel effet bénéfique de la simvastatin (*Al-Ani et al., 2010*). Cependant, avec les statines, il faut rester prudent, étant donné les effets secondaires sérieux décrits sur les muscles après des prises chroniques (*Mansi and Mortensen, 2013; Parker and Thompson, 2012*). Néanmoins, la pravastatine constitue une piste intéressante, car contrairement à d'autres membres des statines, elle est hydrophile et ainsi moins susceptible de passer la barrière placentaire. Enfin, des **approches immuno-modulatrices** pourraient être tentées. En effet, l'inhibiteur du complément (CR2-Crry) a un effet bénéfique dans le modèle CBA/J x DBA2 (*Qing et al., 2011*). De plus, la silibinine (le principal élément de la silymarine, un extrait poly-phénolique obtenu à partir des fruits et des graines de *Silybum marianum*) a des activités hépato-protectrice et anti-inflammatoire et a montré des capacités à limiter l'hypersensibilité des globules blancs périphériques des femmes prééclamptiques à des stimuli pro-inflammatoires (*Giorgi et al., 2012*).

Ces souris prééclamptiques, avec leur **phénotype très marqué**, sont donc un **outil puissant pour tester de nouvelles approches thérapeutiques** (seules ou en combinaison) puisqu'elles permettront de détecter une amélioration, même si celle-ci est modérée.

3. Explorer les conséquences à long terme

La prééclampsie a également des conséquences à long terme chez les mères (voir Introduction, Chapitre 2, I-2). Ainsi, les femmes ayant eu une prééclampsie ont des risques accrus de développer des **maladies cardiovasculaires** (*Lykke et al., 2009*) et des **insuffisances rénales** (*Vikse et al., 2008*). Ces risques pourraient être liés à des modifications épigénétiques se mettant en place au cours de la prééclampsie.

Le modèle murin STOX1 constitue là encore un outil de choix pour tester cette hypothèse. Ainsi, **des anomalies épigénétiques** (notamment la méthylation de l'ADN) pourront être cherchées plusieurs mois après la gestation prééclamptique dans les reins, le cœur et les cellules endothéliales. Cela permettra peut être l'obtention de candidats sur lesquels agir pour limiter les conséquences à long terme de la prééclampsie.

III. STOX1

STOX1 est un gène exprimé de façon ubiquitaire, et bien conservé au cours de l'évolution puisqu'on lui retrouve des homologues chez tous les vertébrés, même non placentaires. Ceci suggère un rôle plus général de ce facteur de transcription au niveau cellulaire. En ce sens, il est intéressant de noter que son expression est plus élevée dans le placenta et le cerveau et que STOX1 a également été décrit comme possiblement impliqué dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (*Van Abel et al., 2011, 2012; Van Dijk et al., 2010b*). Au vu de nos observations sur les radicaux libres et la fonction mitochondriale, cela fait particulièrement sens, puisque la dysfonction mitochondriale et le déséquilibre de gestion des radicaux libres seraient primordiaux dans les maladies neurodégénératives (*Federico et al., 2012*).

Ce gène ayant été jusqu'ici très peu étudié, il est probable que de nouvelles informations sur sa/ses fonction(s) vont émerger au cours des années à venir.

De plus, il existe chez l'humain, un paralogue de STOX1 : STOX2, dont les fonctions n'ont encore jamais été étudiées, mais qui pourrait en partager certaines avec STOX1. La seule information disponible à propos de STOX2 est sa plus faible expression dans du tissu décidual de grossesses compliquées par une prééclampsie et/ou un retard de croissance comparée à du tissu décidual de grossesses normales (*Fenstad et al., 2010a*).

IV. Conclusion

Ce travail constitue le résultat de **4 années passionnantes** dans le laboratoire du Dr Daniel Vaiman. J'y ai découvert le petit monde du placenta, et cela m'a ouvert **énormément de perspectives**, car cet organe transitoire permet d'appréhender de nombreux domaines, tels que la biologie du développement, l'épigénétique, la génétique, la physiologie, l'immunologie. J'ai eu la chance de participer à la caractérisation du 1^{er} modèle murin de prééclampsie sévère, ce qui m'a valu des **retours très positifs aux différents congrès** auxquels j'ai eu la chance d'intervenir (Annexe 5).

J'espère sincèrement que ce travail continuera et aboutira à une **meilleure compréhension de la physiopathologie de la prééclampsie**, ainsi qu'à une **évolution favorable de la prise en charge** des patientes.

RÉFÉRENCES

- Abadía-Molina, A.C., Ruiz, C., Montes, M.J., King, A., Loke, Y.W., and Olivares, E.G. (1996). Immune phenotype and cytotoxic activity of lymphocytes from human term decidua against trophoblast. *J. Reprod. Immunol.* *31*, 109–123.
- Van Abel, D., Hölzel, D.R., Jain, S., Lun, F.M.F., Zheng, Y.W.L., Chen, E.Z., Sun, H., Chiu, R.W.K., Lo, Y.M.D., Van Dijk, M., et al. (2011). SFRS7-mediated splicing of tau exon 10 is directly regulated by STOX1A in glial cells. *PLoS ONE* *6*, e21994.
- Van Abel, D., Abdulhamid, O., Scheper, W., Van Dijk, M., and Oudejans, C.B.M. (2012). STOX1A induces phosphorylation of tau proteins at epitopes hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* *528*, 104–109.
- Abitbol, C.L., and Rodriguez, M.M. (2012). The long-term renal and cardiovascular consequences of prematurity. *Nat Rev Nephrol* *8*, 265–274.
- Adamson, S.L., Lu, Y., Whiteley, K.J., Holmyard, D., Hemberger, M., Pfarrer, C., and Cross, J.C. (2002). Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev. Biol.* *250*, 358–373.
- Adenot, P.G., Mercier, Y., Renard, J.P., and Thompson, E.M. (1997). Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development* *124*, 4615–4625.
- Adjaye, J., Huntriss, J., Herwig, R., BenKahla, A., Brink, T.C., Wierling, C., Hultschig, C., Groth, D., Yaspo, M.-L., Picton, H.M., et al. (2005). Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. *Stem Cells* *23*, 1514–1525.
- Aghajafari, F., Nagulesapillai, T., Ronksley, P.E., Tough, S.C., O'Beirne, M., and Rabi, D.M. (2013). Association between maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and pregnancy and neonatal outcomes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ* *346*, f1169.
- Ahmed, A., Singh, J., Khan, Y., Seshan, S.V., and Girardi, G. (2010). A new mouse model to explore therapies for preeclampsia. *PLoS ONE* *5*, e13663.
- Akolekar, R., Syngelaki, A., Beta, J., Kocylowski, R., and Nicolaides, K.H. (2009). Maternal serum placental protein 13 at 11-13 weeks of gestation in preeclampsia. *Prenat. Diagn.* *29*, 1103–1108.
- Akolekar, R., De Cruz, J., Foidart, J.-M., Munaut, C., and Nicolaides, K.H. (2010). Maternal plasma soluble fms-like tyrosine kinase-1 and free vascular endothelial growth factor at 11 to 13 weeks of gestation in preeclampsia. *Prenat. Diagn.* *30*, 191–197.
- Akolekar, R., Veduta, A., Minekawa, R., Chelemen, T., and Nicolaides, K.H. (2011). Maternal plasma P-selectin at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Pregnancy* *30*, 311–321.
- Al-Ani, B., Hewett, P.W., Cudmore, M.J., Fujisawa, T., Saifeddine, M., Williams, H., Ramma, W., Sissaoui, S., Jayaraman, P.-S., Ohba, M., et al. (2010). Activation of proteinase-activated receptor 2 stimulates soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 release via epidermal growth factor receptor transactivation in endothelial cells. *Hypertension* *55*, 689–697.
- Almog, B., Shalom-Paz, E., Dufort, D., and Tulandi, T. (2010). Promoting implantation by local injury to the endometrium. *Fertil. Steril.* *94*, 2026–2029.
- Alsat, E., Malassine, A., Tarrade, A., Merviel, P., and Evain-Brion, D. (1999). Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste. *MS. Médecine sciences* *15*, 1236–1243.
- Anderson, U.D., Olsson, M.G., Rutardóttir, S., Centlow, M., Kristensen, K.H., Isberg, P.E., Thilaganathan, B., Akerström, B., and Hansson, S.R. (2011). Fetal hemoglobin and α 1-microglobulin as first- and early second-trimester predictive biomarkers for preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *204*, 520.e1–5.
- Anderson, U.D., Olsson, M.G., Kristensen, K.H., Åkerström, B., and Hansson, S.R. (2012). Review: Biochemical markers to predict preeclampsia. *Placenta* *33 Suppl*, S42–47.
- Anson-Cartwright, L., Dawson, K., Holmyard, D., Fisher, S.J., Lazzarini, R.A., and Cross, J.C. (2000). The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat. Genet.* *25*, 311–314.

- Aplin, J.D. (1991). Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J. Cell. Sci.* 99 (Pt 4), 681–692.
- Aplin, J.D., Jones, C.J.P., and Harris, L.K. (2009). Adhesion molecules in human trophoblast - a review. I. Villous trophoblast. *Placenta* 30, 293–298.
- Arngrímsson, R., Sigurðardóttir, S., Frigge, M.L., Bjarnadóttir, R.I., Jónsson, T., Stefánsson, H., Baldursdóttir, A., Einarsdóttir, A.S., Palsson, B., Snorradóttir, S., et al. (1999). A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2p13. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1799–1805.
- Ashton, S.V., Whitley, G.S.J., Dash, P.R., Wareing, M., Crocker, I.P., Baker, P.N., and Cartwright, J.E. (2005). Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 102–108.
- Auer, J., Camoin, L., Guillonneau, F., Rigourd, V., Chelbi, S.T., Leduc, M., Laparre, J., Mignot, T.-M., and Vaiman, D. (2010). Serum profile in preeclampsia and intra-uterine growth restriction revealed by iTRAQ technology. *J Proteomics* 73, 1004–1017.
- Ayala, D.E., Uceda, R., and Hermida, R.C. (2012). Chronotherapy With Low-Dose Aspirin for Prevention of Complications in Pregnancy. *Chronobiol. Int.*
- Bachour, A., Teramo, K., Hiilesmaa, V., and Maasilta, P. (2008). Increased plasma levels of inflammatory markers and upper airway resistance during sleep in pre-eclampsia. *Sleep Med.* 9, 667–674.
- Baggott, L.M. (1997). *Human Reproduction* (Cambridge University Press).
- Bai, Y., Yang, W., Yang, H., Liao, Q., Ye, G., Fu, G., Ji, L., Xu, P., Wang, H., Li, Y., et al. (2012). Downregulated miR-195 detected in preeclamptic placenta affects trophoblast cell invasion via modulating ActRIIA expression. *PLoS ONE* 7, e38875.
- Bakhti, A., and Vaiman, D. (2011). Prevention of gravidic endothelial hypertension by aspirin treatment administered from the 8th week of gestation. *Hypertens. Res.* 34, 1116–1120.
- Bany, B.M., and Cross, J.C. (2006). Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization. *Dev. Biol.* 294, 445–456.
- Barak, Y., Nelson, M.C., Ong, E.S., Jones, Y.Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K.R., Koder, A., and Evans, R.M. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* 4, 585–595.
- Barboux, S., Gascoïn-Lachambre, G., Buffat, C., Monnier, P., Mondon, F., Tonanny, M.-B., Pinard, A., Auer, J., Bessières, B., Barlier, A., et al. (2012). A genome-wide approach reveals novel imprinted genes expressed in the human placenta. *Epigenetics* 7, 1079–1090.
- Barraud-Lange, V., Naud-Barriant, N., Bomsel, M., Wolf, J.-P., and Ziyat, A. (2007). Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *FASEB J.* 21, 3446–3449.
- Barrientos, G., Tirado-González, I., Freitag, N., Kobelt, P., Moschansky, P., Klapp, B.F., Thijssen, V.L.J.L., and Blois, S.M. (2012). CXCR4(+) Dendritic cells promote angiogenesis during embryo implantation in mice. *Angiogenesis.*
- Basso, O., Rasmussen, S., Weinberg, C.R., Wilcox, A.J., Irgens, L.M., and Skjaerven, R. (2006). Trends in fetal and infant survival following preeclampsia. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 296, 1357–1362.
- Baumann, M.U., Bersinger, N.A., Mohaupt, M.G., Raio, L., Gerber, S., and Surbek, D.V. (2008). First-trimester serum levels of soluble endoglin and soluble fms-like tyrosine kinase-1 as first-trimester markers for late-onset preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 266.e1–6.
- Benbassa, A., Bouvier-Colle, M., Connehaye, P., Fillette, D., Joly, J., Jouglu, E., Keller, M.J., Lacombe, C., Mascart, M., and Mercier, F. (2006). Rapport du comité national d'experts sur la mortalité maternelle (CNEMM).
- Benson, G.V., Lim, H., Paria, B.C., Satokata, I., Dey, S.K., and Maas, R.L. (1996). Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 122, 2687–2696.

- Berends, A.L., Bertoli-Avella, A.M., De Groot, C.J.M., Van Duijn, C.M., Oostra, B.A., and Steegers, E.A.P. (2007). STOX1 gene in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *BJOG* *114*, 1163–1167.
- Bergmann, A., Ahmad, S., Cudmore, M., Gruber, A.D., Wittschen, P., Lindenmaier, W., Christofori, G., Gross, V., Gonzalves, A.C. da C., Gröne, H.-J., et al. (2010). Reduction of circulating soluble Flt-1 alleviates preeclampsia-like symptoms in a mouse model. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 1857–1867.
- Bernardi, F., Constantino, L., Machado, R., Petronilho, F., and Dal-Pizzol, F. (2008). Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in pre-eclamptic women. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* *34*, 957–963.
- Bhattacharya, S., and Campbell, D.M. (2005). The incidence of severe complications of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* *24*, 181–190.
- Bilinski, M.J., Thorne, J.G., Oh, M.J., Leonard, S., Murrant, C., Tayade, C., and Croy, B.A. (2008). Uterine NK cells in murine pregnancy. *Reprod. Biomed. Online* *16*, 218–226.
- Bills, V.L., Varet, J., Millar, A., Harper, S.J., Soothill, P.W., and Bates, D.O. (2009). Failure to up-regulate VEGF165b in maternal plasma is a first trimester predictive marker for pre-eclampsia. *Clin. Sci.* *116*, 265–272.
- Bischof, P. (2001). Endocrine, paracrine and autocrine regulation of trophoblastic metalloproteinases. *Early Pregnancy* *5*, 30–31.
- Blois, S.M., Tirado-González, I., Wu, J., Barrientos, G., Johnson, B., Warren, J., Freitag, N., Klapp, B.F., Irmak, S., Ergun, S., et al. (2012). Early expression of pregnancy-specific glycoprotein 22 (PSG22) by trophoblast cells modulates angiogenesis in mice. *Biol. Reprod.* *86*, 191.
- Bora, N.S., Jha, P., and Bora, P.S. (2008). The role of complement in ocular pathology. *Seminars in Immunopathology* *30*, 85–95.
- Boseret, J.-P. (2010). Bio web: cours de bio en ligne.
- Bosio, P.M., Cannon, S., McKenna, P.J., O’Herlihy, C., Conroy, R., and Brady, H. (2001). Plasma P-selectin is elevated in the first trimester in women who subsequently develop pre-eclampsia. *BJOG* *108*, 709–715.
- Boucoiran, I., Suarthana, E., Rey, E., Delvin, E., Fraser, W.B., and Audibert, F. (2013). Repeated Measures of Placental Growth Factor, Placental Protein 13, and A Disintegrin and Metalloprotease 12 at First and Second Trimesters for Preeclampsia Screening. *Am J Perinatol.*
- Le Bouteiller, P., and Blaschitz, A. (1999). The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol. Rev.* *167*, 233–244.
- Le Bouteiller, P., Pizzato, N., Barakonyi, A., and Solier, C. (2003). HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. *J. Reprod. Immunol.* *59*, 219–234.
- Boyd, P.A., Lindenbaum, R.H., and Redman, C. (1987). Pre-eclampsia and trisomy 13: a possible association. *Lancet* *2*, 425–427.
- Braga, V.M., and Gendler, S.J. (1993). Modulation of Muc-1 mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. *J. Cell. Sci.* *105 (Pt 2)*, 397–405.
- Brockelsby, J.C., Anthony, F.W., Johnson, I.R., and Baker, P.N. (2000). The effects of vascular endothelial growth factor on endothelial cells: a potential role in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *182*, 176–183.
- Brosens, I. (1964). A study of the spiral arteries of the decidua basalis in normotensive and hypertensive pregnancies. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* *71*, 222–230.
- Burkart, A.D., Xiong, B., Baibakov, B., Jiménez-Movilla, M., and Dean, J. (2012). Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. *J. Cell Biol.* *197*, 37–44.
- Burton, G.J., Charnock-Jones, D.S., and Jauniaux, E. (2009). Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction* *138*, 895–902.
- Buurma, A., Cohen, D., Veraar, K., Schonkeren, D., Claas, F.H., Bruijn, J.A., Bloemenkamp, K.W., and Baelde, H.J. (2012). Preeclampsia is characterized by placental complement dysregulation. *Hypertension* *60*, 1332–1337.

- Buurma, A.J., Turner, R.J., Driessen, J.H.M., Mooyaart, A.L., Schoones, J.W., Bruijn, J.A., Bloemenkamp, K.W.M., Dekkers, O.M., and Baelde, H.J. (2013). Genetic variants in pre-eclampsia: a meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*.
- Cáceres, M., and Thomas, J.W. (2006). The gene of retroviral origin Syncytin 1 is specific to hominoids and is inactive in Old World monkeys. *J. Hered.* *97*, 100–106.
- Calicchio, R., Doridot, L., Miralles, F., Méhats, C., and Vaiman, D. (sous presse). Dna Methylation, an Epigenetic mode of Gene Expression Regulation in Reproductive Science. CPD.
- Caniggia, I., Grisaru-Gravnosky, S., Kuliszewsky, M., Post, M., and Lye, S.J. (1999). Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J. Clin. Invest.* *103*, 1641–1650.
- Caniggia, I., Mostachfi, H., Winter, J., Gassmann, M., Lye, S.J., Kuliszewski, M., and Post, M. (2000). Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J. Clin. Invest.* *105*, 577–587.
- Carbillon, L. (2012). First trimester uterine artery Doppler for the prediction of preeclampsia and foetal growth restriction. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* *25*, 877–883.
- Carbillon, L., Challier, J.C., Alouini, S., Uzan, M., and Uzan, S. (2001). Uteroplacental circulation development: Doppler assessment and clinical importance. *Placenta* *22*, 795–799.
- Carlino, C., Stabile, H., Morrone, S., Bulla, R., Soriani, A., Agostinis, C., Bossi, F., Mocci, C., Sarazani, F., Tedesco, F., et al. (2008). Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. *Blood* *111*, 3108–3115.
- Carroll, V.A., and Ashcroft, M. (2005). HIF-1a regulation by proline hydroxylation. *Expert Reviews in Molecular Medicine* *7*.
- Cartwright, J.E., Kenny, L.C., Dash, P.R., Crocker, I.P., Aplin, J.D., Baker, P.N., and Whitley, G.S.J. (2002). Trophoblast invasion of spiral arteries: a novel in vitro model. *Placenta* *23*, 232–235.
- Carty, D.M., Anderson, L.A., Freeman, D.J., Welsh, P.I., Brennand, J.E., Dominiczak, A.F., and Delles, C. (2012). Early pregnancy soluble E-selectin concentrations and risk of preeclampsia. *J. Hypertens.* *30*, 954–959.
- Castellucci, M., Scheper, M., Scheffen, I., Celona, A., and Kaufmann, P. (1990). The development of the human placental villous tree. *Anat. Embryol.* *181*, 117–128.
- Caughey, A.B., Stotland, N.E., Washington, A.E., and Escobar, G.J. (2005). Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. *Obstet Gynecol* *106*, 156–161.
- Centre de Référence sur les Agents Tératogènes (2013). Les antihypertenseurs au cours de la grossesse.
- Cerón-Mireles, P., Harlow, S.D., Sánchez-Carrillo, C.I., and Núñez, R.M. (2001). Risk factors for pre-eclampsia/eclampsia among working women in Mexico City. *Paediatr Perinat Epidemiol* *15*, 40–46.
- Chai, N., Patel, Y., Jacobson, K., McMahon, J., McMahon, A., and Rappolee, D.A. (1998). FGF is an essential regulator of the fifth cell division in preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* *198*, 105–115.
- Charalambous, F., Elia, A., and Georgiades, P. (2012). Decidual spiral artery remodeling during early post-implantation period in mice: investigation of associations with decidual uNK cells and invasive trophoblast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *417*, 847–852.
- Chatterjee, P., Chiasson, V.L., Kopriva, S.E., Young, K.J., Chatterjee, V., Jones, K.A., and Mitchell, B.M. (2011). Interleukin 10 deficiency exacerbates toll-like receptor 3-induced preeclampsia-like symptoms in mice. *Hypertension* *58*, 489–496.
- Chavarría, M.E., Lara-González, L., González-Gleason, A., Sojo, I., and Reyes, A. (2002). Maternal plasma cellular fibronectin concentrations in normal and preeclamptic pregnancies: a longitudinal study for early prediction of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *187*, 595–601.

- Chavarría, M.E., Lara-González, L., González-Gleason, A., García-Paleta, Y., Vital-Reyes, V.S., and Reyes, A. (2003). Prostacyclin/thromboxane early changes in pregnancies that are complicated by preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *188*, 986–992.
- Chelbi, S.T., Veitia, R.A., and Vaiman, D. (sous presse). Why Preeclampsia still exists? Medical Hypotheses.
- Chelbi, S.T., Wilson, M.L., Veillard, A.-C., Ingles, S.A., Zhang, J., Mondon, F., Gascoin-Lachambre, G., Doridot, L., Mignot, T.-M., Rebourcet, R., et al. (2012). Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA3 expression and its association with placental diseases. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 1968–1978.
- Chelli, D., Dimassi, K., Zouaoui, B., Sfar, E., Chelli, H., and Chennoufi, M.B. (2009). [Evolution of maternal mortality in a level 3 Tunisian maternity from 1998 to 2007]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* *38*, 655–661.
- Chen, C.-P., Chen, C.-Y., Yang, Y.-C., Su, T.-H., and Chen, H. (2004). Decreased placental GCM1 (glial cells missing) gene expression in pre-eclampsia. *Placenta* *25*, 413–421.
- Chen, L., Wang, D., Wu, Z., Ma, L., and Daley, G.Q. (2010). Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Res.* *20*, 982–993.
- Cheung, V.G., Bruzel, A., Burdick, J.T., Morley, M., Devlin, J.L., and Spielman, R.S. (2008). Monozygotic twins reveal germline contribution to allelic expression differences. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 1357–1360.
- Choy, M.Y., and Manyonda, I.T. (1998). The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast. *Hum. Reprod.* *13*, 2941–2949.
- Clowse, M.E.B., Jamison, M., Myers, E., and James, A.H. (2008). A national study of the complications of lupus in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* *199*, 127.e1–127.e6.
- Cnattingius, S., Reilly, M., Pawitan, Y., and Lichtenstein, P. (2004). Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *Am. J. Med. Genet. A* *130A*, 365–371.
- Coan, P.M., Ferguson-Smith, A.C., and Burton, G.J. (2004). Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol. Reprod.* *70*, 1806–1813.
- Coan, P.M., Burton, G.J., and Ferguson-Smith, A.C. (2005). Imprinted genes in the placenta—a review. *Placenta* *26 Suppl A*, S10–20.
- Coan, P.M., Conroy, N., Burton, G.J., and Ferguson-Smith, A.C. (2006). Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev. Dyn.* *235*, 3280–3294.
- Cockburn, K., and Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J. Clin. Invest.* *120*, 995–1003.
- Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Maxwell, P.H. (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* *275*, 25733–25741.
- Cohen, M., and Bischof, P. (2007). Factors regulating trophoblast invasion. *Gynecol. Obstet. Invest.* *64*, 126–130.
- Comiskey, M., Goldstein, C.Y., De Fazio, S.R., Mammolenti, M., Newmark, J.A., and Warner, C.M. (2003). Evidence that HLA-G is the functional homolog of mouse Qa-2, the Ped gene product. *Hum. Immunol.* *64*, 999–1004.
- Conde-Agudelo, A., and Belizán, J.M. (2000). Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. *BJOG* *107*, 75–83.
- Coonrod, D.V., Hickok, D.E., Zhu, K., Easterling, T.R., and Daling, J.R. (1995). Risk factors for preeclampsia in twin pregnancies: a population-based cohort study. *Obstet Gynecol* *85*, 645–650.
- Croy, B.A., Burke, S.D., Barrette, V.F., Zhang, J., Hatta, K., Smith, G.N., Bianco, J., Yamada, A.T., and Adams, M.A. (2011). Identification of the primary outcomes that result from deficient spiral arterial modification in pregnant mice. *Pregnancy Hypertens* *1*, 87–94.

- Cruickshank, J.K., and Beevers, D.G. (1982). Epidemiology of hypertension: blood pressure in blacks and whites. *Clin. Sci.* 62, 1–6.
- Cui, Y., Wang, W., Dong, N., Lou, J., Srinivasan, D.K., Cheng, W., Huang, X., Liu, M., Fang, C., Peng, J., et al. (2012). Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. *Nature* 484, 246–250.
- Von Dadelszen, P., and Magee, L.A. (2002). Fall in mean arterial pressure and fetal growth restriction in pregnancy hypertension: an updated metaregression analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 24, 941–945.
- Dai, B., Liu, T., Zhang, B., Zhang, X., and Wang, Z. (2013). The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: A meta-analysis. *Gene*.
- Daikoku, T., Song, H., Guo, Y., Riesewijk, A., Mosselman, S., Das, S.K., and Dey, S.K. (2004). Uterine Msx-1 and Wnt4 signaling becomes aberrant in mice with the loss of leukemia inhibitory factor or Hoxa-10: evidence for a novel cytokine-homeobox-Wnt signaling in implantation. *Mol. Endocrinol.* 18, 1238–1250.
- Damsky, C.H., and Fisher, S.J. (1998). Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 660–666.
- Damsky, C.H., Librach, C., Lim, K.H., Fitzgerald, M.L., McMaster, M.T., Janatpour, M., Zhou, Y., Logan, S.K., and Fisher, S.J. (1994). Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 120, 3657–3666.
- Das, S.K., Wang, X.N., Paria, B.C., Damm, D., Abraham, J.A., Klagsbrun, M., Andrews, G.K., and Dey, S.K. (1994). Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 120, 1071–1083.
- Davissou, R.L., Hoffmann, D.S., Butz, G.M., Aldape, G., Schlager, G., Merrill, D.C., Sethi, S., Weiss, R.M., and Bates, J.N. (2002). Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 39, 337–342.
- Dechend, R., Viedt, C., Müller, D.N., Ugele, B., Brandes, R.P., Wallukat, G., Park, J.-K., Janke, J., Barta, P., Theuer, J., et al. (2003). AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* 107, 1632–1639.
- Dekel, N., Gnainsky, Y., Granot, I., and Mor, G. (2010). Inflammation and implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63, 17–21.
- Dekker, G., and Robillard, P.-Y. (2007). Pre-eclampsia: Is the immune maladaptation hypothesis still standing? An epidemiological update. *J. Reprod. Immunol.* 76, 8–16.
- Dekker, G.A., and Sibai, B.M. (1998). Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 179, 1359–1375.
- Dekker, G.A., Robillard, P.Y., and Hulsey, T.C. (1998). Immune maladaptation in the etiology of preeclampsia: a review of corroborative epidemiologic studies. *Obstet Gynecol Surv* 53, 377–382.
- Van Dijk, M., Drewlo, S., and Oudejans, C.B.M. (2010). Differential methylation of STOX1 in human placenta. *Epigenetics* 5, 736–742.
- Van Dijk, M., Mulders, J., Poutsma, A., Konst, A.A.M., Lachmeijer, A.M.A., Dekker, G.A., Blankenstein, M.A., and Oudejans, C.B.M. (2005). Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat. Genet.* 37, 514–519.
- Van Dijk, M., Van Bezu, J., Van Abel, D., Dunk, C., Blankenstein, M.A., Oudejans, C.B.M., and Lye, S.J. (2010a). The STOX1 genotype associated with pre-eclampsia leads to a reduction of trophoblast invasion by alpha-T-catenin upregulation. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2658–2667.
- Van Dijk, M., Van Bezu, J., Poutsma, A., Veerhuis, R., Rozemuller, A.J., Scheper, W., Blankenstein, M.A., and Oudejans, C.B. (2010b). The pre-eclampsia gene STOX1 controls a conserved pathway in placenta and brain upregulated in late-onset Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 19, 673–679.

- Doering, T.P., Haller, N.A., Montgomery, M.A., Freeman, E.J., and Hopkins, M.P. (1998). The role of AT1 angiotensin receptor activation in the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *178*, 1307–1312.
- Doridot, L., Méhats, C., and Vaiman, D. (2012). [Comparative analysis of mice models for preeclampsia]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* *61*, 234–238.
- Douglas, G.C., and King, B.F. (1989). Isolation of pure villous cytotrophoblast from term human placenta using immunomagnetic microspheres. *J. Immunol. Methods* *119*, 259–268.
- Douglas, K.A., and Redman, C.W. (1994). Eclampsia in the United Kingdom. *BMJ* *309*, 1395–1400.
- Duarte, A., Hirashima, M., Benedito, R., Trindade, A., Diniz, P., Bekman, E., Costa, L., Henrique, D., and Rossant, J. (2004). Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes Dev.* *18*, 2474–2478.
- Duckitt, K., and Harrington, D. (2005). Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* *330*, 565.
- Dudley, D.J., Branch, D.W., Edwin, S.S., and Mitchell, M.D. (1996). Induction of preterm birth in mice by RU486. *Biol. Reprod.* *55*, 992–995.
- Duley, L., Gülmezoglu, A.M., and Henderson-Smart, D.J. (2003). Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev* CD000025.
- Dunk, C.E., Gellhaus, A., Drewlo, S., Baczyk, D., Pötgens, A.J.G., Winterhager, E., Kingdom, J.C.P., and Lye, S.J. (2012). The molecular role of connexin 43 in human trophoblast cell fusion. *Biol. Reprod.* *86*, 115.
- Eastbrook, G., Hu, Y., and Von Dadelszen, P. (2008). The role of decidual natural killer cells in normal placentation and in the pathogenesis of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can* *30*, 467–476.
- Einarsson, J.I., Sangi-Haghpeykar, H., and Gardner, M.O. (2003). Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *188*, 1241–1243.
- Erlebacher, A. (2013). Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 23–33.
- Erlebacher, A., Price, K.A., and Glimcher, L.H. (2004). Maintenance of mouse trophoblast stem cell proliferation by TGF-beta/activin. *Dev. Biol.* *275*, 158–169.
- Esplin, M.S., Fausett, M.B., Fraser, A., Kerber, R., Mineau, G., Carrillo, J., and Varner, M.W. (2001). Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* *344*, 867–872.
- Euser, A.G., and Cipolla, M.J. (2009). Magnesium sulfate for the treatment of eclampsia: a brief review. *Stroke* *40*, 1169–1175.
- Ezugwu, E.C., Onah, H.E., Ezugwu, F.O., and Okafor, I.I. (2009). Maternal mortality in a transitional hospital in Enugu, south east Nigeria. *Afr J Reprod Health* *13*, 67–72.
- Falcao, S., Stoyanova, E., Cloutier, G., Maurice, R.L., Gutkowska, J., and Lavoie, J.L. (2009a). Mice overexpressing both human angiotensinogen and human renin as a model of superimposed preeclampsia on chronic hypertension. *Hypertension* *54*, 1401–1407.
- Falcao, S., Solomon, C., Monat, C., Bérubé, J., Gutkowska, J., and Lavoie, J.L. (2009b). Impact of diet and stress on the development of preeclampsia-like symptoms in p57kip2 mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *296*, H119–126.
- Fauque, P., Jouannet, P., Lesaffre, C., Ripoche, M.-A., Dandolo, L., Vaiman, D., and Jammes, H. (2007). Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev. Biol.* *7*, 116.
- Fauque, P., Ripoche, M.-A., Tost, J., Journot, L., Gabory, A., Busato, F., Le Digarcher, A., Mondon, F., Gut, I., Jouannet, P., et al. (2010). Modulation of imprinted gene network in placenta results in normal development of in vitro manipulated mouse embryos. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 1779–1790.
- Fazel, A., Vincenot, A., Malassiné, A., Soncin, F., Gaussem, P., Alsat, E., and Evain-Brion, D. (1998). Increase in expression and activity of thrombomodulin in term human syncytiotrophoblast microvilli. *Placenta* *19*, 261–268.

- Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G.N., and Radi, E. (2012). Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J. Neurol. Sci.* 322, 254–262.
- Fenstad, M.H., Johnson, M.P., Roten, L.T., Aas, P.A., Forsmo, S., Klepper, K., East, C.E., Abraham, L.J., Blangero, J., Brennecke, S.P., et al. (2010a). Genetic and molecular functional characterization of variants within TNFSF13B, a positional candidate preeclampsia susceptibility gene on 13q. *PLoS ONE* 5.
- Fenstad, M.H., Johnson, M.P., Løset, M., Mundal, S.B., Roten, L.T., Eide, I.P., Bjørge, L., Sande, R.K., Johansson, A.K., Dyer, T.D., et al. (2010b). STOX2 but not STOX1 is differentially expressed in decidua from pre-eclamptic women: data from the Second Nord-Trøndelag Health Study. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 960–968.
- Ferner, K., and Mess, A. (2011). Evolution and development of fetal membranes and placentation in amniote vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol* 178, 39–50.
- Firoz, T., Sanghvi, H., Merialdi, M., and Von Dadelszen, P. (2011). Pre-eclampsia in low and middle income countries. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25, 537–548.
- Fisher, K.A., Luger, A., Spargo, B.H., and Lindheimer, M.D. (1981). Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis. *Medicine (Baltimore)* 60, 267–276.
- Foidart, J.-M., Munaut, C., Chantraine, F., Akolekar, R., and Nicolaidis, K.H. (2010). Maternal plasma soluble endoglin at 11–13 weeks' gestation in pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 35, 680–687.
- Founds, S.A., Conley, Y.P., Lyons-Weiler, J.F., Jeyabalan, A., Hogge, W.A., and Conrad, K.P. (2009). Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. *Placenta* 30, 15–24.
- Fowden, A.L., Sibley, C., Reik, W., and Constancia, M. (2006). Imprinted genes, placental development and fetal growth. *Horm. Res.* 65 Suppl 3, 50–58.
- Fowden, A.L., Coan, P.M., Angiolini, E., Burton, G.J., and Constancia, M. (2011). Imprinted genes and the epigenetic regulation of placental phenotype. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 106, 281–288.
- Frank, D., Fortino, W., Clark, L., Musalo, R., Wang, W., Saxena, A., Li, C.-M., Reik, W., Ludwig, T., and Tycko, B. (2002). Placental overgrowth in mice lacking the imprinted gene *Ipl*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7490–7495.
- Funai, E.F., Paltiel, O.B., Malaspina, D., Friedlander, Y., Deutsch, L., and Harlap, S. (2005). Risk factors for pre-eclampsia in nulliparous and parous women: the Jerusalem perinatal study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 19, 59–68.
- Genbacev, O., Schubach, S.A., and Miller, R.K. (1992). Villous culture of first trimester human placenta--model to study extravillous trophoblast (EVT) differentiation. *Placenta* 13, 439–461.
- Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J.W., and Fisher, S.J. (1997). Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277, 1669–1672.
- Genbacev, O., Donne, M., Kapidzic, M., Gormley, M., Lamb, J., Gilmore, J., Larocque, N., Goldfien, G., Zdravkovic, T., McMaster, M.T., et al. (2011). Establishment of human trophoblast progenitor cell lines from the chorion. *Stem Cells* 29, 1427–1436.
- Gendron, R.L., Paradis, H., Hsieh-Li, H.M., Lee, D.W., Potter, S.S., and Markoff, E. (1997). Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in *Hoxa-11* null mice. *Biol. Reprod.* 56, 1097–1105.
- Georgiades, P., Ferguson-Smith, A.C., and Burton, G.J. (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 23, 3–19.
- Ghetler, Y., Raz, T., Ben Nun, I., and Shalgi, R. (1998). Cortical granules reaction after intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 289–294.
- Ghulmiyyah, L., and Sibai, B. (2012). Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin. Perinatol.* 36, 56–59.
- Gilbert, S.F., and Singer, S.R. (2010). *Developmental Biology* (Sinauer Associates Inc., U.S.).

- Giorgi, V.S.I., Peracoli, M.T.S., Peracoli, J.C., Witkin, S.S., and Bannwart-Castro, C.F. (2012). Silibinin modulates the NF- κ B pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J. Reprod. Immunol.* *95*, 67–72.
- Girardi, G., Bulla, R., Salmon, J.E., and Tedesco, F. (2006). The complement system in the pathophysiology of pregnancy. *Mol. Immunol.* *43*, 68–77.
- Gnainsky, Y., Granot, I., Aldo, P.B., Barash, A., Or, Y., Schechtman, E., Mor, G., and Dekel, N. (2010). Local injury of the endometrium induces an inflammatory response that promotes successful implantation. *Fertil. Steril.* *94*, 2030–2036.
- Godbole, G., Suman, P., Gupta, S.K., and Modi, D. (2011). Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. *Fertil. Steril.* *95*, 1278–1283.
- Goldenberg, R.L., Culhane, J.F., Iams, J.D., and Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* *371*, 75–84.
- Goldenberg, R.L., McClure, E.M., Macguire, E.R., Kamath, B.D., and Jobe, A.H. (2011). Lessons for low-income regions following the reduction in hypertension-related maternal mortality in high-income countries. *Int J Gynaecol Obstet* *113*, 91–95.
- Gordon, J.W., and Ruddle, F.H. (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* *214*, 1244–1246.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., and Ruddle, F.H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *77*, 7380–7384.
- Graham, C.H., and Lala, P.K. (1991). Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. *J. Cell. Physiol.* *148*, 228–234.
- Graham, C.H., Hawley, T.S., Hawley, R.G., MacDougall, J.R., Kerbel, R.S., Khoo, N., and Lala, P.K. (1993). Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp. Cell Res.* *206*, 204–211.
- Graves, J.A. (1998). Genomic imprinting, development and disease--is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene? *Reprod. Fertil. Dev.* *10*, 23–29.
- Gris, J.-C., Chaleur, C., Molinari, N., Marès, P., Fabbro-Peray, P., Quéré, I., Lefrant, J.-Y., Haddad, B., and Dautat, M. (2011). Addition of enoxaparin to aspirin for the secondary prevention of placental vascular complications in women with severe pre-eclampsia. The pilot randomised controlled NOH-PE trial. *Thromb. Haemost.* *106*, 1053–1061.
- Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, A., Rossant, J., and Joyner, A.L. (1994). Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* *371*, 333–336.
- Gurdol, F., Yurdum, L.M., Ozturk, U., Isbilen, E., and Cakmakoglu, B. (2012). Association of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphisms with preeclampsia in Turkish women. *Arch. Gynecol. Obstet.* *286*, 51–54.
- Hamatani, T., Carter, M.G., Sharov, A.A., and Ko, M.S.H. (2004). Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev. Cell* *6*, 117–131.
- Hammond, J., Jr (1949). Recovery and culture of tubal mouse ova. *Nature* *163*, 28.
- Hannan, N.J., Paiva, P., Dimitriadis, E., and Salamonsen, L.A. (2010). Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol. Reprod.* *82*, 235–245.
- Haram, K., Svendsen, E., and Abildgaard, U. (2009). The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth* *9*, 8.
- Harris, L.K., Jones, C.J.P., and Aplin, J.D. (2009a). Adhesion molecules in human trophoblast - a review. II. extravillous trophoblast. *Placenta* *30*, 299–304.
- Harris, L.K., Clancy, O.H., Myers, J.E., and Baker, P.N. (2009b). Plasma from women with preeclampsia inhibits trophoblast invasion. *Reprod Sci* *16*, 1082–1090.
- Harrison, G.A., Humphrey, K.E., Jones, N., Badenhop, R., Guo, G., Elakis, G., Kaye, J.A., Turner, R.J., Grehan, M., Wilton, A.N., et al. (1997). A genomewide linkage study of preeclampsia/eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q. *Am. J. Hum. Genet.* *60*, 1158–1167.

- Healy, D.L. (1991). Endometrial prolactin and implantation. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 5, 95–105.
- Heilmann, L., Schorsch, M., Hahn, T., and Fareed, J. (2011). Antiphospholipid syndrome and pre-eclampsia. *Semin. Thromb. Hemost.* 37, 141–145.
- Hemberger, M. (2007). Epigenetic landscape required for placental development. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2422–2436.
- Hiby, S.E., Walker, J.J., O’shaughnessy, K.M., Redman, C.W.G., Carrington, M., Trowsdale, J., and Moffett, A. (2004). Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med.* 200, 957–965.
- Hiby, S.E., Apps, R., Sharkey, A.M., Farrell, L.E., Gardner, L., Mulder, A., Claas, F.H., Walker, J.J., Redman, C.W., Redman, C.C., et al. (2010). Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J. Clin. Invest.* 120, 4102–4110.
- Hight, A.R., Zhang, V.J., Heinemann, G.K., and Roberts, C.T. (2012). Use of Matrigel in culture affects cell phenotype and gene expression in the first trimester trophoblast cell line HTR8/SVneo. *Placenta* 33, 586–588.
- Hoffmann, D.S., Weydert, C.J., Lazartigues, E., Kutschke, W.J., Kienzle, M.F., Leach, J.E., Sharma, J.A., Sharma, R.V., and Davisson, R.L. (2008). Chronic tempol prevents hypertension, proteinuria, and poor fetoplacental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 51, 1058–1065.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., and Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326, 292–295.
- Hu, D., and Cross, J.C. (2010). Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 341–354.
- Hu, D., and Cross, J.C. (2011). Ablation of Tpbpa-positive trophoblast precursors leads to defects in maternal spiral artery remodeling in the mouse placenta. *Dev. Biol.* 358, 231–239.
- Hu, H., Batteux, F., Chéreau, C., Kavian, N., Marut, W., Gobeaux, C., Borderie, D., Dinh-Xuan, A.T., Weill, B., and Nicco, C. (2011). Clopidogrel protects from cell apoptosis and oxidative damage in a mouse model of renal ischaemia-reperfusion injury. *J. Pathol.* 225, 265–275.
- Huang, S.Y., Wang, C.-J., Soong, Y.-K., Wang, H.-S., Wang, M.L., Lin, C.Y., and Chang, C.L. (2011). Site-specific endometrial injury improves implantation and pregnancy in patients with repeated implantation failures. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 140.
- Hung, T.-H., and Burton, G.J. (2006). Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 45, 189–200.
- Hung, T.H., Skepper, J.N., and Burton, G.J. (2001). In vitro ischemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *Am. J. Pathol.* 159, 1031–1043.
- Hunt, J.S., Petroff, M.G., McIntire, R.H., and Ober, C. (2005). HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J.* 19, 681–693.
- Hunt, J.S., Langat, D.K., McIntire, R.H., and Morales, P.J. (2006). The role of HLA-G in human pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4 Suppl 1, S10.
- Huppertz, B., Kertschanska, S., Demir, A.Y., Frank, H.G., and Kaufmann, P. (1998). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res.* 291, 133–148.
- Iglesias-Platas, I., Monk, D., Jebbink, J., Buimer, M., Boer, K., Van der Post, J., Hills, F., Apostolidou, S., Ris-Stalpers, C., and Stanier, P. (2007). STOX1 is not imprinted and is not likely to be involved in preeclampsia. *Nature Genetics* 39, 279–280.
- Ikedife, D. (1980). Eclampsia in multipara. *Br Med J* 280, 985–986.
- Imasawa, T., Nishiwaki, T., Nishimura, M., Shikama, N., Matsumura, R., Nagai, M., Soyama, A., Koike, K., Kitamura, H., and Joh, K. (2006). A case of “pure” preeclampsia with nephrotic syndrome before 15 weeks of gestation in a patient whose renal biopsy showed glomerular capillary endotheliosis. *Am. J. Kidney Dis.* 48, 495–501.

- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., and Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234–238.
- Iqbal, M., Audette, M.C., Petropoulos, S., Gibb, W., and Matthews, S.G. (2012). Placental drug transporters and their role in fetal protection. *Placenta* 33, 137–142.
- Jacobs, M., Nassar, N., Roberts, C.L., Hadfield, R., Morris, J.M., and Ashton, A.W. (2011). Levels of soluble fms-like tyrosine kinase one in first trimester and outcomes of pregnancy: a systematic review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 77.
- James, J.L., Stone, P.R., and Chamley, L.W. (2006). The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. *Hum. Reprod. Update* 12, 137–144.
- Jebbink, J., Wolters, A., Fernando, F., Afink, G., Van der Post, J., and Ris-Stalpers, C. (2012). Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome - a review. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1960–1969.
- Jhunjhunwala, S., Balmert, S.C., Raimondi, G., Dons, E., Nichols, E.E., Thomson, A.W., and Little, S.R. (2012). Controlled release formulations of IL-2, TGF- β 1 and rapamycin for the induction of regulatory T cells. *J Control Release* 159, 78–84.
- Johnson, M.P., Fitzpatrick, E., Dyer, T.D., Jowett, J.B.M., Brennecke, S.P., Blangero, J., and Moses, E.K. (2007). Identification of two novel quantitative trait loci for pre-eclampsia susceptibility on chromosomes 5q and 13q using a variance components-based linkage approach. *Mol. Hum. Reprod.* 13, 61–67.
- Johnson, M.P., Brennecke, S.P., East, C.E., Göring, H.H.H., Kent, J.W., Jr, Dyer, T.D., Said, J.M., Roten, L.T., Iversen, A.-C., Abraham, L.J., et al. (2012). Genome-wide association scan identifies a risk locus for preeclampsia on 2q14, near the inhibin, beta B gene. *PLoS ONE* 7, e33666.
- Jokhi, P.P., King, A., and Loke, Y.W. (1994). Reciprocal expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-erbB2 by non-invasive and invasive human trophoblast populations. *Cytokine* 6, 433–442.
- Jones, J.I., Gockerman, A., Busby, W.H., Jr, Wright, G., and Clemmons, D.R. (1993). Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10553–10557.
- Juch, H., Blaschitz, A., Dohr, G., and Hutter, H. (2012). HLA class I expression in the human placenta. *Wien Med Wochenschr* 162, 196–200.
- Kaitu'u-Lino, T.J., Palmer, K.R., Whitehead, C.L., Williams, E., Lappas, M., and Tong, S. (2012). MMP-14 is expressed in preeclamptic placentas and mediates release of soluble endoglin. *Am. J. Pathol.* 180, 888–894.
- Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S., and Kudo, A. (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat. Genet.* 24, 279–282.
- Kajino, T., Torry, D.S., McIntyre, J.A., and Faulk, W.P. (1988). Trophoblast antigens in human seminal plasma. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 17, 91–95.
- Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 6519–6525.
- Kalma, Y., Granot, I., Gnainsky, Y., Or, Y., Czernobilsky, B., Dekel, N., and Barash, A. (2009). Endometrial biopsy-induced gene modulation: first evidence for the expression of bladder-transmembranal uroplakin Ib in human endometrium. *Fertil. Steril.* 91, 1042–1049, 1049.e1–9.
- Kametas, N.A., Krampl, E., McAuliffe, F., Rampling, M.W., and Nicolaides, K.H. (2004). Pregnancy at high altitude: a hyperviscosity state. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83, 627–633.
- Kanasaki, K., Palmsten, K., Sugimoto, H., Ahmad, S., Hamano, Y., Xie, L., Parry, S., Augustin, H.G., Gattone, V.H., Folkman, J., et al. (2008). Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 453, 1117–1121.
- Kanayama, N., Takahashi, K., Matsuura, T., Sugimura, M., Kobayashi, T., Moniwa, N., Tomita, M., and Nakayama, K. (2002). Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 1129–1135.

- Karmakar, S., and Das, C. (2002). Regulation of trophoblast invasion by IL-1beta and TGF-beta1. *Am. J. Reprod. Immunol.* *48*, 210–219.
- Karsten, C.M., Behrends, J., Wagner, A.K., Fuchs, F., Figge, J., Schmutde, I., Hellberg, L., and Kruse, A. (2009). DC within the pregnant mouse uterus influence growth and functional properties of uterine NK cells. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2203–2214.
- Kaufmann (1991). Functional anatomy of the non-primate placenta. *Placenta Suppl 1*, 13–28.
- Kaufmann, P., Black, S., and Huppertz, B. (2003). Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol. Reprod.* *69*, 1–7.
- Kauma, S., Takacs, P., Scordalakes, C., Walsh, S., Green, K., and Peng, T. (2002). Increased endothelial monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* *100*, 706–714.
- Kenny, L.C., Broadhurst, D.I., Dunn, W., Brown, M., North, R.A., McCowan, L., Roberts, C., Cooper, G.J.S., Kell, D.B., and Baker, P.N. (2010). Robust early pregnancy prediction of later preeclampsia using metabolomic biomarkers. *Hypertension* *56*, 741–749.
- Keyes, L.E., Armaza, J.F., Niermeyer, S., Vargas, E., Young, D.A., and Moore, L.G. (2003). Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatr. Res.* *54*, 20–25.
- Kharb, S. (2000). Total free radical trapping antioxidant potential in pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* *69*, 23–26.
- Kho, E.M., McCowan, L.M.E., North, R.A., Roberts, C.T., Chan, E., Black, M.A., Taylor, R.S., and Dekker, G.A. (2009). Duration of sexual relationship and its effect on preeclampsia and small for gestational age perinatal outcome. *J. Reprod. Immunol.* *82*, 66–73.
- Khong, T.Y. (1991). Acute atherosclerosis in pregnancies complicated by hypertension, small-for-gestational-age infants, and diabetes mellitus. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *115*, 722–725.
- Kivinen, K., Peterson, H., Hiltunen, L., Laivuori, H., Heino, S., Tiala, I., Knuutila, S., Rasi, V., and Kere, J. (2007). Evaluation of STOX1 as a preeclampsia candidate gene in a population-wide sample. *European Journal of Human Genetics* *15*, 494–497.
- Kliman, H.J., Nestler, J.E., Sermasi, E., Sanger, J.M., and Strauss, J.F., 3rd (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* *118*, 1567–1582.
- Klungsoyr, K., Morken, N.H., Irgens, L., Vollset, S.E., and Skjaerven, R. (2012). Secular trends in the epidemiology of pre-eclampsia throughout 40 years in Norway: prevalence, risk factors and perinatal survival. *Paediatr Perinat Epidemiol* *26*, 190–198.
- Knerr, I., Schubert, S.W., Wich, C., Amann, K., Aigner, T., Vogler, T., Jung, R., Dötsch, J., Rascher, W., and Hashemolhosseini, S. (2005). Stimulation of GCMA and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS Lett.* *579*, 3991–3998.
- Koelman, C.A., Coumans, A.B., Nijman, H.W., Doxiadis, I.I., Dekker, G.A., and Claas, F.H. (2000). Correlation between oral sex and a low incidence of preeclampsia: a role for soluble HLA in seminal fluid? *J. Reprod. Immunol.* *46*, 155–166.
- Kohler, P.O., Bridson, W.E., Hammond, J.M., Weintraub, B., Kirschner, M.A., and Van Thiel, D.H. (1971). Clonal lines of human choriocarcinoma cells in culture. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* *153*, 137–153.
- Kozak, K.R., Abbott, B., and Hankinson, O. (1997). ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev. Biol.* *191*, 297–305.
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., et al. (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev.* *14*, 1343–1352.
- Kuehn, M.R., Bradley, A., Robertson, E.J., and Evans, M.J. (1987). A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature* *326*, 295–298.

- Kumasawa, K., Ikawa, M., Kidoya, H., Hasuwa, H., Saito-Fujita, T., Morioka, Y., Takakura, N., Kimura, T., and Okabe, M. (2011). Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 1451–1455.
- Kupferminc, M.J., Rimon, E., Many, A., Sharon, M., Lessing, J.B., and Gamzu, R. (2011). Low molecular weight heparin treatment during subsequent pregnancies of women with inherited thrombophilia and previous severe pregnancy complications. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* *24*, 1042–1045.
- Kyrou, D., Kolibianakis, E.M., Devroey, P., and Fatemi, H.M. (2010). Is the use of donor sperm associated with a higher incidence of preeclampsia in women who achieve pregnancy after intrauterine insemination? *Fertil. Steril.* *93*, 1124–1127.
- Laasanen, J., Hiltunen, M., Romppanen, E.-L., Punnonen, K., Mannermaa, A., and Heinonen, S. (2003). Microsatellite marker association at chromosome region 2p13 in Finnish patients with preeclampsia and obstetric cholestasis suggests a common risk locus. *Eur. J. Hum. Genet.* *11*, 232–236.
- Lachmeijer, A.M., Arngrímsson, R., Bastiaans, E.J., Frigge, M.L., Pals, G., Sigurdardóttir, S., Stéfansson, H., Pálsson, B., Nicolae, D., Kong, A., et al. (2001). A genome-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. *Eur. J. Hum. Genet.* *9*, 758–764.
- Laivuori, H., Lahermo, P., Ollikainen, V., Widen, E., Häivä-Mällinen, L., Sundström, H., Laitinen, T., Kaaja, R., Ylikorkala, O., and Kere, J. (2003). Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. *Am. J. Hum. Genet.* *72*, 168–177.
- Lappas, M., Woodruff, T.M., Taylor, S.M., and Permezel, M. (2012). Complement C5A regulates prolabor mediators in human placenta. *Biol. Reprod.* *86*, 190.
- Lash, G.E., Robson, S.C., and Bulmer, J.N. (2010). Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta 31 Suppl*, S87–92.
- Lawlor, D.A., Morton, S.M.B., Nitsch, D., and Leon, D.A. (2005). Association between childhood and adulthood socioeconomic position and pregnancy induced hypertension: results from the Aberdeen children of the 1950s cohort study. *J Epidemiol Community Health* *59*, 49–55.
- Lee, J.-W., Bae, S.-H., Jeong, J.-W., Kim, S.-H., and Kim, K.-W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.* *36*, 1–12.
- Leno-Durán, E., Hatta, K., Bianco, J., Yamada, A.T., Ruiz-Ruiz, C., Olivares, E.G., and Croy, B.A. (2010). Fetal-placental hypoxia does not result from failure of spiral arterial modification in mice. *Placenta* *31*, 731–737.
- Li, Y., Lemaire, P., and Behringer, R.R. (1997). *Esx1*, a novel X chromosome-linked homeobox gene expressed in mouse extraembryonic tissues and male germ cells. *Dev. Biol.* *188*, 85–95.
- Lie, R.T., Rasmussen, S., Brunborg, H., Gjessing, H.K., Lie-Nielsen, E., and Irgens, L.M. (1998). Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. *BMJ* *316*, 1343–1347.
- Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M., and Dey, S.K. (1997a). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* *91*, 197–208.
- Lim, J.H., Kim, S.Y., Kim, D.J., Park, S.Y., Han, H.W., Han, J.Y., Lee, S.W., Yang, J.H., and Ryu, H.M. (2010). Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and cytochrome P450c17 α in preeclampsia. *Pharmacogenet. Genomics* *20*, 605–610.
- Lim, K.H., Zhou, Y., Janatpour, M., McMaster, M., Bass, K., Chun, S.H., and Fisher, S.J. (1997b). Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am. J. Pathol.* *151*, 1809–1818.
- Lin, J., and August, P. (2005). Genetic thrombophilias and preeclampsia: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* *105*, 182–192.
- Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., McPherson, J.D., Waterston, R.H., Rodgers, J., and Birney, E. (2001). Progress in sequencing the mouse genome. *Genesis* *31*, 137–141.
- Llurba, E., Sánchez, O., Domínguez, C., Soro, G., Goya, M., Alijotas-Reig, J., and Cabero, L. (2013). Smoking during Pregnancy: Changes in Mid-Gestation Angiogenic Factors in Women at Risk

of Developing Preeclampsia According to Uterine Artery Doppler Findings. *Hypertens Pregnancy* 32, 50–59.

Lockwood, C.J., Yen, C.-F., Basar, M., Kayisli, U.A., Martel, M., Buhimschi, I., Buhimschi, C., Huang, S.J., Krikun, G., and Schatz, F. (2008). Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am. J. Pathol.* 172, 1571–1579.

Longo, S.A., Dola, C.P., and Pridjian, G. (2003). Preeclampsia and eclampsia revisited. *South. Med. J.* 96, 891–899.

López-Jaramillo, P., Casas, J.P., and Serrano, N. (2001). Preeclampsia: from epidemiological observations to molecular mechanisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 1227–1235.

López-Jaramillo, P., Herrera, J.A., Arenas-Mantilla, M., Jáuregui, I.E., and Mendoza, M.A. (2008). Subclinical infection as a cause of inflammation in preeclampsia. *Am J Ther* 15, 373–376.

Lorentzen, B., and Henriksen, T. (1998). Plasma lipids and vascular dysfunction in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16, 33–39.

Di Lorenzo, G., Ceccarello, M., Cecotti, V., Ronfani, L., Monasta, L., Vecchi Brumatti, L., Montico, M., and D’Ottavio, G. (2012). First trimester maternal serum PIGF, free β -hCG, PAPP-A, PP-13, uterine artery Doppler and maternal history for the prediction of preeclampsia. *Placenta* 33, 495–501.

Louwen, F., Muschol-Steinmetz, C., Reinhard, J., Reitter, A., and Yuan, J. (2012). A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia. *Oncotarget* 3, 759–773.

Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11162–11166.

Luo, L., Ye, G., Nadeem, L., Fu, G., Yang, B.B., Honarparvar, E., Dunk, C., Lye, S., and Peng, C. (2012). MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *J. Cell. Sci.* 125, 3124–3132.

Luo, Z.-X., Yuan, C.-X., Meng, Q.-J., and Ji, Q. (2011). A Jurassic eutherian mammal and divergence of marsupials and placentals. *Nature* 476, 442–445.

Lyall, F. (2002). The human placental bed revisited. *Placenta* 23, 555–562.

Lyall, F. (2003). Development of the utero-placental circulation: the role of carbon monoxide and nitric oxide in trophoblast invasion and spiral artery transformation. *Microsc. Res. Tech.* 60, 402–411.

Lyall, F. (2005). Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy--a review. *Placenta* 26 Suppl A, S31–36.

Lyall, F., Greer, I.A., Boswell, F., Macara, L.M., Walker, J.J., and Kingdom, J.C. (1994). The cell adhesion molecule, VCAM-1, is selectively elevated in serum in pre-eclampsia: does this indicate the mechanism of leucocyte activation? *Br J Obstet Gynaecol* 101, 485–487.

Lyall, F., Greer, I.A., Boswell, F., Young, A., Macara, L.M., and Jeffers, M.D. (1995). Expression of cell adhesion molecules in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth retardation. *Placenta* 16, 579–587.

Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Jr, Shyamala, G., Conneely, O.M., and O’Malley, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266–2278.

Lykke, J.A., Langhoff-Roos, J., Sibai, B.M., Funai, E.F., Triche, E.W., and Paidas, M.J. (2009). Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. *Hypertension* 53, 944–951.

Madeja, Z., Yadi, H., Apps, R., Boulenouar, S., Roper, S.J., Gardner, L., Moffett, A., Colucci, F., and Hemberger, M. (2011). Paternal MHC expression on mouse trophoblast affects uterine vascularization and fetal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4012–4017.

Malassiné, A., Frendo, J.-L., and Evain-Brion, D. (2010). Trisomy 21- affected placentas highlight prerequisite factors for human trophoblast fusion and differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 475–482.

- Maltepe, E., Bakardjiev, A.I., and Fisher, S.J. (2010). The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J. Clin. Invest.* *120*, 1016–1025.
- Mansi, I., and Mortensen, E. (2013). The controversy of a wider statin utilization: why? *Expert Opin Drug Saf.*
- Marchand, E., Poncelet, C., Carbillon, L., Pharisien, I., Tigaizin, A., and Chanelles, O. (2011). [Is there more complications with pregnancies from the assisted reproductive technology than spontaneous pregnancies? A retrospective study over 6 years]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* *40*, 522–528.
- Marcorelles, P. (2010). [Placenta and preeclampsia: relationships between anatomical lesions and clinical symptoms]. *Ann Fr Anesth Reanim* *29*, e25–29.
- Marcus, M.B., and Quattlebaum, L. (1959). Recurrent hydatidiform mole complicated by preeclampsia. Case report and review of literature. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *78*, 881–883.
- Masoura, S., Kalogiannidis, I.A., Gitas, G., Goutsioulis, A., Koioy, E., Athanasiadis, A., and Vavatsi, N. (2012). Biomarkers in pre-eclampsia: a novel approach to early detection of the disease. *J Obstet Gynaecol* *32*, 609–616.
- Matin, M.M., Walsh, J.R., Gokhale, P.J., Draper, J.S., Bahrami, A.R., Morton, I., Moore, H.D., and Andrews, P.W. (2004). Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* *22*, 659–668.
- Matsumoto, H., Zhao, X., Das, S.K., Hogan, B.L.M., and Dey, S.K. (2002). Indian hedgehog as a progesterone-responsive factor mediating epithelial-mesenchymal interactions in the mouse uterus. *Dev. Biol.* *245*, 280–290.
- Mattar, F., and Sibai, B.M. (2000). Eclampsia. VIII. Risk factors for maternal morbidity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *182*, 307–312.
- Maynard, S.E., Venkatesha, S., Thadhani, R., and Karumanchi, S.A. (2005). Soluble Fms-like tyrosine kinase 1 and endothelial dysfunction in the pathogenesis of preeclampsia. *Pediatr. Res.* *57*, 1R–7R.
- Meekins, J.W., Pijnenborg, R., Hanssens, M., Van Assche, A., and McFadyen, I.R. (1994a). Immunohistochemical detection of lipoprotein(a) in the wall of placental bed spiral arteries in normal and severe preeclamptic pregnancies. *Placenta* *15*, 511–524.
- Meekins, J.W., Pijnenborg, R., Hanssens, M., McFadyen, I.R., and Van Assche, A. (1994b). A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* *101*, 669–674.
- Meher, S., and Duley, L. (2007). Nitric oxide for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev* CD006490.
- Mehrabian, F., Mohammadzadeh, F., Moghtaderi, N., and Najafian, A. (2012). Comparison of placental pathology between severe preeclampsia and HELLP syndrome. *Arch. Gynecol. Obstet.* *285*, 175–181.
- Mello, G., Parretti, E., Fatini, C., Riviello, C., Gensini, F., Marchionni, M., Scarselli, G.F., Gensini, G.F., and Abbate, R. (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*, 86–91.
- Merviel, P., Lourdel, E., Cabry, R., Brzakowski, M., Dupond, S., Boulard, V., Demailly, P., Brasseur, F., Copin, H., and Devaux, A. (2010). La réceptivité utérine. *Réalités En Gynécologie-obstétrique* *147*.
- Meseguer, M., Aplin, J.D., Caballero-Campo, P., O'Connor, J.E., Martín, J.C., Remohí, J., Pellicer, A., and Simón, C. (2001). Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol. Reprod.* *64*, 590–601.
- Mesiano, S., Wang, Y., and Norwitz, E.R. (2011). Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: do they hold the key to birth timing? *Reprod Sci* *18*, 6–19.
- Mikat, B., Zeller, A., Scherag, A., Drommelschmidt, K., Kimmig, R., and Schmidt, M. (2012). β hCG and PAPP-A in first trimester: predictive factors for preeclampsia? *Hypertens Pregnancy* *31*, 261–267.

- Mincheva-Nilsson, L., and Baranov, V. (2010). The role of placental exosomes in reproduction. *Am. J. Reprod. Immunol.* *63*, 520–533.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., et al. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* *287*, 321–324.
- Miyado, K., Yoshida, K., Yamagata, K., Sakakibara, K., Okabe, M., Wang, X., Miyamoto, K., Akutsu, H., Kondo, T., Takahashi, Y., et al. (2008). The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 12921–12926.
- Moffett-King, A. (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 656–663.
- Mondon, F., Mignot, T.-M., Rebourcet, R., Jammes, H., Danan, J.-L., Ferré, F., and Vaiman, D. (2005). Profiling of oxygen-modulated gene expression in early human placenta by systematic sequencing of suppressive subtractive hybridization products. *Physiol. Genomics* *22*, 99–107.
- Monkley, S.J., Delaney, S.J., Pennisi, D.J., Christiansen, J.H., and Wainwright, B.J. (1996). Targeted disruption of the *Wnt2* gene results in placentation defects. *Development* *122*, 3343–3353.
- Moses, E.K., Lade, J.A., Guo, G., Wilton, A.N., Grehan, M., Freed, K., Borg, A., Terwilliger, J.D., North, R., Cooper, D.W., et al. (2000). A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia, on chromosome 2. *Am. J. Hum. Genet.* *67*, 1581–1585.
- Moses, E.K., Fitzpatrick, E., Freed, K.A., Dyer, T.D., Forrest, S., Elliott, K., Johnson, M.P., Blangero, J., and Brennecke, S.P. (2006). Objective prioritization of positional candidate genes at a quantitative trait locus for pre-eclampsia on 2q22. *Mol. Hum. Reprod.* *12*, 505–512.
- Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., and Conneely, O.M. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* *289*, 1751–1754.
- Mulhaupt, H.A., Mazar, A., Cines, D.B., Warhol, M.J., and McCrae, K.R. (1994). Expression of urokinase receptors by human trophoblast. A histochemical and ultrastructural analysis. *Lab. Invest.* *71*, 392–400.
- Munaut, C., Lorquet, S., Pequeux, C., Blacher, S., Berndt, S., Frankenne, F., and Foidart, J.-M. (2008). Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast. *Hum. Reprod.* *23*, 1407–1415.
- Munoz-Suano, A., Hamilton, A.B., and Betz, A.G. (2011). Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol. Rev.* *241*, 20–38.
- Murphy, V.E., Smith, R., Giles, W.B., and Clifton, V.L. (2006). Endocrine Regulation of Human Fetal Growth: The Role of the Mother, Placenta, and Fetus. *Endocrine Reviews* *27*, 141–169.
- Mütze, S., Rudnik-Schöneborn, S., Zerres, K., and Rath, W. (2008). Genes and the preeclampsia syndrome. *J Perinat Med* *36*, 38–58.
- Nadar, S.K., Al Yemeni, E., Blann, A.D., and Lip, G.Y.H. (2004). Thrombomodulin, von Willebrand factor and E-selectin as plasma markers of endothelial damage/dysfunction and activation in pregnancy induced hypertension. *Thromb. Res.* *113*, 123–128.
- Nagy, A. (2003). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Nancy, P., Tagliani, E., Tay, C.-S., Asp, P., Levy, D.E., and Erlebacher, A. (2012). Chemokine gene silencing in decidual stromal cells limits T cell access to the maternal-fetal interface. *Science* *336*, 1317–1321.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., and Boucheix, C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* *287*, 319–321.
- Nessmann, C., and Larroche, J.-C. (2001). *Atlas de pathologie placentaire* (Elsevier Masson).
- Newbern, D., and Freemark, M. (2011). Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* *18*, 409–416.
- Niakan, K.K., and Eggan, K. (2012). Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Dev. Biol.*

- O'Brien, T.E., Ray, J.G., and Chan, W.-S. (2003). Maternal Body Mass Index and the Risk of Preeclampsia: A Systematic Overview. *Epidemiology* *14*, 368–374.
- Ohlsson, R., Falck, P., Hellström, M., Lindahl, P., Boström, H., Franklin, G., Ahrlund-Richter, L., Pollard, J., Soriano, P., and Betsholtz, C. (1999). PDGFB regulates the development of the labyrinthine layer of the mouse fetal placenta. *Dev. Biol.* *212*, 124–136.
- Oudejans, C.B.M., Mulders, J., Lachmeijer, A.M.A., Van Dijk, M., Könst, A.A.M., Westerman, B.A., Van Wijk, I.J., Leegwater, P.A.J., Kato, H.D., Matsuda, T., et al. (2004). The parent-of-origin effect of 10q22 in pre-eclamptic females coincides with two regions clustered for genes with down-regulated expression in androgenetic placentas. *Mol. Hum. Reprod.* *10*, 589–598.
- Palmer, S.K., Moore, L.G., Young, D., Cregger, B., Berman, J.C., and Zamudio, S. (1999). Altered blood pressure course during normal pregnancy and increased preeclampsia at high altitude (3100 meters) in Colorado. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *180*, 1161–1168.
- Paria, B.C., Tan, J., Lubahn, D.B., Dey, S.K., and Das, S.K. (1999). Uterine decidual response occurs in estrogen receptor-alpha-deficient mice. *Endocrinology* *140*, 2704–2710.
- Paria, B.C., Ma, W., Tan, J., Raja, S., Das, S.K., Dey, S.K., and Hogan, B.L. (2001). Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 1047–1052.
- Parker, B.A., and Thompson, P.D. (2012). Effect of statins on skeletal muscle: exercise, myopathy, and muscle outcomes. *Exerc Sport Sci Rev* *40*, 188–194.
- Parr, B.A., and McMahon, A.P. (1998). Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* *395*, 707–710.
- Parrish, M.R., Martin, J.N., Jr, Lamarca, B.B., Ellis, B., Parrish, S.A., Owens, M.Y., and May, W.L. (2013). Randomized, placebo controlled, double blind trial evaluating early pregnancy phytonutrient supplementation in the prevention of preeclampsia. *J Perinatol.*
- Patrelli, T.S., Dall'asta, A., Gizzo, S., Pedrazzi, G., Piantelli, G., Jasonni, V.M., and Modena, A.B. (2012). Calcium supplementation and prevention of preeclampsia: a meta-analysis. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* *25*, 2570–2574.
- Pattillo, R.A., Gey, G.O., Delfs, E., and Mattingly, R.F. (1968). Human hormone production in vitro. *Science* *159*, 1467–1469.
- Pattillo, R.A., Hussa, R.O., and Garancis, J.C. (1971). Glycogen metabolism in human hormone-producing trophoblastic cells in continuous culture. I. Regulation of glycogen metabolism by glucose. *In Vitro* *7*, 59–67.
- Penn, D.J., and Ilmonen, P. (2001). Major Histocompatibility Complex: Human. In *eLS*, (John Wiley & Sons, Ltd),.
- Petit, P., Top, M., Chantraine, F., Brichant, J.F., Dewandre, P.Y., and Foidart, J.M. (2009). [Treatment of severe preeclampsia: until when and for what risks/benefits?]. *Rev Med Liege* *64*, 620–625.
- Petraglia, F., Santuz, M., Florio, P., Simoncini, T., Luisi, S., Plaino, L., Genazzani, A.R., Genazzani, A.D., and Volpe, A. (1998). Paracrine regulation of human placenta: control of hormonogenesis. *J. Reprod. Immunol.* *39*, 221–233.
- Petsas, G., Jeschke, U., Richter, D.U., Minas, V., Hammer, A., Kalantaridou, S., Toth, B., Tsatsanis, C., Friese, K., and Makrigiannakis, A. (2012). Aberrant expression of corticotropin-releasing hormone in pre-eclampsia induces expression of FasL in maternal macrophages and extravillous trophoblast apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.* *18*, 535–545.
- Poaty, H., Coullin, P., Peko, J.F., Dessen, P., Diatta, A.L., Valent, A., Leguern, E., Prévot, S., Gombé-Mbalawa, C., Candelier, J.-J., et al. (2012). Genome-wide high-resolution aCGH analysis of gestational choriocarcinomas. *PLoS ONE* *7*, e29426.
- Polette, M., Nawrocki, B., Pintiaux, A., Massenat, C., Maquoui, E., Volders, L., Schaaps, J.P., Birembaut, P., and Foidart, J.M. (1994). Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Lab. Invest.* *71*, 838–846.

Poon, L.C.Y., Akolekar, R., Lachmann, R., Beta, J., and Nicolaides, K.H. (2010). Hypertensive disorders in pregnancy: screening by biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol* 35, 662–670.

Poon, L.C.Y., Kametas, N.A., Valencia, C., Chelemen, T., and Nicolaides, K.H. (2011). Hypertensive disorders in pregnancy: screening by systolic diastolic and mean arterial pressure at 11-13 weeks. *Hypertens Pregnancy* 30, 93–107.

Poon, L.C.Y., Syngelaki, A., Akolekar, R., Lai, J., and Nicolaides, K.H. (2013). Combined screening for preeclampsia and small for gestational age at 11-13 weeks. *Fetal. Diagn. Ther.* 33, 16–27.

Pottecher, T., Luton, D., Zupan, V., and Collet, M. (2009). Prise en charge multidisciplinaire des formes graves de prééclampsie (SFAR: Société française d’anesthésie et de réanimation CNGOF: Collège national des gynécologues et obstétriciens français SFNN: Société française de néonatalogie SFMP: Société française de médecine périnatale).

Purwosunu, Y., Sekizawa, A., Okazaki, S., Farina, A., Wibowo, N., Nakamura, M., Rizzo, N., Saito, H., and Okai, T. (2009). Prediction of preeclampsia by analysis of cell-free messenger RNA in maternal plasma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 200, 386.e1–7.

Qing, X., Redecha, P.B., Burmeister, M.A., Tomlinson, S., D’Agati, V.D., Davisson, R.L., and Salmon, J.E. (2011). Targeted inhibition of complement activation prevents features of preeclampsia in mice. *Kidney Int.* 79, 331–339.

Quitterer, U., Lothar, H., and Abdalla, S. (2004). AT1 receptor heterodimers and angiotensin II responsiveness in preeclampsia. *Semin. Nephrol.* 24, 115–119.

Rabineau, D., Dupont, J.-M., and Plateaux, P. (2004). *Embryologie Humaine – Le site.*

Rajakumar, A., Doty, K., Daftary, A., Harger, G., and Conrad, K.P. (2003). Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1 α and -2 α proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 24, 199–208.

Rajakumar, A., Cerdeira, A.S., Rana, S., Zsengeller, Z., Edmunds, L., Jeyabalan, A., Hubel, C.A., Stillman, I.E., Parikh, S.M., and Karumanchi, S.A. (2012). Transcriptionally active syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Hypertension* 59, 256–264.

Rebordosa, C., Zelop, C.M., Kogevinas, M., Sørensen, H.T., and Olsen, J. (2010). Use of acetaminophen during pregnancy and risk of preeclampsia, hypertensive and vascular disorders: a birth cohort study. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 23, 371–378.

Redman, C.W., Sacks, G.P., and Sargent, I.L. (1999). Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, 499–506.

Remes Lenicov, F., Rodriguez Rodrigues, C., Sabaté, J., Cabrini, M., Jancic, C., Ostrowski, M., Merlotti, A., Gonzalez, H., Alonso, A., Pasqualini, R.A., et al. (2012). Semen promotes the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol.* 189, 4777–4786.

Renfree, M.B. (2010). Review: Marsupials: placental mammals with a difference. *Placenta* 31 Suppl, S21–26.

Rigourd, V., Chauvet, C., Chelbi, S.T., Rebourcet, R., Mondon, F., Letourneur, F., Mignot, T.M., Barboux, S., and Vaiman, D. (2008). STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PloS One* 3, e3905.

Rigourd, V., Chelbi, S., Chauvet, C., Rebourcet, R., Barboux, S., Bessières, B., Mondon, F., Mignot, T.M., Danan, J.L., and Vaiman, D. (2009). Re-evaluation of the role of STOX1 transcription factor in placental development and preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology* 82, 174–181.

Riley, P., Anson-Cartwright, L., and Cross, J.C. (1998). The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat. Genet.* 18, 271–275.

Rinaudo, P., and Wang, E. (2012). Fetal programming and metabolic syndrome. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 107–130.

Roberge, S., Giguère, Y., Villa, P., Nicolaides, K., Vainio, M., Forest, J.-C., Von Dadelzen, P., Vaiman, D., Tapp, S., and Bujold, E. (2012a). Early administration of low-dose aspirin for the

prevention of severe and mild preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Perinatol* 29, 551–556.

Roberge, S., Villa, P., Nicolaidis, K., Giguère, Y., Vainio, M., Bakthi, A., Ebrashy, A., and Bujold, E. (2012b). Early administration of low-dose aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Fetal. Diagn. Ther.* 31, 141–146.

Roberts, J.M., and Gammill, H.S. (2005). Preeclampsia: recent insights. *Hypertension* 46, 1243–1249.

Roberts, J.M., and Lain, K.Y. (2002). Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 23, 359–372.

Roberts, J.M., Taylor, R.N., and Goldfien, A. (1991). Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia. *Am. J. Hypertens.* 4, 700–708.

Robertson, S.A. (2005). Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.* 322, 43–52.

Robertson, S.A., Roberts, C.T., Farr, K.L., Dunn, A.R., and Seamark, R.F. (1999). Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biol. Reprod.* 60, 251–261.

Robertson, S.A., Chin, P.Y., Glynn, D.J., and Thompson, J.G. (2011). Peri-conceptual cytokines—setting the trajectory for embryo implantation, pregnancy and beyond. *Am. J. Reprod. Immunol.* 66 *Suppl* 1, 2–10.

Robillard, P.Y., Hulsey, T.C., Périanin, J., Janky, E., Miri, E.H., and Papiernik, E. (1994). Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet* 344, 973–975.

Robillard, P.-Y., Dekker, G.A., and Hulsey, T.C. (2002). Evolutionary adaptations to pre-eclampsia/eclampsia in humans: low fecundability rate, loss of oestrus, prohibitions of incest and systematic polyandry. *Am. J. Reprod. Immunol.* 47, 104–111.

Rodesch, F., Simon, P., Donner, C., and Jauniaux, E. (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80, 283–285.

Romero, R., Kusanovic, J.P., Than, N.G., Erez, O., Gotsch, F., Espinoza, J., Edwin, S., Chafetz, I., Gomez, R., Nien, J.K., et al. (2008). First-trimester maternal serum PP13 in the risk assessment for preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 122.e1–122.e11.

Rossant, J., and Cross, J.C. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* 2, 538–548.

Rossi, A.C., and Mullin, P.M. (2011). Prevention of pre-eclampsia with low-dose aspirin or vitamins C and E in women at high or low risk: a systematic review with meta-analysis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 158, 9–16.

Roten, L.T., Johnson, M.P., Forsmo, S., Fitzpatrick, E., Dyer, T.D., Brennecke, S.P., Blangero, J., Moses, E.K., and Austgulen, R. (2009). Association between the candidate susceptibility gene ACVR2A on chromosome 2q22 and pre-eclampsia in a large Norwegian population-based study (the HUNT study). *Eur. J. Hum. Genet.* 17, 250–257.

Rowe, J.H., Ertelt, J.M., Xin, L., and Way, S.S. (2012). Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature* 490, 102–106.

Russ, A.P., Wattler, S., Colledge, W.H., Aparicio, S.A., Carlton, M.B., Pearce, J.J., Barton, S.C., Surani, M.A., Ryan, K., Nehls, M.C., et al. (2000). Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 404, 95–99.

Saji, F., Samejima, Y., Kamiura, S., and Koyama, M. (1999). Dynamics of immunoglobulins at the fetomaternal interface. *Rev. Reprod.* 4, 81–89.

Salmon, J.E., Heuser, C., Triebwasser, M., Liszewski, M.K., Kavanagh, D., Roumenina, L., Branch, D.W., Goodship, T., Fremeaux-Bacchi, V., and Atkinson, J.P. (2011). Mutations in complement regulatory proteins predispose to preeclampsia: a genetic analysis of the PROMISSE cohort. *PLoS Med.* 8, e1001013.

- Samstein, R.M., Josefowicz, S.Z., Arvey, A., Treuting, P.M., and Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* 150, 29–38.
- Sargent, I.L., Borzychowski, A.M., and Redman, C.W.G. (2006). Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod. Biomed. Online* 13, 680–686.
- Satokata, I., Benson, G., and Maas, R. (1995). Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* 374, 460–463.
- Saucedo, M., Deneux-Tharoux, C., and Bouvier-Colle, M.-H. (2010). Épidémiologie des morts maternelles en France 2001-2006.
- Savaj, S., and Vaziri, N. (2012). An overview of recent advances in pathogenesis and diagnosis of preeclampsia. *Iran J Kidney Dis* 6, 334–338.
- Scazzocchio, E., Figueras, F., Crispi, F., Meler, E., Masoller, N., Mula, R., and Gratacos, E. (2013). Performance of a first-trimester screening of preeclampsia in a routine care low-risk setting. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 208, 203.e1–203.e10.
- Scholz, C., Toth, B., Brunnhuber, R., Rampf, E., Weissenbacher, T., Santoso, L., Friese, K., and Jeschke, U. (2008). Glycodelin A induces a tolerogenic phenotype in monocyte-derived dendritic cells in vitro. *Am. J. Reprod. Immunol.* 60, 501–512.
- Schorpp-Kistner, M., Wang, Z.Q., Angel, P., and Wagner, E.F. (1999). JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J.* 18, 934–948.
- Sebire, N.J., Roberts, L., Noble, P., Wallace, E., and Nicolaidis, K.H. (2000). Raised maternal serum inhibin A concentration at 10 to 14 weeks of gestation is associated with pre-eclampsia. *BJOG* 107, 795–797.
- Sengoku, K., Tamate, K., Takaoka, Y., Horikawa, M., Goishi, K., Okada, R., Tsuchiya, K., and Ishikawa, M. (1999). Requirement of sperm-oocyte plasma membrane fusion for establishment of the plasma membrane block to polyspermy in human pronuclear oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 52, 183–188.
- Seoud, M.A.-F., Nassar, A.H., Usta, I.M., Melhem, Z., Kazma, A., and Khalil, A.M. (2002). Impact of advanced maternal age on pregnancy outcome. *Am J Perinatol* 19, 1–8.
- Sfakianaki, A.K., and Norwitz, E.R. (2006). Mechanisms of progesterone action in inhibiting prematurity. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 19, 763–772.
- Sferruzzi-Perri, A.N., Macpherson, A.M., Roberts, C.T., and Robertson, S.A. (2009). Csf2 null mutation alters placental gene expression and trophoblast glycogen cell and giant cell abundance in mice. *Biol. Reprod.* 81, 207–221.
- Sharkey, D.J., Macpherson, A.M., Tremellen, K.P., and Robertson, S.A. (2007). Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Mol. Hum. Reprod.* 13, 491–501.
- Sharkey, D.J., Tremellen, K.P., Jasper, M.J., Gemzell-Danielsson, K., and Robertson, S.A. (2012). Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *J. Immunol.* 188, 2445–2454.
- Shembrey, M.A., and Noble, A.D. (1995). An instructive case of abdominal pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 35, 220–221.
- Shokry, M., Bedaiwy, M.A., Fathalla, M.M.F., Alsemary, A., Elwakil, S., and Murphy, A. (2010). Maternal serum placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 as early predictors of preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 89, 143–146.
- Shyu, M.-K., Chen, C.-W., Lin, N.-Y., Liao, W.-C., Chen, C.-H., Lin, C.-J., Huang, H.-C., Lee, J.-J., Huang, M.-J., Tseng, G.-F., et al. (2011). MUC1 expression is elevated in severe preeclamptic placentas and suppresses trophoblast cell invasion via β 1-integrin signaling. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 3759–3767.
- Sibai, B.M. (2004). Magnesium sulfate prophylaxis in preeclampsia: Lessons learned from recent trials. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 1520–1526.
- Sibai, B., Dekker, G., and Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet* 365, 785–799.
- Sifer, C., and Poncelet, C. (2011). Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain (Springer Verlag France).

- Simmons, D.G., Fortier, A.L., and Cross, J.C. (2007). Diverse subtypes and developmental origins of trophoblast giant cells in the mouse placenta. *Dev. Biol.* *304*, 567–578.
- Singh, J., Ahmed, A., and Girardi, G. (2011). Role of complement component C1q in the onset of preeclampsia in mice. *Hypertension* *58*, 716–724.
- Skjaerven, R., Wilcox, A.J., and Lie, R.T. (2002). The interval between pregnancies and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* *346*, 33–38.
- Skjaerven, R., Vatten, L.J., Wilcox, A.J., Rønning, T., Irgens, L.M., and Lie, R.T. (2005). Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ* *331*, 877.
- Slowinski, T., Neumayer, H.-H., Stolze, T., Gossing, G., Halle, H., and Hocher, B. (2002). Endothelin system in normal and hypertensive pregnancy. *Clin. Sci.* *103 Suppl 48*, 446S–449S.
- Snyder, S.K., Wessner, D.H., Wessells, J.L., Waterhouse, R.M., Wahl, L.M., Zimmermann, W., and Dveksler, G.S. (2001). Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGF-beta1 by human monocytes. *Am. J. Reprod. Immunol.* *45*, 205–216.
- Solier, C., Aguerre-Girr, M., Lenfant, F., Campan, A., Berrebi, A., Rebmann, V., Grosse-Wilde, H., and Le Bouteiller, P. (2002). Secretion of pro-apoptotic intron 4-retaining soluble HLA-G1 by human villous trophoblast. *Eur. J. Immunol.* *32*, 3576–3586.
- Song, H., Lim, H., Das, S.K., Paria, B.C., and Dey, S.K. (2000). Dysregulation of EGF family of growth factors and COX-2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF-deficient mice. *Mol. Endocrinol.* *14*, 1147–1161.
- Soni, C., and Karande, A.A. (2010). Glycodelin A suppresses the cytolytic activity of CD8+ T lymphocytes. *Mol. Immunol.* *47*, 2458–2466.
- Spicer, A.P., Rowse, G.J., Lidner, T.K., and Gendler, S.J. (1995). Delayed mammary tumor progression in Muc-1 null mice. *J. Biol. Chem.* *270*, 30093–30101.
- Stanley, J.L., Andersson, I.J., Poudel, R., Rueda-Clausen, C.F., Sibley, C.P., Davidge, S.T., and Baker, P.N. (2012). Sildenafil citrate rescues fetal growth in the catechol-O-methyl transferase knockout mouse model. *Hypertension* *59*, 1021–1028.
- Staun-Ram, E., and Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *3*, 56.
- Stewart, C.L., Kaspar, P., Brunet, L.J., Bhatt, H., Gadi, I., Köntgen, F., and Abbondanzo, S.J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* *359*, 76–79.
- Strickland, S., and Richards, W.G. (1992). Invasion of the trophoblasts. *Cell* *71*, 355–357.
- Stuart, P.M. (2001). Major Histocompatibility Complex (MHC): Mouse. In *eLS*, (John Wiley & Sons, Ltd),.
- Sullivan, M.H.F. (2004). Endocrine cell lines from the placenta. *Mol. Cell. Endocrinol.* *228*, 103–119.
- Suzuki, M., Sato, S., Arai, Y., Shinohara, T., Tanaka, S., Grealley, J.M., Hattori, N., and Shiota, K. (2007). A new class of tissue-specifically methylated regions involving entire CpG islands in the mouse. *Genes Cells* *12*, 1305–1314.
- Syme, M.R., Paxton, J.W., and Keelan, J.A. (2004). Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet* *43*, 487–514.
- Takamoto, N., Zhao, B., Tsai, S.Y., and DeMayo, F.J. (2002). Identification of Indian hedgehog as a progesterone-responsive gene in the murine uterus. *Mol. Endocrinol.* *16*, 2338–2348.
- Takimoto, E., Ishida, J., Sugiyama, F., Horiguchi, H., Murakami, K., and Fukamizu, A. (1996). Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science* *274*, 995–998.
- Tanaka, M., Gertsenstein, M., Rossant, J., and Nagy, A. (1997). Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development. *Dev. Biol.* *190*, 55–65.

- Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A., and Rossant, J. (1998). Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282, 2072–2075.
- Tannetta, D.S., Sargent, I.L., Linton, E.A., and Redman, C.W.G. (2008). Vitamins C and E inhibit apoptosis of cultured human term placenta trophoblast. *Placenta* 29, 680–690.
- Tannetta, D.S., Dragovic, R.A., Gardiner, C., Redman, C.W., and Sargent, I.L. (2013). Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of flt-1 and endoglin. *PLoS ONE* 8, e56754.
- Tarrade, A., Schoonjans, K., Guibourdenche, J., Bidart, J.M., Vidaud, M., Auwerx, J., Rochette-Egly, C., and Evain-Brion, D. (2001a). PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 142, 4504–4514.
- Tarrade, A., Schoonjans, K., Pavan, L., Auwerx, J., Rochette-Egly, C., Evain-Brion, D., and Fournier, T. (2001b). PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5017–5024.
- Teran, E., Briones, F., Nicolalde, V., Vivero, S., Chedraui, P., and Pérez-López, F.R. (2012). Effect of intravenous hydralazine infusion on maternal plasma nitric oxide levels in gestations complicated with severe preeclampsia: a pilot study. *Arch. Gynecol. Obstet.* 285, 1183–1187.
- Tesser, R.B., Scherholz, P.L.A., Do Nascimento, L., and Katz, S.G. (2010). Trophoblast glycogen cells differentiate early in the mouse ectoplacental cone: putative role during placentation. *Histochem. Cell Biol.* 134, 83–92.
- Thibault, C., and Levasseur, M.-C. (2001). *La Reproduction chez les mammifères et l'homme* (Editions Quae).
- Thomopoulos, C., Tsioufis, C., Michalopoulou, H., Makris, T., Papademetriou, V., and Stefanadis, C. (2013). Assisted reproductive technology and pregnancy-related hypertensive complications: a systematic review. *J Hum Hypertens* 27, 148–157.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Thorne-Lyman, A., and Fawzi, W.W. (2012). Vitamin D during pregnancy and maternal, neonatal and infant health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol* 26 Suppl 1, 75–90.
- Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., and Harris, R.C. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230–234.
- Tipoe, G.L., Lau, T.Y.-H., Nanji, A.A., and Fung, M.-L. (2006). Expression and functions of vasoactive substances regulated by hypoxia-inducible factor-1 in chronic hypoxemia. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 4, 199–218.
- Tower, C.L., Chappell, S.L., Morgan, K., Kalsheker, N., Baker, P.N., and Morgan, L.J. (2005). Transforming growth factor beta1 regulates angiotensin II type I receptor gene expression in the extravillous trophoblast cell line SGHPL-4. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 847–852.
- Tranguch, S., Cheung-Flynn, J., Daikoku, T., Prapapanich, V., Cox, M.B., Xie, H., Wang, H., Das, S.K., Smith, D.F., and Dey, S.K. (2005). Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14326–14331.
- Trupin, L.S., Simon, L.P., and Eskenazi, B. (1996). Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology* 7, 240–244.
- Tsikouras, P., Dafopoulos, A., Trypsianis, G., Vrachnis, N., Bouchlariotou, S., Liatsikos, S.A., Dafopoulos, K., Maroulis, G., Galazios, G., Teichmann, A.T., et al. (2012). Pregnancies and their obstetric outcome in two selected age groups of teenage women in Greece. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 25, 1606–1611.
- Tsui, N.B.Y., and Lo, Y.M.D. (2012). Recent advances in the analysis of fetal nucleic acids in maternal plasma. *Curr. Opin. Hematol.* 19, 462–468.
- Tunster, S.J., Tycko, B., and John, R.M. (2010). The imprinted Phlda2 gene regulates extraembryonic energy stores. *Mol. Cell. Biol.* 30, 295–306.

Udayashankar, R., Baker, D., Tuckerman, E., Laird, S., Li, T.C., and Moore, H.D. (2011). Characterization of invasive trophoblasts generated from human embryonic stem cells. *Hum. Reprod.* 26, 398–406.

Universités de Fribourg, Lausanne et Berne (2005). *Embryologie Humaine*.

Vainio, M., Mäenpää, J., Riutta, A., Ylitalo, P., Ala-Fossi, S.L., and Tuimala, R. (1999). In the dose range of 0.5–2.0 mg/kg, acetylsalicylic acid does not affect prostacyclin production in hypertensive pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand* 78, 82–88.

Valley, J.K., Swinton, P., Boscardin, W.J., Lue, T.F., Rinaudo, P.F., Wu, M.C., and Garcia, M.M. (2010). Preimplantation mouse embryo selection guided by light-induced dielectrophoresis. *PLoS ONE* 5, e10160.

Vassiliadou, N., and Bulmer, J.N. (1996). Quantitative analysis of T lymphocyte subsets in pregnant and nonpregnant human endometrium. *Biol. Reprod.* 55, 1017–1022.

Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y.M., Bdolah, Y., Lim, K.-H., Yuan, H.-T., Libermann, T.A., et al. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* 12, 642–649.

Verwoerd, G.R., Hall, D.R., Grové, D., Maritz, J.S., and Odendaal, H.J. (2002). Primipaternity and duration of exposure to sperm antigens as risk factors for pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 78, 121–126.

Vikse, B.E., Irgens, L.M., Leivestad, T., Skjaerven, R., and Iversen, B.M. (2008). Preeclampsia and the risk of end-stage renal disease. *N. Engl. J. Med.* 359, 800–809.

Vikse, B.E., Irgens, L.M., Karumanchi, S.A., Thadhani, R., Reisæter, A.V., and Skjærven, R. (2012). Familial factors in the association between preeclampsia and later ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol* 7, 1819–1826.

Villar, J., Carroli, G., Wojdyla, D., Abalos, E., Giordano, D., Ba'aqeel, H., Farnot, U., Bergsjø, P., Bakketeig, L., Lumbiganon, P., et al. (2006). Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194, 921–931.

De Vries, J.I.P., Van Pampus, M.G., Hague, W.M., Bezemer, P.D., and Joosten, J.H. (2012). Low-molecular-weight heparin added to aspirin in the prevention of recurrent early-onset preeclampsia in women with inheritable thrombophilia: the FRUIT-RCT. *J. Thromb. Haemost.* 10, 64–72.

De Vries, W.N., Evsikov, A.V., Haac, B.E., Fancher, K.S., Holbrook, A.E., Kemler, R., Solter, D., and Knowles, B.B. (2004). Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Development* 131, 4435–4445.

Wang, H., and Dey, S.K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* 7, 185–199.

Wang, Q.T., Piotrowska, K., Ciemerych, M.A., Milenkovic, L., Scott, M.P., Davis, R.W., and Zernicka-Goetz, M. (2004). A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Dev. Cell* 6, 133–144.

Wang, W., Van De Water, T., and Lufkin, T. (1998). Inner ear and maternal reproductive defects in mice lacking the Hmx3 homeobox gene. *Development* 125, 621–634.

Wang, Y., Walsh, S.W., and Kay, H.H. (1992). Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167, 946–949.

Ware, C.B., Horowitz, M.C., Renshaw, B.R., Hunt, J.S., Liggitt, D., Koblar, S.A., Gliniak, B.C., McKenna, H.J., Papayannopoulou, T., and Thoma, B. (1995). Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development* 121, 1283–1299.

Watson, E.D., and Cross, J.C. (2005). Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda)* 20, 180–193.

Wendling, O., Chambon, P., and Mark, M. (1999). Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 547–551.

- Whitten, W.K. (1956). Culture of tubal mouse ova. *Nature* 177, 96.
- WHO (2005). The World Health Report 2005 - make every mother and child count.
- Wildman, D.E., Chen, C., Erez, O., Grossman, L.I., Goodman, M., and Romero, R. (2006). Evolution of the mammalian placenta revealed by phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3203–3208.
- Williams, Z. (2012). Inducing tolerance to pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 367, 1159–1161.
- De Wolf, F., Robertson, W.B., and Brosens, I. (1975). The ultrastructure of acute atherosclerosis in hypertensive pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 123, 164–174.
- Worley, K.C., Hnat, M.D., and Cunningham, F.G. (2008). Advanced extrauterine pregnancy: diagnostic and therapeutic challenges. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198, 297.e1–7.
- Wu, C.S., Nohr, E.A., Bech, B.H., Vestergaard, M., Catov, J.M., and Olsen, J. (2009). Health of children born to mothers who had preeclampsia: a population-based cohort study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 201, 269.e1–269.e10.
- Wu, J.A., Johnson, B.L., Chen, Y., Ha, C.T., and Dveksler, G.S. (2008). Murine pregnancy-specific glycoprotein 23 induces the proangiogenic factors transforming-growth factor beta 1 and vascular endothelial growth factor a in cell types involved in vascular remodeling in pregnancy. *Biol. Reprod.* 79, 1054–1061.
- Wu, L., De Bruin, A., Saavedra, H.I., Starovic, M., Trimboli, A., Yang, Y., Opavska, J., Wilson, P., Thompson, J.C., Ostrowski, M.C., et al. (2003). Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability. *Nature* 421, 942–947.
- Xiong, X., Demianczuk, N.N., Saunders, L.D., Wang, F.-L., and Fraser, W.D. (2002). Impact of preeclampsia and gestational hypertension on birth weight by gestational age. *Am. J. Epidemiol.* 155, 203–209.
- Xu, R.-H., Chen, X., Li, D.S., Li, R., Addicks, G.C., Glennon, C., Zwaka, T.P., and Thomson, J.A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat. Biotechnol.* 20, 1261–1264.
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R.I., Ornitz, D.M., Leder, P., and Deng, C. (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* 125, 753–765.
- Yamamoto, T., Suzuki, Y., Kojima, K., Suzumori, N., and Suzuki, T. (2010). The biological investigation of prostacyclin in preeclamptic women seen reduced endothelial function. *Hypertens Pregnancy* 29, 484–491.
- Yanit, K.E., Snowden, J.M., Cheng, Y.W., and Caughey, A.B. (2012). The impact of chronic hypertension and pregestational diabetes on pregnancy outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 207, 333.e1–6.
- Yu, J., Shixia, C.Z., Wu, Y., and Duan, T. (2011). Inhibin A, activin A, placental growth factor and uterine artery Doppler pulsatility index in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 37, 528–533.
- Zamudio, S. (2003). The placenta at high altitude. *High Alt. Med. Biol.* 4, 171–191.
- Zeitlin, J., Mohangoo, A., Alexander, S., Barros, H., Blondel, B., Bouvier-Colle, M.-H., Buitendijk, S., Cans, C., Correia, S., and Gissler, M. (2008). European perinatal health report.
- Zeng, F., Baldwin, D.A., and Schultz, R.M. (2004). Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev. Biol.* 272, 483–496.
- Zhang, H., Zhang, Y., Yang, F., Li, L., Liu, S., Xu, Z., Wang, J., and Sun, S. (2011). Complement component C4A and apolipoprotein A-I in plasmas as biomarkers of the severe, early-onset preeclampsia. *Mol Biosyst* 7, 2470–2479.
- Zhang, W., Zhang, D., Shen, M., Liu, Y., Tian, Y., Thomson, A.W., Lee, W.P.A., and Zheng, X.X. (2010). Combined administration of a mutant TGF-beta1/Fc and rapamycin promotes induction of regulatory T cells and islet allograft tolerance. *J. Immunol.* 185, 4750–4759.
- Zhang, Z., Li, Y., Zhang, L.L., Jia, L.T., and Yang, X.Q. (2012). Association of 14 bp insertion/deletion polymorphism of the HLA-G gene in father with severe preeclampsia in Chinese. *Tissue Antigens* 80, 158–164.

Zhou, C.C., Ahmad, S., Mi, T., Abbasi, S., Xia, L., Day, M.-C., Ramin, S.M., Ahmed, A., Kellems, R.E., and Xia, Y. (2008a). Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling. *Hypertension* 51, 1010–1019.

Zhou, C.C., Zhang, Y., Irani, R.A., Zhang, H., Mi, T., Popek, E.J., Hicks, M.J., Ramin, S.M., Kellems, R.E., and Xia, Y. (2008b). Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce preeclampsia in pregnant mice. *Nat. Med.* 14, 855–862.

Zhou, Y., Damsky, C.H., Chiu, K., Roberts, J.M., and Fisher, S.J. (1993). Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J. Clin. Invest.* 91, 950–960.

Zhou, Y., Fisher, S.J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., and Damsky, C.H. (1997a). Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.* 99, 2139–2151.

Zhou, Y., Damsky, C.H., and Fisher, S.J. (1997b). 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, 2152–2164.

Zhou, Y., Bellingard, V., Feng, K.-T., McMaster, M., and Fisher, S.J. (2003). Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C. *Developmental Biology* 263, 114–125.

Zintzaras, E., Kitsios, G., Harrison, G.A., Laivuori, H., Kivinen, K., Kere, J., Messinis, I., Stefanidis, I., and Ioannidis, J.P.A. (2006). Heterogeneity-based genome search meta-analysis for preeclampsia. *Hum. Genet.* 120, 360–370.

Ziyyat, A., Rubinstein, E., Monier-Gavelle, F., Barraud, V., Kulski, O., Prenant, M., Boucheix, C., Bomsel, M., and Wolf, J.-P. (2006). CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J. Cell. Sci.* 119, 416–424.

ANNEXES

ANNEXE 1

REVUE :

COMPARATIVE ANALYSIS OF MICE

MODELS FOR PREECLAMPSIA

**(Accepté pour publication dans Annales de Cardiologie et
d'Angéiologie en avril 2012 et publié en mai 2012)**

Mise au point

Analyse comparative des modèles souris de prééclampsie

Comparative analysis of mice models for preeclampsia

L. Doridot^{a, b, c}, C. Méhats^{a, b, c}, D. Vaiman^{a, □, b, c}

^a Inserm U1016, institut Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France

^b CNRS UMRS 8104, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France

^c Université Paris-Descartes, 12, rue de l'École-de-Médecine, 75006 Paris, France

Reçu le 10 avril 2012 ; accepté le 15 avril 2012

Disponible sur Internet le 8 mai 2012

Résumé

La prééclampsie est une maladie multifactorielle de la grossesse. C'est une cause majeure de mortalité et de morbidité maternelles et périnatales. Elle se définit par l'apparition de novo après la 20^e semaine d'aménorrhée d'une hypertension et d'une protéinurie. Cette pathologie, difficile à prévoir, trouve son origine à des stades précoces de la grossesse, ce qui la rend très difficile à étudier chez l'humain (phase présymptomatique et manque d'accès aux tissus). Des modèles animaux sont donc nécessaires pour étudier la physiopathologie de la prééclampsie, cependant, cette pathologie étant spécifiquement humaine, il n'y en a pas de spontanés. Des modèles induits ont donc été créés. Dans cette revue, les modèles obtenus chez la souris sont décrits et comparés. Ces modèles sont essentiels au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Hypertension ; Protéinurie ; Prééclampsie ; Modèles souris ; Placenta

Abstract

Preeclampsia is a multifactorial disease of pregnancy. It is a major cause of maternal and perinatal mortality and morbidity and is defined by the de novo onset of hypertension and proteinuria after the 20th week of pregnancy. This pathology manifests during the early stages of pregnancy, making it hard to predict and very difficult to study in humans (presymptomatic phase and lack of tissues access). Animal models are therefore necessary to study the physiopathology of preeclampsia, however, since this pathology is specifically human, there are no spontaneous models. Animal models have thus been engineered. In this review, the models obtained in mice are described and compared. These models are essential for the development of new therapeutic strategies.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Hypertension; Proteinuria; Preeclampsia; Mice model; Placenta

1. Introduction

La prééclampsie (PE) est une maladie multifactorielle touchant 3 à 5 % des femmes enceintes. C'est une cause majeure de mortalité et de morbidité maternelles et périnatales. Elle se définit par l'apparition de novo après la 20^e semaine d'aménorrhée d'une hypertension (140/90 mmHg pour la systole et la diastole respectivement, 160/110 dans les PE sévères) et d'une protéinurie (> 300 mg/j). Actuellement, le seul traitement consiste à

extraire le placenta et le fœtus, souvent avant terme, avec pour conséquence une prématurité iatrogène. Singulièrement, la primiparité est un facteur de risque (75 % des PE [1]), ce qui en fait une pathologie difficile à prévoir. L'hypertension, un diabète préexistant ou l'obésité augmentent aussi les risques. Les symptômes s'aggravent dès leur apparition, les PE sévères sont ainsi souvent précoces. La PE a une forte composante génétique, comme le prouvent les analyses épidémiologiques qui permettent d'en estimer l'héritabilité à environ 50 % [2].

D'un point de vue histologique, les placentas de patientes prééclamptiques présentent une invasion trophoblastique moins profonde que les placentas normaux [3] avec un défaut du remodelage des artères utérines par les trophoblastes extravilloux

□ Auteur correspondant.

Adresse e-mail : daniel.vaiman@inserm.fr (D. Vaiman).

invasifs. Ce remodelage a lieu à la fin de premier trimestre et permet normalement une perte des capacités contractiles de ces artères (en raison de la substitution des cellules endothéliales par des trophoblastes d'origine fœtale qui adoptent un phénotype endothélial, sans que les bases moléculaires de cette transformation soient encore bien comprises). Lorsque l'invasion est insuffisante, comme en PE, il y a une hypoperfusion du placenta.

2. Nécessité des modèles animaux

La PE semble restreinte à l'espèce humaine (cela étant sans doute lié à la spécificité humaine concernant l'invasion profonde des trophoblastes humains dans le myomètre maternel), ce qui signifie qu'aucun modèle animal spontané n'existe. Pourtant, des modèles animaux sont nécessaires pour obtenir des pistes ou des réponses quant à la physiopathologie de la PE, puisqu'ils permettent d'explorer tous les stades du développement placentaire. Les modèles animaux sont également essentiels pour explorer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Les rongeurs constituent un modèle de choix pour l'étude de la PE : en effet, comme dans l'espèce humaine, ils développent un placenta discoïde d'origine maternelle et fœtale, de type hémochorial (sang maternel directement au contact du trophoblaste). Le placenta humain est de type monochorial (une seule couche de cellules entre le sang maternel et le sang fœtal), tandis que le placenta murin est trichorial (trois couches), cependant il semble que le sang maternel puisse apparemment accéder à la bicouche de syncytiotrophoblastes [4]. Le placenta murin possède une structure spécifique : le labyrinthe (où se font les échanges fœtoplacentaires), qui pourrait être considéré comme homologue de l'espace intervilloux du placenta humain. Il faut donc être conscient des différences anatomiques réelles entre

placentas murin et humain, qui constitue une limite du modèle murin pour l'étude de la placentation, et en particulier pour les mécanismes d'invasion. Il est cependant à noter que des arguments issus de données cliniques et de modèles murins tendent à distinguer les anomalies d'invasion et la PE (l'invasion superficielle observée ne serait qu'une conséquence de mécanismes plus précoces) :

- une pression artérielle plus élevée au premier trimestre (avant l'invasion profonde des artères utérines) est observée chez les femmes qui développeront par la suite une PE [5] ;
- chez la souris, lorsque le remodelage des artères spiralées utérines est altéré, on n'observe pas d'hypoxie placentaire et de symptômes prééclampsiques, ce qui indique que ce défaut de remodelage n'est pas suffisant pour induire la pathologie [6].

Donc, globalement, le modèle murin pourrait apporter de nouvelles pistes sur la physiopathologie de la PE.

En ce sens, de nombreuses tentatives pour obtenir de bons modèles de PE chez la souris et le rat ont été tentées. Nous ne parlerons ici que des modèles obtenus chez la souris, afin de pouvoir avoir une approche comparative (Fig. 1 pour la pression artérielle, Fig. 2 pour la protéinurie).

Les différents modèles se sont basés sur l'altération d'éléments clés de la physiopathologie de la placentation et de la PE : les équilibres de substances vaso-actives (avec en particulier sFlt1), l'hypertension chronique et le système rénine angiotensine, l'immunité et l'auto-immunité, l'hypoxie, et les gènes soumis à empreinte parentale.

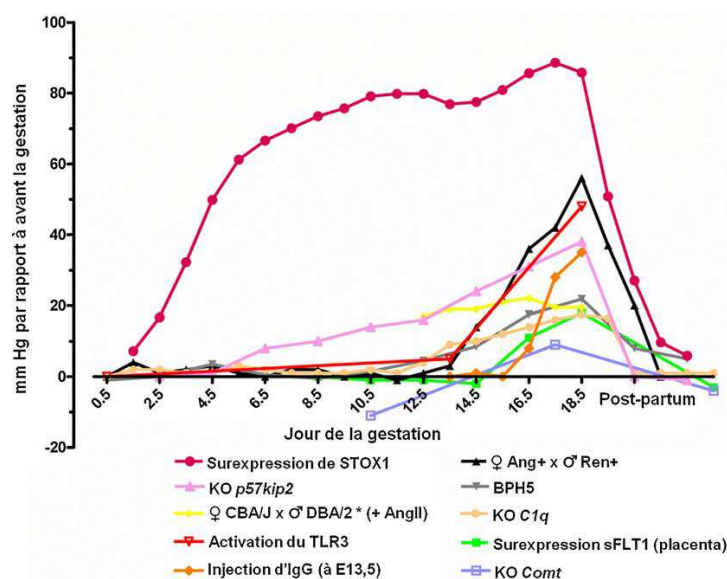


Fig. 1. Pression artérielle systolique au cours de la gestation dans différents modèles de souris prééclampsiques. La pression artérielle mentionnée correspond à la différence observée par rapport au niveau de pression artérielle avant la gestation, sauf dans le cas du croisement ♀CBA/J × ♂DBA/2 (*) où il s'agit de la différence observée par rapport à des souris témoins (♀CBA/J × ♂BALB/c) au même jour de gestation et avec le même traitement à l'angiotensine II (+AngII).

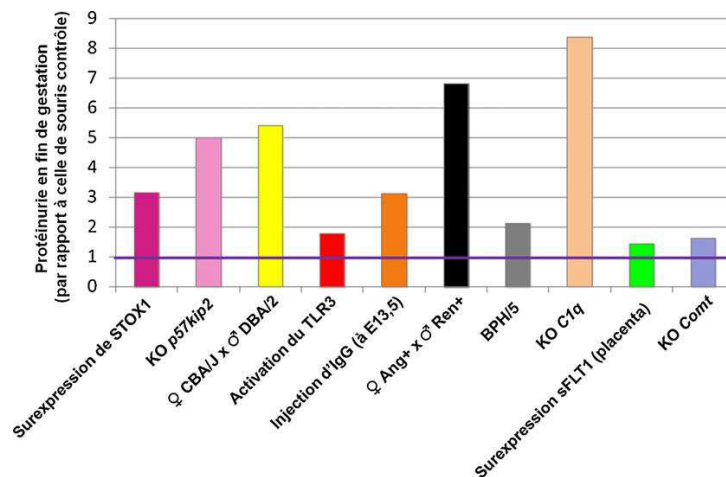


Fig. 2. Protéinurie en fin de gestation de différents modèles de souris prééclampsiques. La valeur mentionnée correspond au facteur d'induction de la protéinurie ou du rapport albumine sur créatinine par rapport à celle ou celui de souris témoins au même stade de gestation (ligne violette à 1).

3. La surexpression de sFLT1

Le dosage sérique de sFLT1 (le récepteur soluble du facteur angiogénique VEGF, qui est donc en compétition avec la forme membranaire) est un des marqueurs les plus précoces connus pour être augmenté chez les femmes atteintes de PE. sFLT1 a été surexprimé dans le trophoblaste murin (grâce à l'infection lentivirale de blastocystes) et cela a engendré l'apparition d'une hypertension modérée (+20 mmHg, courbe verte sur la Fig. 1) et d'une protéinurie ($\times 1,42$, barre verte sur la Fig. 2) [7]. Cependant, l'infection adénovirale induisant l'expression de sFLT1 de souris non gestantes entraîne les mêmes anomalies [8], indiquant que ce mécanisme peut être indépendant de la gestation. Dans ces modèles, des traitements par du VEGF, du Placental Growth Factor (PIGF) ou de la pravastatine (un hypolipémiant) se sont révélés efficaces pour prévenir l'apparition des symptômes.

4. Le système rénine angiotensine et l'hypertension chronique

Une hypertension préalable à la grossesse est un facteur de risque de PE. Le système rénine angiotensine joue un rôle clé dans le contrôle de la pression artérielle. Ainsi, il a été ciblé pour créer un modèle de PE : des femelles transgéniques exprimant l'angiotensinogène humain ont été accouplées avec des mâles transgéniques exprimant la rénine humaine. Les souris gestantes ont montré une élévation transitoire de leur pression artérielle en fin de gestation (+56 mmHg, courbe noire sur la Fig. 1), une protéinurie ($\times 6,8$, barre noire sur la Fig. 2) ainsi qu'une augmentation de la taille des glomérules [9]. Il est intéressant de noter que le croisement réciproque n'a pas d'effet sur la pression artérielle au cours de la gestation. Des femelles doubles transgéniques exprimant à la fois la rénine et l'angiotensinogène humains constituent une variante de ce modèle, avec une hypertension chronique (+30 mmHg) augmentant encore d'environ

20 mmHg pendant la gestation, et une protéinurie gestationnelle [10]. Cela indique que la part de la gestation dans l'augmentation de la pression artérielle du premier modèle (femelle exprimant l'angiotensinogène \times mâle exprimant la rénine) n'est que d'environ 20 mmHg.

La lignée murine BPH/5 constitue un modèle similaire avec une hypertension chronique (+20 mmHg par rapport aux souris C57BL/6). En effet, pendant la gestation, la pression artérielle de ces souris augmente (+25 mmHg, courbe grise sur la Fig. 1) et une protéinurie apparaît ($\times 2,1$, barre grise sur la Fig. 2), et est accompagnée d'une glomérulosclérose [11]. Dans ce dernier modèle, l'implication des espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été proposée [12], supportée par l'efficacité d'un traitement au Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetraméthyl-piperidinoxy), qui mime l'activité de la superoxyde dismutase SOD) à prévenir l'apparition des symptômes.

5. L'immunité innée et l'auto-immunité

Du point de vue immunologique, plusieurs modèles de PE existent : certains impliquent l'immunité innée (avec le système du complément et les TLR), d'autres l'auto-immunité (avec l'injection d'auto-anticorps).

Concernant l'immunité innée, le croisement CBA/J \times DBA/2 constitue le modèle historique. Les souris CBA/J croisées avec des mâles DBA/2 [8] présentent une résorption embryonnaire importante (30 % contre 8 % pour les croisements CBA/J \times BALB/c témoins), une protéinurie ($\times 5,4$, barre jaune sur la Fig. 2) et une endothéliose rénale (accompagnée de dépôts de fibrine). Ces souris ne développent pas d'hypertension gestationnelle, mais montrent une sensibilité accrue à l'angiotensine II avec une augmentation de la pression artérielle de 20 mmHg plus élevée que celle des souris témoins traitées de la même façon (injection d'angiotensine II, 3 μ mol/kg, courbe jaune sur la Fig. 1). La pravastatine et

le VEGF ont également montré leur efficacité thérapeutique dans ce modèle [8]. De façon intéressante, ce modèle est le seul à ne montrer un phénotype qu'à la première gestation (les gestations suivantes étant normales), cela étant sans doute lié aux interactions immunologiques entre ces deux lignées. En ce sens, une activation précoce du complément (C3) a été montrée à l'interface fœtomaternelle dans ce modèle [13]. Cette activation a certainement un rôle clé dans l'induction des symptômes, puisque l'utilisation d'un inhibiteur du complément (CR2-Crry) de façon précoce empêche l'apparition de ceux-ci.

Les souris invalidées (KO) pour C1q constituent un autre argument quant au rôle clé du complément, en effet, elles sont aussi un modèle de PE [14]. Ces souris KO pour C1q développent pendant la gestation une hypertension (+17,5 mmHg, courbe orange claire sur la Fig. 1), de la protéinurie ($\times 8,4$, barre orange claire sur la Fig. 2), de l'endothéliose rénale (avec dépôts de fibrine) ainsi qu'une augmentation du sFLT1 plasmatique et de la mort embryonnaire. La pravastatine empêche l'apparition des symptômes dans cette lignée. Concernant les TLR, l'activation du TLR3 chez des souris gestantes induit une hypertension (+48 mmHg, courbe rouge sur la Fig. 1) et une protéinurie ($\times 1,8$, barre rouge sur la Fig. 2), et ce, uniquement si les souris sont gestantes [15].

En ce qui concerne l'auto-immunité, il a été montré qu'il était possible d'induire un phénotype de type prééclampsique chez la souris gestante en injectant des immunoglobulines (IgG) issues de patientes prééclampsiques [16], et en particulier avec leurs auto-anticorps ciblant le récepteur de l'angiotensine II de type 1A (AT₁). Les souris gestantes ayant reçu l'injection développent une hypertension (+35 mmHg, courbe orange foncé sur la Fig. 1) et une protéinurie ($\times 3,1$, barre orange foncé sur la Fig. 2), ainsi qu'une endothéliose rénale. Ces symptômes sont évités grâce à un traitement au losartan (un antagoniste d'AT₁). Cependant, l'injection de ces auto-anticorps à des souris non gestantes entraîne également une hypertension (+30 mmHg) et une augmentation de la protéinurie (non significative).

6. *Comt* et l'hypoxie

Des souris déficientes (KO) pour le gène *Comt* ont également été proposées comme modèle de PE. COMT est une enzyme responsable de la synthèse du 2-méthyl-œstradiol (2-ME), un inhibiteur de HIF1 α (le facteur de transcription qui induit la transcription de gènes cibles en réponse à l'hypoxie). Les souris KO *Comt* développent une hypertension (+15 mmHg, courbe bleue sur la Fig. 1) et une protéinurie ($\times 1,6$, barre bleue sur la Fig. 2) gestationnelles, accompagnées d'une endothéliose rénale [17]. Ce modèle serait basé sur une réactivité accrue du placenta face à l'hypoxie, induisant des défauts d'invasion et de vascularisation. L'administration de 2-ME, le métabolite déficitaire, traite efficacement ces souris.

7. Les gènes soumis à empreinte parentale

Selon l'hypothèse de Jennifer Marshall-Graves [18], des gènes soumis à empreinte parentale pourraient être impliqués

dans la physiopathologie de la PE (avec expression de l'allèle d'origine maternelle).

Le gène *p57kip2* est un gène soumis à empreinte (à expression maternelle), qui code un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes et régule ainsi la prolifération cellulaire. Les souris gestantes *p57kip2* \pm (croisées avec des mâles *p57kip2* \pm) développent une hypertension gestationnelle (+38 mmHg, courbe rose clair sur la Fig. 1) et une protéinurie ($\times 5$, barre rose clair sur la Fig. 2), ainsi qu'une endothéliose rénale accompagnée de dépôts de fibrine [19].

Lors d'une analyse basée sur des familles de femmes prééclampsiques, le gène *STOX1*, soumis à l'empreinte parentale (dans un type cellulaire particulier, à expression maternelle), fut le premier gène lié à la PE par des approches de clonage positionnel [20]. *STOX1*, pour *STorkhead bOX 1*, est un facteur de transcription et est impliqué dans la prolifération et l'invasion trophoblastique [21]. La surexpression de *STOX1* dans un modèle de choriocarcinome (cellules JEG-3) suivi d'une analyse transcriptomique globale a été réalisée. Cette surexpression mime les altérations transcriptionnelles observées dans des placentas prééclampsiques [22,23]. Des souris transgéniques surexprimant la version humaine de *STOX1* ont été générées (Doridot et al., en préparation). Elles développent au cours de la gestation une hypertension précoce et sévère (+80 mmHg, courbe fuchsia sur la Fig. 1) et une protéinurie ($\times 3,15$, barre fuchsia sur la Fig. 2). Des altérations histologiques ont été observées au niveau des reins, avec des dépôts de fibrine, et au niveau des placentas transgéniques. Dans ce modèle, l'aspirine à faible dose, un traitement proposé pour les patientes à risque [24–26], s'est montré efficace.

8. Conclusion

Il existe donc divers modèles de PE obtenus chez la souris. Dans la plupart, l'hypertension est relativement modérée et apparaît tardivement (après E12,5). Le modèle impliquant la surexpression de *STOX1* se singularise de ce point de vue, puisque l'hypertension apparaît de façon précoce, avant la mise en place du placenta, et atteint un seuil élevé comparable aux cas de PE sévère chez les patientes. Pour ce qui est de la protéinurie, les différents modèles présentent une large gamme phénotypique. Il faut d'ailleurs noter qu'il n'y a pas de corrélation évidente entre la sévérité du phénotype hypertensif et celui du phénotype protéinurique.

D'une part, l'ensemble de ces modèles donne des pistes intéressantes quant aux causes précoces de la PE et quant à sa physiopathologie : par exemple, l'implication des espèces réactives de l'oxygène (lignée BPH/5), l'hypoxie (souris KO *Comt*), des mécanismes faisant intervenir le complément à l'interface materno-fœtale (CBA/J \times DBA/2, et KO *C1q*), des mécanismes pré- ou péri-implantatoires dans le modèle de surexpression de *STOX1*, ce qui renverse le dogme faisant du placenta la cause primaire de la PE. L'ensemble de ces pistes constitue des voies de recherche à poursuivre.

D'autre part, ces modèles sont et seront clé pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ainsi, un essai

clinique a été initié pour mesurer le bénéfice éventuel apporté par les statines dans les cas de PE précoce à Edinburg.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Robillard PY, Hulseley TC, Perianin J, Janky E, Miri EH, Papiernik E. Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet* 1994;344:973–5.
- [2] Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Lichtenstein P. Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *Am J Med Genet A* 2004;130:365–71.
- [3] Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592–4.
- [4] Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 2002;23:3–19.
- [5] Poon LC, Kametas NA, Valencia C, Chelemen T, Nicolaidis KH. Hypertensive disorders in pregnancy: screening by systolic diastolic and mean arterial pressure at 11–13 weeks. *Hypertens Pregnancy* 2011;30:93–107.
- [6] Leno-Duran E, Hatta K, Bianco J, Yamada AT, Ruiz-Ruiz C, Olivares EG, et al. Fetal-placental hypoxia does not result from failure of spiral arterial modification in mice. *Placenta* 2010;31:731–7.
- [7] Kumasawa K, Ikawa M, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, et al. Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:1451–5.
- [8] Bergmann A, Ahmad S, Cudmore M, Gruber AD, Wittschen P, Lindenmaier W, et al. Reduction of circulating soluble Flt-1 alleviates preeclampsia-like symptoms in a mouse model. *J Cell Mol Med* 2010;14:1857–67.
- [9] Takimoto E, Ishida J, Sugiyama F, Horiguchi H, Murakami K, Fukamizu A. Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science* 1996;274:995–8.
- [10] Falcao S, Stoyanova E, Cloutier G, Maurice RL, Gutkowska J, Lavoie JL. Mice overexpressing both human angiotensinogen and human renin as a model of superimposed preeclampsia on chronic hypertension. *Hypertension* 2009;54:1401–7.
- [11] Davison RL, Hoffmann DS, Butz GM, Aldape G, Schlager G, Merrill DC, et al. Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 2002;39:337–42.
- [12] Hoffmann DS, Weydert CJ, Lazartigues E, Kutschke WJ, Kienzle MF, Leach JE, et al. Chronic tempol prevents hypertension, proteinuria, and poor fetoplacental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia. *Hypertension* 2008;51:1058–65.
- [13] Qing X, Redecha PB, Burmeister MA, Tomlinson S, D'Agati VD, Davison RL, et al. Targeted inhibition of complement activation prevents features of preeclampsia in mice. *Kidney Int* 2011;79:331–9.
- [14] Singh J, Ahmed A, Girardi G. Role of complement component C1q in the onset of preeclampsia in mice. *Hypertension* 2011;58:716–24.
- [15] Chatterjee P, Chiasson VL, Kopriva SE, Young KJ, Chatterjee V, Jones KA, et al. Interleukin 10 deficiency exacerbates toll-like receptor 3-induced preeclampsia-like symptoms in mice. *Hypertension* 2011;58:489–96.
- [16] Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med* 2008;14:855–62.
- [17] Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, et al. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 2008;453:1117–21.
- [18] Graves JA. Genomic imprinting, development and disease—is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:23–9.
- [19] Kanayama N, Takahashi K, Matsuura T, Sugimura M, Kobayashi T, Moniwa N, et al. Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol Hum Reprod* 2002;8:1129–35.
- [20] van Dijk M, Mulders J, Poutsma A, Konst AA, Lachmeijer AM, Dekker GA, et al. Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet* 2005;37:514–9.
- [21] van Dijk M, van Bezu J, van Abel D, Dunk C, Blankenstein MA, Oudejans CB, et al. The STOX1 genotype associated with pre-eclampsia leads to a reduction of trophoblast invasion by alpha-T-catenin upregulation. *Hum Mol Genet* 2010;19:2658–67.
- [22] Rigourd V, Chauvet C, Chelbi ST, Rebourcet R, Mondon F, Letourneur F, et al. STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PLoS One* 2008;3:e3905.
- [23] Rigourd V, Chelbi S, Chauvet C, Rebourcet R, Barboux S, Bessieres B, et al. Re-evaluation of the role of STOX1 transcription factor in placental development and preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2009;82:174–81.
- [24] Wallenburg HC, Dekker GA, Makovitz JW, Rotmans P. Low-dose aspirin prevents pregnancy-induced hypertension and pre-eclampsia in angiotensin-sensitive primigravidae. *Lancet* 1986;1:1–3.
- [25] Bujold E, Roberge S, et al. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2010;116:402–14.
- [26] Bakhti A, Vaiman D. Prevention of gravidic endothelial hypertension by aspirin treatment administered from the 8th week of gestation. *Hypertens Res* 2011;34:1116–20.

ANNEXE 2

REVUE :

**DNA METHYLATION, AN
EPIGENETIC MODE OF GENE
EXPRESSION REGULATION IN
REPRODUCTIVE SCIENCE**

**(Accepté pour publication dans Current Pharmaceutical Design
en janvier 2013, sous presse)**

DNA methylation, an epigenetic mode of gene expression regulation in reproductive science

Rosamaria Calicchio*^{1,2,3}, Ludivine Doridot*^{1,2,3}, Francisco Miralles^{1,2,3}, Céline Méhats^{1,2,3}, Daniel Vaiman^{1,2,3}

* These two authors contributed equally to the text.

¹) Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France.

²) CNRS, UMR8104, Paris, France.

³) Université Paris Descartes, Paris, France

Corresponding author : Dr Daniel Vaiman

Email : daniel.vaiman@inserm.fr

Keywords : DNA methylation, Epigenetics, Reproduction, Placenta, Sperm, Infertility, Medically assisted Reproduction, Imprinted genes

Abstract

DNA methylation is an important part of the epigenetic code governing gene expression. In human reproductive diseases, recent studies have shown perturbations to DNA methylation profiles at various genomic loci. In this review, this type of epigenetic alteration is explored in pathological spermatogenesis, ovarian diseases, placental syndromes such as preeclampsia and Intra-Uterine Growth Restriction, uterine diseases such as endometriosis, and in pathophysiological effects associated with Assisted Reproductive Technologies. We review the notion of epigenetics, the technical methods available to analyze DNA methylation, and the known associations between reproductive diseases and DNA methylation, focusing on human pathologies and on animal models when available, but excluding cancer. We show that imprinted genes control regions (ICRs) are a prominent and frequent target of methylation anomalies in reproductive disorders, but that such alterations also affect non-imprinted genes. The mechanisms of gene regulation in response to DNA methylation anomalies is also discussed in this review where it has been investigated.

Keywords : DNA methylation, Epigenetics, Reproduction, Placenta, Sperm, Infertility, Medically assisted Reproduction, Imprinted genes

1. General introduction on DNA methylation

In human (and other mammalian) cell nuclei, the distance separating two consecutive base pairs of DNA is estimated at 0.3 nm [1]. Since there are 3 billion base pairs in one haploid genome, the total size of the haploid genome is around one meter. The nuclei of most cells are ~ 5-10 μm . This poses two major challenges: (i) how to store this huge molecule in such a small volume? and (ii) assuming that the first challenge is solved, how can genes be properly regulated in such a restricted space?

The problem of packing DNA into the nucleus is achieved through its incorporation into chromatin, which involves wrapping DNA around a core of histone proteins forming nucleosomes. These constitutes fibers of 11 nm. These fibers are then packed in 30 nm fibers, then in 300 nm looped domains and finally a 700 nm condensed coiled that constitute the arms of a metaphase chromosome [2]. Once this 'library' is constituted, access to the pertinent information (materialized by the expression of a given gene at a controlled and specific moment in a tissue or during development) seems to constitute a conundrum. Epigenetics is the reading rule of the genetic material, acting as the gatekeeper to authorize an exquisitely precise regulation of gene expression. It is heritable through mitosis and sometimes through meiosis, and thus can bring about heritable changes in gene expression without changing DNA primary sequence. Three major mechanisms of epigenetic regulation have been described: DNA methylation, post-translational modifications to histones, and synthesis of non-coding small RNA, such as micro RNA, that are stored in the cells and generally operate to inhibit gene expression. These three mechanisms act as a network [3]. In this review, we will focus on DNA methylation and its known impact in human reproductive diseases (Figure 1). In mammals, methylation occurs mainly at the C of CpG dinucleotides. The palindromic structure of CpG dinucleotides allows methylation on both strands. DNA methylation is achieved by the action of DNA methyl transferases (DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B and DNMT3L) encoded by related genes and their action and targets have been recently reviewed [4]. A developing field of research is linked to the existence of active mechanisms of demethylation, or to a specific excision of DNA fragments encompassing methylated CpG dinucleotides, via the action of TET (1-3), AID and GADD45 proteins [5-7]. A novel modification of CpG islands, hydroxy-methylation, is emerging as an important modification in mammalian cells. In reproductive science, the reprogramming of the embryo necessitates an active demethylation of the paternal genome, and may involve hydroxyl methylation as an intermediate [8].

While the current dogma associates DNA methylation with transcriptional repression, numerous exceptions are known and global correlations between expression and methylation are low and may be dependent on the position of the CpG. For instance, a very recent study on B-cell development shows that methylation of CpG islands in the body of genes are rather associated with expression increase [9]. In fact, the number of studies attempting to associate DNA methylation to gene expression in a mechanistic way are few. So, while DNA methylation is technically speaking the easiest epigenetic modification to analyze, it is also paradoxically the least studied in terms of its direct or indirect impact on gene expression.

These analyses of DNA methylation were in fact carried out firstly in the context of parental imprinting. Genomic imprinting refers to a system of regulating gene expression that ensures the establishment and maintenance of allele-specific gene expression strictly linked to parental origin. Imprinted genes have been identified in plants, insects, and mammals. In mammals, which are the focus of this review, about 70 imprinted genes have been discovered in humans and more than 100 in mice (see for instance <http://igc.otago.ac.nz/home.html>). Theoretical [10] and experimental considerations [11] strongly suggest that these genes may be more numerous. Imprinting is established in the gonad and implemented in a sex-dependent fashion in the germ cells. Part of this programming is associated with differential DNA methylation at specific loci called Imprinting Control Regions, (ICR). The most extensively described ICR, controls in a mirror fashion the expression of two paradigmatic imprinted genes, IGF2 and H19, whose imprinted status appears to be conserved in all Therian mammals [12]. IGF2 and H19 are located at the telomeric part of chromosome 11 in humans (11p15). The ICR that controls the expression of the two genes (generally called ICR1) is located between the two genes, at ~3kb 5' of H19 (Figure 2). In the classical model, when this ICR is unmethylated, the Zinc Finger Transcription Factor protein *CTCF* is able to bind and to trigger the activation of H19 from a distal (telomeric) enhancer. This is the situation on the maternal allele. In the reciprocal situation encountered on the male allele, the ICR is methylated, preventing the binding of CTCF, allowing the enhancer to activate the IGF2 promoter (~90 kb upstream). It is clear however that this model is oversimplified since the regulation on large genomic elements cannot be accounted for only by the linear order of genes and regulatory elements, but rather by a 3-D structure [13, 14].

In studies on reproductive diseases, altered patterns of expression of imprinted genes are recurrently found. Amongst the most common reproductive defects linked with imprinting, are hydatiform moles [15], where two male genomes initiate the development without female contribution. The loss of DNA methylation specific to maternal DMRs in the female germ line, leads to a total failure of fetal tissue development and overgrowth of placental structures. Predisposition to this epigenetic disease has been linked to mutations in *NLRP7* (Nacht, LRR and Pyrin domain containing 7) [16], suggesting interplay between epigenetic and genetic mechanisms [17]. The purpose of the present review is on reproductive biology but we placed cancer (such as tumours of the genital tract) outside its scope, in order to keep focus and limit the size.

2. Updates on methodologies to identify differentially methylated regions

The identification of differentially methylated regions relies on a methylation-dependent treatment and/or recognition of genomic DNA. Three methods are commonly used to discriminate methylated DNA:

- endonuclease digestion with methylation sensitive/insensitive enzymes
- affinity enrichment using antibodies specific to methylated cytosines (⁵mC) or for hydroxymethylated cytosines (⁵hmC) or specific to proteins interacting with methylated DNA
- bisulfite treatment that drives chemical conversion of DNA (changing all the cytosines in thymines except if they are methylated).

These three methods (described in more detail thereafter, and charted as Figure 3 have been validated along targeted approaches and more recently served as bases for genome-wide studies.

2.a Targeted approaches

Historically, Riggs and Holliday independently proposed that chemical modifications of the DNA such as methylation could influence gene expression [18, 19]. The observations were made after two-dimensional gel electrophoresis, chromatography and/or radioisotope incorporation. The discovery of endonucleases, the enzymes that cut DNA, capable of discriminating methylated from unmethylated DNA in the late seventies boosted the research in this domain, and isoschizomer pairs such as *MspI/HpaII* have been shown to cover up to 98,5% of the CpG Islands or 91,1% of the RefSeq promoters [20, 21]. Both recognize and cut at the same sequence, CCGG, but methylation of the second C in this motif prevents digestion by *HpaII*. Others pairs have been described such as *DpnI/DpnII* or *SmaI/XmaI*, but enzyme-based methods are confined to recognition elements and can only interrogate a subset of all sites of DNA methylation.. Moreover the resolution remains modest; it depends on the DNA sequence, a myriad of bands may be generated from one region, and polyclonal or mixed methylation patterns may render the results uninterpretable.

The next revolution in DNA methylation studies arose from the discovery of the fact that methylcytosines were accessible to specific antibodies [22]. Later on, antibodies specific to proteins bound to methylated cytosines (methyl binding domains) were developed [23]. These approaches, called MeDIP (for Methyl DNA ImmunoPrecipitation) and MBDIP (for Methyl Binding protein DNA) respectively, allow enrichment of sites containing relatively high levels of cytosine methylation, and hence large and dense CpGs islands, but have a low resolution of detection, unable to distinguish methylation at the single-base level. Moreover these methods require relatively large amounts of input genomic DNA; they discriminate with difficulty similar sequences, and false positive results may be obtained due to capture of unmethylated DNA. One advantage of the affinity enrichment approach is the possibility to specifically discriminate hydroxymethylated DNA using antibodies raised against ⁵hmC.

The discovery in 1970 that uracil, thymidine, and deoxycytidine were subjected to sulfonation at position six of their pyrimidine rings upon bisulfite treatment [24, 25] prepared the launch of the bisulfite conversion era. Ten years later, Wang et coll. demonstrated that ⁵mC is also sensitive to bisulfite treatment but at a much slower rate than cytosine [26], and Frommer and colleagues established the nowadays classical method to identify methylation patterns in individual strands of particular genomic sequences by using bisulfite-induced modification of genomic DNA, under conditions whereby cytosine is converted to uracil, but ⁵mC remains nonreactive [27]. Subsequent PCR using two sets of strand-specific primers yields a pair of fragments, one from each strand, in which all uracil and thymine residues are amplified as thymine and only 5-methylcytosine residues are amplified as cytosine. The PCR products are then sequenced. This technique allowed for the first time an easy mapping of methylated DNA at the single-base resolution. There are however several limitations to bisulfite sequencing. Bias and measurement errors may be introduced by incomplete bisulfite

conversion and DNA may be damaged by the treatment. Bisulfite-treated DNA shows a reduced sequence complexity; with the exception of ⁵mC, only three different bases instead of four are present, meaning that more than 90% of Cytidines are changed to Uracils. This decreases hybridization specificity and renders PCR primer design difficult. PCR efficiency may also be different for methylated versus unmethylated version of the same sequence and true quantification may not be easily obtained. One final important limitation is that bisulfite treatment makes no distinction between ⁵mC and ⁵hmC. Nonetheless, the "gold standard" for DNA methylation studies remains bisulfite conversion of DNA followed by cloning and sequencing. However the scaling up of bisulfite conversion sequencing approaches to analysis of the entire genome is impractical, in that it requires synthesis of vast numbers of primers and *a priori* knowledge or assumption of the sequences at specific loci. The use of degenerate primer sequences only adds difficulties, reducing amplification specificity.

One should keep in mind that there are dynamic changes in response to the cellular environment and various other stimuli and that methylated DNA patterns are specific to tissue and developmental stages. Single-base pair resolution is only able to give a comprehensive read-out of DNA methylation patterns in a specific cell type.

To circumvent limitations to investigate the DNA methylation pattern at a genomic locus of interest and determine the context of DNA methylation sites, genome-wide DNA methylation at single-base pair resolution profiling techniques have been developed this past decade.

2.b Genome-wide approaches

Microarray hybridization and next generation sequencing have allowed exploration of genome-wide DNA methylation landscapes. Although revolutionary, such approaches need to maintain a good balance between genome-wide coverage, resolution, and high throughput costs, and still require the recognition of methylated DNA (enzymatically, by affinity enrichment, or chemical conversion).

2.b.1 Array-based

Several techniques have been developed using enzymatic methods such as methylated CpG island amplification, which relies on digestion of one pool of genomic DNA with a methylation sensitive-enzyme and a mock digestion of another pool, or the use of the methylation-dependent endonuclease McrBC to cut randomly the genomic DNA. *HpaII* tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP) method, where the fragments may be hybridized on dedicated arrays or detected by high-throughput sequencing represents is also an enzyme-based approach of choice. Coupling enzymatic methods to array-based analysis provide low resolution and improvements derive from use of pools of restriction enzymes. Dedicated arrays are required.

Affinity enrichment methods permit rapid and efficient genome-wide assessment of DNA methylation, but as mentioned above, they do not interrogate individual CpG dinucleotides. Typically, this approach comprises Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) followed by microarray hybridization (ChIP-chip) on a tiling array or to a feature microarray, such as a CpG island array, where the input DNA and the enriched DNA are labeled with

different fluorescent dyes. Dedicated arrays are also required. Nowadays, next generation sequencing (ChIP-seq) methods are preferred to the array hybridization after ChIP.

In this context, the prevailing view that DNA methylation occurs predominantly at CpG dinucleotide islands in the human genome has been challenged with new findings in studies using next generation sequencing technologies. For instance, in human embryonic stem cells 25% of cytosine methylation is found in a non CpG context, in contrast with human fibroblasts, where almost all methylation occurs in a CG context [28]. Moreover the assumption that DNA methylation regulates gene expression mainly through its effects at 5' promoters has been also challenged, since less than 3% of CpG islands are found methylated in 5' promoters. The majority of ⁵mC are in intragenic and intergenic regions. With a view to interrogate not only CpGs island but a maximum of ⁵mC outside of CpG islands, microarrays have been designed with specific probes to methylated and unmethylated sequences for already annotated loci. Infinium Human Methylation 450 BeadChip of Illumina interrogates over 450,000 CpG sites out of the $\sim 28 \cdot 10^6$ CpG sites in the human genome (0.02%). The Illumina method requires a whole-genome amplification after bisulphite conversion, followed by fragmentation and hybridization of the sample to methylation-specific DNA oligomers that are linked to individual bead types. Each bead type corresponds to a specific DNA CpG site and methylation status. This method offers a good balance between genome-wide coverage, resolution (at the single-base level), and throughput (with the possibility to run 12 samples at the same time).

Limitations of the array-based methods include, i) the necessity of an appropriately designed microarray, ii) hybridization artefacts, iii) the requirement of a whole genome amplification step that introduces technical bias, iv) analyses of the relative fluorescent signal intensity to extract DNA methylation information that often require bioinformatic adjustments and for which one has to deal with choices of threshold necessary to interpret the raw data.

2.b.2 Sequencing-based

Once the DNA is obtained using methods of affinity enrichment, enzymatic approaches, or chemical conversion, high-throughput sequencing is performed using Roche or Illumina platforms. One has to decide the number and the depths of the reads, knowing that a minimum number of reads is required to reliably detect differential methylation among a given pair of samples. Low sequencing depths are often sufficient to detect strong differences such as global loss of DNA methylation.

Several methods have been developed these past decades. Two seminal papers in Nature Biotechnologies in 2010 [29, 30] compared the different approaches, affinity-enrichment, enzymatic approaches, or chemical conversion with bisulfite and high-throughput sequencing:

- MeDIP-seq and MDBIP-seq provide a relative enrichment of methylated DNA rather than absolute DNA methylation levels. But the affinity enrichment approaches do not interrogate CpG-poor genomic regions. Combination with an enzymatic digestion of the unmethylated DNA with a methylation-sensitive enzyme (MRE-seq) can greatly increase genomic coverage. These methods reduce costs. However, the two

enrichment-based methods poorly detect repetitive DNA, where numerous CpGs can be found, and differential methylated regions (DMR), for which deep sequencing is often required. Furthermore, allele-specific epigenetic status cannot be assessed by these approaches.

- Whole-genome Bisulphite-seq termed MethylC-seq, is a shotgun sequencing of bisulphite DNA that provides single-base resolution and has the highest level of coverage and resolution. However it does not discriminate ⁵mC and ⁵hmC and is very expensive.
- Reduced Representation Bisulfite sequencing (RRBS) has a reduced genomic coverage compared to the two enrichment-based methods; RRBS reads cover less than 10% of the 28 10⁶ CpGs. However RRBS has the lowest cost per CpG covered in CpG island, gives a single-based resolution, and allows interrogation of allele-specific epigenetic status.

Targeted bisulfite sequencing using padlock capture is also used to interrogate the methylome [31]. This decreases costs since only genomic regions of interest are analyzed, but allows complex cross-hybridization structures, resulting in an increase in false discoveries.

The future in genome-wide epigenetic studies will be the ability to directly assess the methylation status of a cytosine at the single-base resolution, likely through the use of nanopore or single-molecule real-time sequencing.

3. Examples of genomic methylation alterations in reproductive sciences and human reproductive diseases

A summary of the literature analyzed in this review in relation with DNA methylation and reproductive diseases is presented as Table 1.

3.a Sperm DNA methylation anomalies – during spermatogenesis

One out of six couples seeks fertility treatment. While most fertility defects are considered as idiopathic [32], it is generally admitted that one third originate from female infertility, one third from male infertility and one third to cases where the origin cannot be elucidated. Clearly in male infertilities, defects in spermatogenesis are the cause of most cases, and are caused by mutations in genes constituting a highly complex and multifactorial network [33], as shown by the wealth of data provided by mouse gene-invalidation models. In fact, at least 1000 genes are estimated to be involved in spermatogenesis defects [34]. Outside these strictly genetic considerations, it is interesting to note that the chromatin in sperm is very different from the chromatin of other cells; specifically, the genome is compacted to an extreme point and packed around highly basic (lysine-rich) proteins called protamines [35]. During spermatogenesis, classical histones are substituted progressively by transition histones and ultimately protamines [36]. This implies that the epigenetic structure of the sperm is considerably changed and may suggest that epigenetic marks could be altered in the sperm of infertile men [37]. Amongst these epigenetic marks, it has been shown that DNA methylation at a genome-wide scale through examination of 2600 loci by restriction landmark genomic scanning, is quite different between male germ cells and somatic cells [38].

While abnormal DNA methylation may be widespread in the genome of infertile men, the targeted approach has focused on a quite limited number of genes up until now. It is quite probable that in the years to come, the use of high throughput technologies will increase by large the awareness of the number of loci potentially affected at the DNA methylation level during the process of male gametogenesis. In 2003, Benchaib and coworkers interrogated the global methylation pattern of sperm after immunostaining of the sperm 5mC. Despite this somewhat imprecise method, this early study was able to reveal that overall sperm DNA methylation was correlated with pregnancy rate [39].

Many studies focused on the methylation status of *DAZ* and *DAZL* (Deleted in azoospermia and Deleted in Azoospermia-like, respectively). *DAZ* is located on the Y chromosome and belongs to the AZF region which is partially or totally deleted in 10% of male infertilities [40, 41]. *DAZL* is located on chromosome 3. Like *DAZ*, it is testis specific, and homologous to the *Boule* infertility locus of *Drosophila*. Chai *et al.*, demonstrated that the 5' region of *DAZ* and *DAZL* are hypomethylated in sperm, but not in other tissues.

Navarro-Costa showed that patients with OAT (Oligo-Azoo-Teratozoospermia, meaning sperm that are absent or few and/or malformed) displayed increased methylation at the CpG island located in the promoter of *DAZL*, while the promoter of *DAZ* remained unmethylated in both groups [40]. This result is consistent with the study of Wu (2010) that did not see methylation alterations of *DAZ* after the comparison of 174 idiopathic infertile patients with 58 fertile controls [42].

The only mechanistic insight on the function of the altered methylation of *DAZL* today has been studied in a pig model [43]. In this article, the authors cloned a minimal promoter region of 149 bp in front of the luciferase reporter gene, and showed that *in vitro* methylation leads to a complete extinction of the promoter activity in primordial germ cells. The authors demonstrated that the Zinc Finger Transcription Factor SP1 was bound to the promoter element using gel-shift assays, unless the promoter element was methylated. These observations were confirmed by Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). Overall, these data suggest that, SP1 may contribute to the regulation of the expression of *DAZL* in germ cells in a methylation-dependent manner. Of note, this study is one of the very few that attempt to correlate experimentally DNA methylation, Transcription Factor tethering and gene expression.

Among the other studies on specific genes, Sugimoto and coworkers focused their work on the human *VASA* gene [44]. *VASA* is a member of the DEAD-box protein family with ATP-dependent RNA helicase catalytic activity, which like *DAZL*, has RNA binding activity and is involved in the early steps of spermatogenesis. Potentially, this study reflects the idea that any so-called 'spermatogenetic' gene with a CpG island nearby is a potential candidate to analyze a methylation status in patients with abnormal spermatogenesis. In this study, the authors analyzed a CpG island by MALDI-TOF on a sample of 131 idiopathic azoospermic or severely oligospermic patients. In six patients of the maturation arrest group (n = 17), the methylation rate of each CpG unit within an amplicon was especially high, with the average rate at 77.4 ± 3.07 %. The methylation rate was low in the remaining 11 patients, with an average of 29.3 ± 2.68 % ($P < 0.0001$), with the controls being at 16.3 ± 4.8 %.

An even larger number of studies on spermatogenetic defects has concentrated on imprinted genes.

Some of the first evidence that defective spermatogenesis is associated with methylation in imprinted genes came from the seminal study of Marques and coworkers [45]. This study focused on *MEST* and *H19*, and showed significant anomalies for the latter. This prompted an international research effort aiming at correlating abnormal epigenetic marks on imprinted genes with abnormal spermatogenesis. Kobayashi and coworkers studied *H19*, *GTL2*, *PEG1*, *LIT1*, *ZAC*, *PEG3* and *SNRPN* using a combined bisulphite-PCR restriction analysis (COBRA) and a sequencing technique, in parallel with non-imprinted repetitive sequences (LINE and Alu). The authors analyzed the seven DMRs in the sperm of 97 men from infertile couples, and discovered 14 samples with abnormal paternal methylation at *H19* and *GTL2* DMRs, and 20 with abnormal maternal methylation at *PEG1*, *LIT1*, *ZAC*, *PEG3* and *SNRPN* [46].

Marques and coworkers studied *H19* and *MEST* in oligospermic and control human males by bisulphite treatment followed by cloning and sequencing [47]. Similarly, Minor and coworkers analyzed Oligozoospermic and control patients at three imprinted genes, *H19*, *IG-GTL2* and *MEST*, by the same approach. They revealed that *H19* DMR methylation was decreased in azoospermic men. The most important idea is that alterations also exist in Oligozoospermia, showing that even without known gametogenesis defects, imprinting anomalies exist [48]. They show that in azoospermic patients, the 6th binding site of CTCF near *H19*, where complete methylation was expected, was significantly reduced in cases of obstructive azoospermia due to congenital bilateral absence of vas deferens and in secretory azoospermia due to hypospermatogenesis. *MEST* was analyzed in the same study, and was found to be unmethylated as expected for an imprinted gene in the sperm. The study by Boissonnas and coworkers in 2010 was probably the first to use pyrosequencing on oligospermic, teratozoospermic, and OAT patient sperm. This approach allowed a precise measurement of the degree of methylation alterations in *H19* and *IGF2* in sperm cells, where the DMR is supposed to be fully methylated. There was an overall demethylation in the patient sperm, proportional to the severity of the sperm anomalies and strongly marked at the CTCF binding site of *H19*. The bisulphite analysis is based on billions of molecules while in bisulphite/cloning/sequencing, it is generally less than 20 clones that are analyzed. However, this approach gives no information on the phase of the methylation i.e. if a molecule is methylated at all the consecutive CpG (see methods).

The development of genome-wide approaches to studying genomic methylation will undoubtedly rejuvenate and enrich the growing database of spermatogenic-associated methylation anomalies. Recently Pacheco and coworkers [49] used such genome-wide analysis of methylation with the Human BeadChip Illumina array that allowed the simultaneous analysis of 27,578 CpG dinucleotides. Interestingly, clustering of the methylation data from 21 patients yielded a strong correlation with the motility parameters of the sperm cells. 9,189 CpG showed significant differences in methylation, 80% of which were hypomethylated in low-motility samples, and 194 associated with imprinted genes. The authors performed a simultaneous transcriptome analysis that revealed modifications of genes potentially involved in regulating the epigenetic landscape of the chromatin, such as histone deacetylase *HDAC1*, sirtuin *SIRT3* and the *de novo* methylation enzyme *DNMT3A*. This recent study emphasizes the importance of high-throughput analysis in the future.

Using another approach (Bisulfite PCR-Luminex methylation analysis), Sato and coworkers examined eight (less than 10, write in letters) imprinted loci (*ZDBF2*, *H19*, *GTL2*, *PEG1*, *LIT1*, *ZAC*, *PEG3*, *SNRPN*) in 337 individuals (209 normal, 61 severe Oligozoospermia and 67 moderate Oligozoospermia). 13.9% of the patients showed an abnormal methylation at one or more of these imprinted loci.

Similarly, in 2010, Hammoud and coworkers analyzed CpG methylation at 7 imprinted loci by bisulphite sequencing: *LIT1*, *MEST*, *SNRPN*, *PLAGL1*, *PEG3*, *H19* and *IGF2* on three male groups, normal donors (n=5), oligospermic patients (n=10) and patients with known anomalies of the protamines (n=10). *MEST*, *KCNQ1* (overlapping *LIT1*) as well as *SNRPN* and *H19*, were affected in oligospermic patients.

In 2009, Kobayashi and coworkers studied the DNA methylation of seven imprinted genes and of *XIST*, the non-coding RNA initiating X chromosome inactivation [50], in 78 paired DNA samples (paternal DNA and embryonic DNA) in order to evaluate whether these errors were due to the use of Assisted Reproductive Technologies (ART) or directly transmitted by the sperm [50]. ART and especially ICSI is often used for patients who suffer from oligo/astheno/teratozoospermia, and as discussed here, these alterations are commonly associated to abnormal methylation in the sperm at imprinted loci [51]. Our group was one of the first to report anomalies of the methylation of imprinted genes (especially *H19*) in mice embryos at the blastocyst stage, following the use of ART [52]. Such anomalies induce long-term consequences on gene expression in the placenta [53]. Recently, the same type of anomalies has been reported in human embryos [54]. It is therefore a highly relevant question to know whether the alterations in the embryo are a consequence of ART or an inheritance of an abnormal methylation profile from the paternal sperm. The study of Kobayashi showed that amongst the 17 cases of abnormal methylation in the ART sample, seven cases (41%) presented with a similar anomaly in the parental sperm. In the same study, the authors correlated *DNMT3L* variants with abnormal paternal methylation. *DNMT3L*, discovered in 2001 [55], is an atypical DNA methyl transferase that does not possess any catalytic moiety. However, this enzyme is a cofactor of *DNMT3A* (and *3B*) [56], and seems required for the correct apposition of imprinted marks during the early development of germ cells. In mice, the KO of this enzyme induces a ‘meiotic catastrophe’, where numerous mis-pairings between the parental chromosomes in the germ cells during meiosis trigger the abortion of the whole gametogenetic process. *DNMT3L* seems largely involved in the methylation of repetitive sequences (especially *LINEs*), which appears indispensable for the correct ongoing meiosis [55]. Data published by our group suggest a link between *DNMT3L* and the methylation of specific loci in the case of endometriosis (see § 3c), and imply a pivotal role of this factor in directing the establishment of *de novo* methylation to specific sequences.

Another emerging issue regarding the epigenetics of male gametogenesis is the possible involvement of environmental influences, and in particular of endocrine disruptors, with the idea that such alterations could be transmitted epigenetically through meiosis and therefore to several consecutive generations. The seminal work for the basis of such an idea was published by Michael Skinner’s group in 2005 [57]. Rats exposed to high doses of the fungicide vinclozolin, presented anomalies of the genital tract, spermatogenesis, and several parameters of the sperm biology that seemed heritable during several generations. As reviewed by Price [58], it appears that the data were less clear cut in humans, certainly because the control of the

observational data is much more complex and the genetic background much more heterogeneous than on experimental rodent models.

3.b Ovary

DNA methylation in the ovarian context has less been studied *per se*, except in relation with ovarian cancer which is beyond the scope of this review. Here we will concentrate on diseases that are of ovarian origin but are rather direct causes of infertility; Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) and Premature Ovarian Failure (POF).

3.b.1 Polycystic ovary

PCOS is one of the most frequent ovarian disorders (5 – 15% of women of reproductive age), strongly correlated to endocrine disequilibrium [59]. Ovaries normally synthesizes androgens that are aromatized to estrogens by the CYP19 – aromatase enzyme. Imbalance in this regulation leads to excessive androgenic activity, defects in ovulation and the appearance of cysts on the ovaries that are detectable by ultrasound. Genetic analysis showed that polymorphisms of the gene encoding the androgen receptor (*AR*, located on the X chromosome) are associated with PCOS [60]. This gene encompasses a highly polymorphic (CAG) repeat encoding a glutamine tract, with the shorter alleles being generally considered as the most active. This is somewhat debated, and a study by Hockey and coworkers showed a higher frequency of alleles > 22 repeats in the PCOS population. A more recent study in Indian women failed to find a clear association between PCOS and *AR* short allele expression [61]. The expression of the androgen receptor appears regulated by methylation of a CpG island in the 5' region of the gene, as shown in prostate cancers [62]. In 2010, Laisk and coworkers studied epigenetic variations at this locus using *HpaII*-amplification from heterozygous patients, but failed to associate repeat length and X chromosome inactivation patterns to susceptibility to PCOS. In 2010, Xu and coworkers did not find differences in the methylation profile of circulating DNA on 20 controls and 20 PCOS women using a 5-methyl CpG antibody followed by a ELISA-like test [63]. In a targeted study, Zhu and coworkers used post-bisulphite approaches to analyze the methylation status of *LHR*, *AR*, *FSHR* and *H19* in a mouse model where PCOS was induced by DHEA (Dehydroepiandrosterone) treatment, and showed that the *LHR* gene was demethylated in PCOS [64]. Finally, very recently, a systematic analysis was performed in a rhesus monkey model prenatally androgenized, using the Infinium HumanMethylation27 BeadChip platform [65]. However the authors focus on omental tissues near the gastrointestinal tract, and not directly on the ovarian tissue. The authors suggest that visceral adipose tissue is particularly interesting due to its potential links with metabolic disease, itself frequently shown as a risk factor for PCOS. In infants, 163 regions were found modified and 325 in adults. The analysis of genes nearby showed significantly enriched pathways in infants (anti-proliferative role of TOB (Transducer of ErbB2) in T cell signaling, VDR/RXR activation, Methionine metabolism, Complement system, Nucleotide excision repair pathway) and in adults (TGF β signaling, Axonal guidance signaling, Polyamine regulation in Colon Cancer, Wnt/B-catenin signaling). These differences (interestingly not common between infants and adults) are nevertheless probably linked to the injection of testosterone propionate to the females, and may not, strictly speaking, be specific to the disease.

3.b.2 Premature Ovarian Failure

Premature Ovarian Failure (POF) is defined as an ovarian failure occurring before menopause, and according to the clinical definition before the age of 40. Genetically speaking, mapping studies of POF revealed two important regions on chromosome X [66], one of them having recently been shown to belong to a heterochromatic domain [67]. In 2010, Laisk and coworkers showed that short variants of the Androgen receptor CAG repeat are associated with POF [68]. This is presumably linked to skewed X chromosome inactivation, reported in 2007 for *AR* [69]. Details of the epigenetic mechanisms at work in this ‘X-choice’ however have not been fully elucidated. Another gene that has been investigated for the disease is *PGRMC1* (Progesterone Receptor Membrane Component-1), also located on the X chromosome [70].

3.c Endometriosis

Endometriosis is a frequent disease of reproduction, characterized by the implantation of endometrium tissue outside the uterine cavity. In the classical version of this disease, regurgitation of the menses is at the origin of the lesions [71]. It may affect utero-sacred ligaments, the peritoneal part of the rectum or the vagina, and often the ovary. Endometriosis is highly painful [72, 73], and is considered a major cause of female infertility, even though a recent study suggests that the eutopic uterine tissue of endometriotic patients is similar to that of uteri from control individuals, free of endometriosis lesions, as revealed by transcriptome analyses [74]. More recently, Zelenko and coworkers suggested by analyzing the expression of Nuclear Receptor genes the existence of differences at the epigenetic level. More precisely, they started by analyzing the expression of 84 nuclear receptor genes [75]. Nuclear receptors such as members of the RAR/RXR/PPAR family are known to interact with enzymes that modify histones and methylate/demethylate DNA. The modified genes were functionally clustered using Ingenuity Pathway Analysis (IPA), and epigenetic pathways were identified as the most strongly modified in the endometrium of endometriotic women compared to controls.

The idea that endometriosis may be accompanied by epigenetic modifications is also substantiated by mouse models where uterine tissue is grafted ectopically in the peritoneum. In this situation, hypermethylation of *Hoxa10* was observed [76]. This is in accordance with observations in humans where several studies indicated that the promoter of *HOXA10* is modified by methylation in the lesions [77], this being confirmed by various studies [78], and clearly associated with alterations in gene expression [79].

Accordingly, several recent studies focused on specific genes in an attempt to identify specific differences in the methylation profile at various CpG islands, essentially but not exclusively focusing on genes involved in the regulation of steroidogenesis, the other group of genes being potentially involved in cancer. Namely, *PTGS2*, *HOXA10*, *HOXA11*, *PAX2*, *SF1*, *PGRB*, *E-cadherin*, *ESR1* (=ERA), *CYP19*, *MLH1*, and *p16* have been analyzed to date [78, 80-89]. ERA was reported as not being modified by methylation more than 10 years ago [90]. It may be that at the head of this steroidogenic cascade, SF1 plays the role of a bandmaster since it is a key gene to activate estrogen synthesis. The transcription of this gene was found induced more than 100 fold in endometriomas [79, 91], although this increase may be partly

due to the proximity of ovarian (non endometriotic) tissue as revealed by immunohistochemistry [72]. 5-aza-2' deoxycytidine treatment increases *SF1* mRNA more than 50 fold in endometrial cells, and this induction is regulated through a CpG island located between position -85/239. This site is a conditional binding site for MeCP2, an important factor that mediates chromatin accessibility [91]. The methylation status of SF1 in endometriosis however has not been studied.

In a recent review, Bulun and coworkers speculated that in endometriosis the promoter of ERB is not adequately methylated leading to its overexpression [92]. This overexpression relative to ERA would be the initial event that triggers a down-regulation of the progesterone receptor, consistent with the reduction described by Borghese and co-workers [79]. Progesterone resistance is part of the pathogenesis in this disease at least for a defined category of patients for whom the symptoms are not improved by progesterone treatment. The regulation of progesterone response may also be driven by methylation alterations of the PR promoter, especially the B isoform. This has been substantiated in a cellular model by Wu and coworkers who used TNF α to stimulate an immortalized line of epithelial endometriotic cells for 30 days, triggering a partial methylation of PR-B promoter associated with a reduction in its expression [93].

In line with the putative links between cancer and endometriosis, Vestergaard and coworkers analyzed biopsies from ectopic lesions from 23 patients, and analyzed the promoter methylation of *APC*, *CDKN2A*, *PYCARD*, *RARB*, *RASSF1* and *ESR1*, without identifying significant alterations from this epigenetic point of view [94].

Systematic analysis of genome methylation in endometriosis has been recently performed [95], and revealed by ChIP on chip following immunoprecipitation with an anti-methylC antibody, and hybridization to an Affymetrix promoter CpG array. In total, 25,000 promoters were analyzed after IP starting from pools of three different subtypes of endometriosis (ovarian, deep infiltrating, and superficial). For 35 genes, alterations of methylation were associated to expression changes. Interestingly, hypomethylation was randomly distributed, but hypermethylation was biased towards the extremity of chromosomes [95]. This observation was correlated with a recent paper [96], which showed that specific isoforms of DNMT3L were linked to abnormal hypermethylation of chromosome ends in the general population. This observation prompted the analysis of DNMT3L variants with a high density of SNPs in endometriotic patients versus control individuals [95, 97]. Following this study, a specific DNMT3L haplotype covering intron9-exon10-intron10 was very strongly associated with the risk of endometrioma (RR= 7.21). Since DNMT3L is not catalytically active, this article suggests that it could drive the methylation activity of other factors, interacting with it such as DNMT3A [56]. Several studies showed that DNMT are not expressed appropriately in endometriotic lesions [79, 98]. In the last study, DNMT1 was found reduced more than two fold at the mRNA expression level. This is consistent with the random demethylation observed along chromosomes in endometrioma lesions, since the down regulation of DNMT1 could lead to a loss of the methylation maintenance through cell divisions.

3.d Medically assisted reproduction

Assisted Reproductive Technologies (ART) group the complete set of artificial methods involving the handling of eggs and sperm in order to achieve a pregnancy. This encompasses oocyte and sperm donation, *in vitro* Fertilization (IVF), and ‘ultra-invasive’ techniques such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI), when a sperm cell, from a highly deteriorated spermogram or even starting from a sperm cell with DNA damage, is injected into an oocyte [99]. Nowadays ART conceived children represent 1-4 % of the newborn population in industrialized countries [100]. More than 4 million babies have been conceived through ART worldwide since the beginning of IVF about 30 years ago [101]. Moreover, the use of ART is increasing steadily, with more than a doubling between 1996 and 2007 in the USA [102]. The technical expertise of these approaches is fully recognized since children are quite efficiently conceived. Notwithstanding, over the past few years, questions have started to emerge about the long term evaluation of health risks for these children, especially with the development of epigenetics. Not exhaustively, it seems that ART increases the risk of placental diseases, Intra-Uterine Growth Restriction, and of course twin pregnancies [103]. Later in life, it seems possible that ART is associated with an increased risk of developing metabolic syndrome, involving type II diabetes, obesity and cardiovascular disorders, an ever increasing burden for modern societies [104].

Concrete ideas suggesting increased risks for the health of ART-conceived compared to naturally conceived children, originate from two kinds of studies: those based on epidemiological data, and those based on studies on animal models, especially mice.

Mouse studies revealed modifications to DNA methylation of imprinted genes in oocytes after superovulation [105], and in blastocysts after embryo culture [52, 106]. Transcriptome analysis showed that *in vitro* culture before transplantation considerably modifies the expression profile of placental genes, and in particular imprinted genes [53, 107]. Such defects were also observed in human oocytes [108]. These modifications could have long-term effects and explain in part the increased risks observed after the use of ART.

From epidemiological studies, an increased risk of very preterm (<32 weeks) and preterm (<37) delivery, very low (<1,5 kg) and low (<2,5 kg) birth weight and perinatal mortality was observed when ART was used [109, 110]. There is also an increased risk for preeclampsia or gestational hypertension (x 2.7) in pregnancies achieved using IVF [111, 112]. Nevertheless, these increased risks could be overestimated because the comparison was made with naturally conceived children from fertile parents, which may not be the best control population. Indeed, when ART conceived children are compared to children naturally conceived from subfertile parents (defined as those who need more than 12 months to initiate a pregnancy), the associations between ART and prematurity or low birth weight can no longer be found [113]. Again, however, when all the confounding factors are taken into account, the risk seems to be real [114].

Associations between ART and imprinted genes disorders are recurrently found despite their relative rarity making the analysis difficult. In fact, after ART, the risk for Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS) was estimated at 1/4000, more than 3 times the risk in the general population [115-117]. Interestingly, a large majority of BWS cases after ART are due to imprinting defects in the H19-IGF2 locus, while it’s only the cause of around 50 % of BWS in the general population. Several studies [118-121] also suggest an association between ART and Angelman Syndrome (AS), but due to the rarity of this syndrome, it is premature to give

an accurate estimation of the increased risk. What seems certain is that, similarly to the BWS situation, the part of the syndrome caused by imprinting defects is increased by the use of ART: 5% in the general AS cases, and around 70 % in the ART AS cases. However, Ludwig and colleagues suggest that the subfertility of the parents could be partly responsible, as 20% of AS patients are born from subfertile couples [120]. Other reports suggest that the prevalence of Silver-Russel Syndrome and retinoblastoma could also be increased after the use of ART [122-124].

To obtain a comprehensive vision of the risks associated with ART, ART-conceived children have to be followed in large studies. It seems clear that genomic imprinting is affected by ART, even if the responsible mechanisms involved are not understood. However, it is reassuring to see that the majority of ART-conceived children are overall in good health. This may be due to modulation of the consequences of DNA methylation defects by the placenta, as was suggested by Fauque and colleagues [52] in mice, and confirmed in humans with DNA methylation differences in placenta and cord blood [102], which are not found any more later in life [125], except maybe for *IGF2* and *IGF2R* (generally not imprinted in humans) in mouth epithelium cell samples. Finally, the future will inevitably be based upon the new high-throughput methods to study DNA methylation that will allow the addressing of genome-wide DNA methylation defects.

3.e Placental and fetal membrane diseases

The placenta in Therian mammals is an organ of incredible importance. Its dysfunction inevitably triggers pregnancy losses. At full development, the human placenta presents as a 'pie' of ~ 20 cm in diameter with two different sides morphologically as well as functionally. One side faces the mother's endometrium and one faces the baby. Near the center of this latter, the umbilical cord roots. The placenta plays at least three crucial roles in the development of the baby: endocrine, immunological, and nutritional. The embryo-placental unit is surrounded by two membranes, the amnion and the chorion. These membranes are of extreme importance at the time of delivery. Recent results suggest that alterations in DNA methylation of specific cell types of these membranes could be related to Premature Rupture of fetal Membrane (PROM) and thus involved in prematurity.

3.e.1 Preeclampsia

Preeclampsia is a quite mysterious disease of human pregnancy, frequent (~5% of pregnancy), potentially lethal (up to 16% of maternal death if unattended), generally associated with the first gestation, and whose severity decreases with successive pregnancies with the same partner. It is clinically characterized by a *de novo* gestational hypertension and by proteinuria, developing from mid-gestation [126]. It is classically admitted that the placenta plays a pivotal role in the development of the symptoms. It has been demonstrated that the external layer of the placenta, the syncytiotrophoblast sheds debris towards the general circulation (in higher amounts in the case of placental diseases), thus bringing vasoactive molecules (such as endothelin 1, *ET1*) either directly or carried by micro/nanoparticles [127, 128] to the maternal organs and that affects the endothelium in a generalized fashion, thus probably participating to the hypertensive state of the mother.

The preeclamptic placenta shows a high level of deregulated gene expression compared to normal placentas, as revealed by numerous transcriptomic studies [129-134]. Part of these deregulations may be due to epigenetic modulation, especially by differential CpG methylation between normal and pathological placentas [135]. Using targeted and whole genome approaches, variations in methylation have been found at numerous genes in the preeclamptic placenta: 296 loci in the paper of Jia and coworkers [136] who used MedIP on chip with placental DNA from severe preeclampsias, of which some were validated by bisulphite sequencing, and were close to the following genes: *CAPN*, *EPHX2*, *ADORA2B*, *SOX7*, *CXCL1* and *CDX1*. Yuen and coworkers revealed methylation variations at 34 loci that were hypomethylated in early onset preeclamptic placentas, although these variations were mild (~10-15% max) [137]. Four of these loci were validated by bisulphite sequencing. *TIMP3*, able to limit the actions of metalloproteinases important for trophoblast invasion, was shown to be hypomethylated and to vary in expression level in this study. Amongst the first variations found, *RASSF1A* and *SERPINB5* (maspin), were identified [138, 139], as well as *SERPINA3* [140], *MMP9* [141], *Cullin7* and *Cullin 4B* [142]. The links between methylation alterations and gene expression have seldom been explored from a mechanistic point of view. In vitro methylation of promoter elements in *SERPINA3* and in *TBX15* has nevertheless revealed that DNA polymorphisms may or may not generate variations in gene expression, and that some transcriptional factors may be sensitive to these modifications. More specifically, Chelbi and coworkers showed that the transcription factor *ZBTB7B*, regulated differentially the expression of *SERPINA3*, according to its methylation status, but only for a specific allele, the regulation of the other allele being methylation-insensitive [143]. Along the same line, *PDX1* regulates differentially the promoter of the lipid-metabolism related transcription factor *TBX15* [144]. These fine-tuned adaptations present in placental tissue, may constitute the basis of adaptation of this organ to external threats (hypoxia/ hyperoxia/ xenohormones or other endocrine disrupters, viruses, etc.)

In addition, the level of whole genome methylation has been addressed [145] and revealed an increased methylation level in the preeclampsia group. Whether this abnormal methylation concerns mainly repetitive elements (LINEs for instance) was not specifically analyzed by the authors.

3.e.2 Intra Uterine Growth Restriction (IUGR)

There is abundant literature on methylation alterations accompanying Intra-Uterine Growth Restriction. It is a disease loosely defined as the incapacity of a fetus to grow to its normal (optimal or genetically defined) potential. Often, it is confounded with ‘SGA’ (Small for Gestational Age, which can be not linked to a pathological status) as opposed to ‘AGA’ (Adequate for Gestational Age). We will treat SGA and IUGR indifferently in the rest of this review. In humans the genetic/ethnic variability and the modification of human size throughout generations, makes necessary the use of reference curves that are evolving over the years. Often, a proxy of IUGR/SGA, birth weight is used, which, while easy to collect, does not indicate the rupture in the growth curve that is characteristic of IUGR. In about one third of the cases, preeclampsia (PE) is accompanied by IUGR. Contrary to PE that is a human disease, IUGR can be induced in various animal models and by various procedures as extensively reviewed in 2005 [146].

In particular, the rat model has been extensively studied. Two major procedures were implemented to induce IUGR in this species, isocaloric hypoproteic alimentation of the females during gestation, and bilateral ligation of the uterine arteries. In this latter model one of the first alterations of DNA methylation was observed at the p53 gene in the fetal kidney, where ligation of the arteries triggers hypomethylation of the exons 5-8 of the gene [147], this being associated with an increased apoptosis in this organ in adults. In the liver, following the same procedure (rats were analyzed at birth – D0- and 21 days later -D21), it was shown that enzymes involved in methyl-radical metabolism such as methionine adenosyl transferase and cystathione β synthase are perturbed, [148]. The authors speculate that uteroplacental insufficiency affects hepatic one-carbon metabolism and subsequent DNA methylation; global analysis of the methylation level showed an overall hypomethylation in the liver. In accordance with this observation we showed in another model of growth restricted rats, where the expression of genes was analyzed simultaneously in 5 organs near birth, that DNMTs are essentially reduced in the liver [149]. In the liver and in the same model, Fu and co-workers showed that the expression of the phosphatase Dusp5 is reduced, along with a methylation of its second exon [150]. Dusp5 dephosphorylates enzymes of the MAP Kinase pathway, responsible in particular of the phosphorylation of IRS-1 at P 612, suggesting an action of this deregulation on the insulin pathway and therefore on growth. In 2009, the same team showed that the promoter P2 of *Igf-1* is hypermethylated at D0 in the liver (6 CpG analyzed), although this alteration returns to normal at D21 [151]. As in the liver, methylation-modifying enzymes *Dnmt1* and *Mecp2* were down-regulated from D0 and remain low at D21 in the brain [152]. This observation was substantiated on another IUGR-induced model in the rat, where it was shown that *Dnmt1* and *Dnmt3a* are modified in neural tissue (hypothalamus). In this study, the authors focused on the POMC gene and showed a demethylation at 12 CpG at postnatal D12 [153]. In the IUGR rats, behavior was also recently studied, together with alterations of gene expression in the hippocampus. Methylation and expression was studied for *GR*, *HSD11b2*, *NNAT* and *reelin*. Only *reelin* was found down-regulated, none of the genes showed differences in their methylation status [154]. In the same tissue (hippocampus), after induction of IUGR by a methyl deficient diet, *Dusp5* was shown decreased at d0 and d21, this being accompanied by sex-specific alterations of CpG methylation and histone modifications [155].

In skeletal muscle, it was shown as well that three CpG in the *Glut4* promoter affect the binding of *Mef2A*, *Mef2D* and *MyoD*, three factors crucial for muscle growth. This suggested that glucose transport could be a target of epigenetic mechanisms inducing a defective growth in IUGR through epigenetic mechanisms. The work of Park and coworkers, focused on the pancreas, where the level of *Pdx1*, the major transcription factor for pancreatic beta-cell development is reduced by IUGR. More precisely, in young pups (2 weeks), the 14 CpG islands of the *Pdx1* promoter were not methylated in control and IUGR rats. Later, at 6 months of age, IUGR rats showed a 51.3 % methylation level at these positions associated to diabetes in adulthood, while the controls showed no evidence of methylation. This (together with alterations of the histone code in this model) argues in favor of an *in utero* programming of adult disease [156]. The central role of *Pdx1* was further studied by Pinney and coworkers (2011), where the author showed that *Pdx1* expression can be restored by *Exendin4* treatment (a long-acting glucagon-like peptide, administered to the newborn from D0 to D6). In this

study, Dnmt1 binding to the Pdx1 promoter was studied and shown to be prevented through the recruitment of the transcription factor Usf1 and the histone acetyl transferase Pcaf, thus protecting against methylation and inactivation [157]. Global methylation analysis in the rat pancreas was also performed [158], by the HELP technique, which allowed the identification of 1400 differentially methylated loci, nearby genes involved in cell death, vascularization, and beta cell proliferation.

Mice were also used to study the effects of IUGR, often in relation with imprinted genes. In 2001, Murrell showed that deletion of the IGF2/H19 DMR2, does not affect the imprinted status of the locus, but induces IUGR through reduction of Igf2 expression. Essentially mice were used to study DNA methylation in relation with IUGR in two contexts: the impact of and on imprinted genes, and the effects of environmental perturbations, such as alcohol exposure. In the context of imprinted genes, in 2003, Monk and coworkers studied the proximal mouse chromosome 11 region which shares similarities with the chromosome 7 of humans in the region associated with the Silver-Russel Syndrome (SRS), [159]. SRS is an imprinting syndrome that associates ante and post-natal growth retardation, macrocephaly and body asymmetries (~1/50,000 births). In 10% of the cases, SRS is linked to a uniparental disomy of chromosome 7 [160]. SRS is often associated with demethylation of the IGF2/H19 locus (description and function of the locus is depicted in Figure 2 and paragraph b). Recently, manipulations of the mouse genome allowed alteration of the imprinting code at the locus [161]. The authors substituted one of the important CTCF binding sites separating H19/IGF2 (Figure 2 and § 3a) with the chicken α -globin insulator element, exhibiting enhancer blocking by CTCF and chromatin barrier functions by USF1 and VEZF1. When the normal ICR1 is inherited by the father, it is completely methylated, allowing Igf2 expression. When the chicken globin insulator is used, it is unmethylated on both alleles, allowing CTCF binding. This triggers a quasi-extinction of Igf2 (~10% residual expression) and overexpression of H19, with a very severe IUGR (carriers are half the size of their littermates). Mice were also used to analyze IUGR induced by environmental causes. In 2011, Goyal and coworkers induced IUGR in mice by exposing the mothers to hypoxia [162]. Expression of Ace1, Ace2, At-1b was followed. The methylation of the ACE promoter was analyzed but found unchanged, despite the variations in gene expression.

In several studies, the impact of alcohol exposure was evaluated on neural development in mice [163-166]. Overall in all the conditions studied, IUGR was induced by this exposure. The H19 DMR was not found altered in terms of methylation of the imprinting control region [166], although there was a correlation between methylation and placental weight (but not with embryo weight). In 2011, some of the effects of alcohol exposure (rather malformations than IUGR), which could be corrected by methyl donors, have been shown to be associated to a decreased methylation at 4 CpG in *Igf2* [164]. It has been reported that in the brain, alcohol exposure altered timely developmental DNA methylation, in a way similar to that obtained by administration of the anti-methylation agent 5-azacytidine [167]. Liu and coworkers investigated genome-wide alterations of DNA methylation [168], and detected anomalies in imprinted genes, genes involved in cell cycle, cancer, apoptosis, growth and olfaction (olfactory receptors are generally mono-allelically expressed, which may explain why they are found in this category, of primary targets of environmental stress acting on DNA methylation). Interestingly, these genes were found enriched on chromosome 7, 10 and X.

The alterations to DNA methylation were associated with deregulation of gene expression for 84 genes. Among environmental exposure, it has been shown in an isolated study [169] in a mouse model that IUGR may be induced by bacterial infection with *Campylobacter Rectus* (an oral micro-organism) and triggers methylation of the placental promoter of *Igf2*, P0 and the down-regulation of its expression.

In humans there is an important corpus of reports linking imprinting defects and IUGR associated with the SRS. Many studies confirmed the presence of epimutations (i.e. alterations of the epigenetic status of the chromatin, for instance abnormal methylation of Imprinting Control Regions) at 11p15 that are linked with SRS [170-180]. Overall, it seems that ~40 - 60% of the SRS are associated with such epimutations, while around 10% are associated with Uniparental Disomies of chromosome 7. The location of the epimutations at 11p15 appears patient-specific. In 2010, genetic defects affecting the methylation of ICR1 at the IGF2/H19 locus were found in 16 patients outside the CTCF binding site [181]. The imprinted disease that has an opposite effect than that of the SRS is the BWS, characterized by a double expression of IGF2, from both alleles, and fetal overgrowth. In BWS, the ICR1 gains methylation, while it has often lost methylation in SRS. BWS was shown associated to genetic anomalies in ICR1 in the same study. Concerning SRS, much research is now focused on the unexplained cases. In 2010 Turner and coworkers showed that SRS could be associated with a gain of methylation at the IGF2R locus [182], the imprinting status of which seems to differ in humans according to individuals. A recent study of SRS patients [123] detected an imprinting defect in the PEG/MEST locus, in a sample of patients who followed IVF. As mentioned before (§3.d), this could enter in the growing corpus of evidence showing an increased risk of methylation disorders following the use of assisted reproduction techniques. Many studies on IUGR focus on imprinted genes, often in placental tissue. Among them McMinn and coworkers studied the methylation and expression of numerous genes in IUGR [183]. They found six imprinted genes that were modified (PHLDA2 increased, MEST, MEG3, GATM, GNAS and PLAGL1 decreased), and showed that PHLDA2 and MEST also present changes to DNA methylation. In idiopathic IUGR, biallelic expression of H19 was found in one case [93]. Expression of H19 was found increased in IUGR placenta while its methylation level was lower [184]. Using the first Illumina platform for methylation analysis (Golden Gate), Bourque and co-workers analyzed the 11p15.5 ICR1 (H19/IGF2) and showed that it was decreased in IUGR [185]. This was confirmed independently [186]. Always focusing on imprinted genes, Lambertini and co-workers used MeDIP on chip, and showed a slight tendency toward hypermethylation in differentially methylated regions of the imprinted genes [187]. Few studies have focused on non-imprinted genes. In 2010, the Golden Gate platform (ancient version, with 1536 CpG only) allowed the identification of five loci differentially (hyper) methylated in IUGR placentas [137]. Other genome-wide approaches were carried out using the novel generation 27K BeadChip platform and allowed the detection of specific methylation signatures in IUGR placentas [188]. Consistently, Michels and coworkers found an association between LINE-1 methylation in the placenta and birthweight [189]. MSAP-PCR showed that the promoter of the transcription factor TBX15 was differentially methylated in IUGR placentas [144]. TBX15 is involved in lipid metabolism [190]. In this case methylation of the TBX15 promoter is positively correlated with baby weight and the promoter is regulated by the transcription factor PDX1 in a

methylation-dependent fashion. In 2010, Gascoin-Lachambre and coworkers showed that DNA methylation is modified in the *CUL7* promoter, with this gene being strongly up-regulated in IUGR [142]. Several teams focused on epigenetic marks present in cord blood cells. The last study published [191] did not identify significant differences, as in the study of Tobi (2011), that focused on imprinted genes [192]. To this respect it is important to note the study of Einstein and coworkers (2010) that isolated CD34+ hematopoietic stem cells from cord blood and analyzed the methylation level genome-wide by the HELP technique. 56 loci were identified near 35 genes, several of which point to a network where the transcription factor HNF4A occupies a central position. This suggests that genome-wide approaches could be very efficient to discover differences if they are applied to purified cell populations, where differences are not blurred by the tissue heterogeneity.

3.e.3 Preterm labor-Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM)

To date, only one publication describes epigenetic variation in the promoter of one gene and an increased risk to preterm premature rupture of membranes and preterm labor [193]. J Strauss III and coll. demonstrated that a single-nucleotide polymorphism in a population of Afro-American women in the promoter of the metalloprotease MMP1 increases its methylation status and increases the expression of MMP1 in amnion fibroblasts. These women are more prone to PPRM. It has also been postulated that nutrition and environmental exposure would induce epigenetic modifications in the gestational tissues and increase odds to a preterm delivery, but no study demonstrates this to date.

4. Conclusions

Technical advances that allow us to probe the epigenetic code are key towards understanding the rules that define gene expression patterns, in physiological as well as pathological situations. Reproductive diseases in humans as presented in this review are all prone to alterations in DNA methylation, with a recurrent finding of alterations at imprinted gene loci, prompting them as indicators of disorders. In the future, genome-wide approaches will be implemented and allow the development of tissue-specific integrative databases of genome polymorphism, epigenome marks, and gene expression.

Acknowledgements

The kindness and efficiency of Dr Emma Walton in improving the English throughout the manuscript is greatly acknowledged by the authors.

References

- [1] Watson, J. D.; Crick, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; *171*: 737-8.
- [2] Eickbush, T. H.; Moudrianakis, E. N. The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids. *Cell* 1978; *13*: 295-306.
- [3] Guil, S.; Esteller, M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; *41*: 87-95.
- [4] Kinney, S. R.; Pradhan, S. Regulation of expression and activity of DNA (cytosine-5) methyltransferases in mammalian cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011; *101*: 311-33.
- [5] De Carvalho, D. D.; You, J. S.; Jones, P. A. DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends Cell Biol* 2010; *20*: 609-17.
- [6] Guo, J. U.; Su, Y.; Zhong, C.; Ming, G. L.; Song, H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 2011; *145*: 423-34.
- [7] Niehrs, C.; Schafer, A. Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends Cell Biol* 2012; *22*: 220-7.
- [8] Iqbal, K.; Jin, S. G.; Pfeifer, G. P.; Szabo, P. E. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; *108*: 3642-7.
- [9] Lee, S. T.; Xiao, Y.; Muench, M. O.; Xiao, J.; Fomin, M. E.; Wiencke, J. K.; Zheng, S.; Dou, X.; de Smith, A.; Chokkalingam, A.; Buffler, P.; Ma, X.; Wiemels, J. L. A global DNA methylation and gene expression analysis of early human B-cell development reveals a demethylation signature and transcription factor network. *Nucleic Acids Res* 2012; *40*: 11339-51.
- [10] Luedi, P. P.; Dietrich, F. S.; Weidman, J. R.; Bosko, J. M.; Jirtle, R. L.; Hartemink, A. J. Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Res* 2007; *17*: 1723-30.
- [11] Barbaux, S.; Gascoin-Lachambre, G.; Buffat, C.; Monnier, P.; Mondon, F.; Tonanny, M. B.; Pinard, A.; Auer, J.; Bessieres, B.; Barlier, A.; Jacques, S.; Simeoni, U.; Dandolo, L.; Letourneur, F.; Jammes, H.; Vaiman, D. A genome-wide approach reveals novel imprinted genes expressed in the human placenta. *Epigenetics* 2012; *7*: 1079-90.
- [12] Smits, G.; Mungall, A. J.; Griffiths-Jones, S.; Smith, P.; Beury, D.; Matthews, L.; Rogers, J.; Pask, A. J.; Shaw, G.; VandeBerg, J. L.; McCarrey, J. R.; Renfree, M. B.; Reik, W.; Dunham, I. Conservation of the H19 noncoding RNA and H19-IGF2 imprinting mechanism in therians. *Nat Genet* 2008; *40*: 971-6.
- [13] Kato, Y.; Sasaki, H. Imprinting and looping: epigenetic marks control interactions between regulatory elements. *Bioessays* 2005; *27*: 1-4.
- [14] Krueger, C.; Osborne, C. S. Raising the curtains on interchromosomal interactions. *Trends Genet* 2006; *22*: 637-9.
- [15] Kajii, T.; Ohama, K. Androgenetic origin of hydatidiform mole. *Nature* 1977; *268*: 633-4.
- [16] Murdoch, S.; Djuric, U.; Mazhar, B.; Seoud, M.; Khan, R.; Kuick, R.; Bagga, R.; Kircheisen, R.; Ao, A.; Ratti, B.; Hanash, S.; Rouleau, G. A.; Slim, R. Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet* 2006; *38*: 300-2.
- [17] Bestor, T. H.; Bourc'his, D. Genetics and epigenetics of hydatidiform moles. *Nat Genet* 2006; *38*: 274-6.
- [18] Holliday, R.; Pugh, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 1975; *187*: 226-32.
- [19] Riggs, A. D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975; *14*: 9-25.
- [20] Bird, A. P.; Southern, E. M. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J Mol Biol* 1978; *118*: 27-47.
- [21] Cedar, H.; Solage, A.; Glaser, G.; Razin, A. Direct detection of methylated cytosine in DNA by use of the restriction enzyme MspI. *Nucleic Acids Res* 1979; *6*: 2125-32.

- [22] Adouard, V.; Dante, R.; Niveleau, A.; Delain, E.; Revet, B.; Ehrlich, M. The accessibility of 5-methylcytosine to specific antibodies in double-stranded DNA of Xanthomonas phage XP12. *Eur J Biochem* 1985; *152*: 115-21.
- [23] Hendrich, B.; Bird, A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998; *18*: 6538-47.
- [24] Hayatsu, H.; Wataya, Y.; Kai, K.; Iida, S. Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry* 1970; *9*: 2858-65.
- [25] Hayatsu, H.; Wataya, Y.; Kazushige, K. The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine. *J Am Chem Soc* 1970; *92*: 724-6.
- [26] Wang, R. Y.; Gehrke, C. W.; Ehrlich, M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* 1980; *8*: 4777-90.
- [27] Frommer, M.; McDonald, L. E.; Millar, D. S.; Collis, C. M.; Watt, F.; Grigg, G. W.; Molloy, P. L.; Paul, C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; *89*: 1827-31.
- [28] Lister, R.; Ecker, J. R. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* 2009; *19*: 959-66.
- [29] Bock, C.; Tomazou, E. M.; Brinkman, A. B.; Muller, F.; Simmer, F.; Gu, H.; Jager, N.; Gnirke, A.; Stunnenberg, H. G.; Meissner, A. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol* 2010; *28*: 1106-14.
- [30] Harris, R. A.; Wang, T.; Coarfa, C.; Nagarajan, R. P.; Hong, C.; Downey, S. L.; Johnson, B. E.; Fouse, S. D.; Delaney, A.; Zhao, Y.; Olshen, A.; Ballinger, T.; Zhou, X.; Forsberg, K. J.; Gu, J.; Echipare, L.; O'Geen, H.; Lister, R.; Pelizzola, M.; Xi, Y.; Epstein, C. B.; Bernstein, B. E.; Hawkins, R. D.; Ren, B.; Chung, W. Y.; Gu, H.; Bock, C.; Gnirke, A.; Zhang, M. Q.; Haussler, D.; Ecker, J. R.; Li, W.; Farnham, P. J.; Waterland, R. A.; Meissner, A.; Marra, M. A.; Hirst, M.; Milosavljevic, A.; Costello, J. F. Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat Biotechnol* 2010; *28*: 1097-105.
- [31] Deng, J.; Shoemaker, R.; Xie, B.; Gore, A.; LeProust, E. M.; Antosiewicz-Bourget, J.; Egli, D.; Maherali, N.; Park, I. H.; Yu, J.; Daley, G. Q.; Eggan, K.; Hochedlinger, K.; Thomson, J.; Wang, W.; Gao, Y.; Zhang, K. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol* 2009; *27*: 353-60.
- [32] Layman, L. C. Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet* 2002; *39*: 153-61.
- [33] Matzuk, M. M.; Lamb, D. J. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008; *14*: 1197-213.
- [34] Schultz, N.; Hamra, F. K.; Garbers, D. L. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; *100*: 12201-6.
- [35] Rousseaux, S.; Reynoird, N.; Escoffier, E.; Thevenon, J.; Caron, C.; Khochbin, S. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online* 2008; *16*: 492-503.
- [36] Wykes, S. M.; Krawetz, S. A. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 2003; *278*: 29471-7.
- [37] Ooi, S. L.; Henikoff, S. Germline histone dynamics and epigenetics. *Curr Opin Cell Biol* 2007; *19*: 257-65.
- [38] Oakes, C. C.; La Salle, S.; Smiraglia, D. J.; Robaire, B.; Trasler, J. M. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol* 2007; *307*: 368-79.
- [39] Benchaib, M.; Ajina, M.; Lornage, J.; Niveleau, A.; Durand, P.; Guerin, J. F. Quantitation by image analysis of global DNA methylation in human spermatozoa and its prognostic value in in vitro fertilization: a preliminary study. *Fertil Steril* 2003; *80*: 947-53.
- [40] Navarro-Costa, P.; Nogueira, P.; Carvalho, M.; Leal, F.; Cordeiro, I.; Calhaz-Jorge, C.; Goncalves, J.; Plancha, C. E. Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. *Hum Reprod* 2010; *25*: 2647-54.

- [41] Ghorbian, S. Routine diagnostic testing of Y chromosome deletions in male infertile and subfertile. *Gene* 2012; *503*: 160-4.
- [42] Wu, W.; Lu, C.; Xia, Y.; Shen, O.; Ji, G.; Gu, A.; Song, L.; Wang, X. Lack of association between DAZ gene methylation patterns and spermatogenic failure. *Clin Chem Lab Med* 2010; *48*: 355-60.
- [43] Linher, K.; Cheung, Q.; Baker, P.; Bedecarrats, G.; Shiota, K.; Li, J. An epigenetic mechanism regulates germ cell-specific expression of the porcine Deleted in Azoospermia-Like (DAZL) gene. *Differentiation* 2009; *77*: 335-49.
- [44] Sugimoto, K.; Koh, E.; Sin, H. S.; Maeda, Y.; Narimoto, K.; Izumi, K.; Kobori, Y.; Kitamura, E.; Nagase, H.; Yoshida, A.; Namiki, M. Tissue-specific differentially methylated regions of the human VASA gene are potentially associated with maturation arrest phenotype in the testis. *J Hum Genet* 2009; *54*: 450-6.
- [45] Marques, C. J.; Carvalho, F.; Sousa, M.; Barros, A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004; *363*: 1700-2.
- [46] Kobayashi, H.; Sato, A.; Otsu, E.; Hiura, H.; Tomatsu, C.; Utsunomiya, T.; Sasaki, H.; Yaegashi, N.; Arima, T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 2007; *16*: 2542-51.
- [47] Marques, C. J.; Costa, P.; Vaz, B.; Carvalho, F.; Fernandes, S.; Barros, A.; Sousa, M. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008; *14*: 67-74.
- [48] Marques, C. J.; Francisco, T.; Sousa, S.; Carvalho, F.; Barros, A.; Sousa, M. Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertil Steril* 2010; *94*: 585-94.
- [49] Pacheco, S. E.; Houseman, E. A.; Christensen, B. C.; Marsit, C. J.; Kelsey, K. T.; Sigman, M.; Boekelheide, K. Integrative DNA methylation and gene expression analyses identify DNA packaging and epigenetic regulatory genes associated with low motility sperm. *PLoS One* 2011; *6*: e20280.
- [50] Kobayashi, H.; Hiura, H.; John, R. M.; Sato, A.; Otsu, E.; Kobayashi, N.; Suzuki, R.; Suzuki, F.; Hayashi, C.; Utsunomiya, T.; Yaegashi, N.; Arima, T. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet* 2009; *17*: 1582-91.
- [51] Boissonnas, C. C.; Abdalaoui, H. E.; Haelewyn, V.; Fauque, P.; Dupont, J. M.; Gut, I.; Vaiman, D.; Jouannet, P.; Tost, J.; Jammes, H. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet* 2010; *18*: 73-80.
- [52] Fauque, P.; Jouannet, P.; Lesaffre, C.; Ripoche, M. A.; Dandolo, L.; Vaiman, D.; Jammes, H. Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol* 2007; *7*: 116.
- [53] Fauque, P.; Mondon, F.; Letourneur, F.; Ripoche, M. A.; Journot, L.; Barboux, S.; Dandolo, L.; Patrat, C.; Wolf, J. P.; Jouannet, P.; Jammes, H.; Vaiman, D. In vitro fertilization and embryo culture strongly impact the placental transcriptome in the mouse model. *PLoS One* 2010; *5*: e9218.
- [54] Chen, S. L.; Shi, X. Y.; Zheng, H. Y.; Wu, F. R.; Luo, C. Aberrant DNA methylation of imprinted H19 gene in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2010; *94*: 2356-8, 2358 e1.
- [55] Bourc'his, D.; Xu, G. L.; Lin, C. S.; Bollman, B.; Bestor, T. H. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001; *294*: 2536-9.
- [56] Jia, D.; Jurkowska, R. Z.; Zhang, X.; Jeltsch, A.; Cheng, X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* 2007; *449*: 248-51.
- [57] Anway, M. D.; Cupp, A. S.; Uzumcu, M.; Skinner, M. K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005; *308*: 1466-9.
- [58] Germain, A. M.; Romanik, M. C.; Guerra, I.; Solari, S.; Reyes, M. S.; Johnson, R. J.; Price, K.; Karumanchi, S. A.; Valdes, G. Endothelial dysfunction: a link among preeclampsia, recurrent pregnancy loss, and future cardiovascular events? *Hypertension* 2007; *49*: 90-5.
- [59] ESHRE/ASRM. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004; *19*: 41-7.

- [60] Hickey, T.; Chandy, A.; Norman, R. J. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 161-5.
- [61] Dasgupta, S.; Sirisha, P. V.; Neelaveni, K.; Anuradha, K.; Reddy, A. G.; Thangaraj, K.; Reddy, B. M. Androgen receptor CAG repeat polymorphism and epigenetic influence among the south Indian women with Polycystic Ovary Syndrome. *PLoS One* 2010; 5: e12401.
- [62] Nakayama, T.; Watanabe, M.; Suzuki, H.; Toyota, M.; Sekita, N.; Hirokawa, Y.; Mizokami, A.; Ito, H.; Yatani, R.; Shiraishi, T. Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. *Lab Invest* 2000; 80: 1789-96.
- [63] Xu, N.; Azziz, R.; Goodarzi, M. O. Epigenetics in polycystic ovary syndrome: a pilot study of global DNA methylation. *Fertil Steril* 2010; 94: 781-3 e1.
- [64] Zhu, J. Q.; Zhu, L.; Liang, X. W.; Xing, F. Q.; Schatten, H.; Sun, Q. Y. Demethylation of LHR in dehydroepiandrosterone-induced mouse model of polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 260-6.
- [65] Xu, N.; Kwon, S.; Abbott, D. H.; Geller, D. H.; Dumesic, D. A.; Azziz, R.; Guo, X.; Goodarzi, M. O. Epigenetic mechanism underlying the development of polycystic ovary syndrome (PCOS)-like phenotypes in prenatally androgenized rhesus monkeys. *PLoS One* 2011; 6: e27286.
- [66] Vaiman, D. Fertility, sex determination, and the X chromosome. *Cytogenet Genome Res* 2002; 99: 224-8.
- [67] Rizzolio, F.; Pramparo, T.; Sala, C.; Zuffardi, O.; De Santis, L.; Rabellotti, E.; Calzi, F.; Fusi, F.; Bellazzi, R.; Toniolo, D. Epigenetic analysis of the critical region I for premature ovarian failure: demonstration of a highly heterochromatic domain on the long arm of the mammalian X chromosome. *J Med Genet* 2009; 46: 585-92.
- [68] Laisk, T.; Haller-Kikkatalo, K.; Laanpere, M.; Jakovlev, U.; Peters, M.; Karro, H.; Salumets, A. Androgen receptor epigenetic variations influence early follicular phase gonadotropin levels. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010; 89: 1557-63.
- [69] Bretherick, K. L.; Metzger, D. L.; Chanoine, J. P.; Panagiotopoulos, C.; Watson, S. K.; Lam, W. L.; Fluker, M. R.; Brown, C. J.; Robinson, W. P. Skewed X-chromosome inactivation is associated with primary but not secondary ovarian failure. *Am J Med Genet A* 2007; 143A: 945-51.
- [70] Mansouri, M. R.; Schuster, J.; Badhai, J.; Stattin, E. L.; Losel, R.; Wehling, M.; Carlsson, B.; Hovatta, O.; Karlstrom, P. O.; Golovleva, I.; Toniolo, D.; Bione, S.; Peluso, J.; Dahl, N. Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 3776-83.
- [71] Sampson, J. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14: 422-469.
- [72] Noel, J. C.; Borghese, B.; Vaiman, D.; Fayt, I.; Anaf, V.; Chapron, C. Steroidogenic factor-1 expression in ovarian endometriosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011; 18: 258-61.
- [73] de Ziegler, D.; Borghese, B.; Chapron, C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management. *Lancet* 2010; 376: 730-8.
- [74] Fassbender, A.; Verbeeck, N.; Bornigen, D.; Kyama, C. M.; Bokor, A.; Vodolazkaia, A.; Peeraer, K.; Tomassetti, C.; Meuleman, C.; Gevaert, O.; Van de Plas, R.; Ojeda, F.; De Moor, B.; Moreau, Y.; Waelkens, E.; D'Hooghe, T. M. Combined mRNA microarray and proteomic analysis of eutopic endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod* 2012; 27: 2020-9.
- [75] Zelenko, Z.; Aghajanova, L.; Irwin, J. C.; Giudice, L. C. Nuclear receptor, coregulator signaling, and chromatin remodeling pathways suggest involvement of the epigenome in the steroid hormone response of endometrium and abnormalities in endometriosis. *Reprod Sci* 2012; 19: 152-62.
- [76] Lee, B.; Du, H.; Taylor, H. S. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol Reprod* 2009; 80: 79-85.
- [77] Wu, Y.; Halverson, G.; Basir, Z.; Strawn, E.; Yan, P.; Guo, S. W. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 371-80.

- [78] Szczepanska, M.; Wirstlein, P.; Luczak, M.; Jagodzinski, P. P.; Skrzypczak, J. Reduced expression of HOXA10 in the midluteal endometrium from infertile women with minimal endometriosis. *Biomed Pharmacother* 2010; *64*: 697-705.
- [79] Borghese, B.; Mondon, F.; Noel, J. C.; Fayt, I.; Mignot, T. M.; Vaiman, D.; Chapron, C. Gene expression profile for ectopic versus eutopic endometrium provides new insights into endometriosis oncogenic potential. *Mol Endocrinol* 2008; *22*: 2557-62.
- [80] Wang, D.; Chen, Q.; Zhang, C.; Ren, F.; Li, T. DNA hypomethylation of the COX-2 gene promoter is associated with up-regulation of its mRNA expression in eutopic endometrium of endometriosis. *Eur J Med Res* 2012; *17*: 12.
- [81] Szczepanska, M.; Wirstlein, P.; Skrzypczak, J.; Jagodzinski, P. P. Expression of HOXA11 in the mid-luteal endometrium from women with endometriosis-associated infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; *10*: 1.
- [82] de Graaff, A. A.; Delvoux, B.; Van de Vijver, K. K.; Kyama, C. M.; D'Hooghe, T. M.; Dunselman, G. A.; Romano, A. Paired-box gene 2 is down-regulated in endometriosis and correlates with low epidermal growth factor receptor expression. *Hum Reprod* 2012; *27*: 1676-84.
- [83] Jichan, N.; Xishi, L.; Guo, S. W. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in adenomyosis and its rectification by a histone deacetylase inhibitor and a demethylation agent. *Reprod Sci* 2010; *17*: 995-1005.
- [84] Xue, Q.; Lin, Z.; Cheng, Y. H.; Huang, C. C.; Marsh, E.; Yin, P.; Milad, M. P.; Confino, E.; Reierstad, S.; Innes, J.; Bulun, S. E. Promoter methylation regulates estrogen receptor 2 in human endometrium and endometriosis. *Biol Reprod* 2007; *77*: 681-7.
- [85] Xue, Q.; Zhou, Y. F.; Zhu, S. N.; Bulun, S. E. Hypermethylation of the CpG island spanning from exon II to intron III is associated with steroidogenic factor 1 expression in stromal cells of endometriosis. *Reprod Sci* 2011; *18*: 1080-4.
- [86] Izawa, M.; Taniguchi, F.; Uegaki, T.; Takai, E.; Iwabe, T.; Terakawa, N.; Harada, T. Demethylation of a nonpromoter cytosine-phosphate-guanine island in the aromatase gene may cause the aberrant up-regulation in endometriotic tissues. *Fertil Steril* 2010; *95*: 33-9.
- [87] Wu, Y.; Strawn, E.; Basir, Z.; Halverson, G.; Guo, S. W. Promoter hypermethylation of progesterone receptor isoform B (PR-B) in endometriosis. *Epigenetics* 2006; *1*: 106-11.
- [88] Ren, F.; Wang, D.; Jiang, Y. Epigenetic inactivation of hMLH1 in the malignant transformation of ovarian endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2012; *285*: 215-21.
- [89] Martini, M.; Ciccarone, M.; Garganese, G.; Maggiore, C.; Evangelista, A.; Rahimi, S.; Zannoni, G.; Vittori, G.; Larocca, L. M. Possible involvement of hMLH1, p16(INK4a) and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. *Int J Cancer* 2002; *102*: 398-406.
- [90] Lelievre-Pegorier, M.; Merlet-Benichou, C. The number of nephrons in the mammalian kidney: environmental influences play a determining role. *Exp Nephrol* 2000; *8*: 63-5.
- [91] Xue, Q.; Lin, Z.; Yin, P.; Milad, M. P.; Cheng, Y. H.; Confino, E.; Reierstad, S.; Bulun, S. E. Transcriptional activation of steroidogenic factor-1 by hypomethylation of the 5' CpG island in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; *92*: 3261-7.
- [92] Bulun, S. E. Endometriosis. *N Engl J Med* 2009; *360*: 268-79.
- [93] Wu, Y.; Starzinski-Powitz, A.; Guo, S. W. Prolonged stimulation with tumor necrosis factor-alpha induced partial methylation at PR-B promoter in immortalized epithelial-like endometriotic cells. *Fertil Steril* 2008; *90*: 234-7.
- [94] Vestergaard, A. L.; Thorup, K.; Knudsen, U. B.; Munk, T.; Rosbach, H.; Poulsen, J. B.; Guldborg, P.; Martensen, P. M. Oncogenic events associated with endometrial and ovarian cancers are rare in endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2011; *17*: 758-61.
- [95] Borghese, B.; Barboux, S.; Mondon, F.; Santulli, P.; Pierre, G.; Vinci, G.; Chapron, C.; Vaiman, D. Research resource: genome-wide profiling of methylated promoters in endometriosis reveals a subtelomeric location of hypermethylation. *Mol Endocrinol* 2010; *24*: 1872-85.
- [96] El-Maarri, O.; Kareta, M. S.; Mikeska, T.; Becker, T.; Diaz-Lacava, A.; Junen, J.; Nusgen, N.; Behne, F.; Wienker, T.; Waha, A.; Oldenburg, J.; Chedin, F. A systematic search for DNA

methyltransferase polymorphisms reveals a rare DNMT3L variant associated with subtelomeric hypomethylation. *Hum Mol Genet* 2009; *18*: 1755-68.

[97] Borghese, B.; Santulli, P.; Hequet, D.; Pierre, G.; de Ziegler, D.; Vaiman, D.; Chapron, C. Genetic polymorphisms of DNMT3L involved in hypermethylation of chromosomal ends are associated with greater risk of developing ovarian endometriosis. *Am J Pathol* 2012; *180*: 1781-6.

[98] Wu, Y.; Strawn, E.; Basir, Z.; Halverson, G.; Guo, S. W. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2007; *87*: 24-32.

[99] Ahmadi, A.; Ng, S. C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999; *284*: 696-704.

[100] de Mouzon, J.; Goossens, V.; Bhattacharya, S.; Castilla, J. A.; Ferraretti, A. P.; Korsak, V.; Kupka, M.; Nygren, K. G.; Nyboe Andersen, A. Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2010; *25*: 1851-62.

[101] Halliday, J. L.; Ukoumunne, O. C.; Baker, H. W.; Breheny, S.; Jaques, A. M.; Garrett, C.; Healy, D.; Amor, D. Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 2010; *25*: 59-65.

[102] Katari, S.; Turan, N.; Bibikova, M.; Erinle, O.; Chalian, R.; Foster, M.; Gaughan, J. P.; Coutifaris, C.; Sapienza, C. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet* 2009; *18*: 3769-78.

[103] de Mouzon, J.; Goossens, V.; Bhattacharya, S.; Castilla, J. A.; Ferraretti, A. P.; Korsak, V.; Kupka, M.; Nygren, K. G.; Andersen, A. N. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2012; *27*: 954-66.

[104] Cardozo, E.; Pavone, M. E.; Hirshfeld-Cytron, J. E. Metabolic syndrome and oocyte quality. *Trends Endocrinol Metab* 2011; *22*: 103-9.

[105] Market-Velker, B. A.; Zhang, L.; Magri, L. S.; Bonvissuto, A. C.; Mann, M. R. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 2010; *19*: 36-51.

[106] Doherty, A. S.; Mann, M. R.; Tremblay, K. D.; Bartolomei, M. S.; Schultz, R. M. Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 2000; *62*: 1526-35.

[107] Fauque, P.; Ripoche, M. A.; Tost, J.; Journot, L.; Gabory, A.; Busato, F.; Le Digarcher, A.; Mondon, F.; Gut, I.; Jouannet, P.; Vaiman, D.; Dandolo, L.; Jammes, H. Modulation of imprinted gene network in placenta results in normal development of in vitro manipulated mouse embryos. *Hum Mol Genet* 2010; *19*: 1779-90.

[108] Sato, A.; Otsu, E.; Negishi, H.; Utsunomiya, T.; Arima, T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 2007; *22*: 26-35.

[109] Helmerhorst, F. M.; Perquin, D. A.; Donker, D.; Keirse, M. J. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ* 2004; *328*: 261.

[110] Jackson, R. A.; Gibson, K. A.; Wu, Y. W.; Croughan, M. S. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2004; *103*: 551-63.

[111] Shevell, T.; Malone, F. D.; Vidaver, J.; Porter, T. F.; Luthy, D. A.; Comstock, C. H.; Hankins, G. D.; Eddleman, K.; Dolan, S.; Dugoff, L.; Craigo, S.; Timor, I. E.; Carr, S. R.; Wolfe, H. M.; Bianchi, D. W.; D'Alton, M. E. Assisted reproductive technology and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 2005; *106*: 1039-45.

[112] Chen, X. K.; Wen, S. W.; Bottomley, J.; Smith, G. N.; Leader, A.; Walker, M. C. In vitro fertilization is associated with an increased risk for preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2009; *28*: 1-12.

[113] Romundstad, L. B.; Romundstad, P. R.; Sunde, A.; von Doring, V.; Skjaerven, R.; Gunnell, D.; Vatten, L. J. Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet* 2008; *372*: 737-43.

- [114] Thomopoulos, C.; Tsioufis, C.; Michalopoulou, H.; Makris, T.; Papademetriou, V.; Stefanadis, C. Assisted reproductive technology and pregnancy-related hypertensive complications: a systematic review. *J Hum Hypertens* 2012.
- [115] DeBaun, M. R.; Niemitz, E. L.; Feinberg, A. P. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 156-60.
- [116] Maher, E. R.; Afnan, M.; Barratt, C. L. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Hum Reprod* 2003; 18: 2508-11.
- [117] Gicquel, C.; Gaston, V.; Mandelbaum, J.; Siffroi, J. P.; Flahault, A.; Le Bouc, Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1338-41.
- [118] Cox, G. F.; Burger, J.; Lip, V.; Mau, U. A.; Sperling, K.; Wu, B. L.; Horsthemke, B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 162-4.
- [119] Orstavik, K. H.; Eiklid, K.; van der Hagen, C. B.; Spetalen, S.; Kierulf, K.; Skjeldal, O.; Buiting, K. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 218-9.
- [120] Ludwig, M.; Katalinic, A.; Gross, S.; Sutcliffe, A.; Varon, R.; Horsthemke, B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005; 42: 289-91.
- [121] Sutcliffe, A. G.; Peters, C. J.; Bowdin, S.; Temple, K.; Reardon, W.; Wilson, L.; Clayton-Smith, J.; Brueton, L. A.; Bannister, W.; Maher, E. R. Assisted reproductive therapies and imprinting disorders--a preliminary British survey. *Hum Reprod* 2006; 21: 1009-11.
- [122] Blik, J.; Terhal, P.; van den Bogaard, M. J.; Maas, S.; Hamel, B.; Salieb-Beugelaar, G.; Simon, M.; Letteboer, T.; van der Smagt, J.; Kroes, H.; Mannens, M. Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 604-14.
- [123] Kagami, M.; Nagai, T.; Fukami, M.; Yamazawa, K.; Ogata, T. Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 131-6.
- [124] Moll, A. C.; Imhof, S. M.; Cruysberg, J. R.; Schouten-van Meeteren, A. Y.; Boers, M.; van Leeuwen, F. E. Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. *Lancet* 2003; 361: 309-10.
- [125] Puumala, S. E.; Nelson, H. H.; Ross, J. A.; Nguyen, R. H.; Damario, M. A.; Spector, L. G. Similar DNA methylation levels in specific imprinting control regions in children conceived with and without assisted reproductive technology: a cross-sectional study. *BMC Pediatr* 2012; 12: 33.
- [126] Redman, C. W.; Sargent, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; 308: 1592-4.
- [127] Goswami, D.; Tannetta, D. S.; Magee, L. A.; Fuchisawa, A.; Redman, C. W.; Sargent, I. L.; von Dadelszen, P. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset preeclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta* 2006; 27: 56-61.
- [128] Lok, C. A.; Van Der Post, J. A.; Sargent, I. L.; Hau, C. M.; Sturk, A.; Boer, K.; Nieuwland, R. Changes in microparticle numbers and cellular origin during pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2008; 27: 344-60.
- [129] Nishizawa, H.; Pryor-Koishi, K.; Kato, T.; Kowa, H.; Kurahashi, H.; Udagawa, Y. Microarray analysis of differentially expressed fetal genes in placental tissue derived from early and late onset severe pre-eclampsia. *Placenta* 2007; 28: 487-97.
- [130] Toft, J. H.; Lian, I. A.; Tarca, A. L.; Erez, O.; Espinoza, J.; Eide, I. P.; Bjorge, L.; Draghici, S.; Romero, R.; Austgulen, R. Whole-genome microarray and targeted analysis of angiogenesis-regulating gene expression (ENG, FLT1, VEGF, PlGF) in placentas from pre-eclamptic and small-for-gestational-age pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; 21: 267-73.

- [131] Varkonyi, T.; Nagy, B.; Fule, T.; Tarca, A. L.; Karaszi, K.; Schonleber, J.; Hupuczi, P.; Mihalik, N.; Kovalszky, I.; Rigo, J., Jr.; Meiri, H.; Papp, Z.; Romero, R.; Than, N. G. Microarray profiling reveals that placental transcriptomes of early-onset HELLP syndrome and preeclampsia are similar. *Placenta* 2011; 32 *Suppl*: S21-9.
- [132] Centlow, M.; Wingren, C.; Borrebaeck, C.; Brownstein, M. J.; Hansson, S. R. Differential gene expression analysis of placentas with increased vascular resistance and pre-eclampsia using whole-genome microarrays. *J Pregnancy* 2011; 2011: 472354.
- [133] Tsai, S.; Hardison, N. E.; James, A. H.; Motsinger-Reif, A. A.; Bischoff, S. R.; Thames, B. H.; Piedrahita, J. A. Transcriptional profiling of human placentas from pregnancies complicated by preeclampsia reveals dysregulation of sialic acid acetyltransferase and immune signalling pathways. *Placenta* 2011; 32: 175-82.
- [134] Loset, M.; Mundal, S. B.; Johnson, M. P.; Fenstad, M. H.; Freed, K. A.; Lian, I. A.; Eide, I. P.; Bjorge, L.; Blangero, J.; Moses, E. K.; Austgulen, R. A transcriptional profile of the decidua in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204: 84 e1-27.
- [135] Chelbi, S. T.; Vaiman, D. Genetic and epigenetic factors contribute to the onset of preeclampsia. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 282: 120-9.
- [136] Jia, R. Z.; Zhang, X.; Hu, P.; Liu, X. M.; Hua, X. D.; Wang, X.; Ding, H. J. Screening for differential methylation status in human placenta in preeclampsia using a CpG island plus promoter microarray. *Int J Mol Med* 2012; 30: 133-41.
- [137] Yuen, R. K.; Penaherrera, M. S.; von Dadelszen, P.; McFadden, D. E.; Robinson, W. P. DNA methylation profiling of human placentas reveals promoter hypomethylation of multiple genes in early-onset preeclampsia. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 1006-12.
- [138] Tsui, D. W.; Chan, K. C.; Chim, S. S.; Chan, L. W.; Leung, T. Y.; Lau, T. K.; Lo, Y. M.; Chiu, R. W. Quantitative aberrations of hypermethylated RASSF1A gene sequences in maternal plasma in pre-eclampsia. *Prenat Diagn* 2007; 27: 1212-8.
- [139] Bellido, M. L.; Radpour, R.; Lapaire, O.; De Bie, I.; Hosli, I.; Bitzer, J.; Hmadcha, A.; Zhong, X. Y.; Holzgreve, W. MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma. *Biol Reprod* 2010; 82: 745-50.
- [140] Chelbi, S. T.; Mondon, F.; Jammes, H.; Buffat, C.; Mignot, T. M.; Tost, J.; Busato, F.; Gut, I.; Rebourcet, R.; Laissue, P.; Tsatsaris, V.; Goffinet, F.; Rigourd, V.; Carbonne, B.; Ferre, F.; Vaiman, D. Expressional and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia. *Hypertension* 2007; 49: 76-83.
- [141] Wang, Z.; Lu, S.; Liu, C.; Zhao, B.; Pei, K.; Tian, L.; Ma, X. Expressional and epigenetic alterations of placental matrix metalloproteinase 9 in preeclampsia. *Gynecol Endocrinol* 2010; 26: 96-102.
- [142] Gascoin-Lachambre, G.; Buffat, C.; Rebourcet, R.; Chelbi, S. T.; Rigourd, V.; Mondon, F.; Mignot, T. M.; Legras, E.; Simeoni, U.; Vaiman, D.; Barboux, S. Cullins in human intra-uterine growth restriction: expressional and epigenetic alterations. *Placenta* 2010; 31: 151-7.
- [143] Chelbi, S. T.; Wilson, M. L.; Veillard, A. C.; Ingles, S. A.; Zhang, J.; Mondon, F.; Gascoin-Lachambre, G.; Doridot, L.; Mignot, T. M.; Rebourcet, R.; Carbonne, B.; Concordet, J. P.; Barboux, S.; Vaiman, D. Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control SERPINA3 expression and its association with placental diseases. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 1968-78.
- [144] Chelbi, S. T.; Doridot, L.; Mondon, F.; Dussour, C.; Rebourcet, R.; Busato, F.; Gascoin-Lachambre, G.; Barboux, S.; Rigourd, V.; Mignot, T. M.; Tost, J.; Vaiman, D. Combination of promoter hypomethylation and PDX1 overexpression leads to TBX15 decrease in vascular IUGR placentas. *Epigenetics* 2011; 6: 247-55.
- [145] Kulkarni, A.; Chavan-Gautam, P.; Mehendale, S.; Yadav, H.; Joshi, S. Global DNA methylation patterns in placenta and its association with maternal hypertension in pre-eclampsia. *DNA Cell Biol* 2011; 30: 79-84.
- [146] McMillen, I. C.; Robinson, J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005; 85: 571-633.

- [147] Pham, T. D.; MacLennan, N. K.; Chiu, C. T.; Laksana, G. S.; Hsu, J. L.; Lane, R. H. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R962-70.
- [148] MacLennan, N. K.; James, S. J.; Melnyk, S.; Piroozzi, A.; Jernigan, S.; Hsu, J. L.; Janke, S. M.; Pham, T. D.; Lane, R. H. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol Genomics* 2004; 18: 43-50.
- [149] Vaiman, D.; Gascoin-Lachambre, G.; Boubred, F.; Mondon, F.; Feuerstein, J. M.; Ligi, I.; Grandvuillemin, I.; Barboux, S.; Ghigo, E.; Achard, V.; Simeoni, U.; Buffat, C. The intensity of IUGR-induced transcriptome deregulations is inversely correlated with the onset of organ function in a rat model. *PLoS One* 2011; 6: e21222.
- [150] Fu, Q.; McKnight, R. A.; Yu, X.; Callaway, C. W.; Lane, R. H. Growth retardation alters the epigenetic characteristics of hepatic dual specificity phosphatase 5. *FASEB J* 2006; 20: 2127-9.
- [151] Fu, Q.; Yu, X.; Callaway, C. W.; Lane, R. H.; McKnight, R. A. Epigenetics: intrauterine growth retardation (IUGR) modifies the histone code along the rat hepatic IGF-1 gene. *FASEB J* 2009; 23: 2438-49.
- [152] Ke, X.; Lei, Q.; James, S. J.; Kelleher, S. L.; Melnyk, S.; Jernigan, S.; Yu, X.; Wang, L.; Callaway, C. W.; Gill, G.; Chan, G. M.; Albertine, K. H.; McKnight, R. A.; Lane, R. H. Uteroplacental insufficiency affects epigenetic determinants of chromatin structure in brains of neonatal and juvenile IUGR rats. *Physiol Genomics* 2006; 25: 16-28.
- [153] Coupe, B.; Amarger, V.; Grit, I.; Benani, A.; Parnet, P. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 2010; 151: 702-13.
- [154] Konycheva, G.; Dziadek, M. A.; Ferguson, L. R.; Krageloh, C. U.; Coolen, M. W.; Davison, M.; Breier, B. H. Dietary methyl donor deficiency during pregnancy in rats shapes learning and anxiety in offspring. *Nutr Res* 2011; 31: 790-804.
- [155] Ke, X.; McKnight, R. A.; Caprau, D.; O'Grady, S.; Fu, Q.; Yu, X.; Callaway, C. W.; Albertine, K. H.; Lane, R. H. Intrauterine growth restriction affects hippocampal dual specificity phosphatase 5 gene expression and epigenetic characteristics. *Physiol Genomics* 2011; 43: 1160-9.
- [156] Park, J. H.; Stoffers, D. A.; Nicholls, R. D.; Simmons, R. A. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest* 2008; 118: 2316-24.
- [157] Pinney, S. E.; Jaeckle Santos, L. J.; Han, Y.; Stoffers, D. A.; Simmons, R. A. Exendin-4 increases histone acetylase activity and reverses epigenetic modifications that silence Pdx1 in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetologia* 2011; 54: 2606-14.
- [158] Thompson, R. F.; Fazzari, M. J.; Niu, H.; Barzilai, N.; Simmons, R. A.; Grealley, J. M. Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats. *J Biol Chem* 2010; 285: 15111-8.
- [159] Monk, D.; Smith, R.; Arnaud, P.; Preece, M. A.; Stanier, P.; Beechey, C. V.; Peters, J.; Kelsey, G.; Moore, G. E. Imprinted methylation profiles for proximal mouse chromosomes 11 and 7 as revealed by methylation-sensitive representational difference analysis. *Mamm Genome* 2003; 14: 805-16.
- [160] Eggerding, F. A.; Schonberg, S. A.; Chehab, F. F.; Norton, M. E.; Cox, V. A.; Epstein, C. J. Uniparental isodisomy for paternal 7p and maternal 7q in a child with growth retardation. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 253-65.
- [161] Lee, D. H.; Singh, P.; Tsark, W. M.; Szabo, P. E. Complete biallelic insulation at the H19/Igf2 imprinting control region position results in fetal growth retardation and perinatal lethality. *PLoS One* 2010; 5: e12630.
- [162] Goyal, R.; Leitzke, A.; Goyal, D.; Gheorghe, C. P.; Longo, L. D. Antenatal maternal hypoxic stress: adaptations in fetal lung Renin-Angiotensin system. *Reprod Sci* 2011; 18: 180-9.
- [163] Zhou, F. C.; Chen, Y.; Love, A. Cellular DNA methylation program during neurulation and its alteration by alcohol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011; 91: 703-15.

- [164] Downing, C.; Johnson, T. E.; Larson, C.; Leakey, T. I.; Siegfried, R. N.; Rafferty, T. M.; Cooney, C. A. Subtle decreases in DNA methylation and gene expression at the mouse *Igf2* locus following prenatal alcohol exposure: effects of a methyl-supplemented diet. *Alcohol* 2011; *45*: 65-71.
- [165] Liu, Y.; Balaraman, Y.; Wang, G.; Nephew, K. P.; Zhou, F. C. Alcohol exposure alters DNA methylation profiles in mouse embryos at early neurulation. *Epigenetics* 2009; *4*: 500-11.
- [166] Haycock, P. C.; Ramsay, M. Exposure of mouse embryos to ethanol during preimplantation development: effect on DNA methylation in the h19 imprinting control region. *Biol Reprod* 2009; *81*: 618-27.
- [167] Woods, A. K.; Hoffmann, D. S.; Weydert, C. J.; Butler, S. D.; Zhou, Y.; Sharma, R. V.; Davisson, R. L. Adenoviral delivery of VEGF121 early in pregnancy prevents spontaneous development of preeclampsia in BPH/5 mice. *Hypertension* 2011; *57*: 94-102.
- [168] Zhao, L.; Zhou, H.; Lu, L.; Liu, L.; Li, X.; Lin, Y.; Yu, S. Identification of quantitative trait loci controlling rice mature seed culturability using chromosomal segment substitution lines. *Plant Cell Rep* 2009; *28*: 247-56.
- [169] Bobetsis, Y. A.; Barros, S. P.; Lin, D. M.; Weidman, J. R.; Dolinoy, D. C.; Jirtle, R. L.; Boggess, K. A.; Beck, J. D.; Offenbacher, S. Bacterial infection promotes DNA hypermethylation. *J Dent Res* 2007; *86*: 169-74.
- [170] Gicquel, C.; Rossignol, S.; Cabrol, S.; Houang, M.; Steunou, V.; Barbu, V.; Danton, F.; Thibaud, N.; Le Merrer, M.; Burglen, L.; Bertrand, A. M.; Netchine, I.; Le Bouc, Y. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 2005; *37*: 1003-7.
- [171] Eggermann, T.; Schonherr, N.; Meyer, E.; Obermann, C.; Mavany, M.; Eggermann, K.; Ranke, M. B.; Wollmann, H. A. Epigenetic mutations in 11p15 in Silver-Russell syndrome are restricted to the telomeric imprinting domain. *J Med Genet* 2006; *43*: 615-6.
- [172] Schonherr, N.; Meyer, E.; Roos, A.; Schmidt, A.; Wollmann, H. A.; Eggermann, T. The centromeric 11p15 imprinting centre is also involved in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2007; *44*: 59-63.
- [173] Netchine, I.; Rossignol, S.; Dufourg, M. N.; Azzi, S.; Rousseau, A.; Perin, L.; Houang, M.; Steunou, V.; Esteve, B.; Thibaud, N.; Demay, M. C.; Danton, F.; Petriczko, E.; Bertrand, A. M.; Heinrichs, C.; Carel, J. C.; Loeuille, G. A.; Pinto, G.; Jacquemont, M. L.; Gicquel, C.; Cabrol, S.; Le Bouc, Y. 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; *92*: 3148-54.
- [174] Eggermann, T.; Meyer, E.; Caglayan, A. O.; Dundar, M.; Schonherr, N. ICR1 epimutations in 11p15 are restricted to patients with Silver-Russell syndrome features. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008; *21*: 59-62.
- [175] Binder, G.; Seidel, A. K.; Martin, D. D.; Schweizer, R.; Schwarze, C. P.; Wollmann, H. A.; Eggermann, T.; Ranke, M. B. The endocrine phenotype in silver-russell syndrome is defined by the underlying epigenetic alteration. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; *93*: 1402-7.
- [176] Eggermann, T.; Schonherr, N.; Jager, S.; Spaich, C.; Ranke, M. B.; Wollmann, H. A.; Binder, G. Segmental maternal UPD(7q) in Silver-Russell syndrome. *Clin Genet* 2008; *74*: 486-9.
- [177] Wojdacz, T. K.; Dobrovic, A.; Algar, E. M. Rapid detection of methylation change at H19 in human imprinting disorders using methylation-sensitive high-resolution melting. *Hum Mutat* 2008; *29*: 1255-60.
- [178] Bartholdi, D.; Krajewska-Walasek, M.; Ounap, K.; Gaspar, H.; Chrzanowska, K. H.; Ilyana, H.; Kayserili, H.; Lurie, I. W.; Schinzel, A.; Baumer, A. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver-Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes. *J Med Genet* 2009; *46*: 192-7.
- [179] Eggermann, T. Silver-Russell and Beckwith-Wiedemann syndromes: opposite (epi)mutations in 11p15 result in opposite clinical pictures. *Horm Res* 2009; *71 Suppl 2*: 30-5.

- [180] Eggermann, T.; Spengler, S.; Bachmann, N.; Baudis, M.; Mau-Holzmann, U. A.; Singer, S.; Rossier, E. Chromosome 11p15 duplication in Silver-Russell syndrome due to a maternally inherited translocation t(11;15). *Am J Med Genet A* 2010; *152A*: 1484-7.
- [181] Demars, J.; Shmela, M. E.; Rossignol, S.; Okabe, J.; Netchine, I.; Azzi, S.; Cabrol, S.; Le Caignec, C.; David, A.; Le Bouc, Y.; El-Osta, A.; Gicquel, C. Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum Mol Genet* 2010; *19*: 803-14.
- [182] Turner, C. L.; Mackay, D. M.; Callaway, J. L.; Docherty, L. E.; Poole, R. L.; Bullman, H.; Lever, M.; Castle, B. M.; Kivuva, E. C.; Turnpenny, P. D.; Mehta, S. G.; Mansour, S.; Wakeling, E. L.; Mathew, V.; Madden, J.; Davies, J. H.; Temple, I. K. Methylation analysis of 79 patients with growth restriction reveals novel patterns of methylation change at imprinted loci. *Eur J Hum Genet* 2010; *18*: 648-55.
- [183] McMinn, J.; Wei, M.; Schupf, N.; Cusmai, J.; Johnson, E. B.; Smith, A. C.; Weksberg, R.; Thaker, H. M.; Tycko, B. Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction. *Placenta* 2006; *27*: 540-9.
- [184] Koukoura, O.; Sifakis, S.; Zaravinos, A.; Apostolidou, S.; Jones, A.; Hajjioannou, J.; Widschwendter, M.; Spandidos, D. A. Hypomethylation along with increased H19 expression in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction. *Placenta* 2011; *32*: 51-7.
- [185] Bourque, D. K.; Avila, L.; Penaherrera, M.; von Dadelszen, P.; Robinson, W. P. Decreased placental methylation at the H19/IGF2 imprinting control region is associated with normotensive intrauterine growth restriction but not preeclampsia. *Placenta* 2010; *31*: 197-202.
- [186] Tabano, S.; Colapietro, P.; Cetin, I.; Grati, F. R.; Zanutto, S.; Mando, C.; Antonazzo, P.; Pileri, P.; Rossella, F.; Larizza, L.; Sirchia, S. M.; Miozzo, M. Epigenetic modulation of the IGF2/H19 imprinted domain in human embryonic and extra-embryonic compartments and its possible role in fetal growth restriction. *Epigenetics* 2010; *5*: 313-24.
- [187] Lambertini, L.; Lee, T. L.; Chan, W. Y.; Lee, M. J.; Diplas, A.; Wetmur, J.; Chen, J. Differential methylation of imprinted genes in growth-restricted placentas. *Reprod Sci* 2011; *18*: 1111-7.
- [188] Banister, C. E.; Koestler, D. C.; Maccani, M. A.; Padbury, J. F.; Houseman, E. A.; Marsit, C. J. Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas. *Epigenetics* 2011; *6*: 920-7.
- [189] Michels, K. B.; Harris, H. R.; Barault, L. Birthweight, maternal weight trajectories and global DNA methylation of LINE-1 repetitive elements. *PLoS One* 2011; *6*: e25254.
- [190] Gesta, S.; Bluher, M.; Yamamoto, Y.; Norris, A. W.; Berndt, J.; Kralisch, S.; Boucher, J.; Lewis, C.; Kahn, C. R. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; *103*: 6676-81.
- [191] Adkins, R. M.; Tylavsky, F. A.; Krushkal, J. Newborn umbilical cord blood DNA methylation and gene expression levels exhibit limited association with birth weight. *Chem Biodivers* 2012; *9*: 888-99.
- [192] Tobi, E. W.; Heijmans, B. T.; Kremer, D.; Putter, H.; Delemarre-van de Waal, H. A.; Finken, M. J.; Wit, J. M.; Slagboom, P. E. DNA methylation of IGF2, GNASAS, INSIGF and LEP and being born small for gestational age. *Epigenetics* 2011; *6*: 171-6.
- [193] Wang, H.; Ogawa, M.; Wood, J. R.; Bartolomei, M. S.; Sammel, M. D.; Kusanovic, J. P.; Walsh, S. W.; Romero, R.; Strauss, J. F., 3rd. Genetic and epigenetic mechanisms combine to control MMP1 expression and its association with preterm premature rupture of membranes. *Hum Mol Genet* 2008; *17*: 1087-96.

Legends of the figures.

Figure 1: An overview of the four reproductive organs studied in this review and of the diseases that are evoked. In the center is represented a DNA molecule, methyl residues being positioned on the red strand. DNMT1 (in blue) is the DNA Methyl Transferase that transmits the methylation from the existing strand to the neo-synthesized strand. DNMT3A (in yellow) and DNMT3L (in green) form a heterodimer that dimerizes and associates at specific positions to the chromatin to proceed to a *de novo* DNA methylation. This vision does not present the complex of proteins that drives this methylation which is clearly site-specific in response to various external stimuli.

Figure 2: A schematic representation of the two alleles (maternal and paternal) present at the paradigmatic IGF2/H19 imprinted locus. On the maternal chromosome (in pink), the imprinting control region (ICR, in yellow) is demethylated (white lollipops). This allows the binding of the CTCF Zinc Finger Transcription factor, leading to insulation of the left part of the ICR. In this case, the enhancer activates H19 (in pink/purple) expression, while IGF2 (in grey) is not expressed. On the paternal allele (in blue), methylation of the ICR (black lollipops) prevents CTCF binding; then the enhancer activates the IGF2 (in blue) promoter, leading to expression from the paternal allele, while H19 (in grey) is not expressed. The actual distance between H19 and the ICR is ~3 kb, while the actual distance between H19 and IGF2 is ~90 kb.

Figure 3: An overview of the major technical possibilities available to analyze DNA methylation. Some approaches are adequate to analyze a specific locus (left box), some are of interest to analyze the whole genome (right box). The genomic DNA is processed along the three possibilities represented in light gray in the upper part. The arrows correspond either to the possibilities of genome-wide analyses, or to technical destinations of the DNA, which can be PCR-amplified or ligated for locus-specific analysis. The large arrows correspond to issues where data mining is necessary, essentially because it correspond to genome-wide analyses, where bioinformatics plays a pivotal position in order to be able to interpret the data.

Figure 1

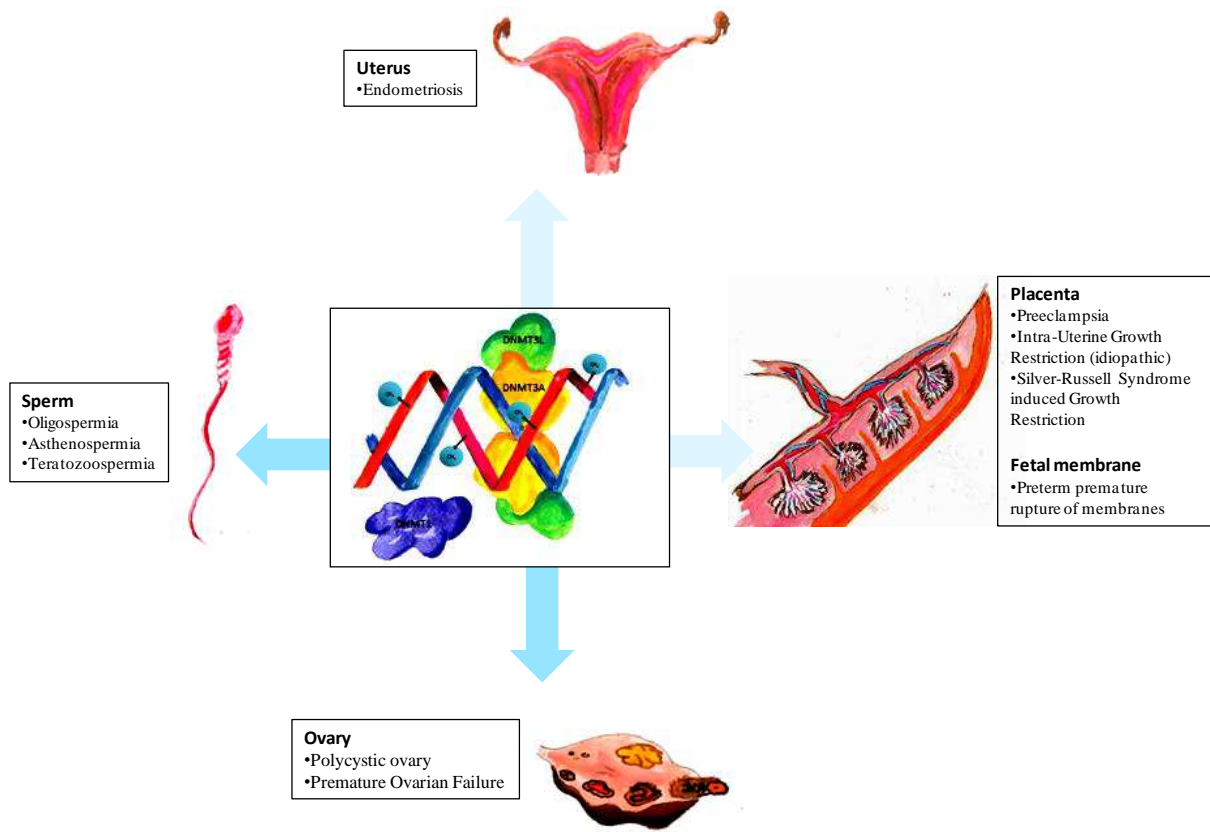
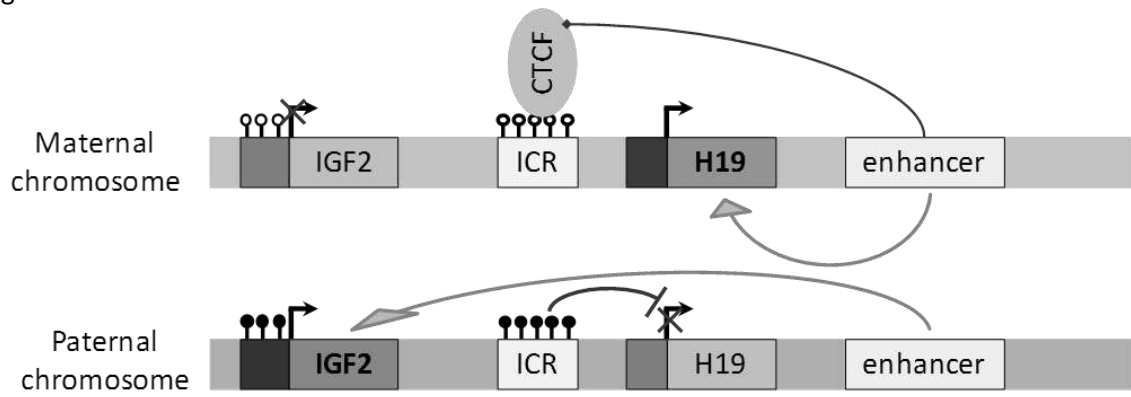


Figure 2



♀/♂ Unmethylated / Methylated cytosine

Adapted from Sha, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2008.

Figure 3

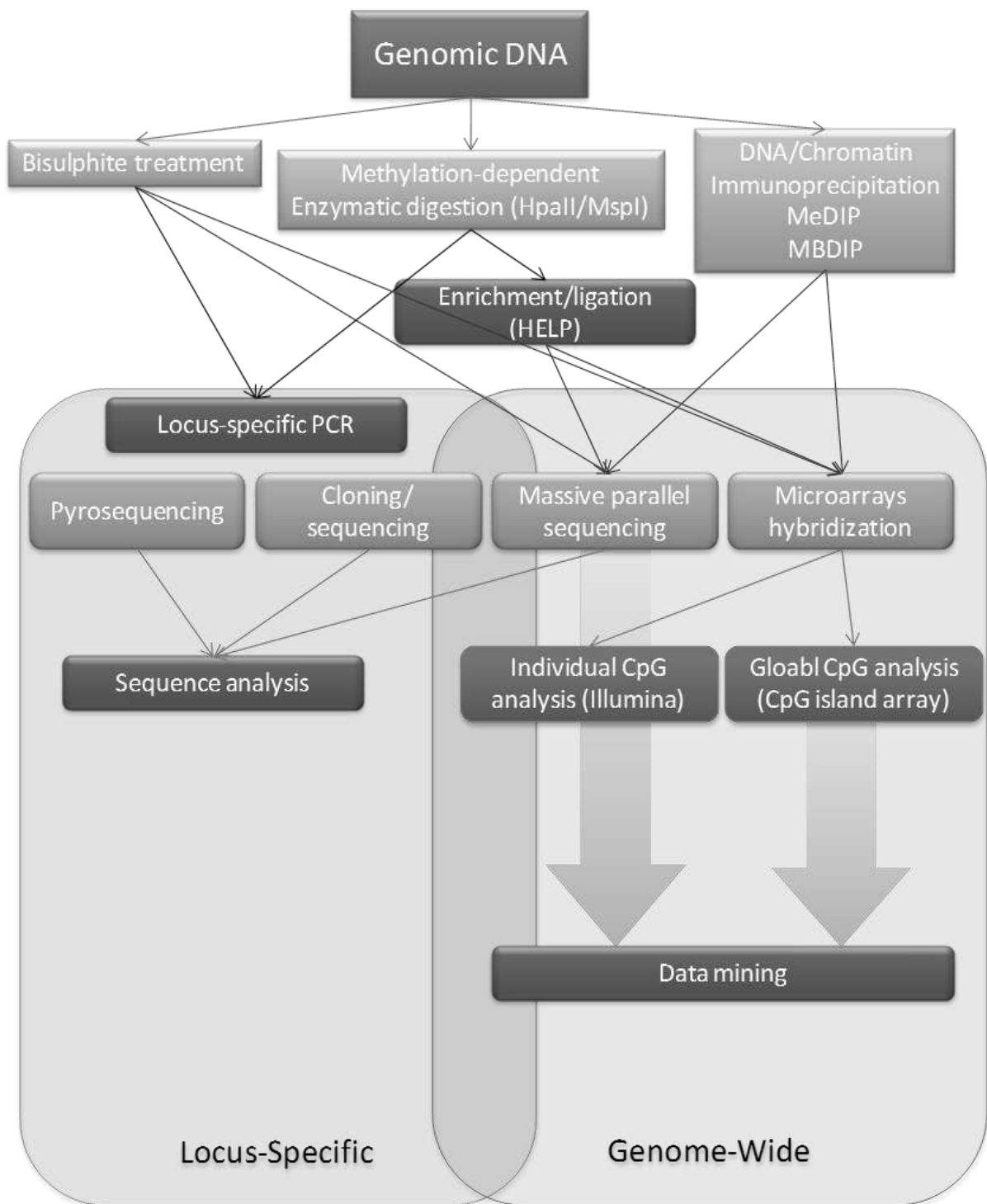


TABLE 1 : Recapitulation of the phenotypes and observations described in this review. (pink: IUGR, yellow: preeclampsia, green: spermatogenesis, purple: endometriosis, grey: Polycystic Ovary, blue: assisted reproductive technologies)

Species	Tissue	Disease	Induced phenotype	Genes analyzed: expression	Genes analyzed: methylation	Gene activity/outcome
Human		IUGR spontaneous		genome-wide	genome-wide	nt
Yucatan minipigs	Liver	IUGR spontaneous		Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) Cystathionine-g-lyase (CGL) : lower		lower
Rat	Hippocampus	IUGR induced methyl-donor deficient	Changes in behaviour and IUGR (aged offspring are more anxious and have better learning ability)	GR	GR	lower nt
				HSD11b2 NNAT Reelin : lower TGFb signaling(smad7, Smurf2, Smad2 and Smad3) LINE1	HSD11b2 NNAT Reelin	nt nt nt
Human	Umbilical cord	spontaneous low and high birthweight, premature infants			LINE-1 methylation decreased	
Human	Fetal adrenal cortex	IUGR	Nicotine treatment	StAR	StAR promoter one CpG (-377) sensitive to nicotine treatment target of PAX6	
Rat	Hippocampus	IUGR	See paper	DUSP5 decreased at Day 0 et Day 21 (dentate gyrus)	sex-specific alterations of CpG methylation and histone code	Protein decreased at day 21 only, ERK phosphorylation increased
Sheep	Heart	IUGR	Placental function restriction	IGF2 increased	IGF2/H19 unchanged	Greater relative left ventricle weight
Human	Placenta	Fetal Growth Restriction		IGF1R increased IGF2R increased IGF2 decreased	IGF1R unchanged IGF2R unchanged IGF2 not significant at two putative DMR	
Rat	Pancreas	IUGR	Bilateral uterine artery ligation followed by Exendine-4 treatment	Pdx1 induced by Exendin4 treatment, afetr being extinguished through IUGR induction	prevention of Dnmt1 binding induce demethylation	Phosphorylation of USF1, Association with PCAF at the proximal promoter of Pdx1, increase of HAT activity, prevention of Dnmt1 binding patterns of DNA methylation in human placenta are reliably and significantly associated with infant growth
Human	Placenta	IUGR	Small for gestational age	genome-wide DNA methylation	Genome-wide analysis identifies profiles specific of IUGR in placental methylation	Mild overall hypermethylation of the DMRs
Human	Placenta	Severe IUGR		DNA methylation of placenta imprinted genes	Genome-wide (MedIP on Chip) focused on all imprinted genes	
Mouse	Neural tube	IUGR induced	Alcool treatment/AZA treatment	5-MeC, MBD1, DNMT1 expression	Altered DNA methylation following drug(s) treatment	
Human	Placenta	Fetal Growth Restriction		H19 was increased in IUGR	H19 methylation lower	increased H19 transcription in the FGR group of placentas.
Mouse	Lungs	Induced IUGR	Antenatal maternal hypoxia	ACE1 mRNA increased but protein decreased Ace2 increased mRNA and protein	Methylation unchnaged in the promoter	

Human	Placenta	IUGR		At-1b increased Renin increased protein mmir 199b, 27b, 200b, 468 decreased TBX15 expression regulated by PDX1, repressed in IUGR	Promoter induction is methylation and PDX1- dependent IGF2 no significant differences GNASAS no significant differences INSIGF no significant differences LEP no significant differences IGF2	
Human	Blood cells	IUGR				
Mouse	All tissues	IUGR induced	substitution of the CTCF binding site with Chicken b globin insulator x2			
Human		SRS		Uniparental disomy chromosome 7	44% of the patients with hypomethylation on chromosome 11p15 Moderate decrease at 4 CpG of Igf2	
Mouse	embryo and placenta	IUGR	Alcohol induced, correction by methyl donors for malformation in particular	Igf2 decreased ~1,5 fold		
Human	Placenta/Bl ood/fetal	Preeclampsia and IUGR		TIMP3 expression inversely correlated with methylation	Illumina 1505 CpG, 34 loci hypomethylated in EOPET, 5 in IUGR; TIMP3 CAPG GLI2 KRT13 LINE-1 methylation, ICR1 of IGF2/H19 DMR2 hypomethylation	
Human	cord blood, placenta and umbilical cord Fetal DNA in maternal plasma	Idiopathic IUGR		IGF2/H19		
Human		IUGR/preeclampsia		SRY	hypermethylated RASSF1A	Diagnostic/prognostic seems possible?
Rat	Pancreas	IUGR	Bilateral uterine artery ligation	RASSF1A Beta-globin Change in mRNA expression of genes associated with cell death, vascularisation, beta-cell proliferation and insulin secretion	1400 loci identified by the HELP technique at conserved intergenic loci	
Human	CD34+ hematopoie tic stem cells from cord blood	IUGR			near	
Human		Silver- Russell syndrome, IUGR			PLAGL1	
Human	Placenta	IUGR, Preeclampsia , PE+IUGR		IGF2/H19 ICR1	IGF2R several (~10%) patients with a complete gain of methylation PEG10 MEST1 GRB10 KCNQ1OT1 H19 loss of methylation IGF2P0 DLK1 PEG3 NESPAS Illumina Golden Gate/ Bisulphite Pyrosequencing 11p15 ICR1 demethylated in normotensive IUGR placentas only. ICR2 not modified, LINE-1 not	

Rats	Hypothalamus	IUGR, induced	isocaloric low protein; (Restricted and control fetuses adopted randomly by restricted or control mothers, for estimating separately the effects of gestation and lactation)	Cell differentiation/Cytoskeleton, catch-up growth corrects the phenotype delayed placental leptin surge; expression modified in IUGR Bmp2,4,7, cyclin, double cortin, Dnmt1, Dnmt3a	modified POMC promoter overall demethylated at 7 positions at PND12	
Mouse	early neurulation	IUGR induced by alcohol consumption	IUGR	Links methylation expression for 84 genes	Genome-wide MedIP-chip chromosomes 7, 10 and X more frequent; imprinted genes, cell cycle, growth, apoptosis, cancer and olfaction	
Human	Leukocytes	BWS/SRS	IUGR/overgrowth	IGF2/H19	Genetic defects affecting methylation of ICR1 in 21 BWS and 16 SRS patients outside the CTCF binding sites	
Human	Placenta	IUGR/PE	IUGR	Cullin4B, Cullin7	Cullin7 promoter hypomethylated in IUGR	SP1 may act as a regulator induced by IUGR of Cullin genes
Human	Leukocytes	SRS/ BWS		five maternally and two paternally methylated loci	167 patients, Loss of methylation at 11p15 SRS and BWS patients, outsid ICR1 and 2, LOM at other loci (DLK1/GTL2 DMR (>2/3 patients). Multilocus LOM for SRS patients. Exclusion of LOT1 (ZAC1/PLAGL1 in SRS)	multilocus LOM can also concern SRS patients, LOM can involve both paternally and maternally methylated loci in the same patient
Human		SRS IUGR and postnatal growth retardation				
Human	Leukocytes	SRS			Impact of epigenetic mechanisms in development of the CVS UPD (chr7) and 11p15 epimutation are not always associated assessed for a group of 188 patients	
Rat	Liver	IUGR	Bilateral uterine artery ligation	IGF1: Days 0 and 21 IUGR decreases the hematic and seric expression	Methylation analyzed > at several positions among 12 CpG sites. Several modifications in both directions at D0 and D21. Strong hypermethylation at D0 At Prom2 (6 CpG analyzed) rather normalized at P21. Histone (6 modif, P1 taken as reference.	
Mouse	Placenta	IUGR induced by alcohol exposure periimplantatory	IUGR		H19 DMR less methylated (paternal alleles). Imprinting unaffected	
Human	DNA (blood cells?)	SRS			201 patients at IGF2/H19 40% of the patients with epimutation at the locus amongst 201	
Human	Placenta and neonatal blood	IUGR		IGF2 expression decreased, one case of H19 biallelic expression	KvDMR and H19 DMR, 20 controls and 24 SGA, alterations leading to abiallelic expression of H19 in one case	
Human	Blood cells	BWS/SRS				technique by High-resolution Melting curves
Rat	Pancreas	IUGR	IUGR induced by bilateral arteries ligation	PDX1 low levels in beta cells. Inactivation reversible by HDAC inhibition.	Evaluation of DNA from islets of 5 IUGR and 5 control animals revealed that at age 2 weeks none of the 14 CpG sites in	

					the Pdx1 promoter were methylated in islets from either IUGR or control animals. At 6 months of age (n = 5 animals per group), Pdx1 DNA methylation levels across the CpG island averaged 51.3% ± 10.3% compared with no CpG methylation in controls (P < 0.05 vs. controls). No single CpG site was consistently methylated .	
Human	DNA (blood cells?)	SRS		IGF2/H19		ICR1 hypomethylation
Human	DNA (blood cells?)	SRS				Analysis of several regions: 14q32, 6q24 ICR2. Only 11p15.5 and UPD7 seem important.
Rat	Skeletal muscle (proxy C2C12)	IUGR				Glut4 Promoter, three CpG clusters affecting the binding of MEF2A, MEF2D and MYOD
Human		SRS		IGF2/H19		Epimutations at 11p15 (19/44), UPD7 (5/44)
Human		SRS				11p15
Human		SRS				Evaluation of the prevalence of epimutations at 11p15 in SRS
Human	DNA (leukocytes)	SRS	After IVF			31 Cytosines at PEG/MEST (7q31) and 23 at the H19 DMR at 11p15
Mouse	Placenta	IUGR	induced by oral infection with Campylobacter Rectus	Igf2 down-regulated		hypermethylation of the Igf2 P0 promoter
Human	DNA	SRS				11p15 epimutations are associated to SRS
Rat	Liver	IUGR	Bilateral uterine artery ligation	DUSP5 mRNA reduced		methylation of exon 2 of DUSP5
		SRS and BWS	fetal and postnatal growth retardation	Imprinted domains in 11p5		Loss of DNA methylation
Human	DNA				SRS and 11p15 epimutations, no in IUGR idiopathic	
Rat	brain	IUGR	Bilateral uterine artery ligation			Cerebral DNA methylation reduced at D0, decrease of DNMT1, MECP2, HDAC1, remain low at d21
Human	Placenta	IUGR			PHLDA2 increased, MEST3, MEG, GATM, GNAS PLAGL1 decreased non imprinted: LEP, CRH, HPGD, INHBA, IGF1, INDAO, PSGs GLRX, AGTR1, DSCR1, SLC	DNA methylation at PHLDA2 and MEST
Human Rats	DNA Liver	SRS IUGR	Bilateral uterine artery ligation		S-adenosyl homocystein, decrease methionin adenosyl transferase and cystathione-beta synthase	Epimutations at 11p15 consequences on DNA methylation
Mouse	Mouse embryos		Growth alterations		imprinted loci in Chrs 11 and 7 p	
Human	Placenta	IUGR	Growth retardation	ESX1L		imprinted in mice, not in humans, no variation in human IUGR (methylation and expression)
Rat	Kidney	IUGR	Bilateral uterine	p53		hypomethylations exons 5-

Human Mouse	Liver of 1 day old mice	IUGR IUGR	artery ligation Growth retardation Growth retardation	duplication of 11p15 maternal IGF2	8 Deletion of a 54 bp methylated core region in DMR2 on the paternal allele reduced Igf2 mRNA levels	intragenic methylation an increases levels of transcription
Human	Placenta	Preeclampsia		CAPN2, EPHX2, ADORA2B, SOX7, CXCL1 & CDX1	Microarray analysis identified 296 genes that showed significantly aberrant DNA methylation in preeclampsia (PE)	This study demonstrated aberrant patterns of DNA methylation in PE
Human	Placenta	Preeclampsia and Early onset Preeclampsia (EOPET)		TIMP3, CAPG, MEST	The promoter of TIMP3 was confirmed to be significantly hypomethylated in EOPET placentas	gene-specific hypomethylation may be a common phenomenon in EOPET placentas, and that TIMP3 could serve as a potential prenatal diagnostic marker for EOPET.
Human	maternal plasma	Preeclampsia		RASSF1A	Hypermethylation of RASSF1A in PE	utility of hypermethylated RASSF1A sequences in maternal plasma as a gender- and polymorphism- independent marker for pre- eclampsia.
Human	maternal plasma, Placenta	Preeclampsia		RASSF1A, SERPINB5		
Human	Placenta	Preeclampsia		MMP9	hypomethylated in PE placentas	Reduced synthesis of MMP9 in PE placentas may result from epigenetic changes of the methylation status of CpG sites in the promoter region.
Human	Placenta	Preeclampsia/IUGR		SERPINA3, A5, A8, B2, B5, and B7	Hypomethylation of SERPINA3 promoter in PE and IUGR	
Human	Placenta	Preeclampsia/IUGR		TBX15, PDX1	Hypomethylation of TBX15 promoter	Reduced expression of TBX15 in IUGR
Human Human	JEG-3 cells Placenta	Preeclampsia/IUGR Preeclampsia		SERPINA3 Global DNA methylation	Increased global DNA methylation levels were seen in the PE group	A positive association between global DNA methylation and systolic and diastolic blood pressure was seen in the term PE group
Human	Sperm	ART				The proportion of sperm with DNA fragmentation appears to be potentially useful as a predictor of ICSI outcome, whereas embryo quality based on morphological criteria, appeared unaffected by DNA fragmentation
Human/ Mouse medakaf ish	germ cells and testis sperm, ovary	gametogenes is		DAZ and DAZL DAZ and DAZL		the odazl or its protein is a marker for germ cells during embryogenesis and at critical stages of gametogenesis in both sexes of medaka
Human	spermatozo a, leukocytes, placenta	ART	Inheritable male infertility	DAZ and DAZL		The 5' end of both genes are hypomethylated in spermatozoa but not in leukocytes or placenta, consistent with the expression pattern of the genes
Human	sperm	oligoasthenozoospermic		DAZL	increased methylation defects in the DAZL	Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm.
Pig	somatic and germ cells	Azoospermi a	Male infetility	DAZL	Methylation supresses DAZL promoter activity	DNA methylation may suppress DAZL expression in somatic cells by interfering with Sp1 binding
Human	testicular	idiopathic		VASA	high VASA TDMR	

	biopsies	azoospermic or severely oligospermic			methylation rates in MA	
Human	Sperm	oligospermic		MEST and H19		
Human	Sperm	azoospermia, vasectomy reversal		H19, IG-GTL2 and MEST	Hypomethylation of H19 DMR	
Human	Sperm	oligospermic		H19 and IGF2	Perturbations of the 6th CTCF site of the H19 DMR	
Human	Sperm	teratozoospermic and OAT		<i>HDAC1, SIRT3, DNMT3A</i>		
Human	Sperm	low sperm motility			abnormal methylation	
Human	Sperm	severe OZ and 67 moderate OZ		LIT1, MEST, SNRPN, PLAGL1, PEG3, H19 and IGF2	significantly increased methylation	
Human	Sperm	oligospermic patients and patients with known anomalies of the protamines				
Human	Sperm	ART, Oligospermia		XIST, DNMT3L		
Mouse	Blastocysts	ART Superovulation		H19	Superovulation clearly disrupted H19 methylation gene expression in individual blastocysts	H19 could be used as a sensor of the invasiveness of the ART
Female rat	Spermatogonia	vinclozolin, methoxychlor	Inheritable male infertility	Global DNA methylation	altered DNA methylation patterns in the germ line	
Human	Endometrium biopsies	Endometriosis		84 nuclear receptor genes		DNA methylation and transcriptional repression signaling as the most affected pathway in endometrium in women with endometriosis
Human/	eutopic endometrium	Endometriosis		Hoxa10, IGFBP1, Pgr-AB	hypermethylation of Hoxa10 in the endometriosis	
Human	Endometrium biopsies	Endometriosis		Hoxa10	Hypermethylation	Reduced expression of Hoxa10 in endometrium is associated with hypermethylation
Human	cystic endometriosis lesions of the ovary	Endometriosis		SF1	Methylation reduces SF1 expression	increased methylation of SF1 promoter in endometrial cells
Human	Endometrial cells	Endometriosis		PR-B	partial methylation of PR-B promoter associated with a reduction in its expression	prolonged exposure of endometrial cells to TNF-alpha induces partial methylation of PR-B promoter
Human	Endometrium biopsies			APC, CDKN2A, PYCARD, RARB, RASSF1 and ESR1		
Human	Endometrium biopsies	OMA, DIE and SUP		<i>Global DNA methylation</i>	35 genes alterations of methylation associated to expression modifications	
Mouse	Ovary	PCOS		LHR, AR, FSHR and H19	<i>LHR</i> gene was demethylated in PCos	evidence for close linkage between DNA demethylation of LHR and PCOS
Mouse	Oocytes, blastocytes	ART		DNA methylation of imprinted genes	maternal as well as paternal H19 methylation was perturbed by superovulation	
Mouse	blastocytes			H19	Culture medium affects H19 methylation and expression	
Human	placenta and cord blood	ART		DNA methylation at more than 700 genes (1536 CpG sites)	ART may have an effect on global patterns of DNA methylation and gene expression	
Human	Lymphocytes and buccal cells	ART		KvDMR and CTCF binding sites in H19, IGF2 DMR0 and IGF2R	differences in methylation in IGF2 and IGF2R	

ANNEXE 3

LA REGULATION DE MIR34-A DANS LES PATHOLOGIES PLACENTAIRES

(soumis à Epigenetics, under review)

Résumé

Cette étude a été principalement réalisée au cours du stage de M1 de Dorothée Houry, que j'ai co-encadré avec Daniel Vaiman. Le point de départ de cette étude a été l'observation d'une diminution de l'expression de la SERPINA3 suite à la surexpression de mir34a dans des cellules de cancer du colon (lignée HTC116) par une approche transcriptomique. Or, la SERPINA3 est un de nos gènes d'intérêt dans l'étude des pathologies placentaires (Annexe 3).

Nous avons donc étudié l'expression de mir34a (en détectant le micro ARN primaire, pri-mir34a) dans des placentas témoins et pathologiques et cherché à mieux comprendre sa régulation (grâce à son analyse dans des cellules JEG-3).

Ainsi, nous avons montré que le pri-mir34a est surexprimée dans les placentas prééclampsiques et que son expression placentaire est beaucoup plus élevée au cours du premier trimestre de la grossesse qu'à terme. En ce qui concerne la régulation de mir34a, nous avons montré que P53, un activateur connu de mir34a, est réduit dans tous les placentas pathologiques et que l'hypoxie peut induire l'expression du pri-mir34a dans des cellules JEG-3. Nous avons également étudié l'état de méthylation du promoteur de mir34a (autour des sites de liaison de P53) et avons révélé son hypométhylation dans tous les placentas prééclampsiques (associée ou non à un RCIU) par rapport à des placentas normaux, tandis que l'hypoxie induit son hyperméthylation dans les cellules JEG-3. Enfin, nous avons évalué la régulation de la SERPINA3 par mir34a dans les cellules JEG-3 et démontré une inhibition de son expression suite à la surexpression de mir34a, ceci étant indépendant de la 3'UTR de la SERPINA3.

En conclusion, nous apportons de nouveaux arguments en faveur d'un rôle de mir34a dans la physiopathologie des maladies placentaires, renforçant ainsi les études précédentes montrant que mir34a régule la capacité d'invasion des cellules du trophoblaste. Toutes ces données sont cohérentes avec une participation de mir34a dans le développement de la prééclampsie.

Mir34a: a key player in preeclampsia pathophysiology

Doridot L[#], Houry D[#], ... , Vaiman D.

[#] These two authors contributed equally to this study.

Abstract

Introduction

Preeclampsia (PE) is a common pregnancy disease, affecting 5 to 10% of pregnancies (Sibai, Dekker, and Kupferminc 2005) and it is one of the first causes of maternal mortality. This disease is defined by the occurrence of gestational hypertension and proteinuria. The only definitive treatment is to deliver the placenta, and so the fetus and therefore it often leads to the birth of premature babies. PE can be associated with with intra-uterine growth retardation (IUGR), in around one third of the cases. Despite the late onset of the symptoms, the causes are thought to occur early during the first trimester of pregnancy, notably with an abnormal placentation leading to shallow invasion of the maternal uterine arteries and hypoperfusion (responsible of a pathological hypoxia) (Redman and Sargent 2005).

In our team, we studied Serine protease inhibitor (SERPIN) family in the context of placental diseases. Indeed, these proteins are involved in various pathways affected in these diseases such as inflammation, coagulation, fibrinolysis, complement activation, and phagocytosis. We recently showed that SERPINA3 is upregulated in PE+IUGR and IUGR placentas and that its promoter is hypomethylated in PE and IUGR placentas in a region binding lots of transcription factor (like HIF, Hypoxia inducible factor) (Chelbi et al. 2007; Auer et al. 2010). SERPINA3 is a specific inhibitor of elastase, a member of matrix metalloprotease family, which plays a crucial role during the implantation process, so this protein could play a role in the pathophysiology of PE. It is confirmed by the recent study showing the association of SNP in the promoter region of this gene and preeclampsia, these SNP regulating the fixation of transcription factor according to the methylation status (Chelbi et al. 2011).

Micro RNAs (miRNAs) are post-transcriptional regulators, non-coding RNA. They are encoded in different parts of the genome: intergenic regions, but also intronic regions, and they can

also be polycistronic. They are mostly transcribed by RNA pol II. First they are transcribed as primary-miRNA, constituted by a hairpin and flanking sequences. This pri-miRNA is processed by Drosha Complex, an RNase III enzyme, into precursor-miRNA which is only composed by the hairpin. This precursor-miRNA is then exported to the cytoplasm via Exportin 5. In the cytoplasm, the pre-miRNA is processed by Dicer Complex, a second RNase III enzyme, into a mature miRNA-miRNA* duplex. This double stranded molecule is composed by mature miRNA guide strand and miRNA passenger strand. The mature miRNA is then loaded into the RISC complex (RNA-induced silencing complex) while miRNA passenger strand is degraded. miRNA in the RISC complex can interact with UTR of its mRNA targets and could function with two silencing mechanisms : either mRNA target degradation, either mRNA target translational inhibition (Davis and Hata 2009; van Rooij and Olson 2007).

MiRNA have already been described to play essential role during development (Schmittgen 2008). For example, mir-196 acts upstream of Hoxb8 and Sonic Hedgehog in limb development, for the antero-posterior axis patterning (Hornstein et al. 2005). So, miRNAs may function in fail-safe mechanisms, assuring fidelity of expression domains crucial for patterning/development. They could therefore be important for placentation, which is a finely regulated step for a harmonious pregnancy.

Here, we specifically study mir34a, as it was recently shown that its overexpression in HTC116 cells (colon cancer cell line) leads to a decrease of SERPINA3 mRNA (Chang et al. 2007). So we assessed the idea that SERPINA3 could be regulated in placental diseases by an abnormal mir34a expression. Mir34a gene is located in chr1p36 and it has the specificity to have 2 exons, with the mature miRNA encoded by the second one, like all the miRNA from mir34 family. However mir34a has the particularity to have a very large intron of about 30 kb. It was shown that mir34a is regulated by P53 (via P53 binding sites in its promoter). Several validated targets of Mir34a are described which are implicated in different biological pathways. For example, mir34a inhibits BCL2, which is involved in apoptosis. Inhibition of CyclinD1 and E2 as well as Cyclin Dependent Kinase CDK4 and 6, MET, the hepatocyte growth factor receptor and the proto-oncogene N-MYC, all involved in cell cycle, leads to G1 arrest. E2F3 transcription factor inhibition leads to proliferation inhibition. Delta like protein DLL1, a notch ligand, is also inhibited by mir34a, which means Notch signalling can be disturb by mir34a. And last but not least, SIRT1, an NAD-dependent deacetylase, is a mir34a target, and it has also been shown to inhibit several pro-apoptotic proteins including P53, all of this forming a positive feedback loop (Hermeking 2010; Raver-Shapira et al. 2007).

In this study, we showed that mir34a is expressed in the placentas, and differently in pathological ones. Its expression seemed to be elevated in early pregnancy. We revealed that P53, a key regulator of mir34a is reduced in all pathological placentas studied. We also showed that mir34a is induced by hypoxia in choriocarcinoma cells. We could display differences in promoter methylation status in pathological placentas and following hypoxia exposure in choriocarcinoma cells. And finally, we showed that mir34a is able to indirectly inhibit SERPINA3 expression in choriocarcinoma cell.

Methods

Human Material Samples and Ethics

Placentas from normal and pathological pregnancies (PE and IUGR) were collected after caesarean delivery from 3 maternities (St Antoine, Port-Royal, and Institut de Puériculture, Paris, France) following the indications of the Cochin Hospital ethical committee. We had access to complete clinical data for each individual. Placental fragment from voluntary termination of pregnancy were also collected and formed the “early placenta” group.

The inclusion criteria used for PE patients were the following clinical thresholds: systolic pressure >140 mm Hg, diastolic pressure >90 mm Hg, and proteinuria >0.3 g per 24 hours. The inclusion criteria used for IUGR was weight at birth <10th percentile, and it was characterized as vascular if a notch was observed during uterine doppler at the second or/and the third trimester assessment.

We classified the patients in 3 groups: isolated PE (PE), PE associated with IUGR (PE+IUGR), isolated IUGR (IUGR) and vascular IUGR (vasc IUGR). Women who underwent caesarean surgery without suffering any disease during pregnancy formed the control group.

Fragments (10 to 20 mm) from the placental subchorial zone were dissected as described previously (Mondon et al. 2005, Vaiman et al. 2005). Maternal membranes were eliminated, and floating villi were washed in Hanks' balanced salt solution (HBSS). A fraction of these samples was kept frozen and another kept in TRIzol (5 mL/g, Invitrogen), and total RNA was extracted, treated with RNase-free DNase, and quantified by spectrophotometry.

RNA extraction and Quantitative RT-PCR conditions

Total RNA from collected tissues was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions, treated with RNase-free DNase, and quantified by spectrophotometry. Reverse transcription (RT) was carried out according to a standardized protocol. Briefly, 4 µg of total DNase-treated RNA was reverse transcribed in a volume of 25 µL at 39°C using the M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers during 1 hour.

Quantitative RT-PCR was carried out using the LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science) in accordance with the manufacturer's instructions. The reaction was performed in a Light-Cycler 480 Thermocycler (Roche Applied Science). Primers were designed for the coding sequences of the different genes using the PRIMER3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>) and aligned with basic local alignment search tool software (BLAST) to avoid nonspecific annealing. Samples were submitted to cycling according to the following PCR program: 95°C for 5 min followed by 45 cycles of 3 temperature steps (94°C for 10 s, 58°C for 15 s, and 72°C for 15 s). Finally, samples were submitted to a progressive temperature elevation (from 65 to 99°C at 0.1°C/s), resulting in a melting curve, enabling to check the PCR products homogeneity. In addition, amplification products were systematically controlled by agarose gel electrophoresis.

The threshold cycle number (Ct) values were collected with the LightCycler480 software (Roche Applied Science) in the exponential phase of the PCR reaction. These Ct values were normalized by the Ct values obtained for the succinate dehydrogenase subunit A (*SDHA*) for mRNA used as normalising gene.

All primers are presented as Supplemental Table 1.

Name	Forward	Reverse
SDHA	TACAAGGTGCGGATTGATGA	CAAAGGGCTTCTTCTGTTGC
Pri-mir34	TTTAAGCTTATGCGCCCTGCC	TTTCTCGAGAGAGCTTCCGAAGTCCTGG
Genomic mir34a (for cloning)	AAGGTGGTGGTCTGGCTATG	CCAGGACTCCACGTTTCATCT
Mir34a Promoter	CACGAGCAGGAAGGAGGAC	GAGCAGGTAGTGCAGGCTTC
P53	AGCAGTGGGGCTCTCAGTAA	ATAAGCAGACAGGGCCACAC
BCL2	CCCAAGCAATGGATGATTTGA	GGCATTCTGGGAGCTTCATCT
SERPINA3	AGCAGTGGGGCTCTCAGTAA	ATAAGCAGACAGGGCCACAC
SERPINA3 3'UTR (for cloning)	TGAGTGTGGTGGtctagaTGGAGA CAAGGACCATTGTGCGTTTC	TGAGTGTGGTGGtctagaGTCCAACGAAAT TATTTATTGCTGTC

Supplemental table 1: Primers for qPCR analysis

Plasmid construction

To produce the pcDNA-mir34a vector, a 1025 bp fragment encompassing the mir34a hairpin was amplified from placental genomic DNA and cloned into pcDNA3.1 vector (Life Technologies) digested by EcoRV (Fermentas). It was already described that such construction could allow the expression and maturation of micro RNA (Rao et al. 2010).

For Luc-3'UTR-SERPINA3, a 353 bp fragment corresponding to the 3'UTR of SERPINA3 was amplified from placental genomic DNA and cloned into a modified pGL3 basic vector (Promega, modified by the integration of a minimal CMV upstream of the luciferase gene) digested by XbaI (Fermentas).

Cell culture, hypoxia and transfection.

The JEG-3 cell line is a conventionally used model of trophoblast cells (Kohler et al. 1971). JEG-3 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium Glutamax (Life Technologies) supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum (Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin, at 37°C in the presence of 5% CO₂.

To analyze the effect of hypoxia on gene expression, cells were seeded in 60 mm diameter glass dishes, placed in a Lwoff chamber at 37°C and exposed to an oxygen-depleted atmosphere (2% O₂, 5% CO₂) or maintained as control at 37°C in humidified normal atmosphere (20% O₂ – 5% CO₂). Cells were then harvested for RNA extraction using TRIzol Reagent (Invitrogen) at 3, 24, 36 and 72 h. The kinetics was done twice independently. For 3h and 72h, a part of the cells was kept for genomic DNA extraction.

For transfection to assess BCL2 and SERPINA3 expression following mir34a transfection, cells were seeded the day before transfection at 80% of confluence, and then transfected using lipofectamine 2000 (Life technologies) according to manufacturer's instruction. Three independent experiments each including three replicates for both conditions (empty vector and pcDNA-mir34a) were performed.

For luciferase assay, cells were seeded the day before transfection at 30% of confluence, and then transfected using the calcium phosphate method as previously described XXX. For luciferase assays (see below), cells were seeded in 24-well plates and harvested after 48 h. Quantities of plasmid DNA used for transfections were, respectively, 1 µg per well total for luciferase assays (i.e., 590 ng of

reporter luciferase, 400 ng of mir34a-expressing vector and 10 ng of renilla, pRL-RSV, Promega). DNA quantifications were performed using a Nanodrop spectrophotometer. Each experiment included three to five replicates for each conditions and was repeated thrice independently.

Luciferase Assay

Mir34a activity on 3'UTR of SERPINA3 was assessed by the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). A Renilla luciferase vector (pRL-RSV, Promega) was co-transfected in all experiments to monitor transfection efficiency. Luminescence was measured using a Berthold Lumat LB9507 luminometer (EG&G Berthold). The experiment was performed twice independently with three to six replicates per condition. The observed firefly activity was divided by the activity recorded from Renilla luciferase vector (pRL-RSV, Promega), and the mean values of the replicates were calculated. These mean values were then divided by the mean values of the corresponding condition to obtain the fold induction by mir34a expression compared to the empty vector.

Genomic DNA extraction and methylation analysis with McrBC digestion

DNA was extracted under standard procedures (Mondon et al. 2005). Briefly, samples were first digested with proteinase K and SDS. Phenol-chloroform extractions were followed by alcohol precipitation of genomic DNA which was subsequently dissolved in water overnight. Gel electrophoresis and OD measurement (NanoDrop 1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE) were performed to quantify the genomic DNA and check for its integrity.

Methylation of mir34a promoter status was determined by methylation-sensitive McrBC-PCR assay, as previously described (Holemon et al. 2007; Ordway et al. 2006; Borghese et al. 2010).

DNA (1 μ g) was treated either with 25 U of McrBC endonuclease (New England Biolabs, Beverly, MA) or mock treated with an equivalent volume of water in a 50- μ l reaction mixture containing 1 \times NEB2 buffer, 0.1 mg/ml BSA, and 2 mM GTP. Treated and mock-treated reactions were incubated at 37 C during 6 h. Then, the enzyme was inactivated (65 C, 20 min), and the samples were precipitated, washed, and resuspended in 30 μ l of H₂O. After the McrBC treatment, subsequent fluorescence-based quantitative PCR was used, starting from 2 μ l of resuspended DNAs. Quantitative RT-PCR was carried out using the LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science) in accordance with the manufacturer's instructions. The reaction was performed in a Light-Cycler 480 Thermocycler (Roche Applied Science).

Specific PCR primers for mir34a promoter and a region without McrBC restriction site (as a reference for normalising) were used. Samples were submitted to cycling according to the following PCR program: 95°C for 5 min followed by 45 cycles of 3 temperature steps (94°C for 10 s, 58°C for 15 s, and 72°C for 15 s). Finally, samples were submitted to a progressive temperature elevation (from 65 to 99°C at 0.1°C/s), resulting in a melting curve, enabling to check the PCR products homogeneity. In addition, amplification products were systematically controlled by agarose gel electrophoresis.

The Ct (threshold cycle number) values were collected with the LightCycler software (Roche) in the exponential phase of the PCR. Cleavage of methylated DNA by McrBC induces DNA strand breaks and abrogates PCR amplification. Conversely, the presence of unmethylated cytosines in DNA prevents enzyme cleavage and can be detected by PCR amplification. Mock-treated DNA (undigested) served as a control and was considered as the maximal PCR product recovery. Methylated DNA has decreased amounts of PCR product after McrBC digestion. Thus, the Ct values of treated samples were normalized by the Ct values of the mock-treated DNA (Δ Ct). The results are presented as fold induction of PCR product recovery after the digestion of DNA with McrBC relative to undigested DNA (computed by $2^{-\Delta$ Ct).

Statistical analysis

Statistical significance was evaluated using one or two-ways ANOVA followed by post-hoc tests (Student-Neuman Keuls) on the Ct differences (Δ Ct) or normalized Relative Light Units. The calculations were made using the Excel® Add-in StatistiXL package. For the correlation analysis, a linear regression was performed on excel and the significance of the observed value of R was calculated with VassarStats website (<http://www.vassarstats.net/>). The threshold for significance was fixed at 0.05.

Results

We first assessed the mir34a expression in control and pathological placentas. MiRNA quantification is not easy due to their small size, so we decided to estimate mir34a expression by the quantification of the spliced primary miRNA (pri-mir34a), as it was previously done (Raver-Shapira et al. 2007). The complete set of data was analysed by ANOVA, but it didn't reach significant values. However, if we focus on preeclamptic placentas, we could show an increased level of pri-mir34a (3 fold) compared to control placentas (**Figure 1**, $p=1.9 \times 10^{-2}$ by Student test).

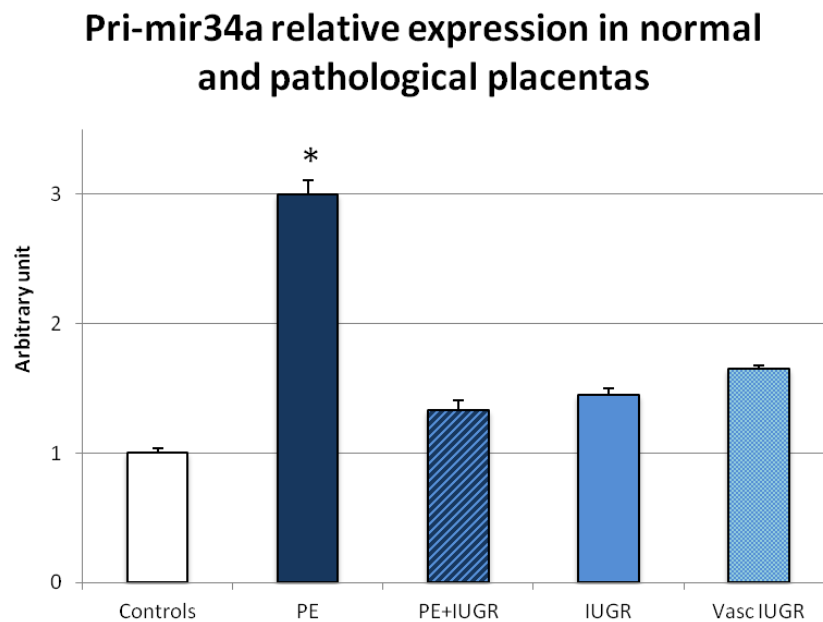


Figure 1: Pri-mir34a mRNAs is significantly increased in PE and IUGR placentas

Expression was assessed by qRT-PCR in 10 Term control placentas (Controls), 10 preeclamptic placentas (PE), 5 preeclamptic placentas associated with IUGR (PE+IUGR), 7 IUGR placentas (IUGR) and 6 vascular IUGR (vasc IUGR). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA. The expression level obtained for the control placentas was arbitrary set to one. * for $p < 0.05$.

We then investigate if there was a difference in the pri-mir34a expression in early placentas (from first trimester of pregnancy) and showed an important elevation (20 fold) of pri-mir34a RNA in these early placentas (**Figure 2**, $p=1.3 \times 10^{-7}$ by Student test).

Pri-mir34a relative expression in placentas from first and third trimester of pregnancy

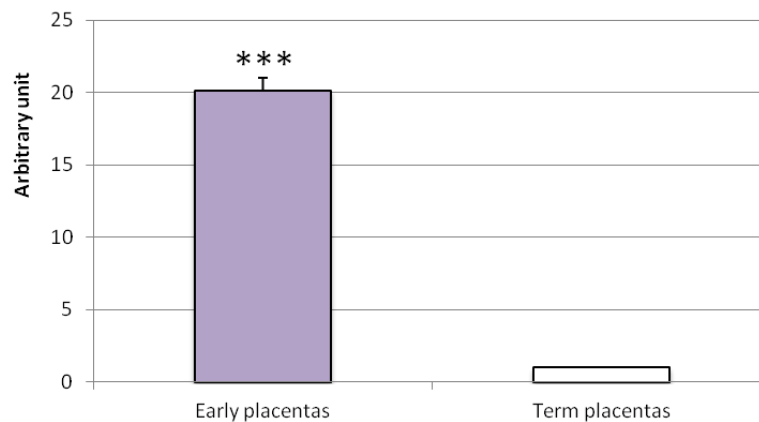
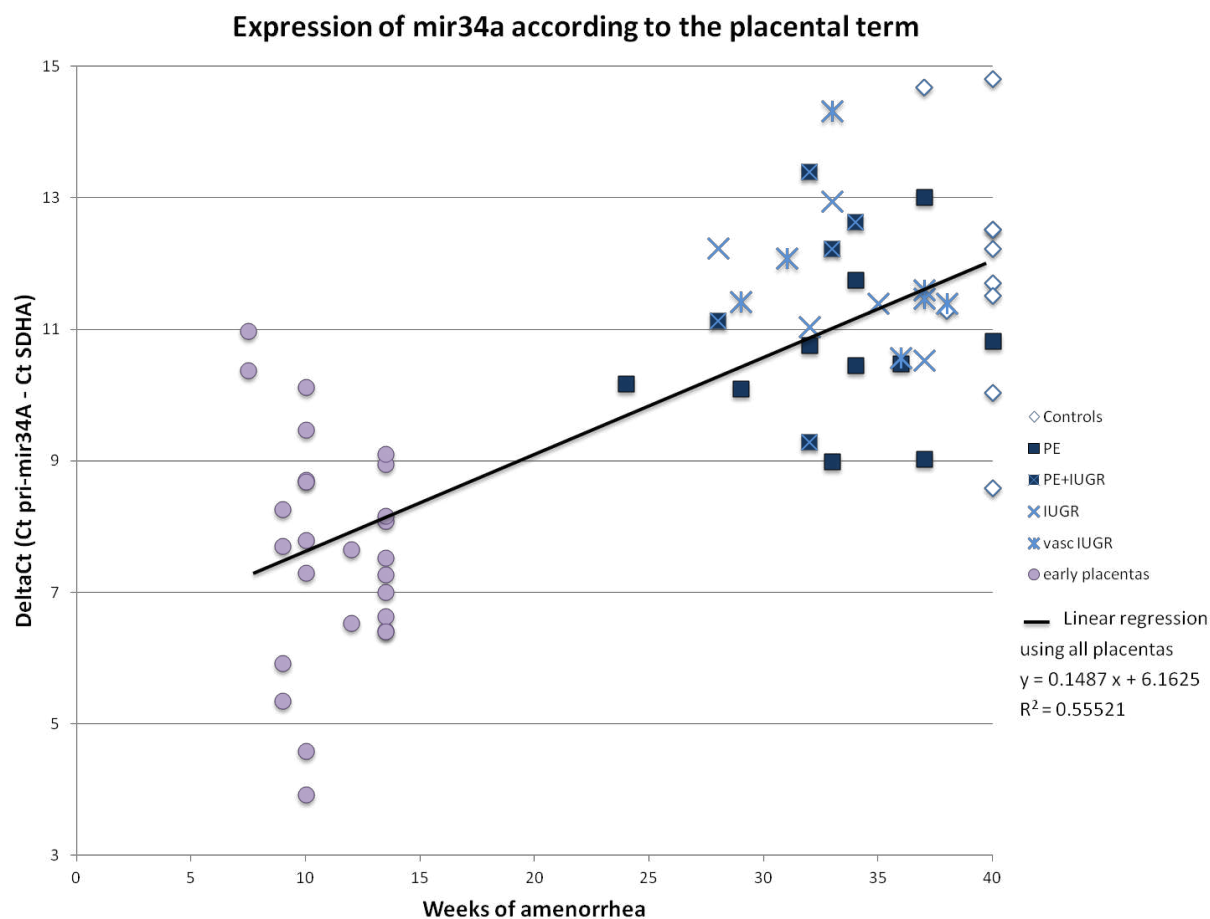


Figure 2: Pri-mir34a mRNAs level is significantly greater in first trimester placentas than in term placentas

Expression was assessed by qRT-PCR in 10 Term control placentas (Term placentas) and 26 placentas from first trimester of pregnancy (Early placentas). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA. The expression level obtained for the control term placentas was arbitrary set to one. *** for $p < 0.001$.

We then wondered if the increase observed in preeclamptic placentas was due to the placental term rather than the pathological state. Indeed, the preeclamptic placentas are younger than the control placentas (33 weeks and 4 days \pm 5 days of amenorrhea against 39 weeks and 3 days \pm 1 day, $p = 8,6 \times 10^{-4}$ by Student test). To assess if mir34a expression diminishes according to placental term, we performed correlation analyses (**Figure 3**). The only significant correlation was found when all the placentas (from first and third trimester of pregnancy, with or without preeclamptic placentas exclusion) were taken into account ($R = 0,75$ for 63 samples, or 53 without preeclamptic placentas, $p < 0.0001$ in both cases). If we consider these correlation, the preeclamptic placentas must have less than twice mir34a RNA ($\times 1,85$), so it is probably the combined effect of the pathology and the youth that explained the elevated mir34a level observed in preeclamptic placentas.



Expression was assessed by qRT-PCR in 10 term control placentas (Controls), 10 preeclamptic placentas (PE), 5 preeclamptic placentas associated with IUGR (PE+IUGR), 7 IUGR placentas (IUGR), 6 vascular IUGR (vasc IUGR) and 26 placentas from first trimester of pregnancy (early placentas). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA, and the obtained deltaCt were spotted according to the weeks of amenorrhea.

In order to better understand how the pri-mir34a is increased in pathophysiological placentas, we assessed the hypothesis of a regulation by hypoxia, as it is known that pathological placentas display a higher level of Hypoxia Inducible Factor (HIF) (Caniggia, Mostachfi, et al. 2000). To do so, we put choriocarcinoma JEG-3 cell in hypoxia (2% O₂) and kinetically evaluate pri-mir34a expression (**Figure 4**). These revealed a strong induction of pri-mir34a expression after 24 and 36 hours of hypoxia (23 fold, $p=2.2 \times 10^{-2}$ and 6 fold, $p=2.4 \times 10^{-2}$ by Student test comparing normoxia and hypoxia deltaCt values, for 24h and 36h of hypoxia respectively).

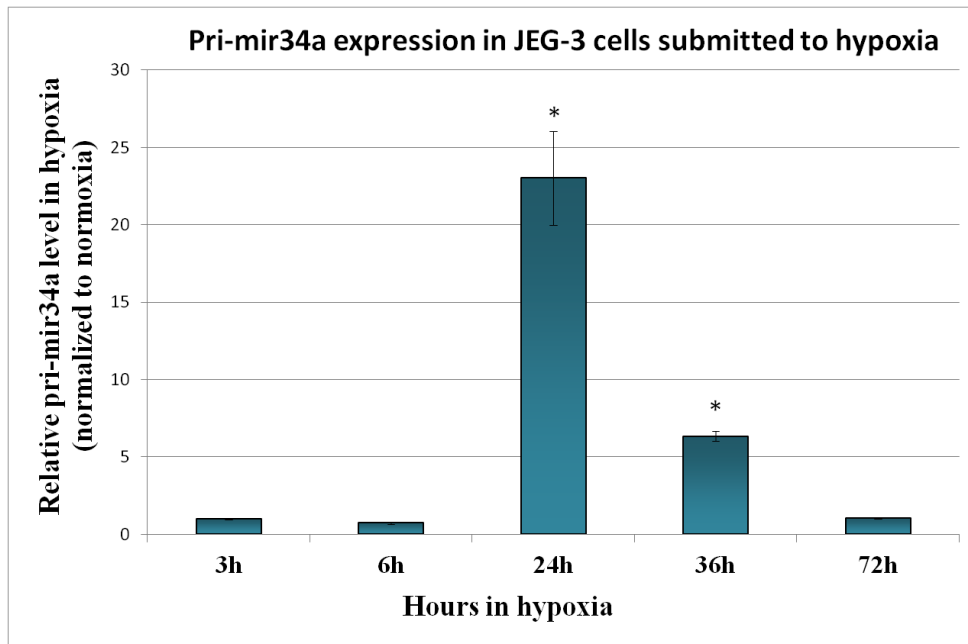


Figure 4: Hypoxia induces the expression of pri-mir34a

Expression was assessed by qRT-PCR in cells submitted to 3, 24, 36 or 48h of hypoxia (2% O₂) or under classical normoxic culture condition (20% O₂). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA. The graphical representation shows the relative expression in hypoxia compared to normoxia. $p=2.2 \times 10^{-4}$ by two-factor ANOVA. * for $p < 0.05$.

As mir34a is regulated by P53 (Hermeking 2010), we looked at the expression of this factor in control and pathological placentas (**Figure 5**). We showed a systematic decrease of P53 mRNA level in all the pathological placentas studied. In preeclamptic placentas, a 3.2- to 3.7-fold decrease is observed ($p=5.5 \times 10^{-6}$ and $p=2.2 \times 10^{-3}$ for PE and PE+IUGR placentas, respectively). In IUGR placentas, it is a 2.2- to 2.7-fold decrease, which is observed ($p=1.3 \times 10^{-3}$ and $p=4.1 \times 10^{-3}$ for IUGR and vascular IUGR placentas, respectively).

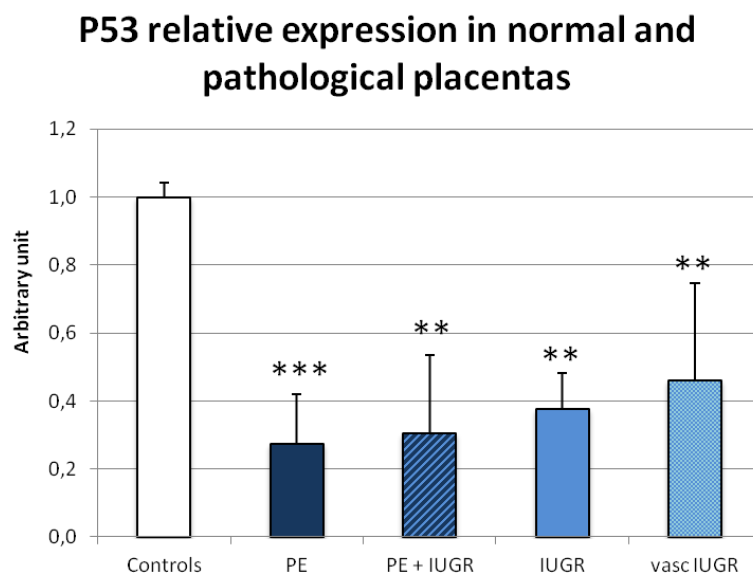


Figure 5: P53 mRNAs is significantly decreased in all the pathological placentas

Expression was assessed by qRT-PCR in 11 control placentas (Controls), 13 preeclamptic placentas (PE), 4 preeclamptic placentas associated with IUGR (PER), 7 IUGR placentas (IUGR) and 7 vascular IUGR (vasc IUGR). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA. The expression level obtained for the control placentas was arbitrary set to one. $p=1.3 \times 10^{-5}$ by ANOVA. ** for $p < 0.01$, *** for $p < 0.001$.

So, P53 cannot explain the pri-mir34a increase in preeclamptic placentas. Other mechanism could explain mir34a regulation, such as promoter methylation. Indeed, the mir34a promoter contains a CpG island, so this gene could be regulated by methylation. We assessed the promoter methylation by a methylation sensitive enzymatic digestion (by McrBC) followed by quantitative PCR in normal and pathological placentas. The complete set of data was analysed by ANOVA, but it didn't reach significant values. However, this experiment displayed a hypomethylation of the promoter in all preeclamptic placentas, associated or not with IUGR, compared to control placentas (**Figure 6**, $p=4.6 \times 10^{-2}$ and $p=6.6 \times 10^{-3}$ by Student test respectively for PE and PE+IUGR group compared to Control group).

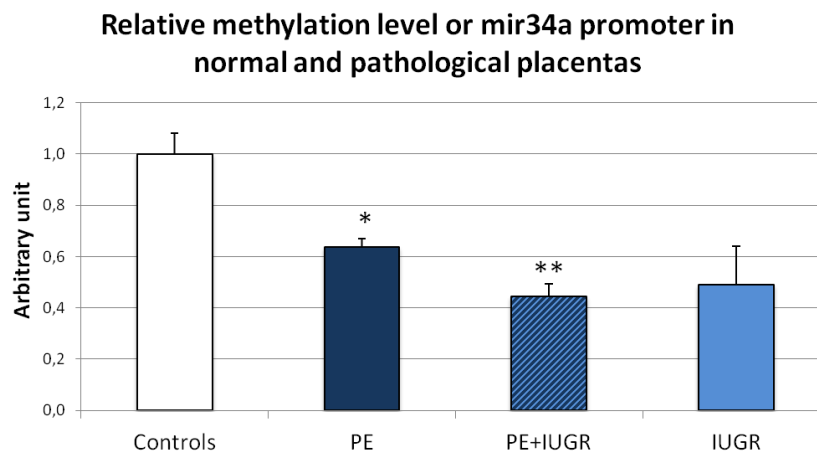


Figure 6: Mir34a promoter methylation is significantly decreased in PE placentas

Methylation was assessed by McrBC digestion followed by quantitative PCR in 5 term control placentas (Controls), 5 preeclamptic placentas (PE), 5 preeclamptic placentas associated with IUGR (PE+IUGR) and 5 IUGR placentas (IUGR). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for non-digested DNA. The methylation level obtained for the control placentas was arbitrary set to one. * for $p < 0.05$ and ** for $p < 0.01$.

We also checked if hypoxia could influence the mir34a promoter methylation (**Figure7**), and we showed that 72 hours of hypoxia induced a hypermethylation of the promoter in choriocarcinoma cells ($p=2.4 \times 10^{-2}$ by Post hoc Student test compared to 72 hours in normoxic conditions).

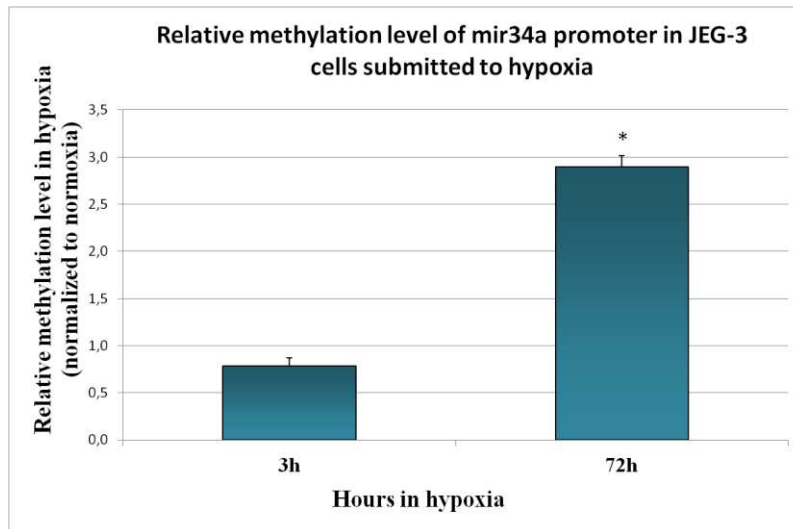


Figure 7: Mir34a promoter methylation is significantly increased in cells submitted to 72 hours of hypoxia

McrBC digestion followed by quantitative PCR in cells submitted to 3 and 72 hours of normoxia or hypoxia was performed to assess methylation status. The Ct values of each sample were normalized by those obtained for non-digested DNA. The graphical representation shows the relative methylation status in hypoxia compared to normoxia. * for $p < 0.05$.

Finally, we performed overexpression of mir34a in JEG-3 cells to know if it could regulate SERPINA3. As a positive control, we assessed BCL2 expression in these cells, as it is a known target of mir34a. We found BCL2 mRNA level decreased 3-fold ($p = 1.6 \times 10^{-2}$ by Student test compared to cells transfected with an empty vector), this way confirming the efficiency of the experiments. In the same condition, we showed a 2.2-fold decrease of SERPINA3 mRNA in cells transfected with mir34a ($p = 1.0 \times 10^{-2}$ by Student test compared to cells transfected with an empty vector). Therefore, we confirmed the ability of mir34a to down regulate SERPINA3 expression.

Mir34a transfection in JEG-3 cells

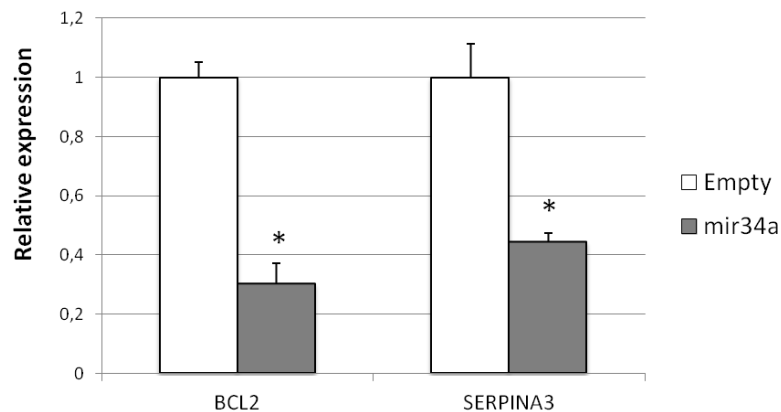


Figure 8: Decreased BCL2 and SERPINA3 expression in cells transfected by a plasmid encoding mir34a

Expression was assessed by qRT-PCR in cells transfected by an empty vector (Empty) or a plasmid encoding mir34a (mir34a). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA. The expression level obtained for the control cells (empty vector) was arbitrary set to one. * for $p < 0.05$.

However, the effect of mir34a on SERPINA3 expression could be direct or indirect. To have a better idea, we searched if SERPINA3 was predicted to be a mir34a target by predicting algorithms (such as TargetScan and miRanda). It is not the case. We then manually explored SERPINA3 3'UTR for sequence complementarity to the seed region of mir34a. The seed region is located in position 2 to 7 in the mature RNA, and it seems necessary to have an almost perfect match to this part to have an inhibitory effect. In SERPINA3 3'UTR, we found only a very imperfect match. To determine if this may be enough to induce silencing, we cloned the complete 3'UTR of SERPINA3 downstream of the luciferase gene and realize transfection of JEG-3 cells with the concomitant transfection of mir34a plasmid or an empty vector (**Figure 9**). We didn't show any difference in the luciferase activity following mir34a transfection, so mir34a didn't target the 3'UTR of SERPINA3.

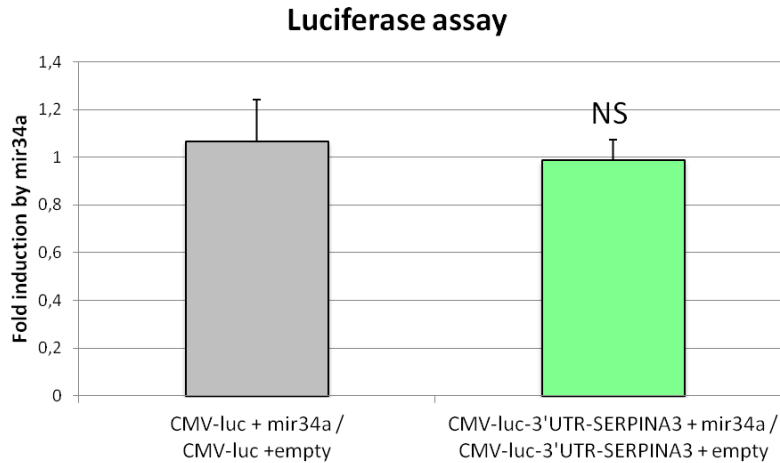


Figure 9: Mir34a don't regulate the SERPINA3 by targeting its 3'UTR

Luciferase activity was measured in JEG-3 cells transfected with two different firefly luciferase vectors (CMV-luc to measure the basal level, and CMV-luc-3'UTR-SERPINA3, which contains the 3'UTR sequence of SERPINA3 downstream of the luciferase gene) and with an empty vector or a plasmid encoding mir34a. The values of each sample were normalized by those obtained for Renilla luciferase. The graphical representation shows the fold induction following mir34a expression. NS for Non Significant.

Discussion

In this study, we showed that pri-mir34a is overexpressed in preeclamptic placentas and that its placenta expression is much higher during first trimester of pregnancy than at term. Concerning mir34a regulation, we showed that P53, a known activator of mir34a, is reduced in all pathological placentas and that hypoxia can induce pri-mir34a expression in JEG-3 cells. We also studied the methylation status of mir34a promoter (around the P53 binding sites) and revealed a hypomethylation in all preeclamptic placentas (associated or not with IUGR), whereas hypoxia induced a hypermethylation in JEG-3 cells. Finally, we assessed SERPINA3 regulation by mir34a in JEG-3 cells and demonstrated a down regulation of its expression following mir34a overexpression, this regulation being independent of 3'UTR SERPINA3 binding.

The placental defect leading to preeclampsia is occurring in the first trimester of pregnancy, when mir34a is the most expressed so it could have a role in the early stages of preeclampsia. So we proposed a model (**Figure 10**): at the end of the pregnancy, in physiological cases, there is more P53, but mir34a promoter is more methylated and therefore could have a weak responsiveness; in preeclampsia, on the opposite, there is a smaller amount of P53 but a hypomethylated promoter which can have a better responsiveness to P53 and in sum induce a higher mir34a expression. At the beginning of pregnancy, the higher expression of mir34a could be partly due to HIF1, which is abundant due to the physiological hypoxia, and probably even more abundant in preeclampsia

(Caniggia, Winter, et al. 2000). Indeed, HIF binding site (RCGTG) can be found in mir34a promoter, and we show in JEG-3 cells a high induction of pri-mir34a in hypoxia. However, this activation by hypoxia is certainly mediated by a cofactor present in trophoblast cells as mir34a has been previously found to be decreased by hypoxia in another cell type (renal tubular epithelial cell) (Du et al. 2012). Furthermore, mir34a induction by hypoxia in the cell did not last more than 36 hours, probably due to the progressive promoter methylation. So at the beginning of pregnancy, a higher mir34a expression by a promoter hypomethylation, as what is observed at the end of pregnancy, could participate to induce preeclampsia.

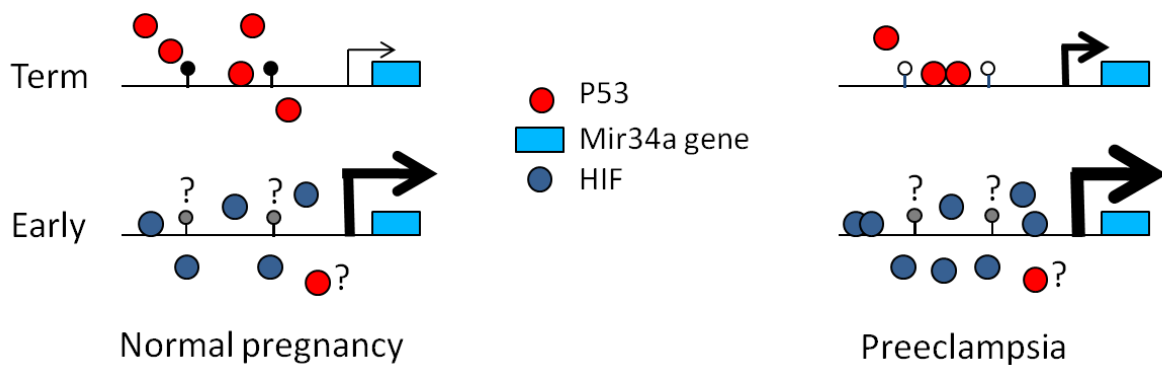


Figure 10: Mir34a regulation along pregnancy if physiological and pathological cases.

In this model, we proposed that mir34a regulation is mediated by the combined effect of methylation status and transcription factor. At the end of pregnancy, P53 could bind the hypomethylated promoter of pathological placentas and induced a higher expression. At the beginning of pregnancy, HIF1 could induce a high expression of mir34a in physiological cases and a higher one in pathological cases.

Concerning the impact of mir34a overexpression in pathological cases, we propose that it could play a role via SERPINA3 downregulation. Indeed, we already proposed a role of this protein in placental diseases (Chelbi et al. 2007; Chelbi et al. 2012). However, how mir34a regulates SERPINA3 remains elusive. It is probably indirectly, by downregulate an activator of SERPINA3 expression. Nevertheless, it could be through another part of SERPINA3 mRNA, as it is now demonstrated that miRNA can act on coding regions (Forman, Legesse-Miller, and Coller 2008).

In conclusion, we bring some new evidences about an involvement of mir34a in the pathophysiology of placental disease, thus reinforcing previous studies showing that mir34a regulate the invasive capacity of trophoblast cells (R. T. K. Pang et al. 2010, -34; R. T. Pang et al. 2013). All these data are coherent with an involvement of mir34a in preeclampsia development.

References

- Auer, Jana, Luc Camoin, François Guillonéau, Virginie Rigourd, Sonia T Chelbi, Marjorie Leduc, Jérôme Laparre, Thérèse-Marie Mignot, and Daniel Vaiman. 2010. "Serum Profile in Preeclampsia and Intra-uterine Growth Restriction Revealed by iTRAQ Technology." *Journal of Proteomics* 73 (5) (March 10): 1004–1017.
- Borghese, Bruno, Sandrine Barbaux, Françoise Mondon, Pietro Santulli, Guillaume Pierre, Giovanna Vinci, Charles Chapron, and Daniel Vaiman. 2010. "Research Resource: Genome-wide Profiling of Methylated Promoters in Endometriosis Reveals a Subtelomeric Location of Hypermethylation." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 24 (9) (September): 1872–1885.
- Caniggia, I, H Mostachfi, J Winter, M Gassmann, S J Lye, M Kuliszewski, and M Post. 2000. "Hypoxia-inducible Factor-1 Mediates the Biological Effects of Oxygen on Human Trophoblast Differentiation Through TGFbeta(3)." *The Journal of Clinical Investigation* 105 (5) (March): 577–587.
- Caniggia, I, J Winter, S J Lye, and M Post. 2000. "Oxygen and Placental Development During the First Trimester: Implications for the Pathophysiology of Pre-eclampsia." *Placenta* 21 Suppl A (April): S25–30.
- Chang, Tsung-Cheng, Erik A Wentzel, Oliver A Kent, Kalyani Ramachandran, Michael Mullendore, Kwang Hyuck Lee, Georg Feldmann, et al. 2007. "Transactivation of miR-34a by P53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis." *Molecular Cell* 26 (5) (June 8): 745–752.
- Chelbi, Sonia T, Ludivine Doridot, Françoise Mondon, Chloé Dussour, Régis Rebourcet, Florence Busato, Géraldine Gascoin-Lachambre, et al. 2011. "Combination of Promoter Hypomethylation and PDX1 Overexpression Leads to TBX15 Decrease in Vascular IUGR Placentas." *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society* 6 (2) (February): 247–255.
- Chelbi, Sonia T, Françoise Mondon, Hélène Jammes, Christophe Buffat, Thérèse-Marie Mignot, Jorg Tost, Florence Busato, et al. 2007. "Expressional and Epigenetic Alterations of Placental Serine Protease Inhibitors: SERPINA3 Is a Potential Marker of Preeclampsia." *Hypertension* 49 (1) (January): 76–83.
- Chelbi, Sonia T, Melissa L Wilson, Anne-Clémence Veillard, Sue A Ingles, Jim Zhang, Françoise Mondon, Géraldine Gascoin-Lachambre, et al. 2012. "Genetic and Epigenetic Mechanisms Collaborate to Control SERPINA3 Expression and Its Association with Placental Diseases." *Human Molecular Genetics* 21 (9) (May 1): 1968–1978.
- Davis, Brandi N, and Akiko Hata. 2009. "Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of Mechanisms." *Cell Communication and Signaling: CCS* 7: 18.
- Du, Rui, Wenjuan Sun, Lin Xia, Ali Zhao, Yan Yu, Lijuan Zhao, Hanmin Wang, Chen Huang, and Shiren Sun. 2012. "Hypoxia-induced Down-regulation of microRNA-34a Promotes EMT by Targeting the Notch Signaling Pathway in Tubular Epithelial Cells." *PloS One* 7 (2): e30771.
- Forman, Joshua J, Aster Legesse-Miller, and Hilary A Collier. 2008. "A Search for Conserved Sequences in Coding Regions Reveals That the Let-7 microRNA Targets Dicer Within Its Coding Sequence." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (39) (September 30): 14879–14884.
- Hermeking, H. 2010. "The miR-34 Family in Cancer and Apoptosis." *Cell Death and Differentiation* 17 (2) (February): 193–199.
- Holemon, H, Y Korshunova, J M Ordway, J A Bedell, R W Citek, N Lakey, J Leon, M Finney, J D McPherson, and J A Jeddloh. 2007. "MethylScreen: DNA Methylation Density Monitoring Using Quantitative PCR." *BioTechniques* 43 (5) (November): 683–693.
- Hornstein, Eran, Jennifer H Mansfield, Soraya Yekta, Jimmy Kuang-Hsien Hu, Brian D Harfe, Michael T McManus, Scott Baskerville, David P Bartel, and Clifford J Tabin. 2005. "The microRNA miR-196 Acts Upstream of Hoxb8 and Shh in Limb Development." *Nature* 438 (7068) (December 1): 671–674.
- Ordway, J M, J A Bedell, R W Citek, A Nunberg, A Garrido, R Kendall, J R Stevens, et al.

2006. “Comprehensive DNA Methylation Profiling in a Human Cancer Genome Identifies Novel Epigenetic Targets.” *Carcinogenesis* 27 (12) (December): 2409–2423.

Pang, Ronald T K, Carmen O N Leung, Tian-Min Ye, Weimin Liu, Philip C N Chiu, Kevin K W Lam, Kai-Fai Lee, and William S B Yeung. 2010. “MicroRNA-34a Suppresses Invasion Through Downregulation of Notch1 and Jagged1 in Cervical Carcinoma and Choriocarcinoma Cells.” *Carcinogenesis* 31 (6) (June): 1037–1044.

Pang, Ronald Tk, Carmen On Leung, Cheuk-Lun Lee, Kevin Kw Lam, Tian-Min Ye, Philip Cn Chiu, and William Sb Yeung. 2013. “MicroRNA-34a Is a Tumor Suppressor in Choriocarcinoma via Regulation of Delta-like1.” *BMC Cancer* 13: 25.

Rao, Dinesh S, Ryan M O’Connell, Aadel A Chaudhuri, Yvette Garcia-Flores, Theresa L Geiger, and David Baltimore. 2010. “MicroRNA-34a Perturbs B Lymphocyte Development by Repressing the Forkhead Box Transcription Factor Foxp1.” *Immunity* 33 (1) (July 23): 48–59.

Raver-Shapira, Nina, Efi Marciano, Eti Meiri, Yael Spector, Nitzan Rosenfeld, Neta Moskovits, Zvi Bentwich, and Moshe Oren. 2007. “Transcriptional Activation of miR-34a Contributes to P53-mediated Apoptosis.” *Molecular Cell* 26 (5) (June 8): 731–743.

Redman, Christopher W, and Ian L Sargent. 2005. “Latest Advances in Understanding Preeclampsia.” *Science (New York, N.Y.)* 308 (5728) (June 10): 1592–1594.

Van Rooij, Eva, and Eric N Olson. 2007. “MicroRNAs: Powerful New Regulators of Heart Disease and Provocative Therapeutic Targets.” *The Journal of Clinical Investigation* 117 (9) (September): 2369–2376.

Schmittgen, Thomas D. 2008. “Regulation of microRNA Processing in Development, Differentiation and Cancer.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (5B) (October): 1811–1819.

Sibai, Baha, Gus Dekker, and Michael Kupferminc. 2005. “Pre-eclampsia.” *Lancet* 365 (9461) (March 26): 785–799.

ANNEXE 4

LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION A DOIGT DE ZINC SONT DEREGULES DANS LES PATHOLOGIES PLACENTAIRES

(en préparation)

Résumé

Le développement du placenta humain repose sur la différenciation des cellules souches trophoblastiques en trophoblastes invasifs, en trophoblastes villosités et en syncytiotrophoblaste. Un dysfonctionnement dans ces processus de différenciation peut conduire à des maladies placentaires, telles que la prééclampsie (PE) et le retard de croissance intra-utérin (RCIU).

De nombreuses protéines à doigts de zinc (ZFP) ont été impliqués dans la régulation de la différenciation et de la détermination du destin cellulaire.

Ici, nous avons sélectionné 16 gènes codant des protéines à doigts de zinc en fonction de leurs dérégulations dans des modèles cellulaires de maladies placentaires. Pour 9 d'entre eux, nous avons pu montrer une diminution de leur expression, que ce soit dans tous les cas de RCIU (ZNF334 et ZNF559) ou, plus précisément dans les RCIU avec une composante vasculaire (ZNF35, 654, 354C et ZIM2). ZNF91, 292 et 295 sont diminués dans les cas de pré-éclampsie, en plus des cas de RCIU. Lorsque les deux maladies sont combinées, seul ZNF395 a été trouvé dérégulé (augmenté). Six de ces gènes sont également régulés par l'hypoxie dans les cellules de choriocarcinome JEG-3.

L'altération de l'expression de ces facteurs de transcription dans les placentas pathologiques et leur régulation par l'hypoxie ouvrent la voie à de nouvelles hypothèses quant à leur rôle dans la physiopathologie des maladies placentaires.

Zinc Finger Transcription Factors are deregulated in placental diseases

Doridot et al.

Abstract

Human placental development rests on the differentiation of trophoblast stem cells into invasive trophoblast, villous trophoblasts and syncytiotrophoblast. Dysfunction in the differentiation process may lead to placental diseases, such as preeclampsia (PE) and intrauterine growth restriction (IUGR).

Numerous zinc finger proteins (ZFPs) have been implicated in regulating differentiation and cell fate determination.

Here we selected 16 zinc finger protein genes according to their deregulations in cell models of placental diseases. Expression levels were decreased for 9 genes, either in all cases of IUGR (ZNF334 and ZNF559), or specifically in IUGRs with a vascular component (ZNF35, 654, 354C and ZIM2). ZNF91, 292 and 295 were decreased in preeclampsia and IUGR. When the two diseases were combined, only ZNF395 was deregulated (increased). Six of these genes were induced by hypoxia in the JEG-3 choriocarcinoma cell models.

The expression alteration of these transcription factors open therefore new gates for understanding the pathophysiology of placental diseases.

Introduction

Preeclampsia (PE) and intrauterine growth restriction (IUGR) are two common obstetrical complications, which represent major causes of materno-fetal morbidity and mortality. PE complicates 2-5% of all pregnancies, and is associated with IUGR in roughly 30% of cases (Sibai et al., 2005). IUGR is defined by a falling off in the fetal growth curve, but practically, infants being below the tenth percentile for their gestational age are generally considered growth restricted, so IUGR arises by definition in 10 % of pregnancies. PE is a maternal multi-systemic disorder characterized by pregnancy-induced hypertension, proteinuria and endothelial dysfunction. It can lead to life-threatening clinical conditions, such as hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) syndrome or eclampsia (seizures) (Jebbink et al., 2012). Both diseases often share a common etiology with notably a defective placental perfusion, subsequent to shallow invasion of uterine spiral arteries by invasive extravillous cytotrophoblasts. This substandard invasion results in a deficient maternal arterial remodelling at the feto-maternal interface, consecutively leading to intermittent vascular flow, hypoxia-reoxygenation injuries, localized ischemic lesions and oxidative stress. The most classical hypothesis for explaining the preeclamptic syndrome is that the release of placental factors, such as

secreted molecules and microparticles, into the maternal blood flow triggers maternal systemic inflammation, endothelial lesions and subsequent symptoms (Maynard and Karumanchi, 2011).

Recently, several high throughput analysis of different models for PE and IUGR have been performed (Buffat et al., 2007; Rigourd et al., 2008). The analysis based on STOX1 overexpression in JEG-3 cells, a choriocarcinoma cell line considered as a model for trophoblasts cells, showed that the transcriptomic alterations induced by STOX1 are reminiscent of those observed in preeclamptic placentas (Rigourd et al., 2008). Recently, it has been shown that mice carrying fetuses overexpressing STOX1 are prone to severe preeclampsia (Doridot et al., 2013). To note, in JEG-3 cells overexpressing STOX1, functional clustering identified a strong enrichment in transcription factors among the modified genes especially in members of the zinc finger protein family, with induction ratios reaching more than 5 fold at the transcription level (Rigourd et al., 2009).

The zinc finger proteins are a large family of proteins originally described as DNA binding proteins. Indeed, in the human genome, around 1000 genes encode proteins containing zinc fingers. These proteins are characterized by short protein motifs composed of two or three β -layers and one α -helix. Besides DNA binding, zinc fingers can also provide protein–protein and RNA–protein interactions. Many proteins containing zinc fingers are *trans* regulators of gene expression that play an important role in cellular processes such as development, differentiation, and suppression of malignant cell transformation (oncosuppression) (Razin et al., 2012). However, the precise function of most zinc finger proteins is not characterized.

Several zinc finger proteins have already been described or proposed to play a role in placental development. For example, the GATA factors are essential for trophectoderm maintenance at the blastocyst stage, and are probably important for placental morphogenesis (Bai et al., 2013). Sp1 and Sp3 transcription factors are also essential for placental development as their reduced quantity in compound heterozygous knock out mice displayed a reduced spongiotrophoblast layer and a severe disorganization of labyrinth (Krüger et al., 2007). Zfp36L1 and Zfp568 were also showed as important for chorioallantoic attachment and extraembryonic mesoderm migration, respectively (Shibata and García-García, 2011; Stumpo et al., 2004). More recently, a new imprinted gene of the zinc finger family, ZFAT, was described in human placentas and its expression was showed as decreased in pathological placentas (Barboux et al., 2012), suggesting a role in placental development, for which several imprinted genes are already described as crucial. Therefore zing finger protein could participate in pathophysiological pathways involved in placental diseases.

Here we revealed expression variation of selected genes from the zing finger protein family in pathological placentas. Most of them were also regulated by hypoxia. Since hypoxia-hyperoxia is an important signal in placental development and function, this suggests that these genes could play a part

in placental diseases.

Methods

Human Material Samples and Ethics

Placentas from normal and pathological pregnancies (PE and IUGR) were collected after caesarean delivery from 3 maternities (St Antoine, Port-Royal, and Institut de Puériculture, Paris, France). The Cochin Hospital ethical committee approved this study and patients gave their informed consent. We had access to complete clinical data for each individual.

The inclusion criteria used for PE patients were the following clinical thresholds: systolic pressure >140 mm Hg, diastolic pressure >90 mm Hg, and proteinuria >0.3 g per 24 hours. The inclusion criteria used for IUGR was weight at birth <10th percentile, and it was characterized as vascular if at least a notch was observed during uterine Doppler at the second or/and the third trimester assessment.

We classified the patients in 3 groups: isolated PE (PE), PE associated with IUGR (PE+IUGR), isolated IUGR (IUGR) and vascular IUGR (vascIUGR). Women who underwent caesarean surgery without suffering any disease during pregnancy formed the control group (C).

Fragments (10 to 20 mm) from the placental subchorial zone were dissected as described previously (Mondon et al. 2005, Vaiman et al. 2005). Maternal membranes were eliminated, and floating villi were washed in Hanks' balanced salt solution (HBSS). A fraction of these samples was kept in TRIzol (5 mL/g, Invitrogen), and total RNA was extracted, treated with RNase-free DNase, and quantified by spectrophotometry.

Primers and Quantitative RT-PCR Conditions

Reverse transcription was carried out according to a standardized protocol (Mondon et al. 2005). Briefly, 2 µg of total DNase-treated RNA was reverse transcribed in a volume of 25 µL at 39°C using the Superscript reverse transcriptase (Invitrogen) during 1 hour.

Quantitative RT-PCR was carried out in duplicates on 16 control, 12 PE, 7 PE+IUGR, 9 IUGR and 7 vascular IUGR placentas (Table 2). The quantitative PCR was performed with the LightCycler® 480 SYBR Green I Master containing FastStart Taq DNA Polymerase, 1 mM of each primer and 2 µL of cDNA (10 times diluted after the reverse transcription). The reaction was performed in a LightCycler 480 Instrument II, a plate-based thermal block cycler (Roche). Primers (Supplementary Table 1) were designed for the coding sequences of the different Zinc finger protein using the PRIMER3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>). The different couples were chosen from two adjacent exons, to recover all of the previously described isoforms and aligned with basic local alignment search tool software (BLAST) to avoid nonspecific annealing. Their efficiency was assessed and validated as 2. We used the PCR program: 95°C for 5 min followed by 45 cycles of 3 temperature steps (95°C for 10 s, 58°C for 15 s, and 72°C for 15 s). Finally, samples were submitted to a progressive temperature elevation (from 65 to 99°C at 0.1°C/s), resulting in a fusion curve, enabling to check the PCR products homogeneity. In addition, amplification products were systematically controlled by agarose gel electrophoresis. The threshold cycle number (Ct) values were collected with the LightCycler software (Roche) in the exponential phase of the PCR reaction. These Cts were normalized by the Ct values obtained for the succinate dehydrogenase subunit A (SDHA) used as a normalizing gene and shown previously to be stable and highly expressed in the placenta.

Cell culture and hypoxia.

The JEG-3 cell line is a conventionally used model of trophoblast cells (Kohler et al. 1971). JEG-3 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium Glutamax (Life Technologies) supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum (Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin, at 37°C in the presence of 5% CO₂.

To analyze the effect of hypoxia on gene expression, cells were seeded in 60 mm diameter glass dishes, placed in a Lwoff chamber at 37°C and exposed to an oxygen-depleted atmosphere (2% O₂, 5% CO₂) or maintained as control at 37°C in humidified normal atmosphere (21% O₂ – 5% CO₂). Cells were then harvested for RNA extraction using TRIzol Reagent (Invitrogen) at 3, 6, 12, 24, 36 and 48 h. The kinetics was done twice independently (except for 12h of hypoxia, conditions for which one of the experiments was lost due to RNA degradation).

Statistical analysis

Statistics were systematically performed with the delta Ct values and using the StatistiXL add-in, and by full factorial analysis of variance, followed by post hoc Student test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

We selected 16 genes of the zing finger family according to their variation found in the transcriptomic analyses previously performed in the laboratory (Table 1). These analyses consisted in the comparison of native JEG-3 choriocarcinoma cells with different modified counterparts. The modified cells are of 4 types: 1) by the overexpression of STOX1 transcription factor, proposed to play a essential role in PE (Doridot et al., 2013; Rigourd et al., 2008, 2009); 2) by the overexpression of PDX1 transcription factor, as this transcription factor was proposed to play a role in IUGR (Buffat et al., 2007); 3) submitted to culture conditions with protein depletion, in order to mimic IUGR as it was conclusively done in a rat model (Buffat et al., 2007) and 4) submitted to culture conditions with protein depletion in the context of PDX1 overexpression.

PDX1 has been previously shown to be overexpressed in vIUGR placentas (Buffat et al., 2007), and is known to have a major role in the glucose-dependent regulation of the insulin gene expression (Johnson et al., 2006). The cellular model with PDX1 overexpression with protein depletion suggests that PDX1 counterbalance the harmful effect of protein depletion (unpublished data).

Gene	Transcriptomic data	Localisation (according to ProteinAtlas)
ZIM2	5,1 fold increase by STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells *	Nucleus
ZMYM4	2,8 fold increase by protein depletion in PDX1 overexpressing choriocarcinoma cells # 2,5 fold decrease by PDX1 overexpression in choriocarcinoma cells *	External layer of syncytiotrophoblast (membrane and cytoplasm)
ZSCAN18	6,1 fold increase by STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells *	Syncytiotrophoblast, endothelial cells (nucleus)
ZNF35	2,5 fold increase by PDX1 overexpression in choriocarcinoma cells *	Weak expression in trophoblast cells (cytoplasm)
ZNF334	2,1 fold increase by protein depletion in choriocarcinoma cells (with # or without PDX1 overexpression §)	Considered Negative
ZNF395	4,1 fold increase by STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells *	Considered Negative
ZNF627	3,8 fold increase by STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells *	
ZNF644	2,7 fold decrease by PDX1 overexpression in choriocarcinoma cells *	
ZNF654	7,9 fold increase by STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells *	Trophoblast cells and decidua (cytoplasm)
ZNF559	5,3 fold increase by STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells *	
ZNF91	3,8 fold increase by PDX1 overexpression in choriocarcinoma cells submitted to protein depletion \$ 2,1 fold decrease by protein depletion in choriocarcinoma cells §	
ZBTB45	2,3 fold increase by PDX1 overexpression in choriocarcinoma cells submitted to protein depletion \$	Trophoblast cells and decidua (cytoplasm)
ZNF608	5,6 fold increase by protein depletion in choriocarcinoma cells § 2,7 fold increase by protein depletion in PDX1 overexpressing choriocarcinoma cells #	Strong labelling of syncytium (cytoplasm)
ZNF354C	1,8 fold increase by protein depletion in PDX1 overexpressing choriocarcinoma cells # 1,9 fold increase by PDX1 overexpression in choriocarcinoma cells submitted to protein depletion \$	Strong labelling of syncytium, endothelial cells (cytoplasm)
ZNF292	2,4 fold decrease by PDX1 overexpression in choriocarcinoma cells *	Syncytium, endothelial cells, (cytoplasm)
ZNF295	2 fold increase by protein depletion in PDX1 overexpressing choriocarcinoma cells # 3,1 fold decrease by PDX1 overexpression in choriocarcinoma cells * 2,1 fold decrease by PDX1 overexpression in choriocarcinoma cells submitted to protein depletion \$	Strong labelling of syncytium nuclei

* compared to choriocarcinoma cells without PDX1 or STOX1 overexpression

compared to PDX1 overexpressing choriocarcinoma cells without protein depletion

§ compared to choriocarcinoma cells without protein depletion and without PDX1 overexpression

\$ compared choriocarcinoma cells with protein depletion without PDX1 overexpression

Table 1: Gene selection according to transcriptomic data

We then analysed the expression of these selected genes in normal (C for Control placentas, n=16) and different types of pathological placentas: preeclamptic placentas (PE, n=12), preeclamptic

placentas associated with IUGR (PE+IUGR, n=7), IUGR placentas (IUGR, n=9) and vascular IUGR (vascIUGR, n=7), for which the vascular anomaly was demonstrated by the observation of a notch during Doppler echography. The patient characteristics are summarized in Table 2.

	n	Mother age	Weeks of Amenorrhea	Birth weight (g)	Systolic Blood pressure (mmHg)	Diastolic Blood Pressure (mmHg)	Proteinuria (g/24h)	Notch (Uterine Doppler)
C	16	39 ± 2	39 ± 3 days	3530 ± 210	<140	<90	<0,3	0
PE	12	31 ± 2	33+5 ± 7 days *	1950 ± 170 *	151 ± 3	90 ± 2	3,5 ± 0,9	0
PER	7	35 ± 1	31 ± 10 days *	1080 ± 140 *	159 ± 12	100 ± 6	5,0 ± 2,4	2 in one case
IUGR	9	31 ± 3	34+2 ± 7 days *	1520 ± 150 *	<140	<90	<0,3	0
Vasc IUGR	7	30 ± 2	34+1 ± 8 days *	1560 ± 230 *	<140	<90	<0,3	2 in all cases #

: Notch observed at the second and at the third trimester visit

± sem

* p<0,05 by Student test (comparison with the control group)

Table 2: Patient characteristics

We were able to show a significant difference of mRNA level for 10 out of the 16 studied genes in at least one type of pathological placentas (in bold in the Table 1). For 9 of them, the variations were reductions.

We revealed a significant decrease of ZNF334 and ZNF559 mRNAs in all IUGR placentas (Figure 1, $p=5.2 \times 10^{-4}$ and $p=7.5 \times 10^{-4}$ for ZNF334 and ZNF559, respectively, for the two IUGR groups together by Post-hoc Student test). For ZNF334, there is a 63% decrease in the IUGR group ($p=1.7 \times 10^{-2}$ by Post-hoc Student test) and an 82% decrease in the vascular IUGR group ($p=1.9 \times 10^{-3}$ by Post-hoc Student test). For ZNF559, there is a 60% decrease in the IUGR group ($p=3.1 \times 10^{-2}$ by Post-hoc Student test) and an 80% decrease in the vascular IUGR group ($p=3.9 \times 10^{-4}$ by Post-hoc Student test).

To note, these two mRNA are present at relatively high levels in placentas, with ZNF559 being about twice less abundant than ZNF334.

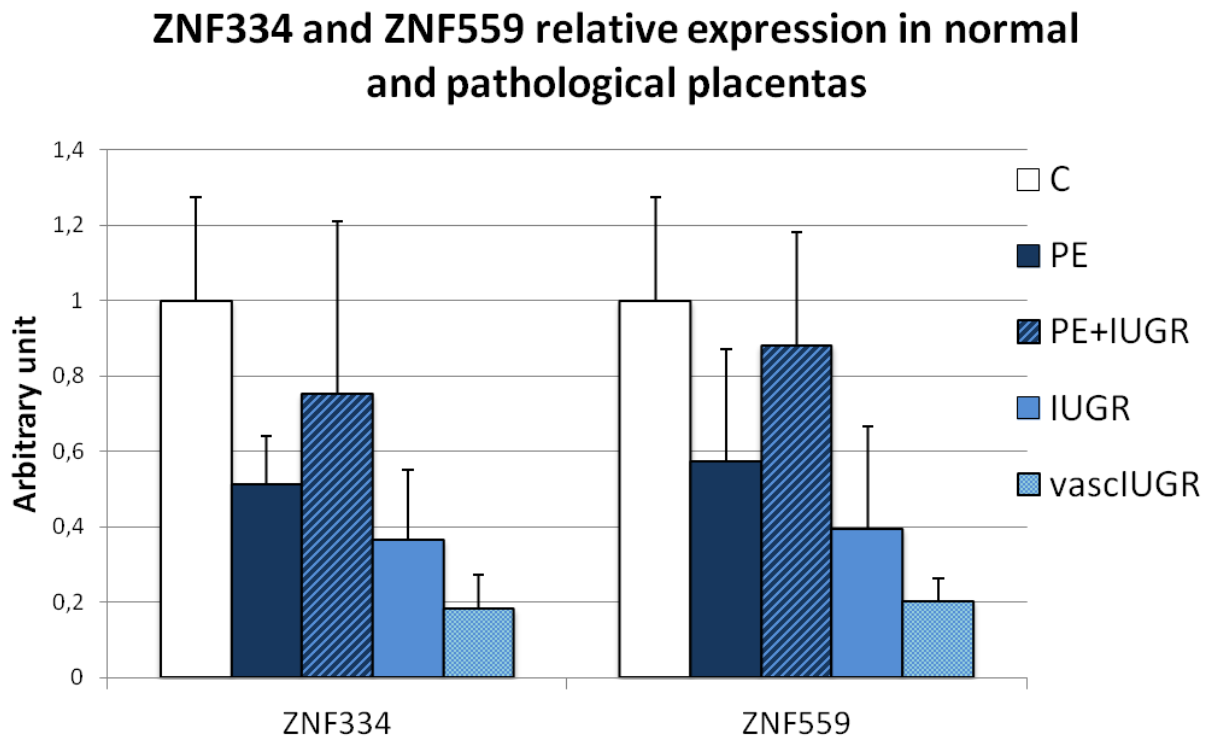


Figure 1: ZNF334 and ZNF559 mRNAs are significantly decreased in IUGR placentas

Expression was assessed by qRT-PCR in 16 Term control placentas (T), 12 preeclamptic placentas (PE), 7 preeclamptic placentas associated with IUGR (PE+IUGR), 9 IUGR placentas (IUGR) and 7 vascular IUGR (vasclIUGR). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA. The expression level obtained for the control placentas was arbitrary set to one. $p=6.19 \times 10^{-3}$ for ZNF334 and $p=1.24 \times 10^{-2}$ for ZNF559 by ANOVA.

For ZIM2, ZNF35, ZNF654 and ZNF354C, ANOVA analyses didn't reach significant values, but there is a significant decrease in the vascular IUGR placentas subgroup (Figure 2). Indeed, there is a 44% decrease for ZIM2 and ZNF35 ($p=3.56 \times 10^{-2}$ and $p=3.11 \times 10^{-2}$, respectively by Student test), there is a 62% reduction for ZNF654 ($p=7.39 \times 10^{-3}$ by Student test) and a drop of 58% for ZNF354C ($p=8.82 \times 10^{-3}$ by Student test).

The expression of ZIM2 is really weak in placentas, around 8 times less than ZNF334, despite a strong expression of the protein according to ProteinAtlas; whereas ZNF354c is expressed almost at the same amount than ZNF334. ZNF35 is three times less abundant than ZNF334. ZNF654 mRNAs are more abundant with an expression of almost 3 times superior than this of ZNF334.

Relative expression of ZIM2, ZNF35, ZNF654 and ZNF354c in normal and pathological placentas

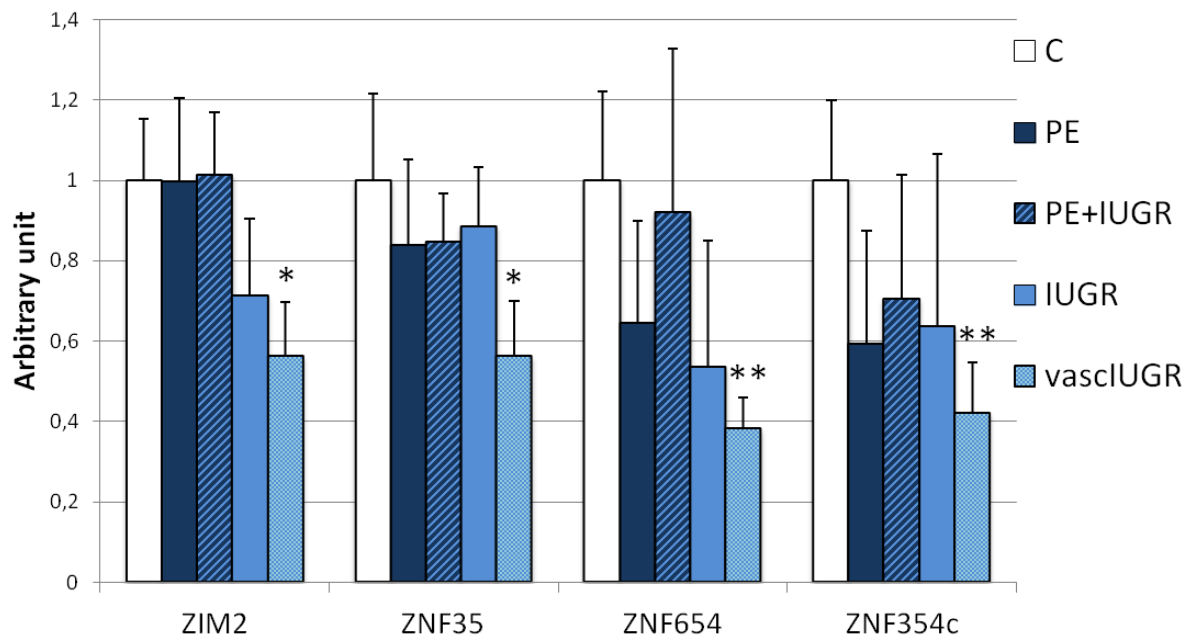


Figure 2: ZIM2, ZNF35, ZNF654 and ZNF354C mRNAs are specifically reduced in vascular IUGR placentas

Expression was assessed by qRT-PCR in 16 Term control placentas (T), 12 preeclamptic placentas (PE), 7 preeclamptic placentas associated with IUGR (PE+IUGR), 9 IUGR placentas (IUGR) and 7 vascular IUGR (vasclIUGR). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA. The expression level obtained for the control placentas was arbitrary set to one.

ZNF91, ZNF292 and ZNF295 were showed decreased in preeclamptic and IUGR placentas (Figure 3). For ZNF91, there are a 64% decrease in preeclamptic placentas ($p=1.4 \times 10^{-2}$) and a 69% drop in IUGR placentas ($p=1.2 \times 10^{-2}$). The decrease for ZNF91 observed in vascular IUGR placentas is not significant. For ZNF292, there are a 45% decrease in preeclamptic placentas ($p=2.8 \times 10^{-2}$), a 63% drop in IUGR placentas ($p=2.2 \times 10^{-3}$) and a 67% reduction in vascular IUGR placenta ($p=4.4 \times 10^{-4}$). For ZNF295, there are a 57% decrease in preeclamptic placentas ($p=1.4 \times 10^{-3}$), a 55% drop in IUGR placentas ($p=8.3 \times 10^{-3}$) and a 52% reduction in vascular IUGR placenta ($p=1,4 \times 10^{-2}$).

These three genes are well expressed in placentas, with the highest expression for ZNF91, which is around 70 times more expressed than ZNF334. The ZNF292 and ZNF295 mRNAs are around 30 and 8 times more abundant than ZNF334 mRNA, respectively.

Relative Expression of ZNF91, ZNF292 and ZNF295 in normal and pathological placentas

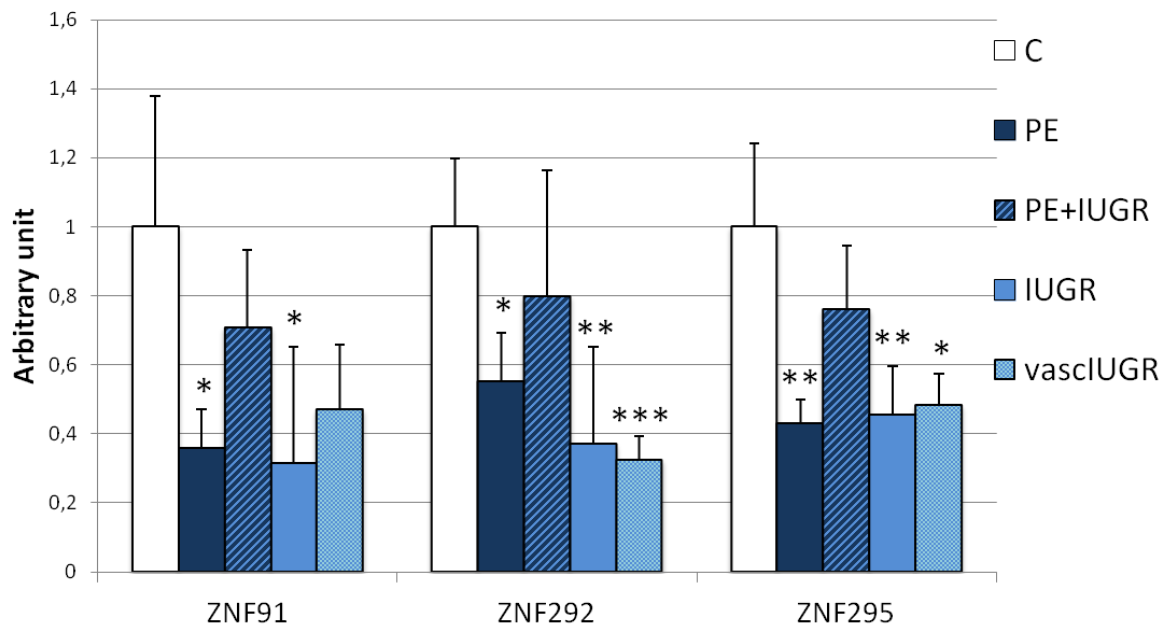


Figure 3: ZNF91, ZNF292 and ZNF295 mRNAs are decreased in preeclamptic and IUGR placentas

Expression was assessed by qRT-PCR in 16 Term control placentas (T), 12 preeclamptic placentas (PE), 7 preeclamptic placentas associated with IUGR (PE+IUGR), 9 IUGR placentas (IUGR) and 7 vascular IUGR (vascIUGR). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA. The expression level obtained for the control placentas was arbitrary set to one. $p=2.35 \times 10^{-2}$ for ZNF91, $p=1.87 \times 10^{-3}$ for ZNF292 and $p=4.51 \times 10^{-2}$ by ANOVA.

We showed an increase for only one gene (Figure 4) : ZNF395 displays a 2,1 fold increase in preeclamptic placentas associated with IUGR ($p=6.9 \times 10^{-3}$ by Student test, in this case, the ANOVA analysis was not significant).

ZNF395 is also well expressed in placentas, as its mRNA is around 20 times more abundant than ZNF334 mRNA.

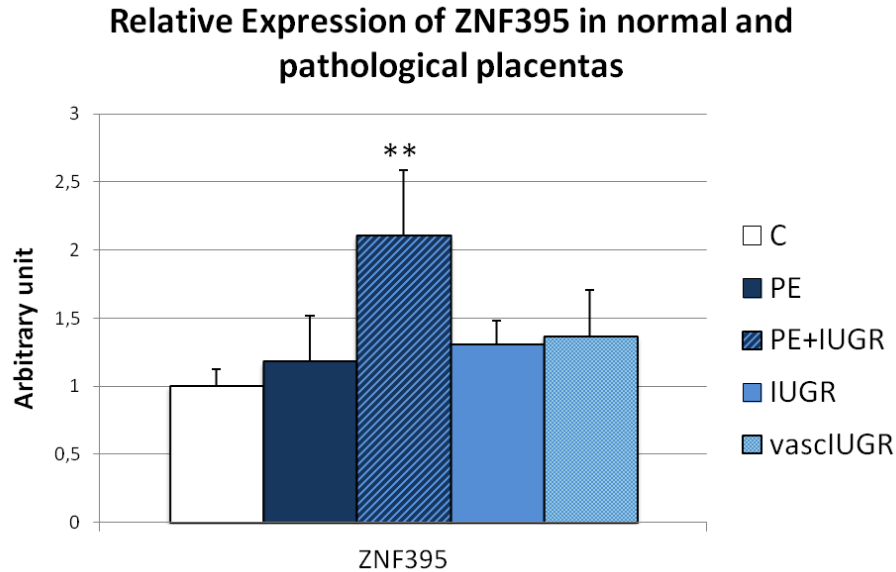


Figure 4: ZNF395 mRNA is specifically increased in placenta from preeclampsia associated with IUGR patients

Expression was assessed by qRT-PCR in 16 Term control placentas (T), 12 preeclamptic placentas (PE), 7 preeclamptic placentas associated with IUGR (PE+IUGR), 9 IUGR placentas (IUGR) and 7 vascular IUGR (vasclIUGR). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA. The expression level obtained for the control placentas was arbitrary set to one.

As hypoxia is known to be an important signal for placental development (Hung and Burton, 2006), we addressed the possible regulation by hypoxia of the genes that we found modified in JEG-3 choriocarcinoma cells. Six genes were increased by hypoxia (Figure 5), with different kinetics. ZNF395 mRNA was augmented around 6 fold after 6 hours in hypoxia (2% O₂), compared to normoxia (20% O₂, $p=1.86 \times 10^{-4}$ by Student t-test compared to 6h of normoxia). There is also a significant increase after 24 hours of hypoxia for ZNF334 by almost 8 fold ($p=8.78 \times 10^{-5}$ by Student t-test compared to 24h of normoxia), followed by a decrease by 4 fold at 36h ($p=2.64 \times 10^{-2}$ by Student t-test compared to 36h of normoxia). For ZNF654 and ZNF292, after 24h of hypoxia, there is a significant increase by 4 fold ($p=3.55 \times 10^{-4}$ and $p=5.53 \times 10^{-3}$ by Student t-test compared to 24h of normoxia, respectively), and for ZNF295 by 2 fold ($p=64.94 \times 10^{-3}$ by Student t-test compared to 24h of normoxia). For ZNF559, there is an induction by more than 3 fold at 24h ($p=2.01 \times 10^{-2}$ by Student t-test compared to 24h of normoxia) and by 5 fold at 36h ($p=1.75 \times 10^{-2}$ by Student t-test compared to 36h of normoxia).

Kinetics of expression for several zinc finger genes in cells cultivated in hypoxia

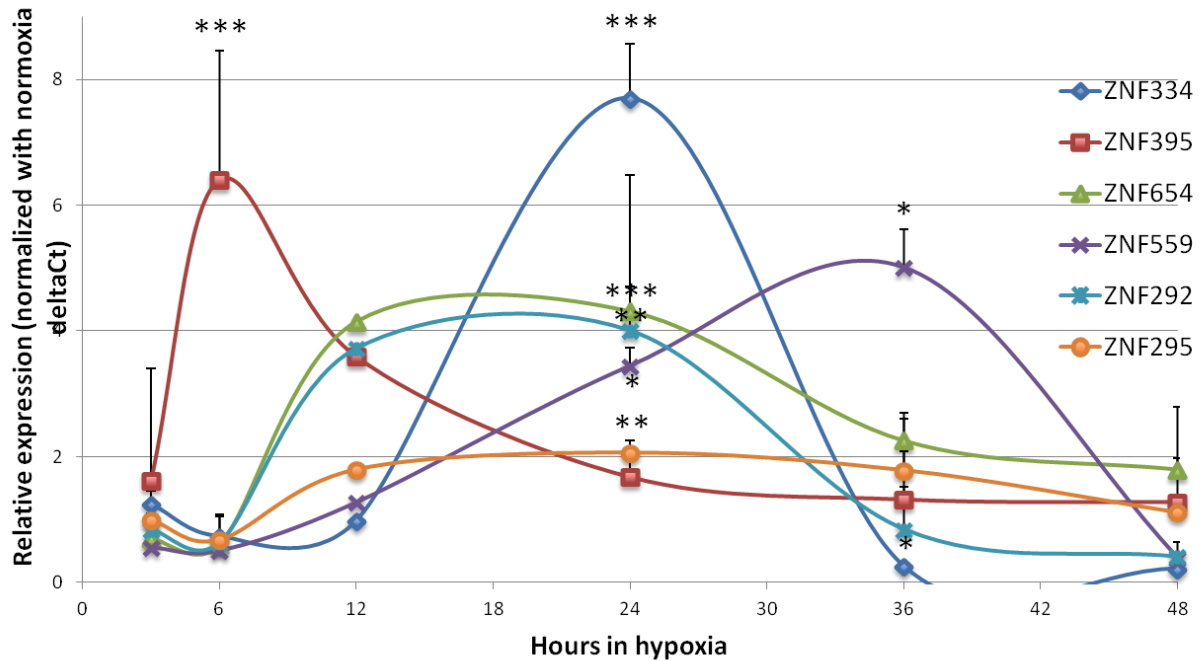


Figure 5: Hypoxia induces the expression of ZNF334, ZNF395, ZNF654, ZNF559, ZNF292 and ZNF295

Expression was assessed by qRT-PCR in cells submitted to 3, 6, 12, 24, 36 or 48h of hypoxia (2% O₂) or under classical normoxic culture condition (20% O₂). The Ct values of each sample were normalized by those obtained for SDHA. The graphical representation shows the relative expression in hypoxia compared to normoxia.

Discussion

To sum up, we show here a decrease in placental mRNA for 9 genes encoding zinc finger proteins in pathological placentas. These variations are either found in all IUGR placentas (ZNF334 and ZNF559), or more specifically in vascular IUGR (ZIM2, ZNF35, ZNF654 and ZNF354C), or are found in preeclamptic as well as IUGR placentas (ZNF91, ZNF292 and ZNF295). For the placentas affected by both pathologies, we found only one deregulated gene (ZNF395), whose expression was significantly increased. Six of these genes were induced by hypoxia. These genes are therefore good candidates to explain some part of the pathophysiology of placental diseases.

For most of the genes analysed here, the available information about their function or their regulation is limited.

ZNF334 is described as expressed in CD4 lymphocyte and decreased in those from patients with rheumatoid arthritis, and proposed to share with CD28 promoter a regulatory sequence named “α” in its own promoter, suggesting a possible co-regulation (Soroczyńska-Cybula et al., 2011).

For ZNF559, it was shown upregulated a 30-fold after 5-aza-dC treatment of a gastric cancer cell line (AGS) and its promoter was shown to be methylated in 5 of 6 gastric cancer cell lines and in 6 of 10 primary gastric cancer cells (Yamashita et al., 2006).

ZIM2 encodes a Kruppel-type (C2H2) zinc-finger protein with a conserved Kruppel-associated box (KRAB) domain, shares a set of 5' exons and a common promoter with PEG3 gene, and both genes are paternally expressed. ZIM2 has the highest levels of expression in adult testis and modest levels in fetal kidney and brain (Kim et al., 2004). More recently, ZIM2 was proposed to play a role in meiotic pairing and synapsis in *C. elegans* (Phillips et al., 2009).

ZNF35 encodes a 58-kDa polypeptide containing 11 consecutive finger motifs located at the amino terminus, an acidic domain located at the carboxy terminus, and the core sequence it recognizes is 5'-C/GC/GAAG/TA-3' (Pengue et al., 1993). Recently, it was shown that its murine homologous Zfp105 is highly expressed in adult mouse testis, and in particular in pachytene spermatocytes. ZNF35 expression was then confirmed in human testis. ZNF35 was located primarily in the cytoplasm of male germ cells. Reduced male fertility was observed in adult Zfp105(LacZ/LacZ) mice, suggesting a role of this factor in male reproduction (Zhou et al., 2010).

ZNF654 was recently proposed to be a tumour suppressor gene. Indeed, ovarian tumourigenesis was offset by the transfer of chromosome 3 fragments containing notably ZNF654 in the tumorigenic OV-90 ovarian cancer cell line, and ZNF654 underexpression was observed in malignant ovarian tumour samples as compared with primary cultures of normal ovarian surface epithelial cells or benign ovarian tumours (Cody et al., 2009).

ZNF354C, also known as hKid3 or KID3 (for Kidney, Ischemia, and Developmentally-regulated protein 3), encodes a 554 amino acid protein with an amino-terminal KRAB domain and 11 carboxyl-terminal C(2)H(2) zinc finger motifs. It is notably expressed in human fetal brain and kidney. It recognizes the consensus core sequence 5'-CCAC-3' and exhibits transcription repressor activity (Gao et al., 2004). As the expression of the murine homologous Kid3 gene in the kidney is developmentally regulated, it suggests a role for Kid3 in the early stages of nephrogenesis (Gao et al., 2004).

ZNF91 is part of a KRAB-ZNF genes subfamily that has expanded specifically in primates to comprise more than 110 loci in the human genome (Hamilton et al., 2006). ZNF91 is overexpressed in mononuclear cells of acute myelogenous leukemia patients, and an anti-sense strategy suppressed cell growth, and induced apoptosis, suggesting an important role of this factor in cell proliferation and/or anti-apoptosis (Unoki et al., 2003). ZNF91 is located in a region of chromosome 19, which is often gained in ovarian carcinomas, and therefore it may play a role by favouring tumour development (Micci et al., 2010). ZNF91 also functions as a repressor for the human Fc gamma RIIB transcription (Nishimura et al., 2001).

A single-nucleotide polymorphism located in an intron of ZNF292 was recently identified as a susceptibility marker for Alzheimer Disease (Furney et al., 2011). Tumor-associated antigens targeting

ZNF292 were found in the sera from patients affected by monoclonal gammopathy of undetermined significance (Blotta et al., 2009). Growth factor independence 1B (Gfi-1B), a transcription factor essential for the development of hematopoietic cells and differentiation of erythroid and megakaryocytic lineages, induces ZNF292, as demonstrated by its upregulation in Gfi-1B overexpressing cells (Koldehoff et al., 2008). In mice, ZNF292 homologous gene, *Zfp292* or *Zn-16*, would have an endocrine role. Indeed, it is able to induce growth hormone (GH) expression by interacting with Pit-1 (Lipkin et al., 1993) and its mRNA abundance correlates with GH expression (Wojtkiewicz et al., 2002).

Human ZNF295 protein harbors a BTB/POZ domain and multiple Krüppel (C(2)H(2)) type zinc finger domains, and thus belongs to a family of POK (POZ and Krüppel) transcription factor. Due to alternative splicing and the use of different polyadenylation signals, ZNF295 gene produces two protein isoforms: ZNF295L with 1066 amino acid residues and ZNF295S with 865 amino acid residues, containing 9 and 5 zinc finger domains, respectively. ZNF295 is ubiquitously expressed in human fetal and adult tissues. ZNF295 acts as a transcription repressor. Both ZNF295L and ZNF295S could interact not only with themselves and each other, but also with another POK protein ZFP161 known to function as a transcription repressor and an activator. ZNF295 may therefore be involved in the bi-directional control of gene expression in concert with ZFP161 (Wang et al., 2005). ZFP295 expression is also modulated by angiotensin II in H295R human adrenocortical cells and it significantly increases cortisol secretion (Romero et al., 2010).

ZNF395, also known as PBF (for Papillomavirus binding factor) and HDBP2 (for Huntington's disease binding protein 2), is a nuclear-cytoplasmic shuttling factor with the ability to inhibit cell growth. It has been identified by its ability to bind to GC-rich sequence elements within upstream promoter regions of certain human papillomavirus (HPV) types and of the Huntingtin protein, respectively (Tanaka et al., 2004). More recently, it was shown to bind to SAP30 and represses transcription via recruitment of the HDAC1 co-repressor complex (Sichtig et al., 2007). Very recently, by loss and gain of function experiments, ZNF395 was shown to coordinate the transcriptional regulatory pathway of PPAR γ 2, which may be necessary for the genesis of adipocytes (Hasegawa et al., 2013).

Globally, none of the zinc finger genes identified in this study have been previously described as important for the placental development or physiology. They constitute therefore new candidate genes, whose functions in the placenta could reveal new pathways important for the pathophysiology of placental diseases, and more particularly IUGR.

References

- Bai, H., Sakurai, T., Godkin, J.D., and Imakawa, K. (2013). Expression and Potential Role of GATA Factors in Trophoblast Development. *J. Reprod. Dev.* 59, 1–6.
- Barboux, S., Gascoin-Lachambre, G., Buffat, C., Monnier, P., Mondon, F., Tonanny, M.-B., Pinard, A., Auer, J., Bessières, B., Barlier, A., et al. (2012). A genome-wide approach reveals novel imprinted genes

expressed in the human placenta. *Epigenetics* 7, 1079–1090.

Blotta, S., Tassone, P., Prabhala, R.H., Tagliaferri, P., Cervi, D., Amin, S., Jakubikova, J., Tai, Y.-T., Podar, K., Mitsiades, C.S., et al. (2009). Identification of novel antigens with induced immune response in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 114, 3276–3284.

Buffat, C., Mondon, F., Rigour, V., Boubred, F., Bessières, B., Fayol, L., Feuerstein, J.-M., Gamberre, M., Jammes, H., Rebouret, R., et al. (2007). A hierarchical analysis of transcriptome alterations in intrauterine growth restriction (IUGR) reveals common pathophysiological pathways in mammals. *J. Pathol.* 213, 337–346.

Cody, N.A.L., Shen, Z., Ripeau, J.-S., Provencher, D.M., Mes-Masson, A.-M., Chevrette, M., and Tonin, P.N. (2009). Characterization of the 3p12.3-pcen region associated with tumor suppression in a novel ovarian cancer cell line model genetically modified by chromosome 3 fragment transfer. *Mol. Carcinog.* 48, 1077–1092.

Doridot, L., Passet, B., Méhats, C., Rigour, V., Barboux, S., Ducat, A., Mondon, F., Vilotte, M., Castille, J., Breuiller-Fouché, M., et al. (2013). Preeclampsia-Like Symptoms Induced in Mice by Fetoplacental Expression of STOX1 Are Reversed by Aspirin Treatment. *Hypertension* 61, 662–668.

Furney, S.J., Simmons, A., Breen, G., Pedroso, I., Lunnon, K., Proitsi, P., Hodges, A., Powell, J., Wahlund, L.-O., Kloszewska, I., et al. (2011). Genome-wide association with MRI atrophy measures as a quantitative trait locus for Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 16, 1130–1138.

Gao, L., Sun, C., Qiu, H.-L., Liu, H., Shao, H.-J., Wang, J., and Li, W.-X. (2004). Cloning and characterization of a novel human zinc finger gene, hKid3, from a C2H2-ZNF enriched human embryonic cDNA library. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 1145–1152.

Hamilton, A.T., Huntley, S., Tran-Gyamfi, M., Baggott, D.M., Gordon, L., and Stubbs, L. (2006). Evolutionary expansion and divergence in the ZNF91 subfamily of primate-specific zinc finger genes. *Genome Res.* 16, 584–594.

Hasegawa, R., Tomaru, Y., de Hoon, M., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., and Shin, J.W. (2013). Identification of ZNF395 as a novel modulator of adipogenesis. *Exp. Cell Res.* 319, 68–76.

Hung, T.-H., and Burton, G.J. (2006). Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 45, 189–200.

Jebbink, J., Wolters, A., Fernando, F., Afink, G., van der Post, J., and Ris-Stalpers, C. (2012). Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome - a review. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1960–1969.

Johnson, J.D., Bernal-Mizrachi, E., Alejandro, E.U., Han, Z., Kalynyak, T.B., Li, H., Beith, J.L., Gross, J., Warnock, G.L., Townsend, R.R., et al. (2006). Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19575–19580.

Kim, J., Bergmann, A., Lucas, S., Stone, R., and Stubbs, L. (2004). Lineage-specific imprinting and evolution of the zinc-finger gene ZIM2. *Genomics* 84, 47–58.

Koldehoff, M., Zakrzewski, J.L., Klein-Hitpass, L., Beelen, D.W., and Elmaagacli, A.H. (2008). Gene profiling of growth factor independence 1B gene (Gfi-1B) in leukemic cells. *Int. J. Hematol.* 87, 39–47.

Krüger, I., Vollmer, M., Simmons, D.G., Simmons, D., Elsässer, H.-P., Philipsen, S., and Suske, G. (2007). Sp1/Sp3 compound heterozygous mice are not viable: impaired erythropoiesis and severe placental defects. *Dev. Dyn.* 236, 2235–2244.

Lipkin, S.M., Näär, A.M., Kalla, K.A., Sack, R.A., and Rosenfeld, M.G. (1993). Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. *Genes Dev.* 7, 1674–1687.

Maynard, S.E., and Karumanchi, S.A. (2011). Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin. Nephrol.* 31, 33–46.

Micci, F., Skotheim, R.I., Haugom, L., Weimer, J., Eibak, A.M.E., Abeler, V.M., Trope, C.G., Arnold, N., Lothe, R.A., and Heim, S. (2010). Array-CGH analysis of microdissected chromosome 19 markers in ovarian carcinoma identifies candidate target genes. *Genes Chromosomes Cancer* 49, 1046–1053.

Nishimura, T., Narita, T., Miyazaki, E., Ito, T., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Martial, J.A., Bellfroid, E.J., Vissing, H., and Taniyama, T. (2001). Characterization of the human Fc gamma RIIB gene promoter: human zinc-finger proteins (ZNF140 and ZNF91) that bind to different regions function as transcription repressors. *Int. Immunol.* 13, 1075–1084.

Pengue, G., Cannada-Bartoli, P., and Lania, L. (1993). The ZNF35 human zinc finger gene encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *FEBS Lett.* 321, 233–236.

Phillips, C.M., Meng, X., Zhang, L., Chretien, J.H., Urnov, F.D., and Dernburg, A.F. (2009). Identification of chromosome sequence motifs that mediate meiotic pairing and synapsis in *C. elegans*. *Nat. Cell Biol.* 11, 934–942.

Razin, S.V., Borunova, V.V., Maksimenko, O.G., and Kantidze, O.L. (2012). Cys2His2 zinc finger protein family: classification, functions, and major members. *Biochemistry Mosc.* 77, 217–226.

Rigour, V., Chauvet, C., Chelbi, S.T., Rebouret, R., Mondon, F., Letourneur, F., Mignot, T.M., Barboux, S., and Vaiman, D. (2008). STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PLoS One* 3, e3905.

- Rigourd, V., Chelbi, S., Chauvet, C., Rebourcet, R., Barbaux, S., Bessières, B., Mondon, F., Mignot, T.M., Danan, J.L., and Vaiman, D. (2009). Re-evaluation of the role of STOX1 transcription factor in placental development and preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology* 82, 174–181.
- Romero, D.G., Gomez-Sanchez, E.P., and Gomez-Sanchez, C.E. (2010). Angiotensin II-regulated transcription regulatory genes in adrenal steroidogenesis. *Physiol. Genomics* 42A, 259–266.
- Shibata, M., and García-García, M.J. (2011). The mouse KRAB zinc-finger protein CHATO is required in embryonic-derived tissues to control yolk sac and placenta morphogenesis. *Dev. Biol.* 349, 331–341.
- Sibai, B., Dekker, G., and Kupferminc, M. (2005). Pre-eclampsia. *Lancet* 365, 785–799.
- Sichtig, N., Körfer, N., and Steger, G. (2007). Papillomavirus binding factor binds to SAP30 and represses transcription via recruitment of the HDAC1 co-repressor complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 467, 67–75.
- Soroczyńska-Cybula, M., Bryl, E., Smoleńska, Z., and Witkowski, J.M. (2011). Varying expression of four genes sharing a common regulatory sequence may differentiate rheumatoid arthritis from ageing effects on the CD4(+) lymphocytes. *Immunology* 132, 78–86.
- Stumpo, D.J., Byrd, N.A., Phillips, R.S., Ghosh, S., Maronpot, R.R., Castranio, T., Meyers, E.N., Mishina, Y., and Blackshear, P.J. (2004). Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of Zfp36L1, a gene encoding a CCCH tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6445–6455.
- Tanaka, K., Shouguchi-Miyata, J., Miyamoto, N., and Ikeda, J.-E. (2004). Novel nuclear shuttle proteins, HDBP1 and HDBP2, bind to neuronal cell-specific cis-regulatory element in the promoter for the human Huntington's disease gene. *J. Biol. Chem.* 279, 7275–7286.
- Unoki, M., Okutsu, J., and Nakamura, Y. (2003). Identification of a novel human gene, ZFP91, involved in acute myelogenous leukemia. *Int. J. Oncol.* 22, 1217–1223.
- Wang, J., Kudoh, J., Takayanagi, A., and Shimizu, N. (2005). Novel human BTB/POZ domain-containing zinc finger protein ZNF295 is directly associated with ZFP161. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 615–627.
- Wojtkiewicz, P.W., Phelps, C.J., and Hurley, D.L. (2002). Transcript abundance in mouse pituitaries with altered growth hormone expression quantified by reverse transcriptase polymerase chain reaction implicates transcription factor Zn-16 in gene regulation in vivo. *Endocrine* 18, 67–74.
- Yamashita, S., Tsujino, Y., Moriguchi, K., Tatematsu, M., and Ushijima, T. (2006). Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci.* 97, 64–71.
- Zhou, H., Liu, L.-H., Zhang, H., Lei, Z., and Lan, Z.-J. (2010). Expression of zinc finger protein 105 in the testis and its role in male fertility. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 511–520.

ANNEXE 5

GENETIC AND EPIGENETIC MECHANISMS COLLABORATE TO CONTROL SERPINA3 EXPRESSION AND ITS ASSOCIATION WITH PLACENTAL DISEASES

**(Accepté pour publication dans Human Molecular Genetics
en janvier 2012, publié en mai 2012)**

Genetic and epigenetic mechanisms collaborate to control *SERPINA3* expression and its association with placental diseases

Sonia T. Chelbi^{1,2}, Melissa L. Wilson³, Anne-Clémence Veillard^{1,2}, Sue A. Ingles³, Jim Zhang⁴, Françoise Mondon^{1,2}, Géraldine Gascoin-Lachambre^{1,2,5}, Ludivine Doridot^{1,2}, Thérèse-Marie Mignot^{1,2}, Régis Rebourcet^{1,2}, Bruno Carbonne^{1,2}, Jean-Paul Concordet^{1,2}, Sandrine Barbaux^{1,2} and Daniel Vaiman^{1,2,*}

¹Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France, ²Inserm, U1016, Paris, France, ³Department of Obstetrics/Gynecology & Preventive Medicine, USC Keck School of Medicine, Los Angeles, CA, USA, ⁴MOE-Shanghai Key Laboratory of Children's Environmental Health, Xinhua Hospital, Shanghai, China and ⁵Service de Médecine Néonatale de Port-Royal, Groupe Hospitalier Cochin-Saint-Vincent-de-Paul, AP-HP, Université Paris Descartes, 75014 Paris, France

Received December 7, 2011; Revised December 7, 2011; Accepted January 10, 2012

SERPINA3 (Serpin peptidase inhibitor clade A member 3), also known as α 1-antichymotrypsin, is a serine protease inhibitor involved in a wide range of biological processes. Recently, it has been shown to be up-regulated in human placental diseases in association with a hypomethylation of the 5' region of the gene. In the present study, we show that the promoter of *SERPINA3* is transcriptionally activated by three transcription factors (TFs) (SP1, MZF1 and ZBTB7B), the level of induction being dependent on the rs1884082 single nucleotide polymorphism (SNP) located inside the promoter, the T allele being consistently induced to a higher level than the G, with or without added TFs. When the promoter was methylated, the response to ZBTB7B was allele specific (the G allele was strongly induced, while the T allele was strongly down-regulated). We propose an adaptive model to explain the interest of such a regulation for placental function and homeostasis. Overexpression of *SERPINA3* in JEG-3 cells, a trophoblast cell model, decreased cell adhesion to the extracellular matrix and to neighboring cells, but protects them from apoptosis, suggesting a way by which this factor could be deleterious at high doses. In addition, we show in different human populations that the T allele appears to predispose to Intra Uterine Growth Restriction (IUGR), while a G allele at a second SNP located in the second exon (rs4634) increases the risk of preeclampsia. Our results provide mechanistic views inside the involvement of *SERPINA3* in placental diseases, through its regulation by a combination of epigenetic, genetic and TF-mediated regulations.

INTRODUCTION

Serine protease inhibitors (SERPINs) are a superfamily consisting of at least 37 proteins in humans (1). They have been shown to regulate a wide range of biological processes, including coagulation, inflammation and wound healing. SERPINs mainly act by inhibiting the activity of proteases, even though some of them are non-inhibitory and function instead

as chaperones or hormone transporters in the circulation. These proteins are therefore very important for maintaining body homeostasis in a broad sense (2). *SERPINA3* (Serpin peptidase inhibitor clade A member 3), initially named α 1-antichymotrypsin (ACT), like other SERPINs, has a characteristic three-dimensional structure and employs a peculiar mode of action referred to as suicide substrate-like inhibition. The SERPIN contains an exposed active site, the

*To whom correspondence should be addressed at: Institut Cochin, Département of Genetics and Development, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France. Tel: +33 144412301; Fax: +33 144412302; Email: daniel.vaiman@inserm.fr

reactive center loop (RCL) that serves as a substrate for the target protease. Upon cleavage of the RCL, the SERPIN undergoes dramatic conformational changes resulting in the formation of a highly stable and irreversible covalent complex with its target. The SERPIN is therefore consumed through achieving its function.

SERPINA3 is a typical acute-phase protein secreted into the circulation during acute and chronic inflammation. SERPINA3 is able to inhibit several proteases, including mast cell chymase, pancreatic chymotrypsin, human glandular kallikrein 2, kallikrein 3 (prostate-specific antigen), pancreatic cationic elastase and an uncharacterized lung serum protease (3–7). However, its major target is probably the neutrophil cathepsin G (8), a pro-inflammatory enzyme released at sites of inflammation contributing to activation of inflammatory cytokines, degradation of pathogens and remodeling of tissues (9). Cathepsin G contributes to wound repair by digesting extracellular matrix (ECM) proteins and by releasing growth factors from the ECM (10). Further, cathepsin G promotes platelet aggregation (11). At sites of vascular injuries and atherosclerosis, this enzyme is able to convert angiotensin I into active angiotensin II (12). Additionally, it increases the permeability of endothelial barriers contributing to perivascular lymphocytic migration and activation (13). Cathepsin G has also a pro-apoptotic activity (14). Therefore, by inhibiting cathepsin G, SERPINA3 should limit inflammation, coagulation, ECM remodeling and should inhibit apoptosis.

SERPINA3 has been implicated in the pathology of several devastating human diseases, including chronic obstructive pulmonary disease, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, cystic fibrosis, stroke and cerebral hemorrhage. SERPINA3 is also expressed at high levels in several malignant melanomas and carcinomas where it might have a role in regulating apoptosis and invasiveness (15,16). In addition, plasma levels of SERPINA3 have been found to be increased in patients with liver, pancreatic and prostate cancers (17,18). Some SERPIN mutations within key structural regions are able to affect the conformational stability of the protein, leading to a group of diseases called serpinopathies (19,20). Experimental and clinical data suggest that some single nucleotide polymorphisms (SNPs) in regulatory regions subtly alter gene expression and plasma levels of SERPINA3, thus disturbing the SERPIN-protease equilibrium. For instance, studies have reported that the rs1884082 SNP (G/T) located in the *SERPINA3* gene promoter is directly correlated with basal gene expression in human cell lines and with SERPINA3 plasma levels (21). This same T has also been shown to increase luciferase activity at a higher level than the G allele in two cell models after induction by oncostatin M (22). Among the two lines, one was T98G (glial/neuronal) and the other astrocytic (U373 MG), and in the second the difference in induction by the two alleles was maximum (up to 7-fold more for the T allele) 6 h after oncostatin M induction. Recently, a significant association has been found between a germ-line *SERPINA3* SNP and overall survival in pancreatic cancer (23).

Preeclampsia (PE) and vascular intrauterine growth restriction (IUGR) are two common obstetrical complications which represent major causes of materno-fetal morbidity and mortality. PE is a maternal multi-systemic disorder characterized by

pregnancy-induced hypertension, proteinuria and endothelial dysfunction. It can lead to life-threatening clinical conditions, such as hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets (HELLP) syndrome or eclampsia (seizures). IUGR is defined by a falling off in the fetal growth curve. Both diseases are thought to share a common etiology in placental malperfusion, secondary to shallow invasion of uterine spiral arteries by invasive extravillous cytotrophoblasts. Defective invasion results in a deficient maternal arterial remodeling at the fetomaternal interface, consecutively leading to intermittent vascular flow, hypoxia-reoxygenation injuries, localized ischemic lesions and oxidative stress in pathological placentas. The most classical hypothesis for explaining the preeclamptic syndrome is that the release of placental debris or microparticles and secreted molecules into the maternal blood flow triggers maternal systemic inflammation, endothelial lesions and subsequent symptoms. Plasma levels of SERPINA3 are increased in women with PE and/or IUGR (24,25). We have previously demonstrated that *SERPINA3* mRNA is overexpressed in the placentas of preeclamptic/IUGR pregnancies compared with controls, along with hypomethylation of the 5' gene region. However, while hypomethylation was present among both isolated PE and PE + IUGR cases, SERPINA3 was only mildly overexpressed in isolated PE (~2-fold) and strongly overexpressed (~10-fold) in IUGR pregnancies, regardless of the presence of PE (26). Since understanding the regulation of *SERPINA3* is imperative to dissecting the role of SERPINA3 in the pathology, we explored herein the molecular bases underlying expressional changes observed in these placental diseases. In addition, we performed a preliminary case-control study that shows in two different populations that a T allele in the promoter (rs1884082) and a G allele in the second exon (rs4934) predispose to placental diseases and especially IUGR.

RESULTS

The rs1884082 SNP located in the promoter correlates to mRNA levels of SERPINA3 in placentas

SERPINA3 mRNA quantity was monitored by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in placentas from individuals that underwent either non-pathological (controls, $n = 14$) or pathological pregnancies (isolated preeclampsia: PE, $n = 14$, isolated intra-uterine growth restriction: IUGR, $n = 17$ and preeclampsia combined with intra-uterine growth restriction: PE + IUGR, $n = 5$). The results are presented in Figure 1A. Compared with non-pathological placentas, *SERPINA3* mRNA levels were ~2-fold higher in isolated PE, 7-fold higher in isolated IUGR and 14-fold higher in PE + IUGR. Then, among the complete set of placentas, 36 for which DNA was available were genotyped at the rs1884082 SNP, a G/T polymorphism located within the *SERPINA3* promoter, in order to determine the average expression level of *SERPINA3* according to the placenta genotype regardless of the pathological status (Fig. 1B). Interestingly, mRNA expression correlated with rs1884082 promoter genotypes. Average expression was 10 times higher in placentas harboring the TT compared with the GG genotypes, while the GT genotype had an intermediate

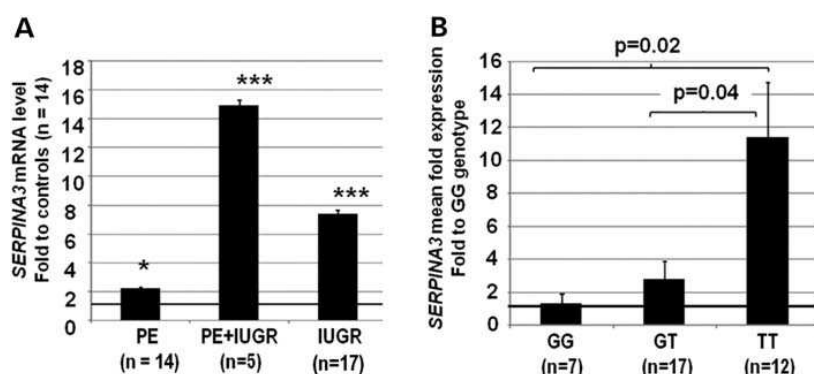


Figure 1. The rs1884082 polymorphism influences placenta mRNA levels of *SERPINA3*. (A) Quantitative RT-PCR of the *SERPINA3* gene on normal and pathological placentas. The expression level was normalized using *SDHA* as reference gene. The results are represented as the fold induction level in pathological placentas (PE $n = 14$, PE + IUGR $n = 5$, vIUGR $n = 17$) compared with controls ($n = 14$). Data are shown as mean \pm SEM. *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$ compared with control placentas. (B) *SERPINA3* mRNA levels calculated according to the genotype at the rs1884082 SNP for 36 placentas. The results are represented as the fold expression compared with GG genotypes.

level of expression (about twice that of GG placentas, the apparent non-proportionality being probably due to interindividual variability).

The rs180482 SNP influences the basal levels of *SERPINA3* promoter activity as well as its transactivation by zinc fingers that are up-regulated in placental diseases

To further evaluate the involvement of this promoter polymorphism on the regulation of *SERPINA3* expression level, the transcriptional activity of the two promoter variants was measured in controlled situations using JEG-3 choriocarcinoma cells, a classical model of trophoblast cells. Constructs containing either the T or G version of the *SERPINA3* promoter upstream of the firefly Luciferase reporter gene were transiently transfected (along with the internal normalizing plasmid pRL-RSV) into JEG-3 cells. Interestingly, the luciferase activity of the T variant was ~ 6 -fold the level of the empty pGL3enh-Luc vector, while the G variant only reached a 3.5-fold induction. Thus, the T allele has a higher basal expression than the G allele (Fig. 2A, $P < 0.0001$) in this cellular context. These data confirmed that the T allele of the promoter contributes to the higher expression of the *SERPINA3* gene in TT placentas.

Bioinformatic analysis of the *SERPINA3* promoter using GenomatixTM software indicated putative binding sites for three Zinc-finger containing transcription factors (TFs), overlapping the rs1884082 SNP, namely MZF1, ZBTB7B and SP1. Thus, to assess the effects of these TFs, a series of transactivation assays with either T or G version of the *SERPINA3* promoter was carried out, in the presence or absence of MZF1, ZBTB7B or SP1 expressing vectors. Variance analysis revealed an effect of the allele ($P < 0.05$) an effect of the inducers ($P < 0.003$) but no effect of the interaction between the type of promoter (harboring a G or a T) and the inducers. To summarize, the three zinc-finger TFs induced an increase in luciferase activity, on both alleles, the highest induction being obtained with ZBTB7B and the lowest with SP1 (Fig. 2A). We assume that this induction reflects the

ability of these zinc fingers TF to bind on *SERPINA3* promoter, even though we cannot exclude the simultaneous existence of indirect effects. The resulting fold induction which remained systematically higher for the T allele than for the G allele seemed to only maintain the difference existing at the basal level.

Then, expression of the three zinc-finger encoding genes was measured in normal and pathological placentas by quantitative RT-PCR. The mRNA levels of *SP1*, *MZF1* and *ZBTB7B* were consistently higher in the IUGR groups compared with normal placentas (Fig. 2B). In PE + IUGR, *ZBTB7B* and *SP1* were significantly up-regulated while up-regulation of *MZF1* was not statistically significant. In isolated PE, only *SP1* was found up-regulated. In all cases, *SP1* was much more strongly up-regulated than MZF1 and ZBTB7B. The fact that in IUGR, either accompanied or not by PE, there was a strongest mRNA increase of these zinc-finger genes in pathological placentas indicated that they probably all contribute to the sharp overexpression of *SERPINA3* expression in placentas of the IUGR (\pm PE) category.

Hypoxia-induced transcription of SP1, MZF1 and ZBTB7B precedes *SERPINA3* increase

The impact of oxygen pressure on *SERPINA3* expression was investigated since a prominent role has been evidenced for hypoxia in placental diseases (27–29). JEG-3 cells were placed in a Lwoff chamber and exposed either to an oxygen-depleted atmosphere (considered a hypoxic condition, 2%O₂) or maintained as control in atmospheric oxygen pressure (considered a normoxic condition). After exposure, the endogenous mRNA level of *SERPINA3* was determined by quantitative RT-PCR in cells harvested at 3, 6, 12, 24, 36 and 48 h. Results are represented on the Figure 3A as *SERPINA3* fold induction in hypoxic condition relative to normoxic condition at each time point. The kinetics showed that under hypoxia the mRNA quantity increased significantly at 24 h (> 3 -fold), and that later on, the induction level progressively decreased. Logically, we also analyzed the effect of

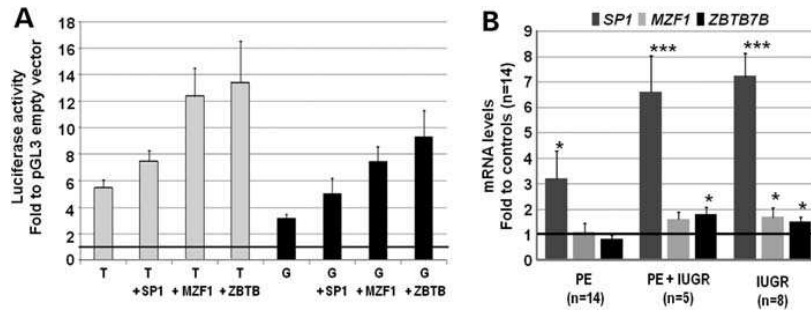


Figure 2. The rs180482 SNP influences the basal levels of *SERPINA3* promoter activity as well as its transactivation by zinc-finger proteins transcriptionally up-regulated in placental diseases. (A) Biological activity of *SERPINA3* promoter either containing a T or a G at the rs180482 SNP following transient transfection into JEG-3 cells was measured by luciferase assays. Transactivation assays with human SP1, MZF1 or ZBTB7B whose putative binding sites overlap the rs1884802 SNP were additionally performed. Results are represented as fold induction compared with the corresponding pGL3enh-Luc empty vector. Data are shown as mean fold \pm SEM of three independent experiments (including three to six replicates per condition). (B) Placenta mRNA levels of SP1, MZF1 and ZBTB7B were assessed by quantitative RT-PCR on normal and pathological placentas. The expression level was normalized using SDHA as reference gene. The results are represented as the fold induction level in pathological placentas compared with control placentas. Data are shown as mean \pm SEM. *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$.

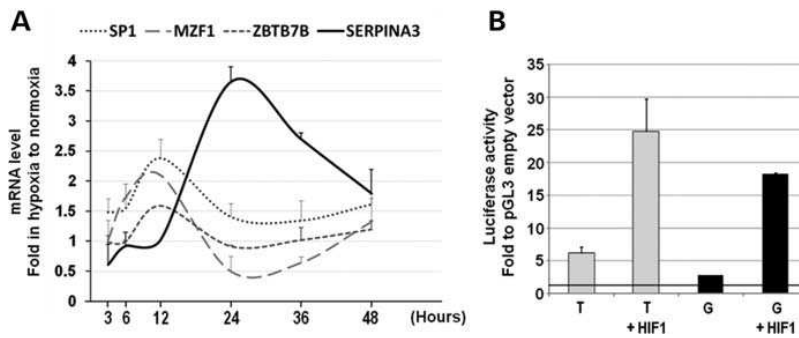


Figure 3. *SERPINA3* regulation under hypoxia. (A) JEG-3 cells were maintained in hypoxia (2% O₂) in a Lwoff chamber during 3, 6, 12, 24, 36 and 48 h. *SERPINA3* expression was monitored by quantitative RT-PCR. Results are represented as fold in hypoxia compared with normoxia (20% O₂). (B) The two alleles of the *SERPINA3* promoter were co-transfected in JEG-3 cells with a vector encoding a stable form of HIF1 α . The results were measured by luciferase assays. Despite the absence of canonical HIF1-binding site in this *SERPINA3* promoter element, HIF1 was able to induce the T and the G alleles.

hypoxia on SP1, MZF1 and ZBTB7B expression (Fig. 3A). Interestingly, all three TFs were transcriptionally induced before 24 h, peaking at 12 h, thus at a time point consistent with their putative involvement in *SERPINA3* induction.

SP1, MZF1 and/or ZBTB7B, consistently with their transient induction by hypoxia.

Induction of *SERPINA3* promoter is HIF1 mediated

To assess the effect of hypoxia on the *SERPINA3* promoter, the luciferase aforementioned constructs were transiently co-transfected in JEG-3 cells with a vector encoding HIF1-TM, a mutated version of HIF1 α (hypoxia inducible factor 1 α -subunit) which cannot be targeted by prolyl-hydroxylases and is therefore constitutively stabilized. HIF1 α overexpression led to a strong induction of the luciferase activity ~4-fold on the T allele and 7-fold on the G allele (Fig. 3B). Again, the basal difference between the *SERPINA3* promoter T and G alleles was maintained. Since the bioinformatic analysis of *SERPINA3* promoter did not predict any HIF1 α -binding site, the HIF1-triggered induction observed might be indirect and mediated through the activation of

The response of the methylated promoter is allele dependant

Since we have previously shown that pathological placentas harbor a hypomethylation of the *SERPINA3* 5' region, we also investigated the role of this parameter on *SERPINA3* regulation. Luciferase assays were performed with SssI-methylated versions of *SERPINA3* promoter either in the presence or the absence of HIF1 α , ZBTB7B and SP1 inducers (Fig. 4), as well as MZF1 (not shown in the figure). As expected, methylation of the plasmids, whatever the allele, resulted in a decrease in luciferase activity compared with the unmethylated situation. These results suggested that DNA hypomethylation in pathological placentas contribute to *SERPINA3* overexpression. When proceeding to transactivation assays, SP1 remained able to induce both alleles, the T allele demonstrating a higher transcriptional activity than the G allele. MZF1 presented a quite similar pattern, being

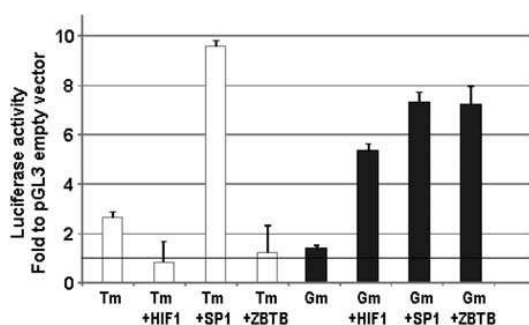


Figure 4. The transactivation of the methylated promoter is allele-dependent. JEG-3 cells were co-transfected with *Sss*I-methylated versions of the *SERPINA3* promoter together with expression vectors encoding for HIF1 α , SP1, ZBTB7B and MZF1 TFs. HIF1 α and ZBTB7B had differential effects on the two methylated promoter versions contrary to SP1 or MZF1 (not shown) that induced both T and G allele transcription. When the promoter was methylated, HIF1 α and ZBTB7B were not able to transactivate the T allele, while they induced the G allele. Since there are apparently no HIF1 α -binding sites in this promoter, one should assume that the effect of this TF was indirect.

able to induce both methylated alleles (data not shown). Strikingly, HIF1 and ZBTB7B induced a clear dichotomous and allele-dependant response. HIF1 α and ZBTB7B were not able to transactivate the T allele and even tended to decrease its activity, whereas they were able to up-regulate the methylated G allele. Since there is no HIF1 α -binding site on the promoter element analyzed, we postulate that the allele-dependant effect observed with HIF1 α could be mediated through ZBTB7B TF in a sequential series of events.

Case-control study reveals that the rs1884082 SNP located inside the *SERPINA3* promoter is associated with IUGR

To investigate the possible association between the rs1884082 SNP and placental diseases, a case-control study was performed. First, a French collection constituted by 134 DNA samples extracted from placentas collected from Caucasian individuals that underwent either non-pathological (controls, $n = 44$) or pathological pregnancies (PE, $n = 30$, IUGR, $n = 38$ and PE + IUGR, $n = 26$) was genotyped for the rs1884082 SNP. The frequencies of the three possible genotypes (GG, GT and TT) were determined and a Chi-square test comparing the observed genotype frequencies in pathological conditions with expected genotype frequencies calculated based on the observed allelic repartition in the control group was performed (Fig. 5A). A significant difference was found when the complete set of pathological samples was considered ($P = 0.008$). The difference remained significant when considering IUGR with or without PE ($P = 0.017$). In this category, the TT genotype appeared overrepresented, while the GG genotype was underrepresented. These data suggested that the promoter T allele is associated with an increased risk of developing IUGR. These data were confirmed when comparing the observed allele frequencies to the HapMap frequencies in the Caucasian population ($P = 0.04$ for IUGR, data not shown). Since the absence of association in the PE group could be due to the limited number of samples

constituting the French collection, we attempted to extend the number of placenta DNAs from this category. Therefore, samples collected at Los Angeles from 166 controls and 120 preeclamptic individuals of Hispanic origin, as well as 32 controls and 185 cases of PE accompanied by HELLP syndrome were analyzed. Again, no significant association was found when the PE samples were considered separately or all together (Table 1).

Case-control study reveals that the rs4934 SNP located in the Exon2 is associated with PE

According to the literature, in a number of complex diseases such as Alzheimer disease, genetic association studies using single SNPs have failed to provide clear evidence for the involvement of the *SERPINA3* gene, suggesting that the analysis looking at multiple SNP patterns might be more revealing (30). Therefore, we decided to additionally analyze the rs4934 SNP, an A/G polymorphism located in the signal peptide region in Exon2 of the *SERPINA3* gene which converts amino acid alanine to threonine. In the French cohort, the GG and AG genotypes were found significantly overrepresented only when placental diseases were taken as a whole ($P = 0.016$, Fig. 5B). When analyzing the Los Angeles collection, a significant association was found with the PE group. The risk of PE (\pm HELLP) was increased when a G allele was present. The relative risk was estimated at 1.66 when a G was present (1.01–2.76) and 1.8 with the AG genotype (1.06–3.06).

Overexpression of *SERPINA3* results in loss of adherence and delay of apoptosis

We wished to explore the biological function of *SERPINA3* in the context of trophoblast cells. Thus, JEG-3 cells were transiently transfected with a vector encoding *SERPINA3*. Strikingly, overexpression of *SERPINA3* led to a strong increase in the number of floating cells. Therefore, the supernatant from JEG-3 culture, after transfection either by the expression vector encoding *SERPINA3* or alternatively by the empty expression vector, was harvested 24 or 48 h post-transfection. Then the number of detached cells found in the supernatant was counted in a Malassez cytometer. As shown in Figure 6A, the number of non-adherent cells was significantly increased by *SERPINA3* overexpression. To decipher if this increase of detachment was correlated with an increase in apoptosis, western blot analysis of the protein extracts from these cells was carried out using anti-cleaved caspase 3 antibody (monitoring apoptosis) and anti- α -actin antibody (to check for the amount of protein in each extract, Fig. 6B). Interestingly, the first wave of detachment was not due to induced apoptosis but rather due to a loss of adherence since *SERPINA3*-transfected cells as mock-transfected cells do not show apoptosis at 24 h. This loss of adherence could probably result from changes in cell adhesion to the ECM and to neighboring cells. At 48 h where apoptotic cells started to be detected, the level of cleaved caspase-3 was decreased in the cell overexpressing *SERPINA3* compared with the control, indicating that these cells are *a priori* more resistant to apoptosis, or potentially protected from its action by *SERPINA3*.

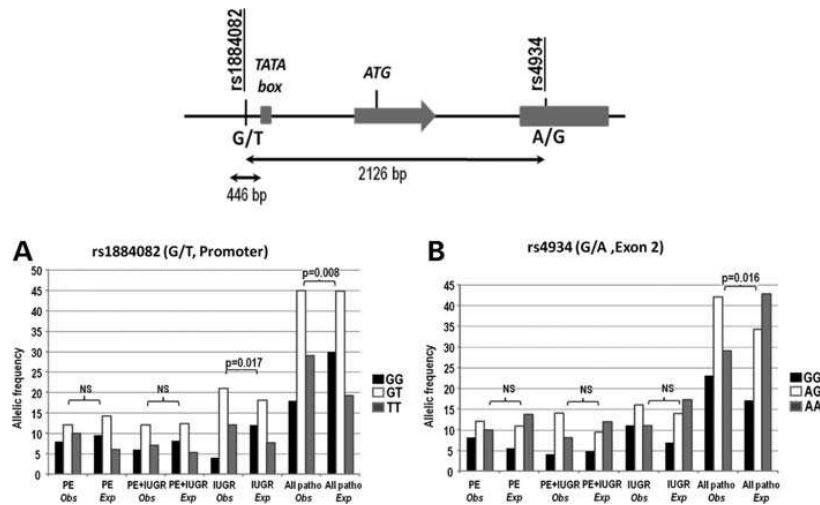


Figure 5. Analysis of the allelic distribution of the two *SERPINA3* polymorphisms and of their haplotypes in placental diseases in the French collection. Positions of the two polymorphisms studied are represented in the below right panel. Rs1884082 is located upstream of the TATA box of the gene within a promoter element described by Morgan *et al.* (21). The rs4934 is present in the second exon. Both SNPs have two alleles of similar frequencies (near 0.5, according to HapMap). The graphs compare observed and expected frequencies (calculated according to the frequencies observed in the control placentas), for the SNPs located (A) in the promoter (B) in Exon2.

DISCUSSION

SERPINA3 is a typical acute-phase protein. In a previous study, we have shown that the mRNA level of *SERPINA3* was induced in placentas from pathological pregnancies concomitantly with a hypomethylation of the 5' region of the gene. Such epigenetic modifications are now well documented in pathological placentas (31–36). However, most studies provide lists of disturbed profiles without further analysis of the mechanistic consequences of these anomalies on gene expression or physiopathology (37). Some authors have previously reported that a G/T polymorphism (rs1884082) located in the *SERPINA3* promoter influences its expression (21) and is associated with physiopathological processes, such as Alzheimer disease or cancer. Herein, we demonstrate for the first time the existence of a combinatorial influence of genetic and epigenetic factors in determining *SERPINA3* gene expression. DNA methylation appears to precondition the responsiveness of the promoter towards specific TFs. More specifically, the transactivation of the *SERPINA3* promoter by the ill-known ZBTB7B zinc-finger TF (also called c-KROX, and essentially known for its function in T cell commitment) follows a complex pattern that is both methylation- and allele-dependent which might impact physiology and physiopathology. In future studies, it would be interesting to develop a ZBTB7B-specific antibody suitable for supershift assays or chromatin IP that would permit to check whether there is a direct interaction of this factor with the *SERPINA3* promoter element. The bioinformatics, as well as the short time necessary for triggering the luciferase response, suggests nevertheless that the interaction may be probably direct.

By transfection of a *SERPINA3*-encoding vector in JEG-3 cells, we could observe that the cells are protected from apoptosis. Although this result is totally novel for this specific

protein, it has been shown that other SERPINS have an anti-apoptotic activity. For instance, PAI-1 (*SERPINE1*) has been shown in a fibrosarcoma cell model to induce resistance to chemotherapy-induced apoptosis (38). In the *SERPINA* clade itself, *SERPINA1* has been shown to protect pancreatic β -cells from apoptosis, by blocking apoptosis mediated by activation of CASPASE-3 (39). Recently, it has been shown that *SERPINA4* (aka Kallistatin) is able to moderate endothelial apoptosis by limiting the amount of reactive oxygen species, and suppressing tumour necrosis factor- α -induced apoptosis (40). Most interestingly, we have shown by proteomic analysis using the iTRAQ technology that *SERPINA4* is increased in the plasma of women affected by PE accompanied with IUGR, but not in isolated PE.

Considering our results, we propose a multistep scenario that recapitulates *SERPINA3* regulation in placental diseases (Fig. 7). We assume that in normal placenta, the *SERPINA3* promoter is methylated (26). At early stages of placental development (corresponding approximately to the first trimester of gestation in humans), the placenta is normally exposed to low ppO_2 (hypoxia), which probably induces the expression of TFs among which SP1 and ZBTB7B, that in turn can up-regulate *SERPINA3* expression at a specific time. Some TFs will transactivate both variants of the promoter (such as SP1 or MZF1) while ZBTB7B (and maybe others) will transactivate the G allele, but poorly transactivate the T allele. This lower responsiveness of the T variant may have functional effects such as inadequate apoptosis or inappropriate maintenance of cell–cell and cell–ECM adhesion which may delay acquisition of migratory and invasive properties of trophoblasts (a process constituting a cornerstone of placental diseases). While in the non-pathological cases, the ppO_2 will increase and set back *SERPINA3* expression to basal level, in the pathological placentas hypoxia is abnormally maintained. Abnormal maintenance of low oxygen pressure

Table 1. Case-Control study of two SNPs of SERPINA3 in different populations

	All subjects, matched on site ^a		French PE (± IUGR)		Los Angeles PE		PE + HELLP		Odds ratio (95% CI)
	Odds ratio (95% CI)	Controls	Cases	Odds ratio (95% CI)	Controls	Cases	Odds ratio (95% CI)	Controls	
Promoter rs1884082	1.00 (ref)	9 (20%)	17 (31%)	1.00 (ref)	97 (20%)	17 (31%)	1.00 (ref)	11 (20%)	47 (25%)
TT	1.05 (0.71; 1.57)	21 (48%)	24 (44%)	0.61 (0.22; 1.64)	55 (48%)	24 (44%)	0.99 (0.61; 1.63)	11 (48%)	97 (52%)
GT	0.71 (0.41; 1.22)	14 (32%)	14 (25%)	0.53 (0.18; 1.58)	14 (32%)	14 (25%)	0.71 (0.28; 1.18)	10 (32%)	41 (22%)
GG	0.69 (0.42; 1.13)	56%	47%	0.73 (0.30; 1.76)	25%	23%	0.71 (0.29; 1.75)	48%	48%
GG vs. TT/TG									
MAF									
Trend	$P = 0.34$			$P = 0.26$			$P = 0.26$		
AA	1.00 (ref)	20 (46%)	18 (32%)	1.00 (ref)	97 (20%)	17 (31%)	1.00 (ref)	10 (30%)	38 (21%)
AG	1.80 (1.06; 3.06)	16 (36%)	26 (46%)	1.81 (0.74; 4.40)	55 (48%)	24 (44%)	1.54 (0.53; 4.48)	11 (33%)	100 (54%)
GG	1.49 (0.86; 2.59)	8 (18%)	12 (21%)	1.67 (0.56; 5.00)	14 (32%)	14 (25%)	1.52 (0.54; 4.28)	12 (36%)	47 (25%)
AG/GG vs. AA	1.66 (1.01; 2.76)	36%	45%	1.76 (0.78; 0.98)	76%	79%	1.52 (0.55; 4.23)	53%	52%
MAF									
Trend	$P = 0.40$			$P = 0.27$			$P = 0.64$		

^aConditional logistic regression with site as grouping variable.

probably disturbs the cell differentiation program and thus can lead to modifications of the methylation landscape. Moreover, it has been shown that oxidative stress can trigger methylation changes. Therefore, anomalies of the ppO₂ probably lead to a progressive loss of methylation of the *SERPINA3* promoter. From then on, *SERPINA3* remains abnormally induced all along the pathological pregnancies. Contrary to the methylated promoter, the unmethylated T allele becomes accessible to TFs and reaches an even higher level of induction compared with the G allele especially in IUGR cases where *SERPINA3* inducers (SP1, MZF1 and ZBTB7B) are all significantly over-expressed. At mid-stage of placentation, when the second wave of invasion starts and the differentiated invasive extravillous cytotrophoblasts begins to secrete large amount of proteases to invade the maternal decidua, excessive amounts of SERPINA3 can have deleterious effects and might contribute to shallow invasion.

The genetic association study performed here has to be considered preliminary, given the limited number of placental samples that were available. Nevertheless, they have been checked on two different human populations and overall, the results, sustained by the *in vitro* experiments, comfort the idea that the T allele somehow increases the risk to develop placental diseases, especially IUGR. We did not found clear association of this SNP with PE. However, this may be explained by the co-existence of detrimental and advantageous effects of a strong SERPINA3 expression. SERPINA3 has anti-inflammatory and anti-apoptotic functions. Since maternal symptoms of PE are mainly triggered by the release of apoptotic syncytial debris and pro-inflammatory molecules in the blood flow, the abnormal up-regulation of SERPINA3 [also materialized by its increase in the maternal serum (25)] could induce compensatory effects that counterbalance PE symptoms. On the other hand, the G/A polymorphism (rs4934) located in the Exon2 of the gene was also found associated with placental diseases. The functional impact of this SNP remains to be investigated but it might influence protease targeting. The identification of detrimental and protective haplotypes using both SNP reinforces the idea that several *SERPINA3* SNPs intervene in the predisposition to the diseases and should be considered to evaluate the risk. The question of the high frequency of the T allele of the promoter in the Caucasian population (~50%) has to be envisaged in the context of balancing selection, since it can be supposed that in contexts outside placentation, a high level of expression of *SERPINA3* could constitute a significant advantage.

Our results add to the idea of the importance of SERPINA3 in the homeostasis of placental development and should encourage other teams to further investigate the predictive power of *SERPINA3* polymorphisms in placental diseases but also other pathologies in the double spectra of genetic haplotypes and DNA methylation of the promoter region.

MATERIALS AND METHODS

Patients and ethics

The French collection has already been described elsewhere (26,41). Placentas from normal and pathological pregnancies

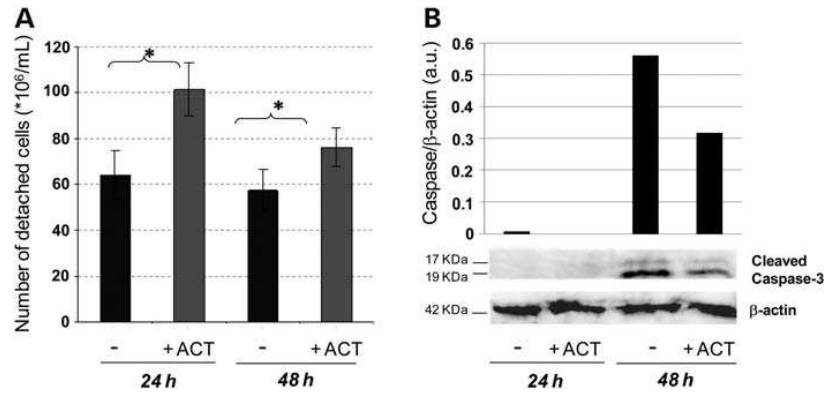


Figure 6. SERPINA3 overexpression results in a loss of adhesion of the JEG-3 cells and delay of apoptosis. Cells were collected in the supernatant of a JEG-3 cells culture, after transfection either by an expression vector encoding SERPINA3 (+ACT) or alternatively by an empty expression vector (-). (A) Cells found in the supernatant were counted in a Malassez cytometer. (B) Apoptotic status of detached cells was evaluated by western blot analysis of the protein extracts using anti-cleaved caspase-3 (monitoring apoptosis) and anti-β-actin antibodies (to check for the amount of protein in each extract).

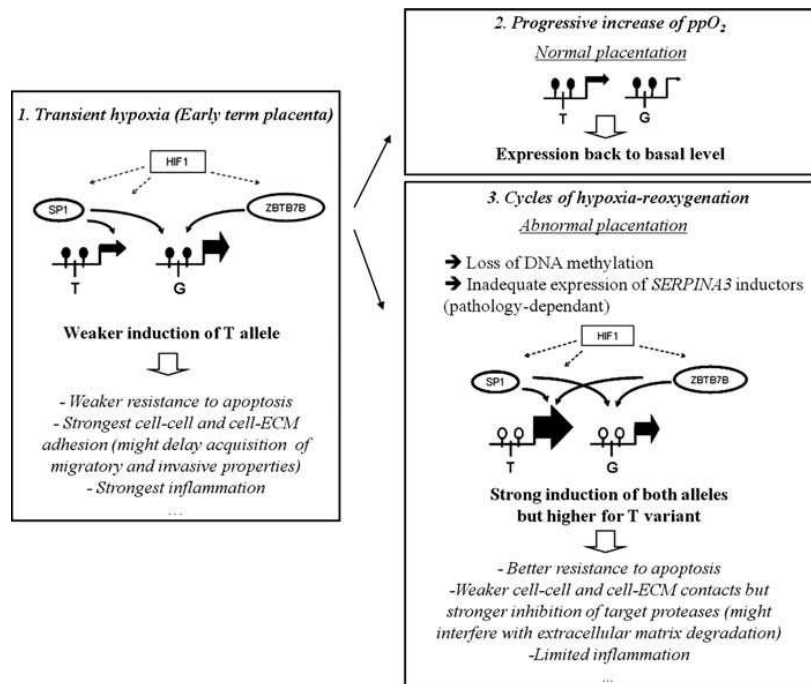


Figure 7. Putative scenario recapitulating the link between regulation of SERPINA3 promoter and placental diseases.

were collected after Caesarean delivery, before labor, from three maternities (Paris, France), following the indications of the Hôpital Cochin ethical committee CCPPRB (Comité Consultatif pour la Protection des Personnes participant à la Recherche Biomédicale). The samples of patients and controls included in the study were collected between 27–39 weeks and 37–39 weeks of gestation, respectively. We obtained signed informed consent with access to complete clinical data for each individual. The inclusion criteria used for PE patients were: systolic pressure >140 mmHg, diastolic pressure >90 mmHg and proteinuria ≥0.3 g/24 h. The

inclusion criteria used for IUGR were reduction in fetal growth during gestation with a birth weight below the 10th percentile. We classified the patients into three groups: (i) isolated PE (PE), (ii) PE associated with IUGR (PE + IUGR), and (iii) vascular IUGR (IUGR) when a notch was observed by Echo-Doppler in at least one uterine artery. Women who underwent caesarean surgery without suffering any disease during pregnancy formed the control group. Exclusion criteria included obesity, chronic hypertension, diabetes, renal diseases, multiple pregnancies and smoking habits.

Human material samples

Fragments from the placenta subchorial zone were dissected as previously described, systematically from caesarean sections, in order to avoid expression modifications induced by the labor (27,42). Most generally, we obtained the tissue fragments from two to three locations corresponding to different cotyledons, in order to correct for possible heterogeneities. Since RNA processing time is the most crucial factor to prepare placental RNA, we processed the samples in less than half an hour after the cesarean. A first fraction of chorionic villi was kept in TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) and frozen before RNA extraction. Total RNA was then extracted according to the manufacturer's protocol. RNA quality was controlled (precise integrity checks and sample quantitation) by Agilent bioanalyser 2100. Only samples with RNA integrity number >8 were kept, which was the case for >90%. Genomic DNA was extracted from the second fraction after mechanical grinding using an electric Ultra-turrax homogenizer, using a classical protocol (Phenol/Chloroform extraction followed by ethanol precipitation).

Genotyping

The study performed on French samples was based on PCR–restriction fragment length polymorphism assays. Specific PCRs on the promoter region or Exon2 were performed in a final volume of 10 µl containing 50 ng of DNA template, 0.1 units of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), 2 mM of MgCl₂ and 0.4 pmol of each primer. The amplification was started with an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of (95°C for 15 s, 55°C for 20 s and 72°C for 30 s). Then, the amplicons (121 and 96 bp for promoter and Exon2, respectively) were digested at 37°C overnight following direct addition of 30 µl of digestion mix containing either *Van9II* (Fermentas) for the promoter analysis or *BsuRI* (Fermentas) for the Exon2 analysis. For the promoter, the primers used were 5'-GGTCATTTCCAGTCC GAGAA-3' and 5'-GGATTTTCATGAATGCTGAGG-3'. For the Exon2, the primers were 5'-TCTGGCCCTCTGAGA CTTAAA-3' and 5'-AGCCGCCAAGAGCCCCAGG-3'. Note that in this case, the reverse primer is mutated to introduce a conditional restriction site for the restriction enzyme *BsuRI*. Digestion patterns were analyzed by electrophoresis in agarose gel.

Cell culture

JEG-3 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium Glutamax (Gibco-Invitrogen, CA, USA) supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum (Gibco-Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin, at 37°C in the presence of 5% CO₂. To analyze the effect of hypoxia on gene expression, cells were seeded in 60 mm diameter glass dishes, placed in a Lwoff chamber at 37°C and exposed to an oxygen-depleted atmosphere (2% O₂, 5% CO₂) or maintained as control at 37°C in humidified normal atmosphere (21% O₂–5% CO₂). Cells were then harvested for RNA extraction using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) at

3, 6, 12, 24, 36 and 48 h. The kinetics was done twice independently.

Quantitative RT–PCR conditions

Four micrograms of total DNase-treated RNA were reverse transcribed using the moloney murine leukemia virus cDNA synthesis kit (Invitrogen) according to a standardized protocol (42). Quantitative RT–PCR was carried out using 2 µl of a 10-fold dilution of the cDNA and 15 µl of mix containing amplification kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), MgCl₂ (4 mmol/l), BSA (0.05 g/l) and primers (10⁻³ mmol/l). The reactions were performed in a Light Cycler Thermocycler (Roche). Primers were designed from coding sequences (GenBank) using the PRIMER3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>). The different couples were chosen to amplify all described isoforms and aligned with BLAST software to avoid non-specific annealing. For SERPINA3, the primers were A3F: AGCAGTGGGGCTC TCAGTAA and A3R: ATAAGCAGACAGGGCCACAC. According to Ensembl, these primers are able to amplify robustly most of the protein-coding alternative transcript described in the Ensembl database (seven out of eight). The analysis of isoform-specific regulation was beyond the scope of our study, although it is an interesting question that could be raised in the future. The PCR program was 50°C for 120 s; 95°C for 120 s, followed by 35 cycles of three temperature steps (94°C for 5 s; 58°C for 10 s; 72°C for 15 s). Finally, samples were submitted to a progressive temperature elevation (from 65 to 99°C at 0.1°C/s), resulting in a melting curve, enabling to check the homogeneity of the PCR products. The products were then controlled by agarose gel electrophoresis. The Ct (threshold cycle number) values were collected with the LightCycler software (Roche) in the exponential phase of the PCR reaction. These Ct values were normalized to the Ct values obtained for expression of Succinate Dehydrogenase subunit A (*SDHA*) as a reference gene [previously shown to be stable and highly expressed in the placenta (43)] applying the $\Delta\Delta Ct$ method. Quantitative RT–PCR was carried out in duplicates for each point.

The primers used were: SDHA.F: 5'-TACAAGGTGCG GATTGATGA-3', SDHA.R: 5'-CAAAGGGCTTCTTCTGTT GC-3', SERPINA3.F: 5'-AGCAGTGGGGCTCTCAGTAA-3', SERPINA3.R: 5'-ATAAGCAGACAGGGCCACAC-3'; MZ F1.F: 5'-GAGGCTGCTGCCCTAGTAGA-3'; MZF1.R: 5'-G AGGGCTCCATCTTCTCTGA-3'; ZBTB7B.F: 5'-AGGCTT CCGGTGTTTCGATT-3'; ZBTB7B.R: 5'-GGTCGTAGCTG TGCAGGAAG-3'; SP1.F: GCACCTGCCCTACTGTAAA; SP1.R: 5'-TTGCCATACACTTTCCACACA-3'.

Plasmid constructs

The two promoter vectors (T and G alleles) were a kind gift from Drs Kalsheker and Morgan. MZF1, SP1 and ZBTB7B expression vectors were obtained from Origene. The SERPINA3 expressing vector was obtained from Invitrogen. The expression vector expressing the stabilized form of HIF1 α was a kind gift from Dr M. Celeste Simon. All plasmid preparations were made using the NucleoBond[®] PC 500 kit (Masherey Nagel). Methylated plasmids were obtained

by incubation of 5 µg of plasmid with the CpG methyltransferase *SssI* (New England Biolabs) during 4–6 h at 37°C according to the manufacturer's instructions, followed by DNA clean up (NucleoSpin Extract II kit, Mashery Nagel).

Luciferase assays

JEG-3 cells were seeded 24 h before transfection in 24-well plates at 30% of confluence. The cells were then transfected using the calcium phosphate method and rinsed the next day. A Renilla luciferase vector (pRL-RSV, Promega) was systematically co-transfected in all experiments to monitor transfection efficiency. Quantities of plasmid DNA used for transfections were total 1 µg per well, i.e. 590 ng of reporter luciferase, 400 ng of TF-expressing vector and 10 ng of pRL-RSV. Cells were harvested after 72 h. Transfection-induced cell mortality was taken into consideration. The day following transfection, the wells were rinsed in order to remove the dead cells and fresh medium was added. The cells were also rinsed before the cell lysis that preceded the luciferase measurement. The viability of the cells was checked under light microscope, without clear differences between the different transfections. In addition, the amount of proteins was quantified and not strongly altered by the transfections. By all means, the use of pRL-RSV as an internal control made it possible to take into consideration exclusively the viable transfected cells.

Transcriptional activity was assessed by the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Luminescence was measured using a Berthold Lumat LB9507 luminometer (EG&G Berthold). The experiments were performed at least twice independently with six replicates per experiment for each condition. The observed firefly activity was divided by the activity recorded from the Renilla luciferase vector, and the mean values of the replicates were calculated. These mean values were then divided by the mean values of the corresponding condition with the empty pGL3-Luc to obtain the fold induction compared with the empty vector. In the case where the constructs were methylated, each condition was compared with the one with empty methylated vector.

Western blot

JEG-3 cells were seeded 24 h prior to transfection on flasks of 25 cm². The cells were transfected in triplicate using either SERPINA3 expressing vector or empty vector using the calcium phosphate method and rinsed 24 h after transfection. Single transfections were performed using 5 µg of plasmid DNA/flask. Forty-eight hours after transfection, cells were scrapped directly in Laemmli buffer, sonicated for 20 s (three times), diluted in Laemmli buffer and then denatured for 10 min at 90°C. The protein concentrations were determined by the method of Bradford, using bovine serum albumin as standard. Equal amounts of proteins (25 µg) were resolved by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis on 8% gels and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Amersham). Molecular weight markers were run in parallel. Membranes were blocked with 5% non-fat milk in PBS/0.05% Tween-20 for 1 h, incubated overnight at 4°C with anti-cleaved caspase-3 (Asp 173)

primary antibodies together with a polyclonal antibody raised against human β-actin (ACTB) both diluted 1/1000 (Cell Signaling Technology) and 45 min with secondary antibody anti-rabbit IgG-peroxydase diluted 1/5000 (Amersham Life Science). The blots were developed with ECL reagents according to the manufacturer's guidelines (Amersham Biosciences) and visualized on Kodak X-ray films. Densitometric analysis was performed using the National Institutes of Health (NIH) Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) and allowed to normalize the intensity of the signal to β-actin in the samples studied.

Statistical analysis

Statistics were systematically performed using the StatistiXL add-in, and by full factorial analysis of variance, followed by *post hoc* Student–Neumann–Keuls *t*-test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

TF analysis

Putative TF binding sites inside the promoter were identified using the MatInspector function of the Genomatix software (<http://genomatix.de>).

Conflict of Interest statement. None declared.

REFERENCES

- Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W. *et al.* (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.*, **276**, 33293–33296.
- Whisstock, J.C. and Bottomley, S.P. (2006) Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16**, 761–768.
- Poller, W., Faber, J.P., Weidinger, S., Tief, K., Scholz, S., Fischer, M., Olek, K., Kirchgesser, M. and Heidtmann, H.H. (1993) A leucine-to-proline substitution causes a defective alpha 1-antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease. *Genomics*, **17**, 740–743.
- Travis, J., Bowen, J. and Baugh, R. (1978) Human alpha-1-antichymotrypsin: interaction with chymotrypsin-like proteinases. *Biochemistry*, **17**, 5651–5656.
- Christensson, A., Laurell, C.B. and Lilja, H. (1990) Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 755–763.
- Frenette, G., Deperthes, D., Tremblay, R.R., Lazure, C. and Dube, J.Y. (1997) Purification of enzymatically active kallikrein hK2 from human seminal plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, **1334**, 109–115.
- Hakansson, H.O. and Ohlsson, K. (1988) Interactions in vitro and in vivo between human and porcine cationic pancreatic elastase and plasma protease inhibitors. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, **369**, 309–315.
- Horvath, A.J., Irving, J.A., Rossjohn, J., Law, R.H., Bottomley, S.P., Quinsey, N.S., Pike, R.N., Coughlin, P.B. and Whisstock, J.C. (2005) The murine orthologue of human antichymotrypsin: a structural paradigm for clade A3 serpins. *J. Biol. Chem.*, **280**, 43168–43178.
- Beatty, K., Bieth, J. and Travis, J. (1980) Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *J. Biol. Chem.*, **255**, 3931–3934.
- Han, Y.P., Yan, C. and Garner, W.L. (2008) Proteolytic activation of matrix metalloproteinase-9 in skin wound healing is inhibited by alpha-1-antichymotrypsin. *J. Invest. Dermatol.*, **128**, 2334–2342.
- Selak, M.A., Chignard, M. and Smith, J.B. (1988) Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem. J.*, **251**, 293–299.

12. Weir, M.R. and Dzau, V.J. (1999) The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am. J. Hypertens.*, **12**, 205S–213S.
13. Chertov, O., Ueda, H., Xu, L.L., Tani, K., Murphy, W.J., Wang, J.M., Howard, O.M., Sayers, T.J. and Oppenheim, J.J. (1997) Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J. Exp. Med.*, **186**, 739–747.
14. Bird, P.I. (1999) Regulation of pro-apoptotic leucocyte granule serine proteinases by intracellular serpins. *Immunol. Cell Biol.*, **77**, 47–57.
15. Jinawath, N., Vasoontara, C., Jinawath, A., Fang, X., Zhao, K., Yap, K.L., Guo, T., Lee, C.S., Wang, W., Balgley, B.M. *et al.* (2010) Oncoproteomic analysis reveals co-upregulation of RELA and STAT5 in carboplatin resistant ovarian carcinoma. *PLoS ONE*, **5**, e11198.
16. Lai, M.L., Rizzo, N., Liguori, C., Zucca, G. and Faa, G. (1998) Alpha-1-antichymotrypsin immunoreactivity in papillary carcinoma of the thyroid gland. *Histopathology*, **33**, 332–336.
17. Matsuzaki, S., Iwamura, K., Itakura, M., Kamiguchi, H. and Katsunuma, T. (1981) A clinical evaluation of serum alpha-1-antichymotrypsin levels in liver disease and cancers. *Gastroenterol. Jpn.*, **16**, 582–591.
18. Estelles, A., Gilibert, J., Grancha, S., Yamamoto, K., Thinnis, T., Espana, F., Aznar, J. and Loskutoff, D.J. (1998) Abnormal expression of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue factor in severe preeclampsia. *Thromb. Haemost.*, **79**, 500–508.
19. Lomas, D.A. and Carrell, R.W. (2002) Serpinopathies and the conformational dementias. *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 759–768.
20. Gooptu, B. and Lomas, D.A. (2009) Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 147–176.
21. Morgan, K., Licastro, F., Tilley, L., Ritchie, A., Morgan, L., Pedrini, S. and Kalsheker, N. (2001) Polymorphism in the alpha(1)-antichymotrypsin (ACT) gene promoter: effect on expression in transfected glial and liver cell lines and plasma ACT concentrations. *Hum. Genet.*, **109**, 303–310.
22. Ritchie, A., Morgan, K. and Kalsheker, N. (2004) Allele-specific overexpression in astrocytes of an Alzheimer's disease associated alpha-1-antichymotrypsin promoter polymorphism. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **131**, 88–92.
23. Zeng, H., Yu, H., Lu, L., Jain, D., Kidd, M.S., Saif, M.W., Chanock, S.J., Hartge, P. and Risch, H.A. (2011) Genetic effects and modifiers of radiotherapy and chemotherapy on survival in pancreatic cancer. *Pancreas*, **40**, 657–663.
24. Blumenstein, M., McMaster, M.T., Black, M.A., Wu, S., Prakash, R., Cooney, J., McCowan, L.M., Cooper, G.J. and North, R.A. (2009) A proteomic approach identifies early pregnancy biomarkers for preeclampsia: novel linkages between a predisposition to preeclampsia and cardiovascular disease. *Proteomics*, **9**, 2929–2945.
25. Auer, J., Camoin, L., Guillonnet, F., Rigourd, V., Chelbi, S.T., Leduc, M., Laparre, J., Mignot, T.M. and Vaiman, D. (2010) Serum profile in preeclampsia and intra-uterine growth restriction revealed by iTRAQ technology. *J. Proteomics*, **73**, 1004–1017.
26. Chelbi, S.T., Mondon, F., Jammes, H., Buffat, C., Mignot, T.M., Tost, J., Busato, F., Gut, I., Rebourcet, R., Laissue, P. *et al.* (2007) Expressional and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia. *Hypertension*, **49**, 76–83.
27. Vaiman, D., Mondon, F., Garcés-Duran, A., Mignot, T.M., Robert, B., Rebourcet, R., Jammes, H., Chelbi, S.T., Quetin, F., Marceau, G. *et al.* (2005) Hypoxia-activated genes from early placenta are elevated in preeclampsia, but not in intra-uterine growth retardation. *BMC Genomics*, **6**, 111.
28. Jauniaux, E., Gulbis, B. and Burton, G.J. (2003) Physiological implications of the materno-fetal oxygen gradient in human early pregnancy. *Reprod. Biomed. Online*, **7**, 250–253.
29. Burton, G.J. and Jauniaux, E. (2004) Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, **11**, 342–352.
30. Baker, C., Belbin, O., Kalsheker, N. and Morgan, K. (2007) SERPINA3 (aka alpha-1-antichymotrypsin). *Front. Biosci.*, **12**, 2821–2835.
31. Chelbi, S.T. and Vaiman, D. (2008) Genetic and epigenetic factors contribute to the onset of preeclampsia. *Mol. Cell Endocrinol.*, **282**, 120–129.
32. Maccani, M.A. and Marsit, C.J. (2009) Epigenetics in the placenta. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **62**, 78–89.
33. Novakovic, B., Sibson, M., Ng, H.K., Manuelpillai, U., Rakyán, V., Down, T., Beck, S., Fournier, T., Evain-Brion, D., Dimitriadis, E. *et al.* (2009) Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface. *J. Biol. Chem.*, **284**, 14838–14848.
34. Bellido, M.L., Radpour, R., Lapaire, O., De Bie, I., Hosli, I., Bitzer, J., Hmadcha, A., Zhong, X.Y. and Holzgreve, W. (2010) MALDI-TOF mass array analysis of RASSF1A and SERPINB5 methylation patterns in human placenta and plasma. *Biol. Reprod.*, **82**, 745–750.
35. Nelissen, E.C., van Montfoort, A.P., Dumoulin, J.C. and Evers, J.L. (2010) Epigenetics and the placenta. *Hum. Reprod. Update*, **17**, 397–417.
36. Chelbi, S.T., Doridot, L., Mondon, F., Dussour, C., Rebourcet, R., Busato, F., Gascoin-Lachambre, G., Barbaux, S., Rigourd, V., Mignot, T.M. *et al.* (2011) Combination of promoter hypomethylation and PDX1 overexpression leads to TBX15 decrease in vascular IUGR placentas. *Epigenetics*, **6**, 247–255.
37. Yuen, R.K., Penaherrera, M.S., von Dadelszen, P., McFadden, D.E. and Robinson, W.P. (2010) DNA methylation profiling of human placentas reveals promoter hypomethylation of multiple genes in early-onset preeclampsia. *Eur. J. Hum. Genet.*, **18**, 1006–1012.
38. Goldenberg, R.L., Culhane, J.F., Iams, J.D. and Romero, R. (2008) Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*, **371**, 75–84.
39. Zhang, B., Lu, Y., Campbell-Thompson, M., Spencer, T., Wasserfall, C., Atkinson, M. and Song, S. (2007) Alpha-1-antitrypsin protects beta-cells from apoptosis. *Diabetes*, **56**, 1316–1323.
40. Shen, B., Gao, L., Hsu, Y.T., Bledsoe, G., Hagiwara, M., Chao, L. and Chao, J. (2010) Kallistatin attenuates endothelial apoptosis through inhibition of oxidative stress and activation of Akt-eNOS signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **299**, H1419–H1427.
41. Gascoin-Lachambre, G., Buffat, C., Rebourcet, R., Chelbi, S.T., Rigourd, V., Mondon, F., Mignot, T.M., Legras, E., Simeoni, U., Vaiman, D. *et al.* (2010) Cullins in human intra-uterine growth restriction: expressional and epigenetic alterations. *Placenta*, **31**, 151–157.
42. Mondon, F., Mignot, T.M., Rebourcet, R., Jammes, H., Danan, J.L., Ferre, F. and Vaiman, D. (2005) Profiling of oxygen-modulated gene expression in early human placenta by systematic sequencing of suppressive subtractive hybridization products. *Physiol. Genomics*, **22**, 99–107.
43. Meller, M., Vadachkoria, S., Luthy, D.A. and Williams, M.A. (2005) Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta*, **26**, 601–607.

ANNEXE 6

COMBINATION OF PROMOTER HYPOMETHYLATION AND PDX1 OVEREXPRESSION LEADS TO TBX15 DECREASE IN VASCULAR IUGR PLACENTAS

**(Accepté pour publication dans Epigenetics en septembre
2010, publié en février 2010)**

Combination of promoter hypomethylation and PDX1 overexpression leads to *TBX15* decrease in vascular IUGR placentas

Sonia T. Chelbi,^{1,2} Ludivine Doridot,^{1,2,†} Françoise Mondon,^{1,2,†} Chloé Dussour,³ Régis Rebourcet,^{1,2} Florence Busato,⁶ Géraldine Gascoin-Lachambre,^{1,2,4} Sandrine Barbaux,^{1,2} Virginie Rigourd,^{1,2,5} Thérèse-Marie Mignot,^{1,2} Jörg Tost⁶ and Daniel Vaiman^{1,2,*}

¹Institut Cochin; Université Paris Descartes; CNRS (UMR 8104); ²Inserm; U1016; ³Service de Gynécologie-Obstétrique et Médecine de la Reproduction; Hôpital Tenon; AP-HP; ⁴Service de Médecine Néonatale de Port-Royal; Groupe Hospitalier Cochin-Saint-Vincent-de-Paul; AP-HP; Université Paris Descartes; ⁵Institut de Puériculture de Paris; Paris; ⁶Laboratoire d'Épigénétique; Centre National de Génotypage; CEA; Institut de Génétique; Evry, France

[†]These authors contributed equally to this work.

Key words: placenta, preeclampsia, intra-uterine growth restriction, placental diseases, lipid metabolism

Abbreviations: CUL7, cullin 7; HELLP, hemolytic anemia elevated liver enzymes low platelet count; IUGR, intra-uterine growth restriction; MSAP-PCR, methylation sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction; PCR, polymerase chain reaction; PDX1, pancreatic and duodenal homeobox protein 1; PE, preeclampsia; SERPINA3, serine protease inhibitor A3; *TBX15*, T-box transcription factor 15; vIUGR, vascular intra-uterine growth restriction; RLU, relative light unit

Preeclampsia (PE) and vascular intra-uterine growth restriction (vIUGR) are two pathological obstetrical conditions originating from placental dysfunction. Recently, methylation changes at the placental level have been shown to be indicative of these diseases. The alteration of such epigenetic marks is therefore a novel pathway that might be critical for these pathologies. Here, we identified a region located in the distal promoter of the T-box-containing transcription factor *TBX15* that is differentially methylated in pathological placentas. The level of methylation correlated significantly with the weight and stature of the newborn. The promoter was found to be hypomethylated in vIUGR coinciding with the downregulation of its expression. PDX1, a transcription factor important for the regulation of insulin metabolism regulation was able to repress the *TBX15* promoter in a methylation-dependent manner, which might, at least partially, explain the specific mRNA decrease of *TBX15* observed in vIUGR placentas. Overall, the data presented herein suggest that *TBX15* might be involved in the pathophysiology of placental diseases.

Introduction

Preeclampsia (PE) is a multisystemic disorder affecting up to 10% of pregnancies.¹ Clinically, PE is characterized by maternal pregnancy-induced hypertension combined with proteinuria. This disease can lead to life-threatening clinical conditions such as Hemolytic anemia, elevated liver enzymes and low platelets counts (HELLP syndrome) or eclampsia (seizures). Intra-uterine growth restriction (IUGR) refers to a condition in which “a fetus fails to reach his potential growth.”² IUGR is clinically suspected when ultrasonographic estimates of fetal size, symmetry or weight appear abnormal. Doppler studies of maternal and fetal circulations allow differentiating vascular IUGRs (vIUGR) secondary to placental dysfunction or maternal vascular disease, such as PE, from those secondary to aneuploidy, genetic syndromes or intra-uterine infections. Both PE and IUGR are important causes of perinatal materno-fetal mortality and morbidity.³ They are also responsible for iatrogenic prematurity subsequent to Caesarean

extraction and for low birth weight of the newborns, thus contributing to an increased risk of developing metabolic syndrome during adulthood.⁴

At the pathophysiological level, PE and vIUGR start at early stages of placentation, when invasive extravillous cytotrophoblasts fail to invade deeply into the uterine spiral arteries.⁵ This shallow invasion limits arterial remodeling at the fetomaternal interface, leading to intermittent vascular flow, hypoxia-reoxygenation injuries,⁶ localized ischemic lesions and oxidative stress.⁷ It has been suggested that the release of placental debris, microparticles,⁸ and molecules secreted into the maternal blood flow might be responsible for the maternal response triggering systemic inflammation, endothelial lesions and subsequent symptoms.⁹ In addition, vIUGR can be attributed to a reduction of the vascular flow towards the fetus interfering with the fetal growth.

DNA methylation, a stable epigenetic mark, plays an important role in development, genomic imprinting, regulation of

*Correspondence to: Daniel Vaiman; Email: daniel.vaiman@inserm.fr
Submitted: 08/11/10; Accepted: 09/29/10
DOI: 10.4161/epi.6.2.13791

chromatin structure, regulation of gene expression and altered DNA methylation patterns have been repeatedly associated with a number of diseases.¹⁰ We have previously shown that the promoters of *CUL7* and *SERPINA3* display altered DNA methylation profiles in placentas from PE and vIUGR patients that correlated with transcriptional deregulation of the respective gene when compared to controls.^{11,12} A recent study demonstrated that this phenomenon might be widespread as human placentas harbor promoter hypomethylation of multiple genes in PE.¹³ Therefore, the identification of epigenetic markers has become a novel molecular alteration that might be critical for the characterization and understanding of these diseases. Furthermore, it may provide an alternative approach for non-invasive presymptomatic diagnosis of pregnancies at risk to develop these life threatening conditions.

Applying methylation-sensitive arbitrarily primed PCR (MSAP PCR) experiments, we identified a region located in the vicinity of *TBX15*. Recently, Gesta and coworkers have demonstrated that this developmental gene is a major actor regulating lipid amount and distribution in human and mice.¹⁴ Various studies have shown alterations of the lipid status of the mother, fetus and placenta in vIUGR and PE.¹⁵⁻¹⁸ Furthermore, lipid peroxides are considered as important precursors of the inflammatory mechanisms involved in these diseases.¹⁹⁻²¹ Therefore, we initiated a study aiming at understanding the transcriptional regulation of this ill-known transcription factor in the context of placental diseases. This led to the identification of a region located in the distal promoter of *TBX15* that is differentially methylated in pathological placentas. Interestingly, hypomethylation was correlated with the low weight and size of newborns. Using JEG-3 cells, we showed that this region modulates the transcriptional activity of *TBX15*, which is repressed by PDX1 overexpression in a methylation-dependent manner. Since PDX1 has been shown to be overexpressed in vIUGR placentas, this might explain, at least partially, the specific decrease of *TBX15* mRNA in these placentas.

Results

Identification of a 5'-flanking region of *TBX15* that is hypomethylated in pathological placentas. A fragment of approximately 800 base pairs with genomic sequence located 2.8 kb upstream of the *TBX15* transcription start site (NM_152380.2) was identified using methylation-sensitive arbitrarily primed (MSAP) PCR. In these experiments that compared pooled placental DNAs from early onset PE, PE+IUGR, vIUGR and controls, bands corresponding to a methylated fragment upstream the *TBX15* gene were detected in samples originating from controls, PE and PE+IUGR (Fig. 1A). Interestingly, following digestion with *HpaII* (a methylation sensitive enzyme that is blocked if the CCGG restriction site is methylated), the signal was reduced compared to the reference (i.e., PCR following *AluI* digestion) in PE and PE+IUGR samples while it was apparently absent in vIUGR. Then clone sequencing was performed on PCR products from PE and vIUGR sample used in MSAP PCR (Fig. 1B), which comforted the MSAP PCR experiments and

strongly suggested that this 5'-flanking region of *TBX15* is hypomethylated in pathological placentas compared to controls, particularly in vIUGR cases.

Confirmation of hypomethylation of the 5'-flanking region of *TBX15* in pathological placentas. To validate and refine the DNA methylation alterations affecting this region, pyrosequencing was carried out on a larger set of individual placental DNAs from normal (n = 15) and pathological pregnancies (16 PE, 16 PE+IUGR and 16 vIUGR). Bisulfite pyrosequencing of two consecutive amplification products enabled us to analyze a region spanning 39 CpG sites (genomic position 10643532–10644222 on chromosome 1) and showed that this region was significantly hypomethylated in early onset PE, PE+IUGR and vIUGR placentas when compared to controls (paired Student's t-test, $p = 10^{-8}$, 10^{-3} and 10^{-16} , respectively, see Table 1). The difference was especially marked on specific CpG dinucleotides (Fig. 2). Overall, the results obtained by pyrosequencing confirmed the results of the MSAP PCR assay with an increased DNA hypomethylation in vIUGR samples compared to PE and PE+IUGR samples. No significant correlation between methylation level and placental or maternal age was found whereas methylation level significantly correlated with the stature ($R = 0.44$, $p = 0.007$) and weight ($R = 0.38$, $p = 0.004$) of the newborns (see Table 1 and Fig. 3). Thus, the diminution of methylation in pathological placentas might be attributed to the disease and might be linked with fetal growth. To the best of our knowledge, this is one of the first examples demonstrating that the degree of methylation of a DNA region is correlated with a complex phenotypic trait.

***TBX15* mRNA level is significantly reduced in vIUGR placentas.** Quantitative RT-PCR was performed on cDNAs samples from control (n = 14) and pathological placentas (14 PE, 5 PE+IUGR, 8 vIUGR). Although placentas from isolated PE were hypomethylated in the 5'-flanking region of the CpG containing element, the mRNA level of *TBX15* was not significantly different in this group compared to controls (Fig. 4). However, the level of *TBX15* mRNA was reduced about two-fold in PE+IUGR and 1.8-fold in vIUGR cases ($p = 0.01$ and $p = 0.02$, respectively). Variations of *TBX15* expression were not correlated with placental age in our samples. In concordance, microarray data from Winn and co-workers showed that *TBX15* expression is stable between 14 and 40 weeks in normal placentas.²²

The 5'-hypomethylated region is a promoter element repressed by the PDX1 transcription factor. The differentially methylated region isolated by MSAP PCR is a CpG island containing element (Fig. 1C) strongly predicted as a promoter region by bioinformatics (according to PROSCAN v1.7 software,²³ score = 82.1). Thus, we wanted to further investigate whether DNA hypomethylation was responsible for the decrease of *TBX15* mRNA level in vIUGR. The JEG-3 cell line, a good model of trophoblast cells²⁴⁻²⁶ was found to be a suitable model system as it displayed a similar DNA methylation patterns in the region of interest. When cells were treated with 5-aza-2'-deoxycytidine, *TBX15* mRNA was decreased about five-fold after exposure to the demethylating agent (Fig. 5). This decrease of expression after demethylation could probably result either from the influence of DNA methylation on the binding of transcriptional regulator(s)

of *TBX15* and/or from downstream effects of the demethylation treatment. Even though the correlation between transcriptional silencing coinciding with hypomethylation is less frequently observed, this result was in concordance with the decrease of *TBX15* expression observed in PE+IUGR and vIUGR placental samples.

To test the biological activity of the differentially methylated region, a 998 bp fragment (-3,372 to -2,374 from *TBX15* TSS, NM_152380.2) was cloned upstream of the firefly Luciferase reporter gene. This p*TBX15*-Luc construct was transiently transfected (along with the internal normalizing plasmid pRL-RSV) into JEG-3 cells and induced a significant increase (-2.5-fold, $p < 10^{-5}$) of luciferase activity when compared to the control (empty pGL3enh-Luc vector, Fig. 6). This confirmed that the differentially methylated region has the properties of a functional promoter. The content of putative transcription factor binding sites was further analyzed with the MatInspector tool (Genomatix™). The differentially methylated region included two putative binding sites for the transcription factor PDX1 (see Fig. 1C), which we have previously found to be specifically increased in human placentas from vIUGR and PE+IUGR pregnancies.²⁷ To assess any possible effects of PDX1 expression on the transcriptional activity of *TBX15*, a series of transactivation assays with p*TBX15*-Luc in the presence or absence of PDX1 was carried out. PDX1 overexpression resulted in a 1.6-fold inhibition of the p*TBX15*-Luc transcription ($p < 10^{-2}$, Fig. 6). Thus, PDX1 probably acts as a repressor on this promoter. We can assume that the PDX1 overexpression observed in vIUGR and PE+IUGR placentas (but not in PE) could explain, at least partially, the concomitant specific decrease of *TBX15* mRNA.

The promoter response to PDX1 transcription factor is methylation-dependent. We further investigated the influence of DNA methylation on the repression of PDX1 on *TBX15*. Luciferase assays were performed with *SssI*-methylated p*TBX15*-Luc and pGL3enh-Luc constructs (Fig. 6). The methylation of p*TBX15*-Luc resulted in a moderate decrease of activity compared to the unmethylated p*TBX15*-Luc (-1.4-fold, $p = 0.04$). This might explain that *TBX15* expression was not sharply modified in PE cases despite DNA hypomethylation. Interestingly, PDX1 overexpression induced a stronger repression of the methylated p*TBX15*-Luc compared to the unmethylated construct and led

to a more important decrease of transcription (1.8-fold) to background level. These results revealed that PDX1 trans-repression is methylation-dependent. Overall, it suggested that in near-term placentas from vIUGR and PE+IUGR pregnancies there are

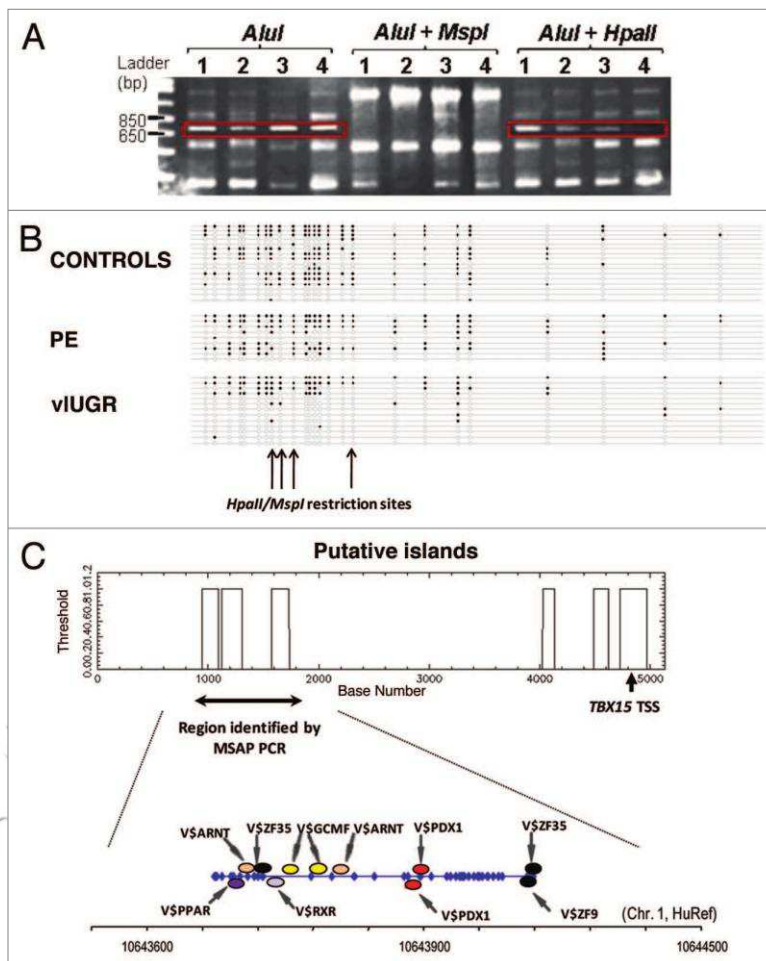
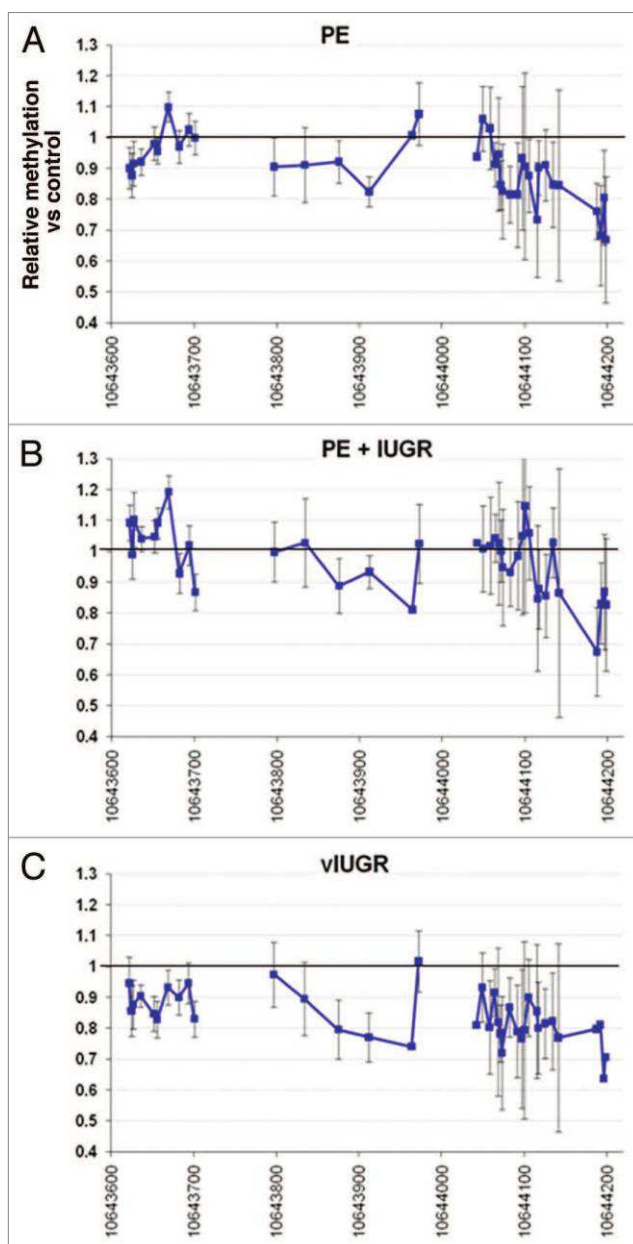


Figure 1. MSAP PCR results. (A) PCR products are visualized after MSAP PCR by electrophoresis on a 4% agarose gel. 1: Controls, 2: PE, 3: PE+IUGR, 4: vIUGR, Ladder = 1 kb plus (Invitrogen). The band of interest that was cloned for sequencing is highlighted by the red boxes. When DNA was digested with *AluI* only, serving as PCR control, bands are present in all samples. *MspI* and *HpaII* are isoschizomers that recognize the sequence CCGG but *HpaII* is blocked by cytosine methylation, while *MspI* is not sensitive to methylation. As expected for samples digested with *MspI*, the bands disappeared. For *HpaII* enzymatic digestion, the band signals were variable according to the disease status and suggested a DNA hypomethylation in pathological placentas. (B) Results of clone sequencing of PCR products from PE and vIUGR samples used for MSAP PCR. The analysis concerned the 5'-part of the region identified which contained the *HpaII* restriction sites (primers are indicated as arrows in C). Data were analyzed using BiQ-analyzer software.⁴⁵ Methylated CpG are shown as solid circles; unmethylated CpG are shown as open circles. (C) The DNA fragment localized by MSAP PCR is determined to be a putative CpG island. The line indicates the region analyzed by pyrosequencing, and each dot corresponds to a CpG. Bioinformatic analysis revealed several putative binding sites among which binding sites for factors crucial for placental development such as V\$GCMF (GCM1, Glial Cell Missing 1), V\$RXR (Retinoid X receptors), V\$PPAR (peroxisome proliferator activated receptors) and V\$ARNT (HIF, hypoxia inducible factor), Zing finger proteins (V\$ZF9, V\$ZF35) as well as for the transcription factor PDX1.

Table 1. The analysis was carried out by two-factors ANOVA (the two factors being the CpG and the pathological status)

	Placental age, Weeks of amenorrhea (mean ± SD)	Maternal age, Years (mean ± SD)	Weight of newborn kg (mean ± SD)	Stature of newborn cm (mean ± SD)	Methylated CpG % (mean ± SEM)
Controls	38.99 ± 1.48	34.40 ± 4.88	3462 ± 682.4	49.36 ± 2.90	42.03 ± 1.87
PE	31.75 ± 1.98	33.60 ± 6.07	1492 ± 367.7	39.14 ± 5.99	37.00 ± 1.36***
PE+IUGR	34.24 ± 3.68	33.20 ± 5.76	1784 ± 460.2	43.38 ± 2.14	38.62 ± 2.21***
vIUGR	33.78 ± 3.21	29.57 ± 4.61	1577 ± 484.8	40.94 ± 2.34	34.56 ± 1.86***

The results were as expected highly significant for the CpG islands ($p = 3.43 \cdot 10^{-70}$), as well as for the pathological status ($p = 3.99 \cdot 10^{-23}$), using the rest of the variance as residual. The analysis was then carried out by a Student's paired t-test CpG per CpG, between each pathology and the control (** in the table). The comparisons between pathological situations yielded also significant values ($p < 1 \times 10^{-5}$, except for the comparison between PE and PE+IUGR, $p = 0.037$). *** $p < 0.001$, paired Student's t-test compared to controls.



complex intertwined mechanisms between DNA methylation and the transcription factor context.

Discussion

We identified a 5'-flanking region of *TBX15* that was hypomethylated in all pathological placentas. The level of hypomethylation was quantitative and variable. It is probable that the varying degrees of methylation that were observed in pathological placentas either reflect the epigenetic heterogeneity between the cell types of the placental villi or reflects a complex spectrum of epigenetic changes occurring in placental diseases.

At expression level, albeit the level of *TBX15* mRNA tends to be increased, it was not significantly different in near-term placentas from isolated PE compared to controls, while vIUGR alone or co-existing with PE demonstrated a significant decrease of *TBX15* expression. This discrepancy between PE and vIUGR (with or without PE) might be explained by the fact that the promoter region driving the expression of *TBX15* is repressed by the PDX1 transcription factor, which is not altered in isolated PE. This would be in concordance with a previous study which suggested that PDX1 is an important conserved mediator of transcriptional alterations in IUGR placentas.²⁷ We did not investigate whether the effect of PDX1 on this promoter was direct or not, but the bioinformatic analysis as well as the short time of transfection indicated that PDX1 probably acts directly. The PDX1 binding site itself does not include any CpG dinucleotide, but some studies have shown that the trans-effect of PDX1 is dependent on the physical accessibility ("chromatin structure") of potential downstream target genes.²⁸ Thus, we can hypothesize that since DNA methylation also modifies the conformation of DNA molecules it may influence the binding of PDX1. The trans-effect of PDX1 is also dependent on the nature of

Figure 2. Pyrosequencing results at various CpG dinucleotides obtained for the region upstream *TBX15* TSS. Results are represented as relative methylation levels for pathological placentas for (A) PE, $n = 16$; (B) PE+IUGR, $n = 16$, (C) vIUGR, $n = 16$ compared to controls ($n = 15$). Data are shown as mean ± SE. Pyrosequencing experiments validated the MSAP PCR results and showed that some CpG sites are specifically affected by DNA hypomethylation.

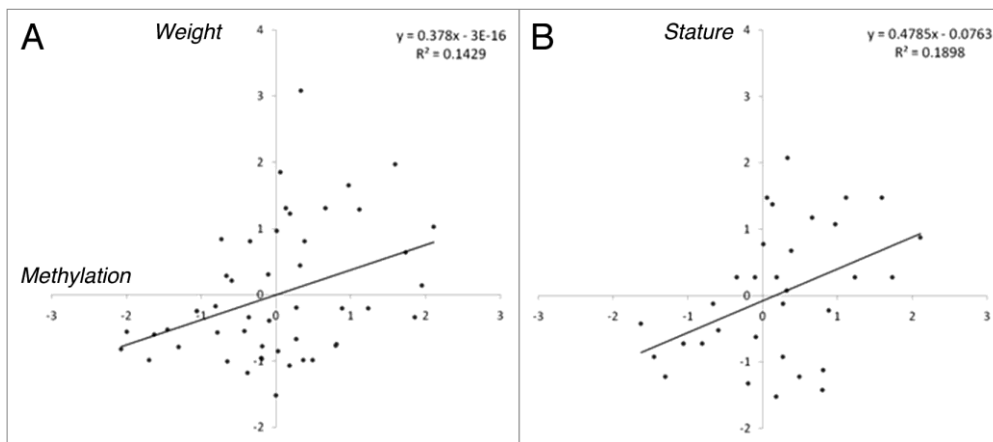


Figure 3. Linear regression plot between methylation and weight (A) or stature (B) of the newborn. Values were submitted to standardization before linear regression analysis (first the mean has been subtracted, and then the value was divided by the standard deviation). Size and stature of newborns were significantly correlated to DNA methylation level.

the transcriptional protein complexes formed by PDX1.^{29,30} Thus if methylation interferes with the binding of some partners of PDX1 inside the protein complex, it may explain the observed methylation-dependent effect. However, we cannot rule out an indirect effect of PDX1 which might be acting on upstream methylation sensitive transcription factor(s) regulating the promoter of *TBX15*.

Our results demonstrate that DNA methylation does not act as a simple “ON-OFF system” on this distal promoter but rather modulates its response to transcription factors, at least to PDX1. Basically, the *TBX15* promoter identified has a positive effect on expression as shown on the first part of **Figure 6**. Overexpression of PDX1 diminishes this positive effect. When the promoter is demethylated, this decrease is significant but the expression is above the basal level. When the promoter is methylated, PDX1 abolishes the pro-transcriptional activity of the promoter (**Fig. 6**, fourth panel). We saw that in small newborns (for instance in cases of IUGR), there is a demethylation of the promoter (**Fig. 3**), and thus the negative effect of PDX1 is possible but still maintaining expression of *TBX15*. In normal placentas, where PDX1 is not normally overexpressed, the *TBX15* promoter is methylated without PDX1 and then the expression profile is that of the third part of **Figure 6**. It is striking that the second and third part of this figure are almost identical. This means that playing with *TBX15* methylation and PDX1 overexpression, the placenta maintain a constant expression level of *TBX15* suggesting the need of a clear regulation of the expression of this gene.

TBX15 is a member of the T-box transcription factors family known to be involved in the regulation of developmental processes. For example, Eomesodermin (TBR2), a member of this family, has a prominent role in mouse trophoblast development.³¹ Until now, *TBX15* has mostly been described for its implication in skeletal morphogenesis.^{32,33} Nevertheless, *Tbx15* has been shown to be expressed in stem cell lines derived from trophoctoderm during early mouse development.³⁴ It has also been shown that *Tbx15* interacts with *Tle3*,³⁵ inside the *Notch*

signaling pathway. This pathway is known for its key role in modulating the balance between proliferation and differentiation throughout development.³⁶ In humans, several reports emphasize the relevance of the *Notch* pathway in normal³⁷ and pathological

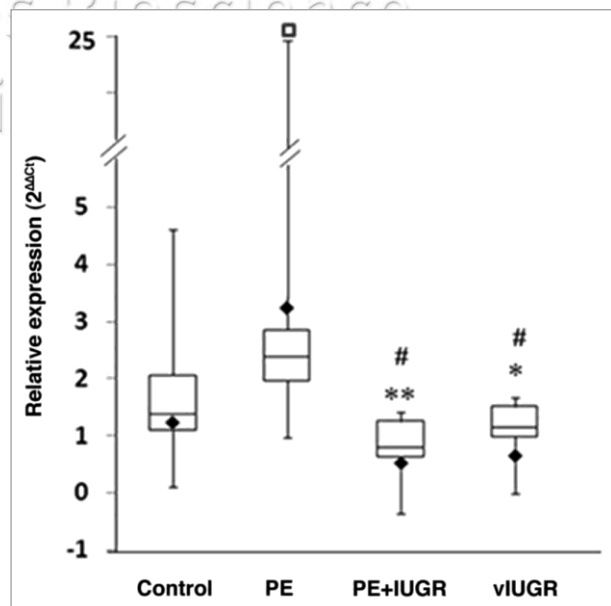


Figure 4. Quantitative RT-PCR of *TBX15* gene on normal (n = 7) and pathological placentas (PE n = 9, PE+IUGR n = 8, vIUGR n = 5). The expression level was normalized using *SDHA* as reference gene. Then the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was calculated for each sample. The box and whiskers plot represent the median value with 50% of the data within the box. The mean value is indicated by the black diamond and the outlier by a square. The whiskers extend to the fifth and ninety-fifth percentiles. Significantly different from control: *p < 0.05 **p < 0.01. Significantly different from PE: (#). *TBX15* expression is significantly reduced in placentas from PE+IUGR and vIUGR.

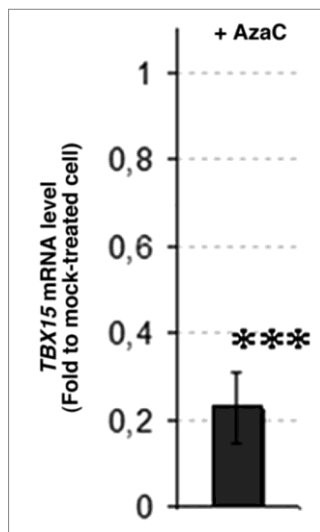


Figure 5. Quantitative RT-PCR of *TBX15* on JEG-3 cells after 5-azacytidine treatment. The expression level was normalized using *SDHA*. The results are represented as the fold induction level in treated cells compared to mock treated cells. Data is shown as mean \pm S.E. for two experiments, each one including between three and five replicates for treated and mock treated cells. ***Significant expression change compared to mock-treated cells, $p < 0.001$.

placental development.³⁸ A recent study also demonstrated a linear decreased expression of *TBX15* in visceral adipose tissue in direct correlation with the body mass index when the BMI ranged from 17–25, while above the gene was extinct.¹⁴ Interestingly, we found highly significant correlations of *TBX15* promoter methylation and newborn size parameters. Here, we show that *TBX15* is regulated by PDX1, which is known to have a major role in the glucose-dependent regulation of the insulin gene expression.³⁹ Insulin also contributes to fatty acid synthesis, esterification of fatty acids, and can force adipose tissue to make triglycerides from fatty acid esters. These elements pave the way to identifying the role of *TBX15* in regulating the transport of fatty acids notably at the fetomaternal interface, or in regulating the accumulation of these fatty acids in adipocytes or other cell types such as primary human cytotrophoblasts which accumulate lipid droplets upon differentiation into syncytiotrophoblast.⁴⁰ This would be of particular interest since lipid metabolism and lipid balance are disrupted in vIUGR placentas. These alterations, combined with hypoxia and oxidative stress, have been shown to contribute to the generation of deleterious lipid peroxides,⁴¹ which are the cornerstones of endothelial dysfunction and inflammation underlying maternal symptoms.¹⁸ In conclusion, it would be of great interest to further study the function of *TBX15* at early stages of trophoblast development and its putative links with placental diseases onset.

Materials and Methods

Patients and ethics. Placentas from normal and pathological pregnancies were collected after Caesarean delivery, before labor, from three maternities (Paris, France), following the indications of the Hôpital Cochin ethical committee CCPPRB (Comité Consultatif pour la Protection des Personnes participant à la Recherche Biomédicale). Placental tissue from patients and controls included in the study was obtained between 27–36 weeks and 37–39 weeks of gestation, respectively. Signed informed consent for each patient was obtained. Inclusion criteria for PE patients were: systolic pressure >140 mm Hg, diastolic pressure >90 mm Hg and proteinuria ≥ 0.3 g/24 h. The inclusion criteria used for IUGR were reduction of fetal growth during gestation with a birth weight below the 10th percentile. We classified the patients in three groups: (1) early onset PE, i.e., when symptoms appear before the thirty-fifth week of gestation (PE), (2) PE associated with IUGR (PE+IUGR), (3) vascular IUGR (vIUGR) when a notch was observed by Echo-Doppler in at least one uterine artery. The control group was constituted with placentas from women who underwent Caesarean surgery without suffering any disease during pregnancy. Exclusion criteria included obesity, chronic hypertension, diabetes, renal diseases, multiple pregnancies and smoking.

Human material samples. Fragments (10–20 mm³) from the placental subchorial zone were dissected as previously described.^{42,43} A first fraction of chorionic villi was kept in TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) and frozen before RNA extraction. Genomic DNA was extracted from the second fraction after mechanical grinding using an electric Ultra-turrax homogenizer, following the standard protocol.

Methylation sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction (MSAP PCR). The technique used for DNA methylation analysis has previously been described.⁴⁴ For each category (Control, PE, PE+IUGR, vIUGR), a pool composed of a strictly equilibrated mix of eight placental DNA samples was constituted to minimize phenotype unrelated individual epigenetic variations. Ethnic and geographic origins of individuals were similar between pools. Four micrograms DNA of each pool were digested with 30 units of *AluI* (Fermentas) for 16 h. Each of these pre-digested DNAs was divided in three aliquots; two of them were submitted to a second enzymatic digestion with either 50 units of *MspI* or *HpaII* (Fermentas) during 24 h. These enzymes recognize the same sequence CCGG but *HpaII* is blocked by Cytosine methylation, while *MspI* is not sensitive to the methylation. The digested DNA samples were precipitated, washed and adjusted to a concentration of 100 ng/ μ L. All samples were amplified from 200 ng to obtain comparable amounts of DNA. DNA quantities were measured using a Nanodrop Spectrophotometer. The primer used that identified the 5' flanking region of *TBX15* was 5'-GCC CGC CGC G-3'. PCR products were resolved on 4% agarose gel. Bands were excised, purified using the NucleoSpin[®] Extract II kit (Macherey-Nagel), cloned in a pCR[®]4-TOPO[®] vector (Invitrogen) and sequenced. The resulting nucleotide sequences were compared to GenBank sequences using the BLAST software (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

Methylation analysis by sequencing. Bisulfite DNA sequencing was performed on the same DNA samples from PE and vIUGR categories that were used for MSAP PCR experiments. DNA samples were processed using the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. Amplification was performed on converted DNA using CpG-free primers directed to modified-DNA. We used a nested PCR approach. The first couple of primers used were 5'-GAA ATG GGA TAG TAT AAT TGA TT-3' and 5'-TCC CTC ATA CTC AAT AAA CTC-3'; the second used for the nested PCR were 5'-GGT GAA AGG TTT TTA ATG ATG T-3' and 5'-CTA ACC ACA CAA AAC TCC CT-3'. Amplification conditions were as follows: 95°C for 5 min, 58°C for 30 seconds and 72°C for 1 min, for 40 cycles. Resulting amplicons were cloned into pCR[®]4-TOPO[®] cloning vector (Invitrogen), transformed into TOP 10 bacteria (Invitrogen). Then, between five and ten clones were sequenced for each individual. Data were analyzed using BiQ analyzer software⁴⁵ and clones showing less than 80% conversion were not included in subsequent analysis.

Methylation analysis by pyrosequencing. Two amplicons covering the *TBX15* 5'-region were designed. The first amplicon of 230 bp was obtained using the two primers: 5'-AAA TGG GAT AGT ATA ATT GAT TTG G-3', 5'-Biotin-CCC ATA AAC TTT TAT TTT TAA AAA ATA TAA-3', while the second 285 bp-amplicon, located 175 bp downstream, was obtained using 5'-AGT TTG TTT TTT ATA AAT TTA TTT G-3', 5'-Biotin-AAC AAA ATT TCC TCA CCT CTT AAA C-3'. We analyzed groups with similar geographic and ethnic composition of 16 placental DNAs from PE, 16 from PE+IUGR, 16 from vIUGR and 15 from controls. DNA samples were treated with sodium bisulfite (EZ DNA Methylation-Gold kit, Zymo Research) and amplified by PCR. The templates were purified using the biotinylated primers, rendered single-stranded and analyzed by serial pyrosequencing to evaluate the methylation percentage at each CpG position.⁴⁶

Promoter composition analysis. CpG island identification was performed using the EMBOSS CpGPlot/CpGReport/Isochore tool (EMBL-EBL, www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html, criteria were Observed/Expected ratio >0.60, Percent C + Percent G >50.00, Length >100). Promoter identification was performed using the web promoter scan service (www.bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/). Predicted sequence regions are regions of DNA that contain a significant number and type of transcriptional elements (TEs) that are usually associated with PolII promoter sequences. Reported putative promoters are those regions of a given sequence that score past the cutoff score of 53, set to recognize 70% of primate promoter sequences in the Eukaryotic Promoter Database.⁴⁷ At this cutoff score, false positive predictions occur at a rate of approximately one in every 14,000 single strand bases. Putative transcription factor binding sites inside the 5'-region were identified using the MatInspector function of the Genomatix software (genomatix.de).

Cell culture and manipulations. The JEG-3 cell line is a conventionally used model of trophoblast cells.⁴⁸ Cells were cultivated in DMEM + GlutaMAX[™] (Gibco-Invitrogen, CA) supplemented with 10% of heat inactivated fetal calf serum

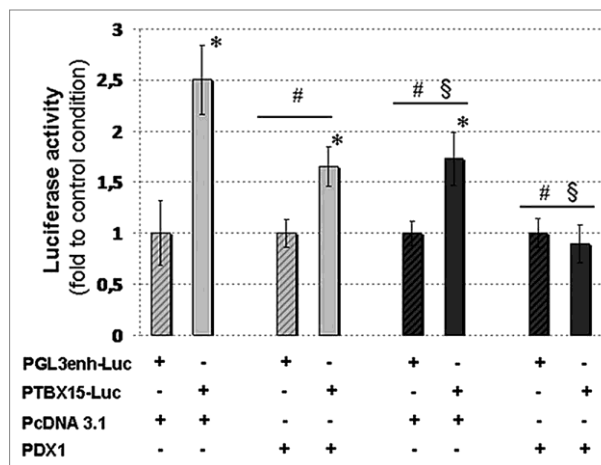


Figure 6. Luciferase activity of the pTBX15 construct. Activity of the Luciferase reporters (Empty pGL3 enhancer or pTBX15) either methylated (black bars) or not (grey bars) was measured using Dual-Glo Luciferase Assay System following transient transfection into JEG-3 cells. To evaluate the trans-activation of the reporters in presence of PDX1, reporters were co-transfected either with an expression vector encoding human PDX1 or with the empty pcDNA3.1/Myc (mock). The different bars correspond to different co-transfection conditions as mentioned (+ = construct added, - = construct not added). Variability of transfection was normalized using pRL-RSV renilla vector. Results are represented as fold induction compared to the corresponding control condition (i.e., empty pGL3enh-Luc in presence of the same expressing vector either empty or encoding PDX1). Thus, conditions with pGL3enh vectors either methylated or not are all set to one-fold, even if the absolute RLU of luciferase activity was decreased for methylated reporter vectors compared to unmethylated reporters. Data is shown as mean fold \pm SEM of three independent experiments (including 3–6 replicates per condition). *Significantly different from the corresponding control with pGL3enh, $p < 0.01$. #Significantly different from the pTBX15-Luc activity in presence of the mock vector $p < 0.05$. \$Significantly different from the corresponding condition with unmethylated vectors, $p < 0.05$. These experiments showed that the identified 5'-flanking region of *TBX15* is a promoter on which trans-repression by PDX1 is methylation dependent. A complete interpretation of this figure and its potential biological consequences appears in the Discussion (see text).

(Gibco-Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin, at 37°C in presence of 5% CO₂. Cells were seeded the day before transfection at 30% of confluence, transfected using the calcium phosphate method and rinsed the next day. For luciferase assays (see below), cells were seeded in 24-well plates and harvested after 48 h. Quantities of plasmid DNA used for transfections were, respectively, 1 μ g per well total for luciferase assays (i.e., 590 ng of reporter luciferase, 400 ng of transcription factor-expressing vector and 10 ng of renilla). DNA quantifications were performed using a Nanodrop spectrophotometer. For experiments in which 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-C) was used, cells were seeded in six-well plates at 30% of confluence into a culture medium supplemented with 10 μ M of 5-aza-C (SIGMA 3656) during 72 h. As control, 5-aza-C was substituted by DMSO (mock-treated cells). Each experiment included three to five replicates for treated and mock treated conditions and was repeated twice independently.

RNA extraction and quantitative RT-PCR conditions. Total RNA was extracted using TRIzol® (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription (RT) was carried out according to a standardized protocol.⁴³ Quantitative RT-PCR was carried out using the amplification kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) complemented with MgCl₂ (4 mmol/L), BSA (0.05 g/L) and primers (10⁻³ mmol/L) to a final volume of 17 µl. The reaction was performed in a Light Cycler Thermocycler (Roche). Primers (5'-GGAAGCGGTTC ATG ATA TT-3'; 5'-GAT GTG GAT CTA GGC CAG TGA-3') were designed from coding sequences (GenBank) using the PRIMER3 software (frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3). Primers were chosen to amplify all described isoforms and aligned with the BLAST software to avoid non-specific annealing. The PCR program was 50°C 120 seconds; 95°C 120 seconds, followed by 35 cycles of three temperature steps (94°C 5 seconds; 58°C 10 seconds; 72°C 15 seconds). Finally, samples were submitted to a progressive temperature elevation (from 65–99°C at 0.1°C/second), resulting in a melting curve to verify the specificity of the PCR products. The products were then controlled by agarose gel electrophoresis. The Ct (threshold cycle number) values were obtained with the LightCycler software (Roche) in the exponential phase of the PCR reaction. These Ct values were normalized to the Ct values obtained for the expression of Succinate Dehydrogenase subunit A (SDHA, 5'-TAC AAG GTG CGG ATT GAT GA-3'; 5'-CAA AGG GCT TCT TCT GTT GC-3') as a reference gene (previously shown to be stable and highly expressed in the placenta⁴⁹). Quantitative RT-PCR was carried out in duplicates.

Constructs. To produce the pTBX15-Luc reporter vector, a 998 bp fragment encompassing the region analyzed by pyrosequencing was amplified by PCR from placental DNA using two primers: 5'-AAA TGG GAC AGC ATA ACT GAT CTG G-3', 5'-AAC AGG ATT TCC TCA CCT CTT GGG-3'. The PCR conditions were 94°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation (94°C, 15 seconds), annealing (58°C, 20 seconds) and extension (72°C, 2 min) using the Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) and a buffer containing 2 mmol/L MgSO₄ and 5% DMSO. The purified PCR fragment was blunt-end ligated into the promoter-less firefly luciferase vector pGL3 Enhancer (Promega) digested by *Sma*I (Fermentas).

References

- Sibai BM, Lindheimer M, Hauth J, Caritis S, VanDorsten P, Klebanoff M, et al. Risk factors for preeclampsia, abruptio placentae and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med* 1998; 339:667-71.
- ACOG. Intrauterine growth restriction. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 72:85-96.
- Garite TJ, Clark R, Thorp JA. Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:481-7.
- Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today* 1995; 1:418-23.
- Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005; 308:1592-4.

Confirmation of template was obtained by sequencing. PDX1 was transferred from a commercial template (OriGene, Rockville) into the pcDNA™ 3.1/mycB expressing vector (Invitrogen) using BamHI/XhoI restriction sites. Plasmid preparations were made on NucleoBond PC 100 columns (Masherey Nagel). Methylated plasmids were obtained by incubation of 5 µg of plasmid with the CpG Methyltransferase *Sss*I (New England Biolabs) during 4–6 h at 37°C according to manufacturer's instructions, followed by DNA clean up (NucleoSpin Extract II kit, Masherey Nagel).

Luciferase assay. Transcriptional activity was assessed by the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). A Renilla luciferase vector (pRL-RSV, Promega) was co-transfected in all experiments to monitor transfection efficiency. Luminescence was measured using a Berthold Lumat LB9507 luminometer (EG&G Berthold). The experiment was performed three times independently with three to six replicates per condition. The observed firefly activity was divided by the activity recorded from Renilla luciferase vector, and the mean values of the replicates were calculated. These mean values were then divided by the mean values of the corresponding condition to obtain the fold induction compared to the empty vector (i.e., methylated vectors were compared to the methylated empty pGL3enh-Luc while unmethylated vectors were compared to the unmethylated empty pGL3enh-Luc).

Statistics. Statistical significance was evaluated using one- or two-ways ANOVA followed by post-hoc tests (Student-Neuman Keuls) on the Ct differences (Δ Ct) or normalized Relative Light Units. The calculations were made using the Excel® Add-in Statistix_{XL} package. For pyrosequencing, the analysis was carried out by a two-factors ANOVA (the two factors being the CpG and the pathological status). The analysis was then carried out by a Student's paired t-test CpG per CpG, between each pathology and the control. Mann Whitney tests were also performed and gave similar results. The threshold for significance was fixed at 0.05.

Acknowledgements

S.T.C. was supported by Paris 7 Denis Diderot University. G.G.L. is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and the Association de Néonatalogie de Port-Royal.

- Hung TH, Burton GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006; 45:189-200.
- Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest* 1996; 97:540-50.
- Reddy A, Zhong XY, Rusterholz C, Hahn S, Holzgreve W, Redman CW, et al. The effect of labour and placental separation on the shedding of syncytiotrophoblast microparticles, cell-free DNA and mRNA in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta* 2008; 29:942-9.
- Hubel CA, Powers RW, Snaedal S, Gammill HS, Ness RB, Roberts JM, et al. C-reactive protein is elevated 30 years after eclamptic pregnancy. *Hypertension* 2008; 51:1499-505.
- Maccani MA, Marsit CJ. Epigenetics in the placenta. *Am J Reprod Immunol* 2009; 62:78-89.
- Gascoin-Lachambre G, Buffat C, Rebouret R, Chelbi ST, Rigourd V, Mondon F, et al. Cullins in human intra-uterine growth restriction: expression and epigenetic alterations. *Placenta* 2010; 31:151-7.
- Chelbi ST, Mondon F, Jammes H, Buffat C, Mignot TM, Tost J, et al. Expression and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia. *Hypertension* 2007; 49:76-83.
- Yuen RK, Penaherrera MS, von Dadelszen F, McFadden DE, Robinson WP. DNA methylation profiling of human placentas reveals promoter hypomethylation of multiple genes in early-onset preeclampsia. *Eur J Hum Genet* 2010; 18:1006-12.
- Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, et al. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:6676-81.

15. Cetin I, Giovannini N, Alvino G, Agostoni C, Riva E, Giovannini M, et al. Intrauterine growth restriction is associated with changes in polyunsaturated fatty acid fetal-maternal relationships. *Pediatr Res* 2002; 52:750-5.
16. Vilbergsson G, Wennergren M, Samsioe G, Percy P, Percy A, Mansson JE, et al. Essential fatty acid status is altered in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *World Rev Nutr Diet* 1994; 76:105-9.
17. Wetzka B, Winkler K, Kinner M, Friedrich I, Marz W, Zahradnik HP. Altered lipid metabolism in preeclampsia and HELLP syndrome: links to enhanced platelet reactivity and fetal growth. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25:455-62.
18. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, 3rd, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2009; 16:206-15.
19. Auer J, Camoin L, Guillonneau F, Rigourd V, Chelbi ST, Leduc M, et al. Serum profile in preeclampsia and intra-uterine growth restriction revealed by iTRAQ technology. *J Proteomics* 2010; 73:1004-17.
20. Ouyang YQ, Li SJ, Zhang Q, Cai HB, Chen HP. Interactions between inflammatory and oxidative stress in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2009; 28:56-62.
21. Catov JM, Newman AB, Roberts JM, Sutton-Tyrrell KC, Kelsey SF, Harris T, et al. Association between infant birth weight and maternal cardiovascular risk factors in the health, aging and body composition study. *Ann Epidemiol* 2007; 17:36-43.
22. Winn VD, Haimov-Kochman R, Paquet AC, Yang YJ, Madhusudhan MS, Gormley M, et al. Gene expression profiling of the human maternal-fetal interface reveals dramatic changes between midgestation and term. *Endocrinology* 2007; 148:1059-79.
23. Prestridge DS. Predicting Pol II promoter sequences using transcription factor binding sites. *J Mol Biol* 1995; 249:923-32.
24. Rigourd V, Chauvet C, Chelbi ST, Rebouret R, Mondon F, Letourneur F, et al. STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PLoS ONE* 2008; 3:e3905.
25. Rigourd V, Chelbi S, Chauvet C, Rebouret R, Barbaux S, Bessieres B, et al. Re-evaluation of the role of STOX1 transcription factor in placental development and preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2009; 82:174-81.
26. Fenstad MH, Johnson MP, Loset M, Mundal SB, Roten LT, Eide IP, et al. STOX2 but not STOX1 is differentially expressed in decidua from preeclamptic women. *Mol Hum Reprod* 2010; 16:960-8.
27. Buffat C, Mondon F, Rigourd V, Boubred F, Bessieres B, Fayol L, et al. A hierarchical analysis of transcriptome alterations in intrauterine growth restriction (IUGR) reveals common pathophysiological pathways in mammals. *J Pathol* 2007; 213:337-46.
28. Chakrabarti SK, James JC, Mirmira RG. Quantitative assessment of gene targeting in vitro and in vivo by the pancreatic transcription factor, Pdx1. Importance of chromatin structure in directing promoter binding. *J Biol Chem* 2002; 277:13286-93.
29. Babu DA, Chakrabarti SK, Garmey JC, Mirmira RG. Pdx1 and BETA2/NeuroD1 participate in a transcriptional complex that mediates short-range DNA looping at the insulin gene. *J Biol Chem* 2008; 283:8164-72.
30. Delporte FM, Pasque V, Devos N, Manfroid I, Voz ML, Motte P, et al. Expression of zebrafish pax6b in pancreas is regulated by two enhancers containing highly conserved cis-elements bound by PDX1, PBX and PREP factors. *BMC Dev Biol* 2008; 8:53.
31. Russ AP, Wartler S, Colledge WH, Aparicio SA, Carlton MB, Pearce JJ, et al. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 2000; 404:95-9.
32. Singh MK, Petry M, Haenig B, Lescher B, Leitges M, Kispert A. The T-box transcription factor Tbx15 is required for skeletal development. *Mech Dev* 2005; 122:131-44.
33. King M, Arnold JS, Shanske A, Morrow BE. T-genes and limb bud development. *Am J Med Genet A* 2006; 140:1407-13.
34. Santos J, Pereira CF, Di-Gregorio A, Spruce T, Alder O, Rodriguez T, et al. Differences in the epigenetic and reprogramming properties of pluripotent and extra-embryonic stem cells implicate chromatin remodelling as an important early event in the developing mouse embryo. *Epigenetics Chromatin* 2010; 3:1.
35. Farin HF, Bussen M, Schmidt MK, Singh MK, Schuster-Gossler K, Kispert A. Transcriptional repression by the T-box proteins Tbx18 and Tbx15 depends on Groucho corepressors. *J Biol Chem* 2007; 282:25748-59.
36. Gasperowicz M, Otto F. The notch signalling pathway in the development of the mouse placenta. *Placenta* 2008; 29:651-9.
37. De Falco M, Cobellis L, Giraldi D, Mastrogiacomo A, Perna A, Colacurci N, et al. Expression and distribution of notch protein members in human placenta throughout pregnancy. *Placenta* 2007; 28:118-26.
38. Cobellis L, Mastrogiacomo A, Federico E, Schettino MT, De Falco M, Manente L, et al. Distribution of Notch protein members in normal and preeclampsia-complicated placentas. *Cell Tissue Res* 2007; 330:527-34.
39. Johnson JD, Bernal-Mizrahi E, Alejandro EU, Han Z, Kalynyak TB, Li H, et al. Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:19575-80.
40. Tarrade A, Schoonjans K, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Auwerx J, et al. PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation. *Endocrinology* 2001; 142:4504-14.
41. Borrego-Diaz E, Rosales JC, Proverbio T, Teppa-Garran A, Andaluz R, Abad C, et al. Effect of placental hypoxia on the plasma membrane Ca-ATPase (PMCA) activity and the level of lipid peroxidation of syncytiotrophoblast and red blood cell ghosts. *Placenta* 2008; 29:44-50.
42. Vaiman D, Mondon F, Garcés-Duran A, Mignot TM, Robert B, Rebouret R, et al. Hypoxia-activated genes from early placenta are elevated in preeclampsia, but not in Intra-Uterine Growth Retardation. *BMC Genomics* 2005; 6:111.
43. Mondon F, Mignot TM, Rebouret R, Jammes H, Danan JL, Ferre F, et al. Profiling of oxygen-modulated gene expression in early human placenta by systematic sequencing of suppressive subtractive hybridization products. *Physiol Genomics* 2005; 22:99-107.
44. Liang G, Salem CE, Yu MC, Nguyen HD, Gonzales FA, Nguyen TT, et al. DNA methylation differences associated with tumor tissues identified by genome scanning analysis. *Genomics* 1998; 53:260-8.
45. Bock C, Reither S, Mikeska T, Paulsen M, Walter J, Lengauer T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* 2005; 21:4067-8.
46. Dupont JM, Tost J, Jammes H, Gut IG. De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem* 2004; 333:119-27.
47. Bucher P, Trifonov EN. Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 1986; 14:10009-26.
48. Kohler PO, Bridson WE. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 32:683-7.
49. Meller M, Vadachkoria S, Luthy DA, Williams MA. Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta* 2005; 26:601-7.

ANNEXE 7

CONGRÈS

I. Communications orales en français

31èmes Journées de l'Hypertension Artérielle - 5th International Meeting of the French Society of Hypertension, Paris, 15-16 décembre 2011

36^{èmes} Journées nationales, Collège national des Gynécologues et Obstétriciens Français, Journée de Recherche en Obstétrique et Gynécologie, Paris, 6 décembre 2012 (Obtention d'un prix de la Société Hospitalière d'Assurances Mutuelles)

II. Communications orales en anglais

22nd European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection, Londres (Royaume Uni), 26-29 avril 2012 (avec l'obtention d'une bourse payant le congrès et l'hôtel sur place)

Joint International Congress of the American Society for Reproductive Immunology (ASRI) and the European Society for Reproductive Immunology (ESRI), Hambourg (Allemagne), 31 mai-2 juin 2012

16th NEDWEP--symposium ("NEDerlandse WERkgroep Preeclampsie", journée néerlandaise sur la prééclampsie), Amsterdam (Pays Bas), 8 mars 2013

14^{ème} congrès de la société internationale d'immunologie de la reproduction (ISIR), Boston (Etats Unis), 28 Mai-1er Juin 2013. Prix du jeune chercheur en recherche fondamentale

III. Présentation sous forme de poster à un congrès international

XVIII ISSHP World Congress (International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy), Genève, 9-12 juillet 2012