



HAL
open science

Apports de l'étude *in vitro* et *in vivo* de la protéine STOX1 dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la prééclampsie

Aurélien Hervé Ducat

► **To cite this version:**

Aurélien Hervé Ducat. Apports de l'étude *in vitro* et *in vivo* de la protéine STOX1 dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la prééclampsie. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB071 . tel-01739617

HAL Id: tel-01739617

<https://theses.hal.science/tel-01739617>

Submitted on 21 Mar 2018

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.



THÈSE

pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris-Descartes

École doctorale de rattachement n° 562 Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

Champ disciplinaire : Sciences du vivant et environnement

Spécialité : Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement le 7 juillet 2016 par

Aurélien, Hervé Ducat

Né le 29 mai 1988 à Laon (Aisne)

APPORTS DE L'ÉTUDE *IN VITRO* ET *IN VIVO* DE LA PROTÉINE STOX1 DANS LA COMPRÉHENSION DES MÉCANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA PRÉÉCLAMPSIE

Travail réalisé sous la direction du **docteur Daniel Vaiman**

Au sein de l'équipe « Génomique, Épигénétique et Physiopathologie de la Reproduction »

Institut Cochin – U1016 Inserm/UMR8104 CNRS/UMR-S8104

Département : Développement, Reproduction et Cancer

Bâtiment faculté deuxième étage – 24 rue du Faubourg Saint-Jacques – 75014 Paris, France

JURY

- Rapporteur Docteur Véronique Duranthon, Directrice de Recherches à l'INRA de Jouy-en-Josas
- Rapporteur Docteur Marie-Noëlle Dieudonné, Professeure à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines
- Examineur Docteur Anne Lombes, Directrice de Recherches à l'Institut Cochin
- Examineur Docteur Olivier Sandra, Chargé de Recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas
- Examineur Professeur Laurent Salomon, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier à la maternité de Necker
- Examinatrice Docteur Karine Reynaud, Chargée de Recherches à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de lire et d'écouter ce travail dans le temps imposé par mes projets personnels. Sincères remerciements pour vos relectures, vos commentaires et votre disponibilité.

Je souhaite ensuite remercier mon directeur de thèse, le docteur Daniel Vaiman, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Cher Daniel, je souhaite te remercier pour ta gentillesse, ta disponibilité et plus simplement pour m'avoir donné cette possibilité de voir et vivre la recherche dans ces conditions. Je souhaite également m'excuser pour tous ces moments de déceptions personnelles dont je t'ai témoigné et qui ont dû te remettre en question. Sache qu'au cours de ce doctorat tu m'as énormément appris sur de nombreux domaines et que, même si mon choix professionnel s'oriente vers des horizons éloignés des laboratoires de biologie fondamentale, je garderai toujours un très bon souvenir de ces trois années dans ton équipe si chaleureuse. Je te souhaite de garder ton esprit créatif débordant qui, même si j'ai souvent peiné à le suivre, va toujours de l'avant et fait avancer la recherche. Je te voue un sincère respect ainsi qu'une grande admiration.

Je remercie infiniment tous les membres de l'équipe que j'ai croisé : Capucine, Jana, Michèle, Sandrine, Julie, Florence, Marc, Come, Brigitte, Patrick, Céline, François, Laurence, Aminata, Ahmed, et j'en oublie... Qu'ils soient chercheurs, ingénieurs ou techniciens, qu'ils m'aient encadré ou simplement aidé, qu'ils aient écouté mes joies ou mes doutes, j'admire et respecte infiniment toutes ces personnes qui m'ont donné un regard différent sur la vie et le monde qui nous entoure. Je me ferai toujours un plaisir de partager à mes proches vos connaissances infinies qui dépassent les frontières de la science.

Je voudrais à ce titre remercier les entreprises « 20 minutes », « Métro » et « Direct Matin » pour leur publication quotidienne des pages « Horoscope » et « Mots-fléchés » qui engendrent toujours moult animations prandiales et nous guident, sans conteste, chaque jour dans nos actes.

Je remercie également tous les étudiants que j'ai rencontrés et avec qui j'ai partagé de multiples discussions aussi bien scientifiques que personnelles : Charlotte, Carole, Laïla, Maëlle, Rosa, Louis, Ludivine, Elma, Elisabetta, Myriam, Jérémy, Sandra, Anne-Lyse, Marhaba, Marion, Elisa, Precilia, Ksenia, Anne-Claire, Nour, Nicolas, et j'en oublie... Je remercie tout particulièrement tous les étudiants que j'ai encadrés au cours de ces trois années, qui m'ont tous fait mûrir dans mes réflexions et mes explications : Elsa, Harald, Amélie, Laura, Alice, Yulian, Irène, Alexandra, Chloé, Betty, Louise et Théo.

Je remercie bien sûr toute ma famille qui m'a supporté dans mes choix pendant ces trois années.

Finally, I would like to thank the person that gives me light and happiness each day with her smile, her softness, her presence and her sweet words. Audrey, you made me understand Shakespeare's words : « And what love can do, that dares love attempt » (William Shakespeare, Romeo and Juliet, Act 2, Scene 2). You and our baby make my life real. I love you.

RÉSUMÉ

La prééclampsie est un syndrome pathologique défini chez la femme par l'apparition *de novo* d'une hypertension artérielle (pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg) et d'une protéinurie (supérieure à 300 mg par jour) au cours de la grossesse. Il s'agit de la deuxième cause de mortalité maternelle en France. Les mécanismes physiopathologiques de ce syndrome, encore mal connus, semblent faire intervenir une dysfonction placentaire à l'origine d'une activation systémique de l'endothélium maternel. Pour améliorer la prise en charge de la prééclampsie et prévenir les complications à court et à long terme, la clé serait d'associer la mise en place d'un dépistage précoce à de nouveaux traitements capables de renverser l'aggravation des symptômes qui, semblerait-il, est inévitable.

Notre équipe travaille sur le gène *STOX1*, exprimé dans les cellules placentaires. Ce gène coderait un facteur de transcription dont jusqu'à présent aucun élément de réponse sur l'ADN n'a été trouvé. Des variants de ce gène ont été identifiés en 2005 chez des patientes atteintes de prééclampsie, et des études cellulaires ont montré que ce facteur est associé au syndrome prééclamptique. Deux modèles d'étude établis et caractérisés au laboratoire ont confirmé l'implication de ce gène dans le syndrome. Notre modèle cellulaire est une lignée de choriocarcinomes surexprimant *STOX1*. L'équipe a montré en 2008 que les altérations transcriptomiques dues à la surexpression de *STOX1* dans cette lignée cellulaire sont corrélées à celles observées dans les placentas de patientes prééclamptiques. Notre modèle murin a été obtenu par transgénèse additive du gène *STOX1* humain. Bien que la prééclampsie ne se développe pas spontanément chez les rongeurs, il a été montré en 2013 que des souris femelles sauvages croisées avec des mâles transgéniques développent un phénotype prééclamptique sévère comprenant une hypertension et une protéinurie.

Dans le but de mieux comprendre le lien entre la surexpression de *STOX1* et l'apparition d'une prééclampsie, nous avons exploré la production *in vitro* et *in vivo* de radicaux libres de l'oxygène et de l'azote, molécules constituant de bons candidats pour jouer un rôle pivot dans l'origine des symptômes. Nous avons pu montrer que *STOX1* était capable, *in vitro* et *in vivo*, de moduler le stress oxydatif, la fonction mitochondriale et la balance des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote. De plus, nous avons étudié dans le modèle murin l'effet de la surexpression de *STOX1* dans le placenta sur les organes du système cardiovasculaires. Nous avons pu montrer que des souris femelles sauvages portant des fœtus transgéniques subissaient une dysfonction endothéliale associée à une hypertrophie cardiaque pathologique.

Enfin, des études en cours de biologie moléculaire *in vitro* et *in silico* tentent d'explorer plus finement les fonctions moléculaires et cellulaires de la protéine *STOX1*, afin de résoudre son rôle dans la prééclampsie, ou dans d'autres domaines de biologie cellulaire. Une partie de ces travaux a notamment permis d'identifier une séquence d'ADN physiquement reconnue par la protéine *STOX1*.

Le travail réalisé au cours de cette thèse permettra d'une part de mieux comprendre la fonction d'une protéine impliquée dans des maladies complexes comme la prééclampsie et la maladie d'Alzheimer, et d'autre part d'aborder de façon plus ciblée la recherche de nouveaux marqueurs ou de nouvelles thérapeutiques pour la prééclampsie grâce au modèle murin.

Mots-clés : *STOX1*, prééclampsie, ROS, RNS, cellule endothéliale, ADN, transcription.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
RÉSUMÉ	5
SOMMAIRE	7
PREMIÈRE PARTIE : ÉTAT DES CONNAISSANCES	9
CHAPITRE I. LA PLACENTATION HUMAINE ET MURINE	11
CHAPITRE II. LA PRÉÉCLAMPSIE	37
CHAPITRE III. LE STRESS OXYDATIF ET NITROSATIF	69
CHAPITRE IV. LES PROTÉINES <i>STOX1</i>	99
DEUXIÈME PARTIE : DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	117
TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS	123
ARTICLE 1. NITROSO-REDOX BALANCE AND MITOCHONDRIAL HOMEOSTASIS ARE REGULATED BY <i>STOX1</i> , A PRE-ECLAMPSIA-ASSOCIATED GENE	125
ARTICLE 2. ENDOTHELIAL CELL DYSFUNCTION AND CARDIAC HYPERTROPHY IN THE <i>STOX1</i> MODEL OF PREECLAMPSIA	149
ARTICLE 3 (EN PRÉPARATION). LOW-DOSE PROTECTIVE ASPIRIN EFFECTS ARE CORRELATED WITH DEREGULATION OF HNF EXPRESSION IN THE PLACENTAS OF <i>STOX1</i> PREECLAMPTIC MICE	171
RÉSULTATS NON PUBLIÉS	187
QUATRIÈME PARTIE : DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION	213
DISCUSSION	215
PERSPECTIVES	219
LISTES ET RÉFÉRENCES	225
LISTE DES FIGURES	227
LISTE DES TABLEAUX	230
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	231
LISTE DES SITES WEB	235
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	237
TABLE DES MATIÈRES	255

PREMIÈRE PARTIE : ÉTAT DES CONNAISSANCES

CHAPITRE I. LA PLACENTATION HUMAINE ET MURINE

1. GÉNÉRALITÉS

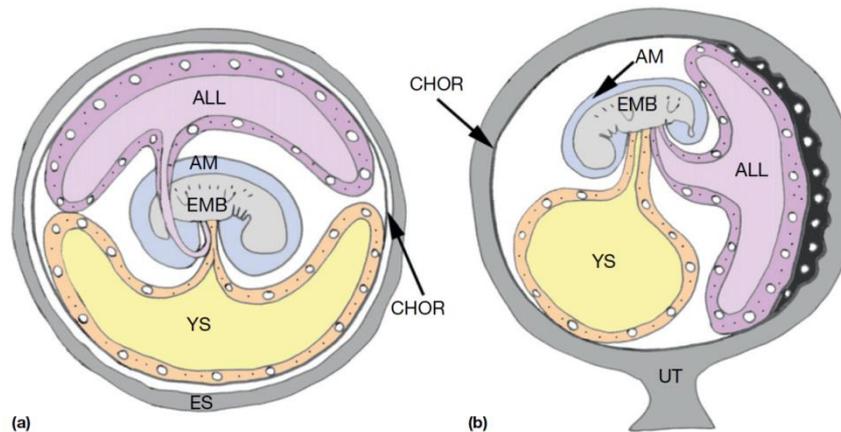
1.1. Définition

En 1937, Mossman a défini le placenta comme « une apposition de tissu parental (généralement maternel) et fœtal dont le but est de permettre des échanges physiologiques » (Mossman, 1937). Cette définition est considérée comme la plus complète (Wooding et Flint, 1994) car elle couvre des situations rencontrées aussi bien chez des espèces non-amniotes, comme certains insectes et poissons, que chez des espèces amniotes, comme certains reptiles et mammifères (Wooding et Burton, 2008). Le tissu situé du côté maternel de cette apposition est souvent dérivé de l'ovaire, l'oviducte ou l'utérus maternel, tandis que le tissu situé du côté fœtal est dérivé du trophoblaste ou trophoctoderme, qui constitue la couche épithéliale externe du blastocyste ou jeune embryon (Wooding et Burton, 2008). Bien qu'on puisse en trouver des ébauches dans quelques groupes inférieurs, le placenta constitue en réalité une acquisition caractéristique des mammifères euthériens. Ainsi, cette caractéristique divise la classe des mammifères en deux groupes : les placentaires, appelés euthériens, et les implacentaires (ou aplacentaires), qui comprennent les monotrèmes et les marsupiaux. Cette division est controversée dans le cas des marsupiaux chez qui un placenta se développe mais de manière transitoire, le fœtus terminant son développement dans une poche marsupiale (Barone, 2001).

Le développement du placenta et de la viviparité daterait du Dévonien, c'est-à-dire il y a environ 380 millions d'années, et serait une raison majeure du succès des vertébrés dans la colonisation des habitats à la fois terrestres et aquatiques (Evain-Brion et Malassiné, 2010 ; Wooding et Burton, 2008). Le passage à la vie terrestre a, au cours de l'évolution, rendu nécessaires de nouvelles adaptations du système reproducteur des êtres-vivants qui ont conduit à la viviparité, notamment une fécondation interne, la formation de membranes embryonnaires et le développement de l'endomètre comme organe de nutrition et de sécrétion interne. C'est ainsi que tout au long de la gestation, les vertébrés vivipares développent un système complexe de quatre membranes, ou annexes, qui enveloppent l'embryon puis le fœtus (Evain-Brion et Malassiné, 2010). Deux d'entre elles constituent de véritables enveloppes : la plus externe est le chorion, la plus interne est l'amnios. Deux autres annexes, le sac vitellin et l'allantoïde, constituent chacune, entre les deux précédentes, une vésicule dont le volume et la conformation varient beaucoup selon l'époque du développement et selon l'espèce (**Figure 1**). Le cordon ombilical unit ces annexes à l'embryon. Les annexes fœtales dérivent de la couche externe du blastocyste ou trophoctoderme, couche formée de cellules appelés trophoblastes. Elles sont chargées d'assurer la nutrition et la protection de l'embryon puis du fœtus (Barone, 2001). On parle de placenta lorsque ces quatre membranes fœtales sont soit apposées, soit fusionnées à la muqueuse utérine pour établir des échanges fœto-maternels (Evain-Brion et Malassiné, 2010). Le placenta est parfois considéré comme une annexe fœtale mais, par sa genèse, à laquelle participe la muqueuse utérine, comme par sa structure et ses fonctions, c'est en fait un organe particulier et très important, malgré son état transitoire (Barone, 2001 ; Evain-Brion et Malassiné, 2010).

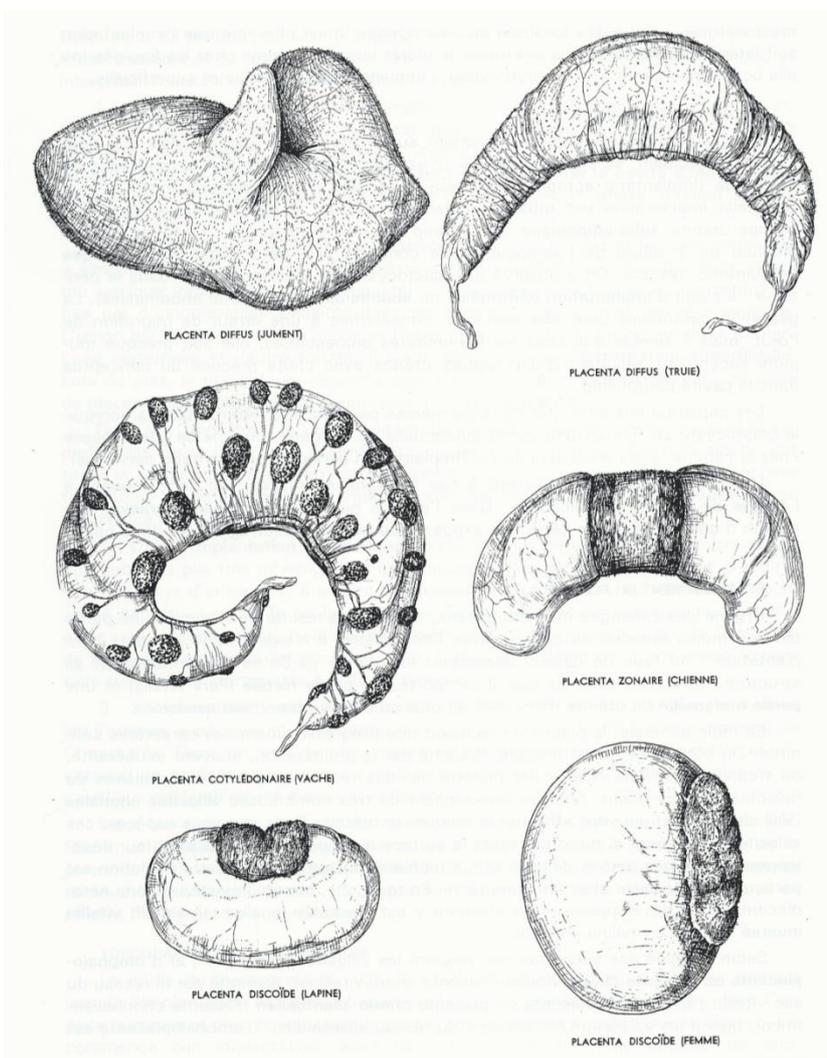
Le placenta présente une extrême variété de formes et de structures selon les espèces, en rapport avec une physiologie fort complexe et encore imparfaitement connue (Barone, 2001).

Figure 1 : structure des membranes fœtales chez les amniotes



D'après Carter et Mess, 2014. Origine des membranes fœtales contribuant à la placentation chez les mammifères. (a) Structure de l'œuf amniote chez les oiseaux, reptiles et monotrèmes. (b) Structure générale de l'embryon et des membranes fœtales à l'intérieur de l'utérus d'un mammifère placentaire ou euthérien. Le chorion (CHOR) se trouve en-dessous de la coquille (ES, *eggshell*) des ovipares, et au contact de la paroi de l'utérus (UT, *uterine wall*) chez les vivipares. Chez les oiseaux et les reptiles, les autres membranes comprennent l'amnios (AM), l'allantoïde (ALL) et le sac vitellin (YS, *yolk sac*). Chez tous les mammifères placentaires, l'allantoïde et le chorion forment un placenta chorio-allantoïdien. Le sac vitellin et le chorion peuvent former, de manière temporaire ou permanente selon les espèces, un placenta chorio-vitellin. Cette structure est absente dans l'espèce humaine.

Figure 2 : les différentes conformations extérieures de placentas



D'après Barone, 2001.

1.2. Classification des placentas

Le placenta est un organe résultant de l'intrication et de l'union, plus ou moins intime selon l'espèce, du chorion et de l'endomètre (Barone, 2001). Il n'existe donc qu'après l'implantation. L'implantation ou nidation est le phénomène par lequel le blastocyste ou le chorion, selon l'espèce, se fixe à la muqueuse utérine, établissant avec celle-ci des rapports intimes qui président à l'édification du placenta. L'aspect et la disposition topographique des structures placentaires sont en grande partie déterminés par le mode d'implantation du blastocyste dans l'utérus. Chez certaines espèces, l'implantation peut être très profonde, provoquant ainsi lors de la parturition l'expulsion d'une partie parfois importante de la muqueuse utérine avec le placenta et les annexes. Cette partie de la muqueuse utérine est nommée caduque, ou décidue (du latin *déciduus*, qui tombe), et son existence caractérise un placenta décidué, par opposition au placenta sans caduque, ou adécidué, comme celui produit lors d'une implantation superficielle. Il est à noter que cette définition de caduque/décidue a évolué car on sait maintenant que ce tissu joue un rôle important dès l'implantation (Wooding et Burton, 2008). On définit aujourd'hui les cellules déciduales par les cellules produites suite à la division, l'élargissement et la différenciation des fibroblastes du stroma utérin maternel sous la dépendance des hormones stéroïdes (Tarachand, 1986).

Différents critères sont utilisés pour classer les placentas : la morphologie, l'organisation des couches cellulaires et les structures histologiques séparant les sangs maternel et fœtal (Wooding et Burton, 2008). Dans tous les cas, le placenta comporte une partie fœtale et une partie maternelle ou utérine (Barone, 2001).

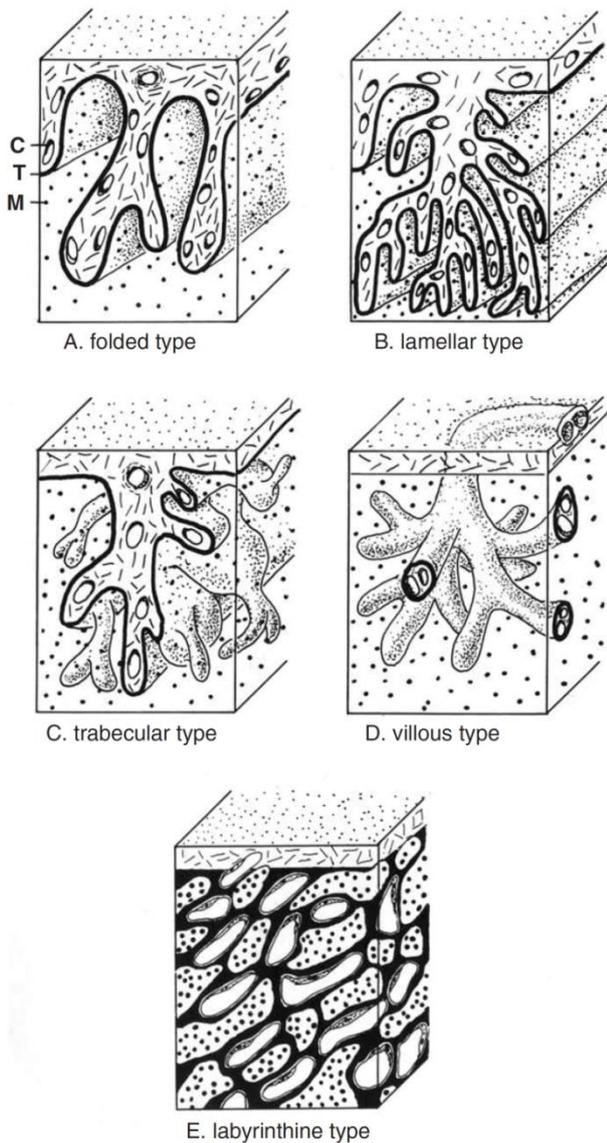
1.2.1. Classification morphologique

On peut reconnaître quatre formes de placenta : diffus, cotylédonaire, zonaire et discoïde (**Figure 2**). Cette classification est basée sur la distribution des villosités placentaires sur le sac chorionique enfermant le fœtus (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014). Les deux premiers types sont adécidués, ce qui leur vaut encore la qualification de semi-placenta, alors que les derniers sont décidués et ainsi considérés comme placentas vrais. Dans la plupart des espèces, la placentation commence par être diffuse, puis les différences s'accroissent dans la suite du développement, proportionnellement au degré d'érosion de l'endomètre. Le placenta diffus constituerait donc une forme primitive. Les autres types sont caractérisés par une union de plus en plus intime des parties fœtales et maternelles, comme le prouve l'étude de la structure (Barone, 2001).

1.2.2. Classification organisationnelle

À l'intérieur de chacune de ces conformations, on peut décrire différentes architectures des membranes chorioniques en contact avec les tissus maternels, autrement dit les variations existant dans la manière dont les tissus maternel et fœtal interagissent (**Figure 3**). Ces structures sont qualifiées de : plissée (*folded*, considérée comme l'organisation tissulaire la plus simple), lamellaire (*lamellar*), trabéculaire (*trabecular*), villosité (*villous*) ou labyrinthique (*labyrinthine*, considérée comme l'organisation la plus complexe).

Figure 3 : les différentes organisations tissulaires des interactions entre les tissus maternels et fœtaux

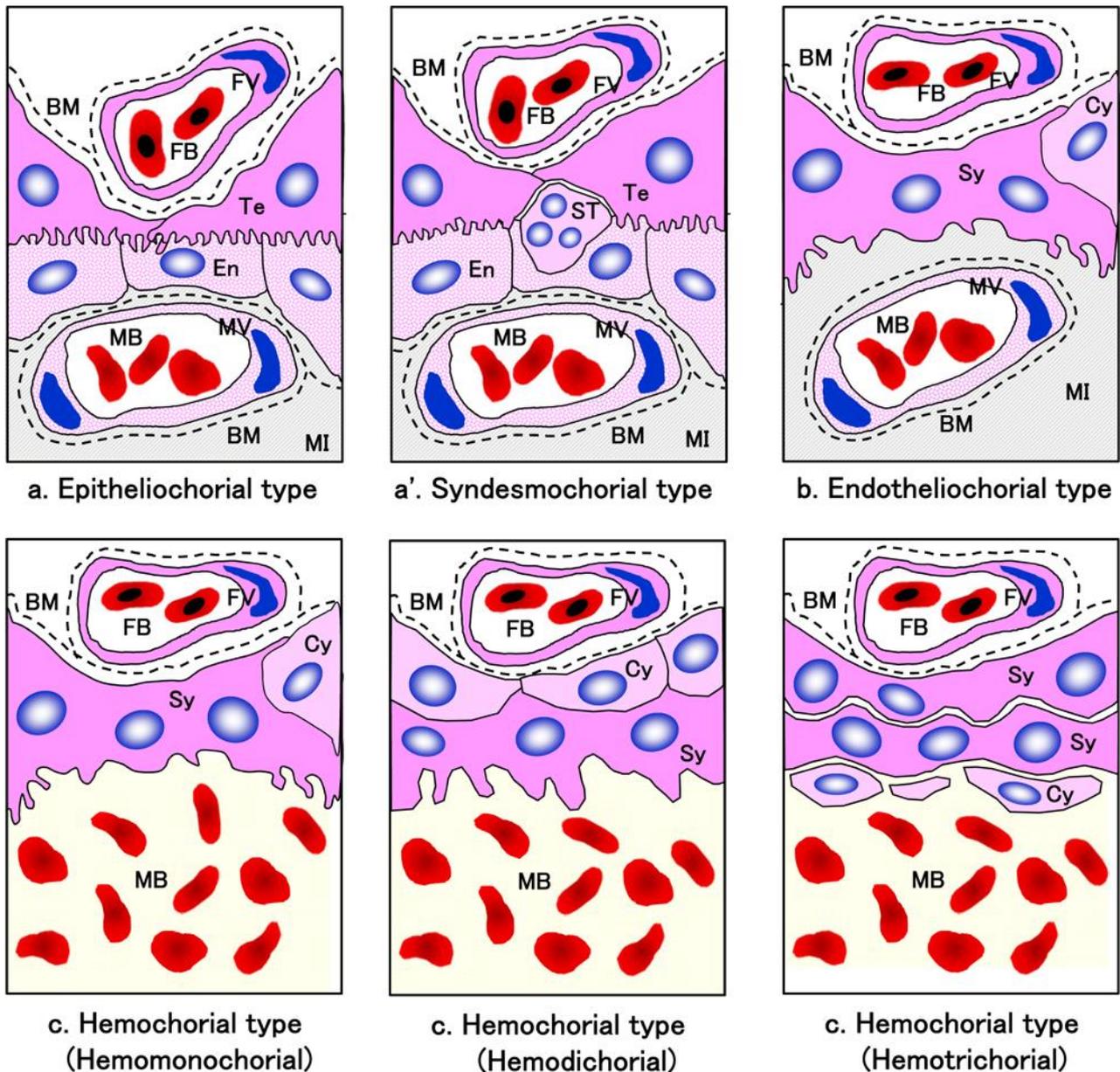


D'après Burton *et al.*, 2006. M : tissu maternel ou sang maternel (gros points) ; T : trophoblastes fœtaux (trait épais) ; C : capillaires fœtaux et tissu interstitiel fœtal.

1.2.3. Classification des structures histologiques interhémales

Cette classification correspond aux variations du nombre de couches cellulaires séparant la circulation maternelle de la circulation fœtale, appelée distance interhémale. On peut schématiser ces variations en disant que le chorion présente avec l'endomètre des rapports qui vont du simple accollement à l'érosion plus ou moins profonde du tissu maternel. Quatre grands types structuraux peuvent ainsi être reconnus en fonction de l'état final de l'endomètre : épitheliochorial, syndesmochorial, endotheliochorial et hémochorial (Barone, 2001). La structure hémochoriale est elle-même divisée en trois sous-types selon le nombre de couches cellulaires séparant l'endothélium fœtal du sang maternel : hémomonochorial, hémodichorial et hémotrichorial (**Figure 4**).

Figure 4 : les différentes structures histologiques des membranes interhémales placentaires



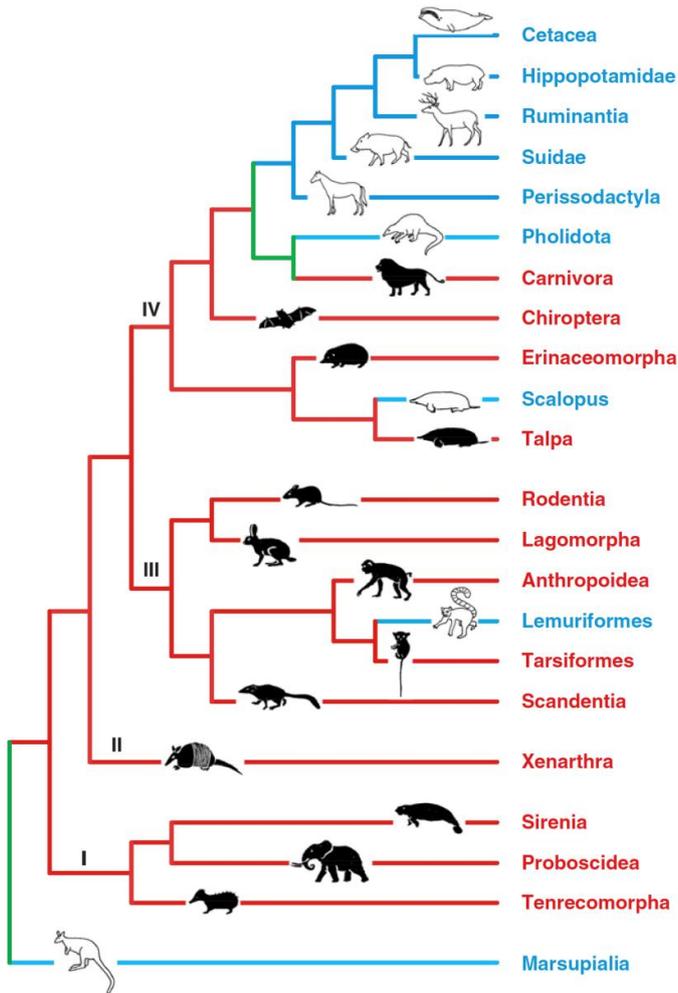
D'après Furukawa *et al.*, 2014. Classification des structures histologiques placentaires selon les rapports cellulaires entre le chorion et la paroi utérine. La placentation épitheliochoriale (ruminants) se caractérise par la simple apposition de l'épithélium trophoblastique du chorion fœtal à l'épithélium utérin. L'invagination des capillaires dans les épithéliums trophoblastique et maternel réduit la distance entre les circulations fœtale et maternelle. Lors de la placentation endotheliochoriale (carnivores), l'invasion du trophoblaste entraîne une destruction de l'épithélium utérin. Le trophoblaste se différencie souvent en cytotrophoblaste et en syncytiotrophoblaste. Enfin, la destruction par le trophoblaste de l'épithélium utérin et des vaisseaux maternels entraîne la formation du placenta hémochorial (rongeurs, primates), où le trophoblaste est directement baigné par le sang maternel. Suivant les espèces, le trophoblaste se présente sous la forme d'une structure à trois couches différenciées en cytotrophoblastes et/ou syncytiotrophoblastes. BM : *basement membrane*, membrane basale ; Te : *trophoblast* ; Cy : *cytotrophoblaste* ; En : *endomètre* ; FB : *fetal blood*, sang fœtal ; FV : *fetal vessel*, vaisseau fœtal ; MB : *maternal blood*, sang maternel ; MI : *maternal interstitium*, stroma maternel ; MV : *maternal vessel*, vaisseau maternel ; ST : *specific trophoblast* ; Sy : *syncytiotrophoblaste*.

1.3. Phylogénie

La classification précédente, établie par Grosser en 1927 (Kaufmann, 1992), se voulait interprétative de l'évolution des structures placentaires. Grosser, mais aussi Mossman (Mossman, 1987) suggéraient alors que la structure épithéliochoriale, présente chez les marsupiaux, était considérée comme primitive, et que la structure hémochoriale, présente dans l'espèce humaine, était vue comme la plus évoluée. Cette interprétation se fonde sur le principe haeckelien selon lequel l'ontogénie récapitule la phylogénie et va de pair avec l'idée finaliste que la diminution du nombre de couches cellulaires entre les circulations est associée à une augmentation de l'efficacité des échanges (Evain-Brion et Malassiné, 2010). Cependant plusieurs arguments vont à l'encontre de ces théories. Tout d'abord, aucune corrélation n'a été trouvée entre le type histologique placentaire et l'« efficacité » du placenta, représentée selon les études par la masse fœtale ou le rapport masse fœtale sur masse placentaire. De plus, ces dernières années, les études de phylogénie moléculaire des mammifères ont permis une meilleure connaissance des relations entre les ordres de mammifères et donné lieu à de nouvelles hypothèses sur l'origine des divers placentas (Murphy *et al.*, 2001). Ainsi, si l'on accepte l'hypothèse d'un ancêtre commun vivipare chez les euthériens, l'analyse des clades montre que, dans les quatre groupes de base, le pouvoir invasif du type placentaire a évolué (**Figure 5**). Ceci fait dire à certains auteurs que la placentation épithéliochoriale, placentation non invasive, n'est pas une forme primitive mais une forme dérivée d'une placentation invasive endothéliochoriale (Carter, 2008). L'évolution vers la placentation épithéliochoriale serait alors une défense de la mère contre les demandes en nutriments du fœtus (Vogel, 2005). En effet, dans la placentation hémochoriale des primates, le fœtus, par l'intermédiaire du trophoblaste a un accès direct au sang artériel maternel. De ce fait, une mère ne peut réduire l'apport en nutriments du sang arrivant au placenta sans réduire celui de ses propres tissus (Evain-Brion et Malassiné, 2010).

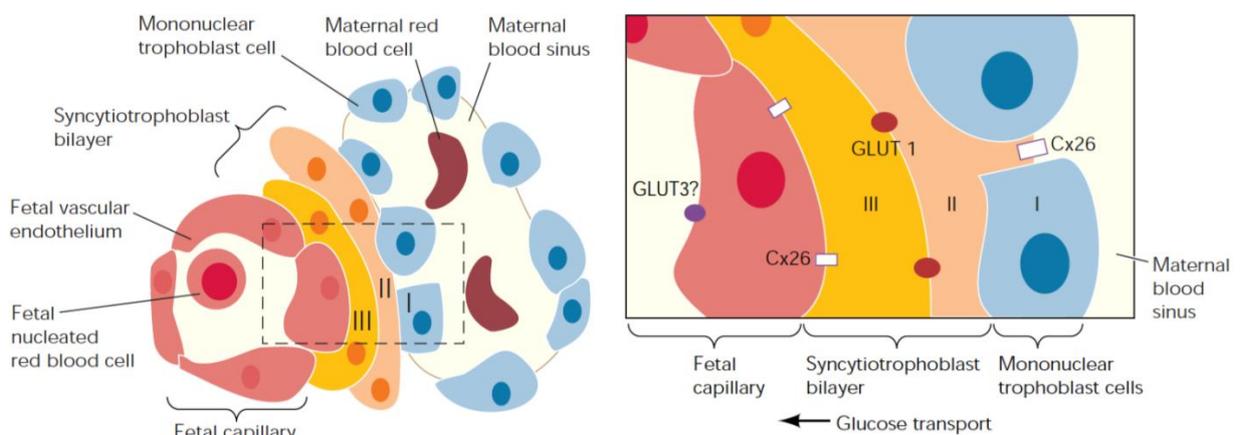
L'analyse de l'évolution de la structure placentaire, comme l'étude de l'évolution des tissus mous en général, se complique par l'absence de fossilisation de ces structures. Seuls les tissus des espèces actuelles sont donc disponibles pour des études moléculaires (Wooding et Burton, 2008). Les études génomiques et épigénomiques devraient néanmoins permettre d'analyser l'évolution des gènes placentaires dans les espèces actuelles ; parmi ceux-ci, les gènes soumis à empreinte (connus pour leur importance considérable dans le développement placentaire) sont une cible d'étude à privilégier (Constância *et al.*, 2004). Par ailleurs la comparaison des structures placentaires des mammifères actuels donne un intéressant point de vue sur l'évolution de celui-ci.

Figure 5 : arbre phylogénétique des mammifères euthériens



D'après Vogel, 2005, modifié de Murphy *et al.*, 2001. Les branches rouges et les animaux noirs correspondent à des espèces possédant un placenta endothéliochorial ou hémochorial, les branches bleues et les animaux blancs à un placenta épithéliochorial. Les branches vertes correspondent à des relations non-résolues. I : Afrothériens ; II : Xenarthériens ; III : Euarchontoglires ; IV : Laurasiathériens.

Figure 6 : interactions et transport du glucose entre la structure trilaminéaire trophoblastique et l'espace sanguin au sein du labyrinthe murin



D'après Watson et Cross, 2005. La structure trilaminéaire trophoblastique correspond à une double couche de syncytiotrophoblastes (couches II et III) entourant l'endothélium des vaisseaux sanguins fœtaux, et d'une couche de cellules trophoblastiques mononucléaires (couche I) qui tapisse les sinus sanguins maternels. Les nutriments comme le glucose doivent être transportés à travers les quatre couches cellulaires pour aller de l'espace sanguin maternel vers les vaisseaux sanguins fœtaux. Les protéines Cx26 et GLUT1 sont impliquées dans le transport du glucose.

1.4. Fonctions

Le placenta a quatre principales fonctions : (1) maximiser la prise d'oxygène et de nutriments de la mère pour le fœtus, (2) permettre l'évacuation des déchets fœtaux, (3) produire des hormones spécifiques (comme l'hormone chorionique gonadotrope ou l'hormone lactogène placentaire) et (4) minimiser le rejet immunologique par le système immunitaire maternel, ces deux dernières fonctions étant non-exclusives. Ces divers objectifs ont fait du placenta un organe de structure microscopique et macroscopique très variée à travers les espèces, tandis que certains organes, comme le poumon ou le cœur par exemple, sont plutôt uniformes à cet égard (Wooding et Burton, 2008).

Le placenta est indispensable à la vie et au développement du fœtus. Son importance est soulignée par l'intensité de sa circulation sanguine : 500 mL par minute chez la femme, une douzaine de litres par minute chez la vache. À son niveau s'effectue en permanence des échanges très nombreux et très complexes, qui permettent de cumuler au bénéfice du fœtus les fonctions d'un poumon, d'un intestin et d'un rein (Barone, 2001).

Les échanges respiratoires sont à double sens, puisque le fœtus absorbe de l'oxygène et rejette du gaz carbonique. Ces échanges sont facilités par l'hémodynamique et par les différences de tension gazeuse entre les circulations maternelle et fœtale.

En ce qui concerne les éléments non gazeux, si l'eau, les sels solubles et le glucose peuvent avoir un transit réglé en grande partie par les phénomènes de diffusion simple, de nombreuses molécules passent dans la circulation fœtale grâce à une intervention active du placenta. Par exemple, une sélection existe pour la plupart des glucides (**Figure 6**). De plus, le placenta est capable de décomposer des molécules glucidiques complexes (hydrolyse par les glucosidases). Il peut aussi synthétiser et stocker le glycogène. Les lipides ne passent qu'en état soluble et comme dans l'intestin, subissent une décomposition puis une resynthèse par l'intervention de nombreuses enzymes, si bien que la composition chimique des lipides fœtaux diffère de celle des lipides maternels. Enfin, le placenta possède une activité protéolytique propre pour faire passer les protides sous une forme moins complexe : il est capable de dégrader puis de synthétiser sous une autre forme spécifique différents éléments maternels. On notera en outre que les hormones et de très nombreuses drogues sont susceptibles de traverser le placenta et de perturber le développement du fœtus. On sait que divers virus peuvent la traverser par leurs propres moyens et que des larves de parasites peuvent passer de la mère au fœtus (Barone, 2001).

La dépuración non gazeuse du sang fœtal semble quant à elle ne nécessiter qu'une assez faible activité du placenta, surtout lorsque l'allantoïde est très développée. En effet, le fœtus reçoit des substances directement assimilables et a donc relativement peu de déchets à éliminer. Une partie de ceux-ci peut être stockée principalement dans l'allantoïde, mais aussi dans le liquide amniotique et dans le contenu intestinal – cela formera le méconium (Barone, 2001).

Enfin, le placenta possède également une activité endocrine. Les gonadotropines chorioniques produites au moment de l'implantation et ensuite pendant une durée variable, assurent le contrôle hormonal de la gestation en se conjuguant à celle des hormones hypophysaires et ovariennes. De plus, de multiples substances stéroïdes, en particulier œstrogènes et progestérone, ainsi qu'une hormone galactogène, appelée aussi prolactine ou LTH (*luteotropic hormone*), sont également sécrétées par le placenta (Barone, 2001).

2. LA PLACENTATION HUMAINE

2.1. Description du placenta humain à terme

2.1.1. Présentation anatomique

Le placenta humain à terme se présente comme un disque arrondi ou ovalaire de 18 à 20 cm de diamètre et pesant environ 500 g (**Figure 7**).

Le placenta humain est, sur le plan anatomique, un placenta de type villosité. L'unité de fonctionnement est donc une villosité choriale, qui est une structure formée par un axe mésenchymateux d'origine embryonnaire où se développent, par une vasculogénèse et une angiogénèse intense, les vaisseaux fœtaux (**Figure 8**). Le placenta humain est dit de type hémochorial car le sang maternel est directement au contact des villosités choriales au niveau de la chambre intervillieuse.

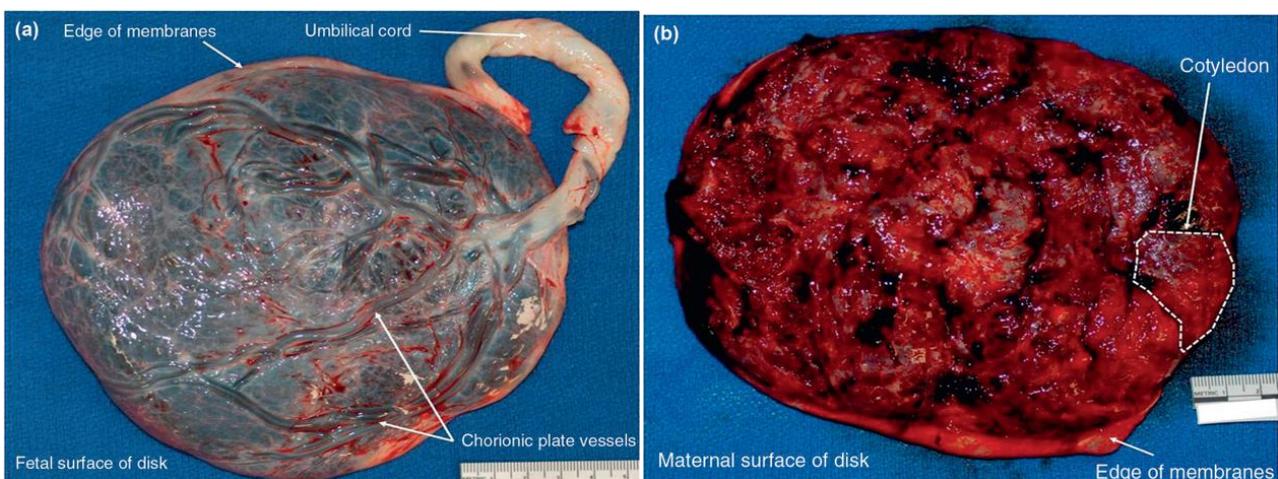
2.1.2. Circulation fœto-placentaire

Le sang maternel traverse le myomètre via les artères utéroplacentaires et entre dans la chambre intervillieuse à une pression de 70 à 80 mmHg, qui tombe à 10-30 mmHg au niveau de la plaque choriale (**Figure 9**). La chambre intervillieuse est donc un vaste espace communicant dont le volume augmente au cours de la gestation pour atteindre 150 à 200 mL. Le sang de la chambre intervillieuse est renouvelé 3 à 4 fois par minute, soit un débit d'environ 600 mL/min.

La circulation entre l'embryon et le placenta est établie dès le 23^e jour après la fécondation et correspond à l'apparition des battements cardiaques de l'embryon. Le cordon ombilical, individualisé dès quatre semaines après la fécondation, comprend deux artères qui conduisent le sang de l'embryon vers le placenta et une veine ombilicale qui ramène le sang qui a circulé dans les villosités choriales vers le cœur de l'embryon (**Figure 9**).

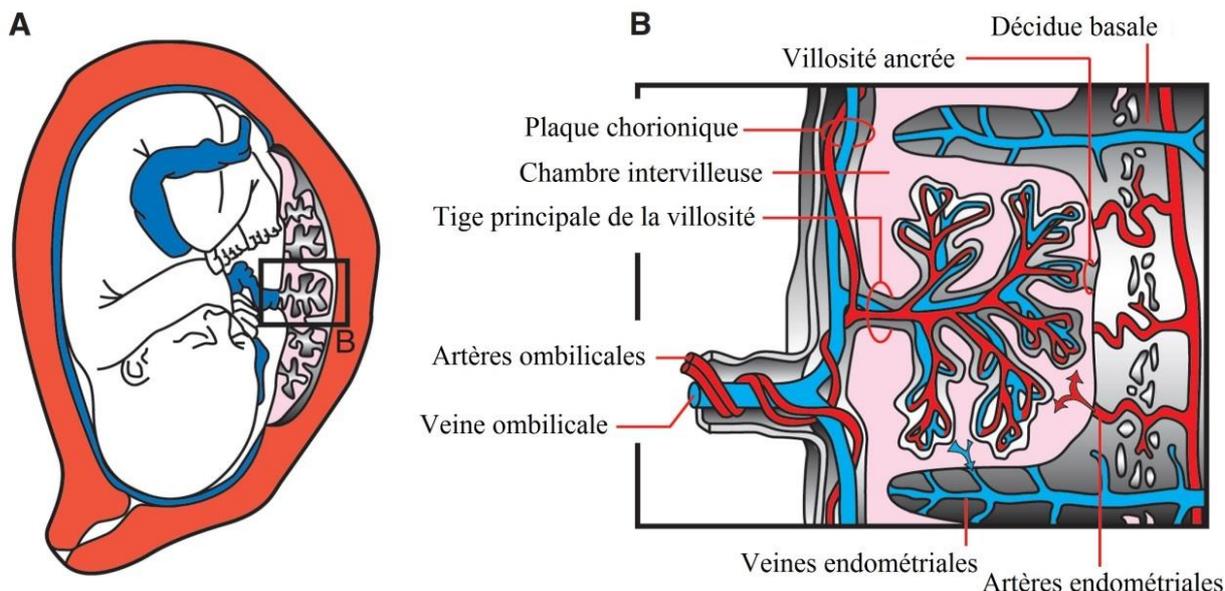
Le réseau fœto-placentaire est un système clos : le sang fœtal n'est jamais en contact direct avec le sang maternel qui circule dans la chambre intervillieuse.

Figure 7 : photos d'un placenta humain normal à terme



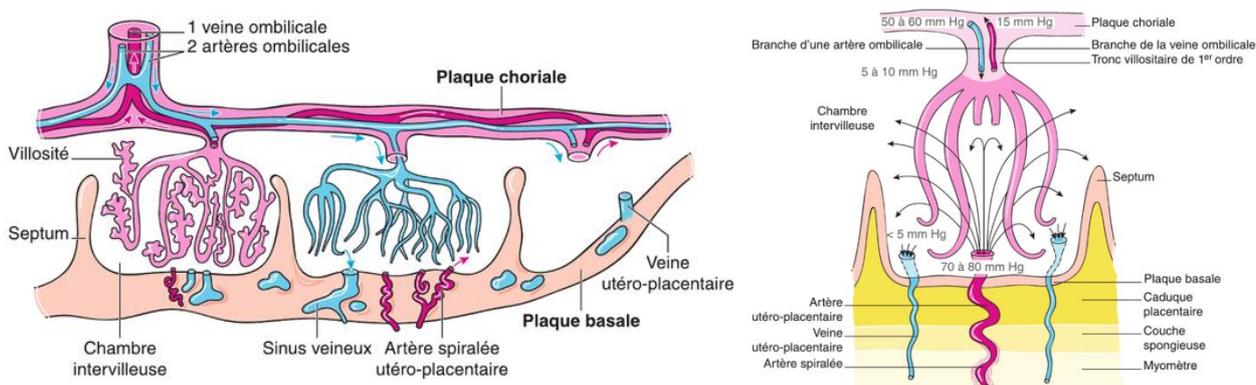
D'après Jarzembowski, 2014. (a) Face fœtale ou plaque choriale : on observe l'arborisation des vaisseaux ombilicaux. Les artères passent au-dessus des veines. (b) Face maternelle ou plaque basale : les cotylédons maternels ont une surface lisse et sont séparés par des sillons plus ou moins profonds.

Figure 8 : anatomie générale du placenta humain



D'après Fuchs et Ellinger, 2004. A : Position du fœtus et du placenta dans l'utérus. B : Agrandissement d'une unité fœto-placentaire. Le placenta humain est un placenta de type histologique hémochorial : des artères endométriales (ou artères spiralées utérines) déversent du sang riche en oxygène dans une chambre intervillieuse. Les échanges (oxygène, CO₂, acides aminés, etc.) se font au niveau de villosités qui contiennent de multiples vaisseaux sanguins fœtaux. Ces vaisseaux sont séparés du sang de la mère par leur endothélium et une couche de syncytiotrophoblaste (couche de cellules fœtales ayant fusionnées). Le sang pauvre en oxygène dans la chambre intervillieuse regagne la circulation maternelle via des veines endométriales.

Figure 9 : structure du placenta humain et de la circulation sanguine placentaire à terme



D'après Ramsey et Harris, 1966 (dessin de Ranice Davis Crosby) et Evain-Brion et Malassiné, 2010. Le sang maternel arrive par les branches terminales des artères spiralées utérines qui s'ouvrent dans la chambre intervillieuse. Grâce à la pression exercée par les artères, le sang maternel atteint la plaque chorionique. Après avoir irrigué les villosités, il regagne l'organisme maternel par les sinus veineux. Le sang fœtal arrive par les deux artères ombilicales, traverse les vaisseaux puis les capillaires des villosités choriales et retourne au fœtus par la veine ombilicale.

2.2. Mécanismes de la placentation humaine

2.2.1. Implantation et développement des villosités choriales

Six jours après la fécondation, le blastocyste a épuisé ses réserves nutritives, sa vie libre ne peut donc être que de courte durée. Il est limité par une assise cellulaire, le trophoctoderme, et s'accôle à l'épithélium utérin. Puis, à partir du trophoctoderme se différencie une assise cellulaire externe, le syncytiotrophoblaste (**Figure 10**). Ce dernier, très invasif à ce stade, pénètre l'épithélium utérin et envahit l'endomètre grâce à son activité protéolytique. Il en résulte la nidation du blastocyste au sein de la muqueuse utérine. Vers le huitième jour suivant la fécondation, des vacuoles apparaissent dans cette masse syncytiale, et vont progressivement former des lacunes entre les travées syncytiales. Ces lacunes constituent un espace qui deviendra la chambre intervillieuse. Au treizième jour, les cytotrophoblastes, qui étaient encore limités à une assise interne, vont envahir les travées de syncytium formant ainsi les villosités choriales primaires. Après deux semaines, ces villosités primaires sont envahies par le mésenchyme allantoïdien d'origine embryonnaire et constituent les villosités secondaires. Enfin les capillaires fœtaux apparaissent dans l'axe mésenchymateux, cette vascularisation caractérise la formation de la villosité tertiaire (Evain-Brion et Malassiné, 2010).

Ainsi, dès trois semaines après la fécondation, l'unité structurale et fonctionnelle du placenta, la villosité choriale, est en place dans sa structure définitive. Elle est soit flottante dans la chambre intervillieuse, soit ancrée dans l'utérus maternel (Evain-Brion et Malassiné, 2010).

Au cours de la grossesse, l'organisation cellulaire des villosités se remodèle de telle sorte que la couche de syncytiotrophoblaste est directement au contact des vaisseaux fœtaux (**Figure 11**). Ce phénomène permet de qualifier le placenta humain d'hémomonochorial.

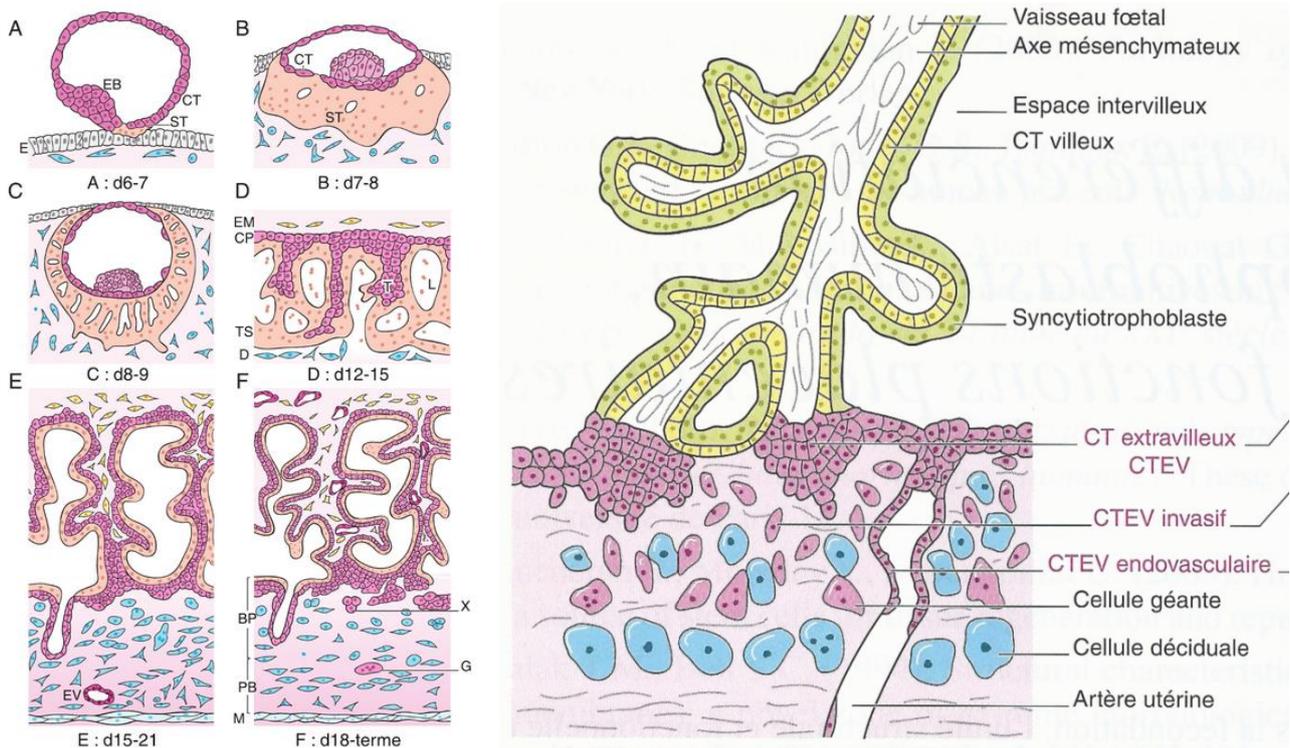
2.2.2. Le remodelage des artères spiralées utérines

Très développées à la fin du cycle menstruel, les artères spiralées subissent une transformation progressive en artères utéroplacentaires (**Figure 12**). Ce remodelage des artères spiralées est un processus physiologique crucial pour le bon développement et la bonne croissance du fœtus (Pijnenborg *et al.*, 2006). Il permet un apport en quantité importante, et avec une faible résistance, de sang dans la chambre intervillieuse, élément essentiel pour le bon déroulement de la grossesse. On le retrouve d'ailleurs altéré dans des maladies de la grossesse comme la prééclampsie et le retard de croissance intra-utérin. D'après (Evain-Brion et Malassiné, 2010), ce remodelage ferait intervenir :

- des facteurs hormonaux d'origine maternelle très précocement ;
- des cellules immunocompétentes maternelles (*natural killer* et macrophages) qui infiltrèrent précocement les parois artérielles et sécrètent des métalloprotéases ;
- des facteurs diffusibles issus du trophoblaste, notamment des facteurs angiogéniques comme le VEGF, le PlGF ou l'angiogénine ;
- une interaction directe entre les trophoblastes invasifs (d'origine endovasculaire ou interstitielle) et les composants de la paroi artérielle (cellules musculaires lisses et cellules endothéliales).

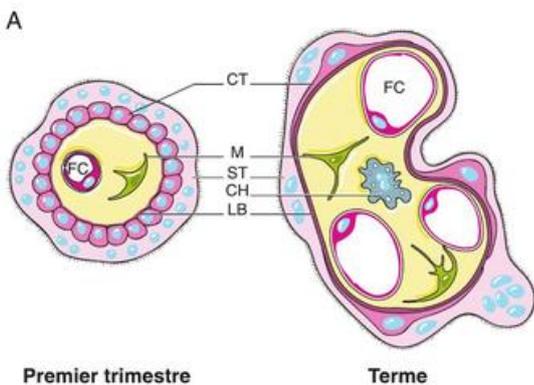
Pendant que s'effectue cette transformation, les lumières artérielles restent obstruées par des bouchons trophoblastiques et la chambre intervillieuse ne contient pas de sang mais un infiltrat sans éléments figurés sanguins maternels. Ce n'est qu'après 12 semaines que s'établit une véritable circulation placentaire maternelle (Evain-Brion et Malassiné, 2010).

Figure 10 : représentation schématique des différentes étapes du développement du placenta humain



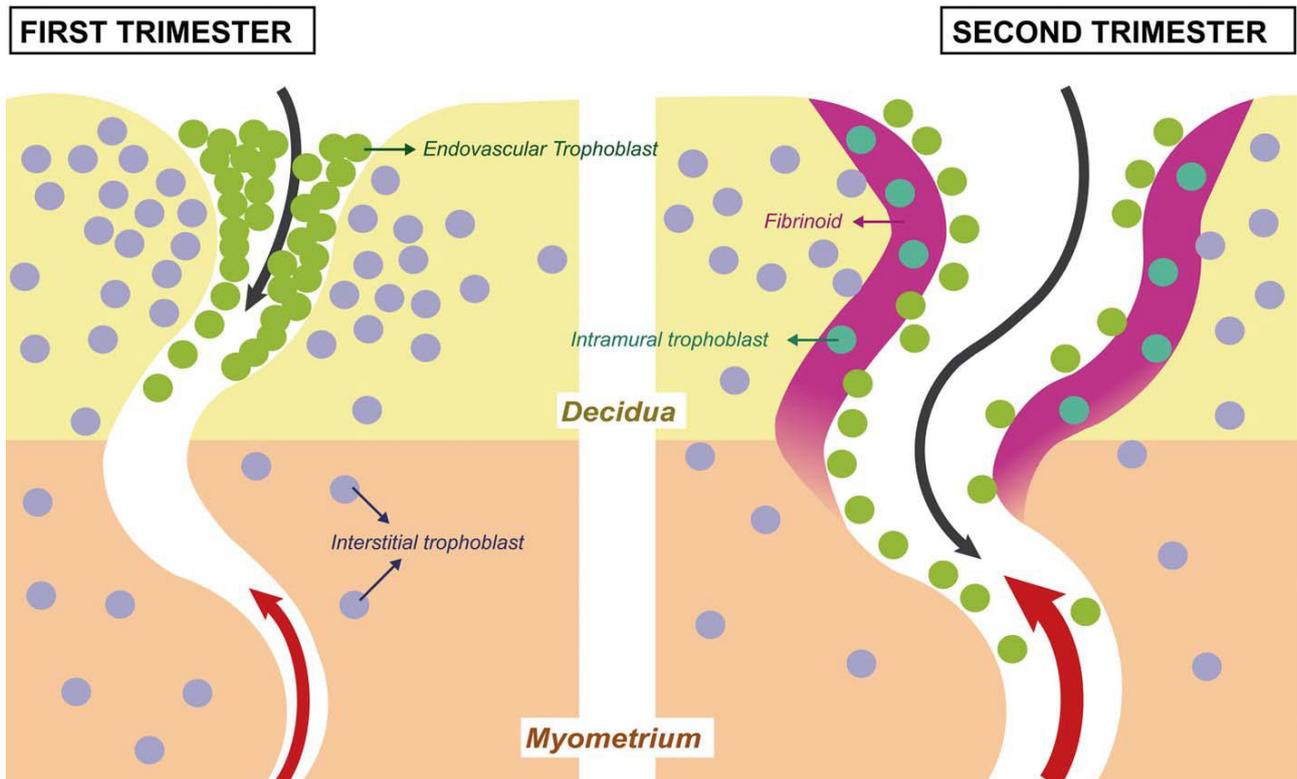
D'après Evain-Brion et Malassiné, 2010, adapté de Kaufmann, 1981. À gauche, A-F : étapes du développement du placenta humain à partir de l'implantation jusqu'à 18 jours. À droite, représentation d'une villosité chorionale à 21 jours. BP : basal plaque, plaque basale ; CP : chorionic plaque, plaque chorionale ; CT : cytotrophoblaste ; D : décidue ; E : épithélium endométrial ; EB : embryoblast, bouton embryonnaire ; EM : embryonic mesoderm, mésoderme embryonnaire ; EV : endometrial vessel, vaisseau endométrial ; G : cellules géantes ; J : zone jonctionnelle ; L : lacunes de sang maternel ; PB : placental bed, lit placentaire ; ST : syncytiotrophoblastes ; T : villosité primaire ; TS : coque cytotrophoblastique ; X : trophoblaste extravilloux.

Figure 11 : coupe transversale d'une villosité flottante au premier trimestre de la grossesse et à terme



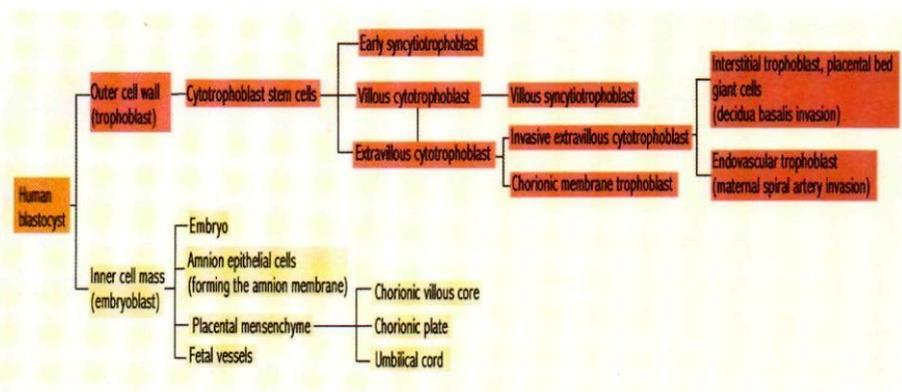
D'après Evain-Brion et Malassiné, 2010. CT : cytotrophoblaste apparaissant de forme cubique au premier trimestre et avec de longs prolongements cytoplasmiques à terme ; M : cellule mésenchymateuse ; ST : syncytiotrophoblaste ; LB : lame basale ; CH : cellule d'Hofbauer, macrophages du placenta.

Figure 12 : remodelage des artères spiralées utérines au cours de la placentation humaine



D'après Pijnenborg *et al.*, 2006. Schéma illustrant le concept de deux vagues de migration de trophoblastes endovasculaires, d'abord dans le segment décidual des artères spiralées au cours du premier trimestre (à gauche), ensuite dans le segment myométrial au début du deuxième trimestre (à droite). Les flèches rouges indiquent la direction du flux sanguin, les flèches noires la direction de migration des trophoblastes endovasculaires.

Figure 13 : représentation des voies de différenciation du blastocyste humain



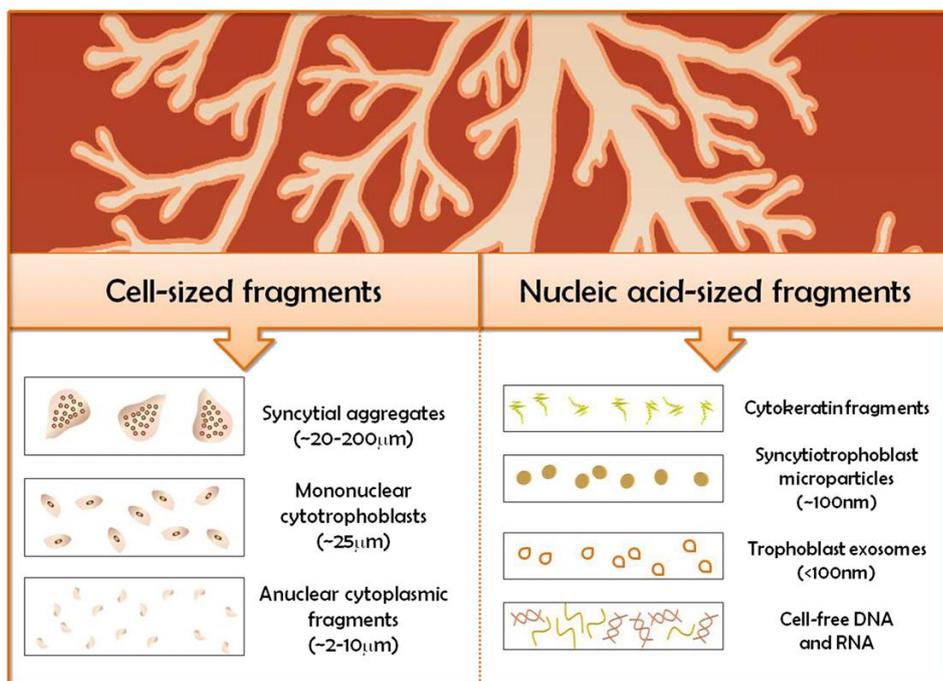
D'après Le Bouteiller et Blaschitz, 1999. Le blastocyste humain est composé de la masse cellulaire interne – embryoblaste – et de la paroi cellulaire externe – trophoblaste. L'embryon dérive de la masse cellulaire interne. Deux types cellulaires majeurs constituent la portion fœtale du placenta humain et des membranes : les cellules souches cytotrophoblastiques, dérivées du trophoblaste, et les cellules épithéliales de l'amnios, le mésenchyme placentaire et les vaisseaux, dérivant de la masse cellulaire interne. La différenciation du trophoblaste à partir des cellules souches cytotrophoblastiques se déroule selon deux voies principales : villositaire et extravillositaire. Les cytotrophoblastes villositaires couvrent toute la villosité chorionale et se différencient soit en syncytiotrophoblaste villositaire par fusion ou en cytotrophoblastes extravillositaires invasifs. Le syncytiotrophoblaste sera situé sur la couche externe de la villosité chorionale, en contact avec le sang maternel. Certains des cytotrophoblastes extravillositaires – les trophoblastes interstitiels ou les cellules géantes du lit placentaire – migrent dans la décidue maternelle. D'autres – les trophoblastes endovasculaires – envahissent les artères spiralées utérines. Finalement, les cytotrophoblastes extravillositaires forment également la membrane chorionique trophoblastique.

2.2.3. Différenciations et spécialisations cellulaires au cours de la placentation

Le processus de placentation est le siège de nombreuses différenciations et spécialisations cellulaires. Comme vu précédemment, le placenta se forme à partir des cellules de la couche externe du blastocyste, le trophoctoderme. S'ensuivent de nombreuses différenciations avec acquisitions de phénotypes et de fonctions particulières (**Figure 13**). Chacun de ces sous-types cellulaires acquiert une fonction particulière au sein du placenta : par exemple, le cytotrophoblaste extravilleux prolifère puis devient invasif et migre dans la décidue et le premier tiers du myomètre pour coloniser les vaisseaux maternels ou se différencier en cellules géantes bi- ou trinuéclées – ces cellules géantes marquent la fin de l'invasion interstitielle (Evain-Brion et Malassiné, 2010). Quant au cytotrophoblaste villositaire, il crée par fusion cellulaire le syncytiotrophoblaste, tissu plurinucléé en contact direct avec le sang fœtal, qui constitue la principale interface fœto-maternelle et possède de nombreuses fonctions endocrines et d'échanges, indispensables au développement fœto-placentaire (Alsat *et al.*, 1999). La formation de cette couche syncytiale fait partie d'un cycle de renouvellement continu d'environ quatre semaines, assurant la pérennité de sa fonction (Polin *et al.*, 2004). Il est à noter qu'au cours de son renouvellement, ce syncytium envoie dans la circulation maternelle des corps apoptotiques qui ont été appelés nœuds syncytiaux (Askelund et Chamley, 2011). Ce processus complètement physiologique a été mis en évidence en 1893 par Georg Schmorl (Lapaire *et al.*, 2007), qui a démontré la présence de ces débris fœtaux dans les vaisseaux pulmonaires de femmes ayant succombé à une éclampsie (Georg Schmorl, 1893). Il a été démontré depuis que d'autres types de débris fœtaux, comme des exosomes ou de l'ADN, sont également relargués de manière physiologique par le placenta dans la circulation maternelle (**Figure 14**), débris qu'une mère peut conserver à vie (Askelund et Chamley, 2011).

Comme de nombreuses voies du développement embryonnaire, le contrôle spatio-temporel de ces différenciations reste peu connu. Il y aurait intervention de facteurs solubles, comme l'hCG qui active la fusion des cytotrophoblastes villositaires, et un rôle avéré du taux d'oxygène. En particulier, une augmentation de la concentration en oxygène favoriserait la différenciation du trophoblaste vers la voie invasive (Evain-Brion et Malassiné, 2010).

Figure 14 : les différents types de débris trophoblastiques relargués par le placenta dans la circulation maternelle au cours de la grossesse



D'après Askelund et Chamley, 2011.

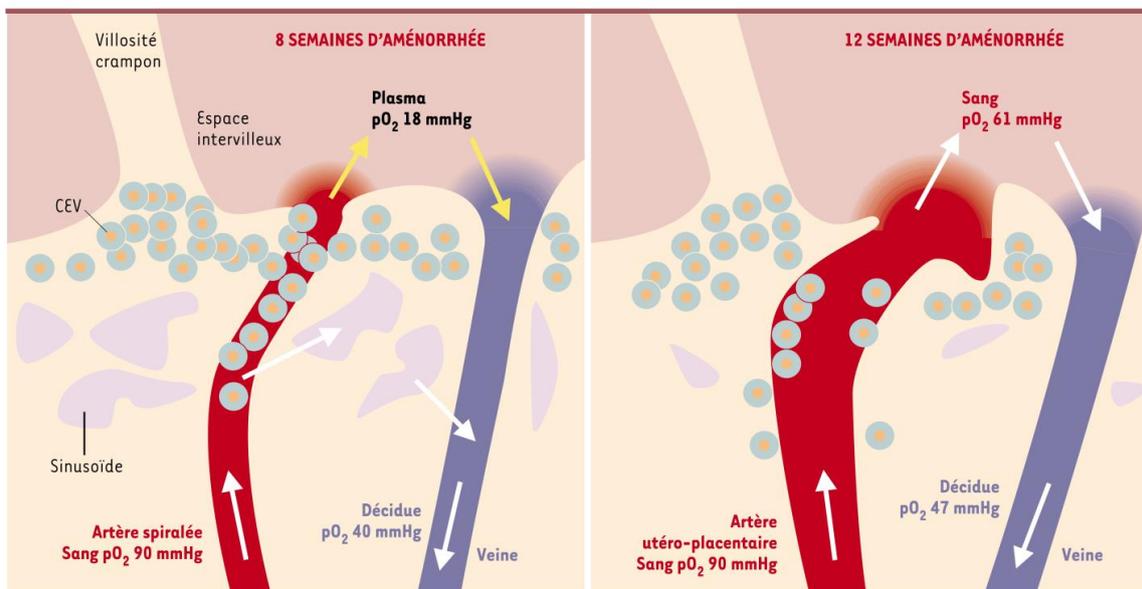
2.2.4. Oxygène et placentation

La pression partielle d'oxygène dans l'utérus au moment de l'implantation est faible : aux alentours de 15 à 18 mmHg dans l'espèce humaine. De telles conditions favorisent le développement embryonnaire préimplantatoire et minimisent la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène hautement tératogènes (Evain-Brion et Malassiné, 2010). En raison de la présence de bouchons trophoblastiques, la pression d'oxygène dans l'espace intervilloux au premier trimestre de la grossesse est d'environ 20 mmHg, alors qu'au niveau de la décidue il avoisine 60 mmHg (**Figure 15**).

Au cours du premier trimestre cet environnement faible en oxygène favorise le développement placentaire par la stimulation de l'angiogenèse et la prolifération des cytotrophoblastes. La disparition progressive des bouchons trophoblastiques augmente significativement les pressions intra-placentaires d'oxygène. C'est à ce stade qu'apparaissent, au sein du trophoblaste, des enzymes antioxydantes comme les superoxydes dismutases (Evain-Brion et Malassiné, 2010). Des pressions d'oxygène de 60 mmHg sont ainsi observées au deuxième trimestre de la grossesse pour répondre à la demande métabolique du fœtus en croissance rapide (Burton et Jauniaux, 2001). Il a été montré que des fluctuations de cette concentration, secondaires à un défaut de remaniement des artères spiralées utérines, sont à l'origine d'un stress du réticulum endoplasmique inhibant la synthèse protéique et/ou d'un stress oxydatif délétère pour le développement fœto-placentaire (Burton, 2009). On attribue ainsi à l'oxygène un rôle dans la genèse de plusieurs maladies de la grossesse (**Figure 16**).

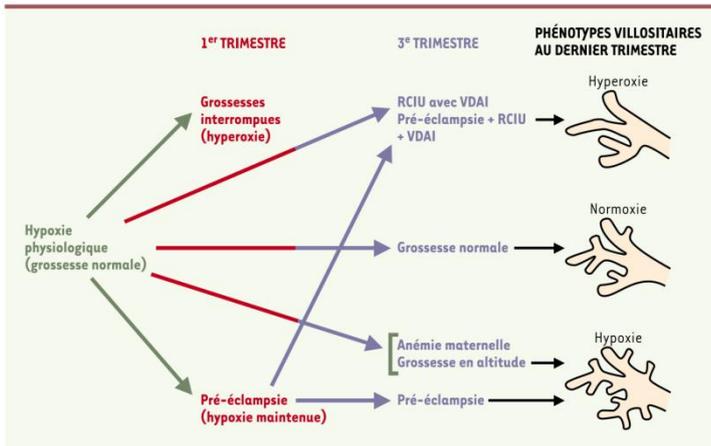
En présence de faibles concentrations d'oxygène, le trophoblaste humain semble donc prolifératif, tandis que l'augmentation de la concentration en oxygène semble favoriser la différenciation du trophoblaste vers la voie invasive et, de fait, le remaniement des artères utérines et la formation de syncytiotrophoblaste (Evain-Brion et Malassiné, 2010). Ce contrôle passerait par des facteurs de transcription sensibles à la pression partielle en oxygène tel HIF-1 (**Figure 17**).

Figure 15 : circulation intervilloux au premier trimestre de grossesse



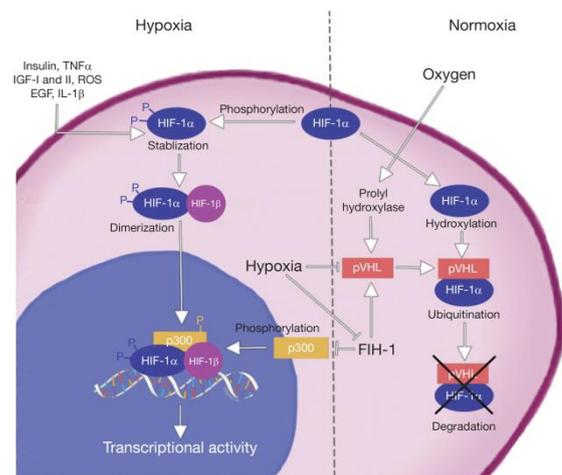
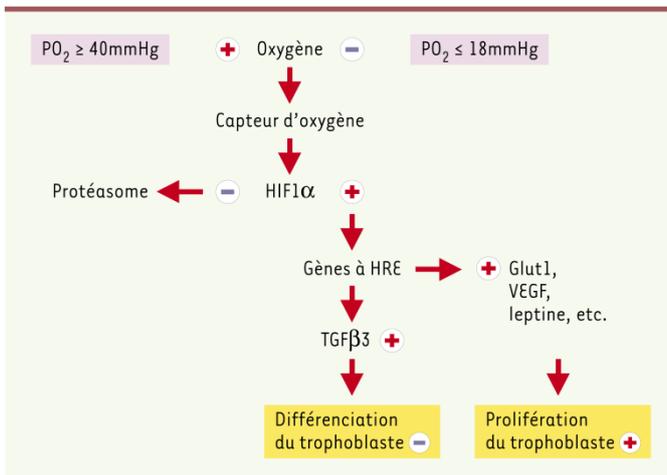
D'après Challier et Uzan, 2003. À huit semaines d'aménorrhée, les artères spiralées de la décidue sont partiellement bouchées par le cytotrophoblaste extravilloux (CEV). Le plasma et quelques hématies maternelles circulent dans l'espace intervilloux (flèches jaunes). Le sang est court-circuité vers un réseau de sinusoides déciduaux et regagne les veines. À douze semaines d'aménorrhée, les bouchons trophoblastiques ont disparu et le sang des artères utéroplacentaires s'écoule dans l'espace intervilloux. Le rôle des sinusoides déciduaux est devenu insignifiant. pO₂ : pression partielle en oxygène.

Figure 16 : environnement en oxygène et maladies



D'après Challier et Uzan, 2003. L'oxygène peut aussi affecter l'ontogenèse des villosités fœtales dont les phénotypes diffèrent selon les maladies et leur degré de gravité. Un aspect hypoxique (hyper-ramification et hyper-capillarisation des villosités terminales) a été noté dans la prééclampsie. Un aspect hyperoxique (ramification villositaire déficiente associée à une angiogenèse) prédomine dans la prééclampsie avec retard de croissance intra-utérin (RCIU) associée à une vélocité diastolique absente ou inversée (VDAI) ou dans le RCIU sans prééclampsie avec VDAI. L'anémie maternelle et la grossesse en altitude sont à l'origine de deux situations où l'appauvrissement en oxygène a des répercussions caractéristiques sur la morphogenèse et l'angiogenèse villositaire. Dans les grossesses en altitude, on observe une ramification très importante des villosités terminales et une hyper-capillarisation.

Figure 17 : pression partielle d'oxygène et expression des gènes dans le trophoblaste



D'après Challier et Uzan, 2003 et James, 2014. À gauche : plusieurs facteurs de transcription inductibles par l'hypoxie, HIF-1, 2 et 3 ont été mis en évidence. La liaison d'un dimère de HIF-1 à une séquence régulatrice HRE (consensus 5'-RCGTG-3') de l'ADN avec d'autres cofacteurs induit la transcription de gènes contrôlés par l'oxygène : VEGF (*vascular endothelial growth factor*), Glut1 (*glucose transporter 1*), leptine, etc. L'activation des gènes à séquence HRE induit directement ou indirectement la prolifération trophoblastique. Certains membres de la famille du TGFβ comme TGFβ2, présentent une séquence d'ADN HRE fixant HIF1α. TGFβ3 pourrait présenter cette séquence et son effet s'exercerait en inhibant la différenciation. À droite : en normoxie, la prolyl-hydroxylase activée hydroxyle la proline 564 du domaine carboxy-terminal de l'HIF1α. Celui-ci fixe alors le facteur suppresseur de tumeur de von Hippel-Lindau, qui associé à d'autres éléments, forme un complexe ayant une activité E3 ubiquitine ligase. L'HIF1α peut alors se lier à des ubiquitines et il est dégradé par le protéasome. D'autres capteurs d'oxygène à groupement hémique agissant sur HIFα ont été proposés. En conditions normoxiques, HIF-1α est oxydée par une prolyl-hydroxylase. Cette hydroxylation est nécessaire et suffisante pour se lier au complexe formé par la protéine suppressive de tumeurs pVHL (*von Hippel-Lindau protein*) et l'E3-ubiquitine ligase. L'ubiquitination mène à sa dégradation par le protéasome. En conditions hypoxiques, il n'y a pas d'hydroxylation, et l'hypoxie inhibe la protéine pVHL et le facteur FIH-1 (*factor inhibiting HIF-1*), permettant l'expression protéique et l'activité transcriptionnelle de HIF-1α. HIF-1α échappe au processus de dégradation et peut ainsi être phosphorylé, ce qui lui permet de former un hétérodimère stable avec HIF-1β. Cet hétérodimère est transloqué dans le noyau où il se lie à des éléments de réponse à l'hypoxie et à des cofacteurs comme p300 pour induire la transcription de gènes. Cette phosphorylation de HIF-1α est non seulement dépendante de l'hypoxie, mais aussi de facteurs de croissance comme l'insuline, le TGFα (*transforming growth factor alpha*), des IGFs (*insulin-like growth factors*), des ROS (*reactive oxygen species*), des EGF (*epidermal growth factor*). Enfin, l'IL-1β (*interleukin 1 bêta*) peut affecter la phosphorylation et la stabilisation de HIF-1α.

2.2.5. Immunité et placentation

La grossesse chez les animaux vivipares peut apparaître comme une énigme immunologique : le fœtus et ses annexes extra-embryonnaires expriment des alloantigènes d'origine paternelle, normalement reconnus par la mère comme du « non-soi » et devant être rejetés par le système immunitaire maternel (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014). Cette énigme a été appelée le paradoxe immunologique de la gestation (Colucci *et al.*, 2014). Plusieurs hypothèses ont été émises, notamment par le prix Nobel Sir Peter Medawar (Medawar, 1953). Depuis cette publication, d'innombrables rapports, revues et discussions ont fait débat de ces hypothèses historiques considérant le fœtus comme une allogreffe non rejetée.

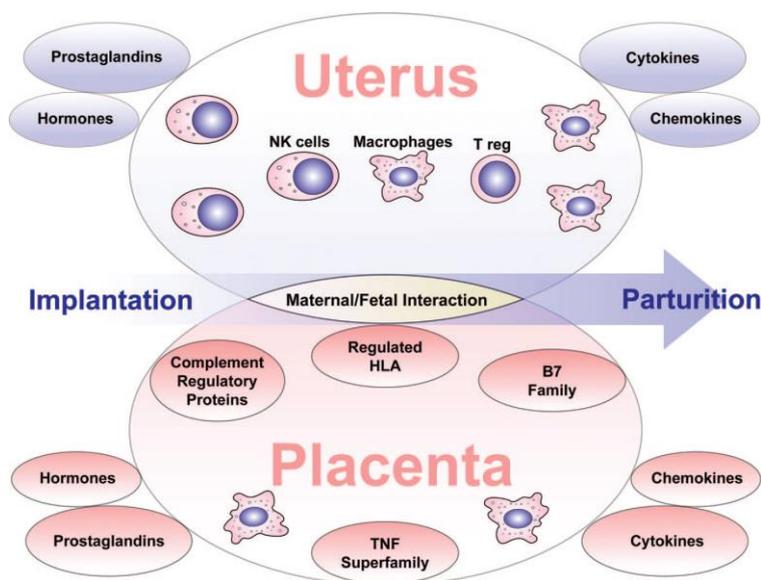
Sans faire de revue exhaustive de ce vaste domaine, il apparaît clair aujourd'hui que l'interaction immunologique entre les cellules fœtales et maternelles repose sur :

- une expression trophoblastique des antigènes HLA différente des cellules adultes et fœtales : les cytotrophoblastes n'expriment pas les antigènes de classe II (HLA-D) et une partie seulement des antigènes de classe I, et les syncytiotrophoblastes n'expriment aucun HLA (Redman *et al.*, 2015) ;
- la présence de cellules immunitaires maternelles particulières dans la décidue, en particulier des cellules *natural killer* utérines (Acar *et al.*, 2011 ; Hiby *et al.*, 2004 ; Le Bouteiller et Tabiasco, 2006 ; Moffett-King, 2002) et des cellules T régulatrices (Teles *et al.*, 2013), possédant des phénotypes et des propriétés différentes de leurs homologues respectives retrouvées dans la circulation maternelle.

Les dernières années de recherche ont montré que le fœtus met en place des mécanismes moléculaires, résumés dans la **Figure 18**, visant à déjouer spécifiquement les réponses immunitaires de la mère dirigées contre des alloantigènes paternels exprimés par le trophoblaste (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014).

Les interactions entre cellules maternelles et cellules trophoblastiques pendant la grossesse ont des conséquences fonctionnelles cruciales et bénéfiques en termes de développement vasculaire placentaire. Il s'établit ainsi entre la mère et son enfant *in utero* un dialogue programmé dès l'implantation embryonnaire, permettant de maintenir un bon déroulement de la grossesse (Saint-Dizier et Chastant-Maillard, 2014).

Figure 18 : mécanismes sous-tendant la tolérance maternelle du fœtus



D'après Hunt *et al.*, 2005. Les mères, via des changements au niveau de l'utérus, et l'embryon puis le fœtus, via des adaptations spéciales du placenta, contribuent à l'établissement d'un site immunologiquement privilégié à l'intérieur duquel le fœtus semiallogénique réside en toute sécurité jusqu'à la fin de la grossesse. *NK cells* : cellules *natural killer* ; *Treg* : cellules T CD4 régulatrices ; *TNF superfamily* : superfamille du *tumor necrosis factor*.

3. LA PLACENTATION MURINE

3.1. Description du placenta murin à terme

3.1.1. Présentation anatomique

Selon la lignée, une souris fait généralement 4 à 12 petits. La durée de la gestation diffère aussi selon la lignée : 19 à 21 jours (Murray *et al.*, 2010). Les stades de gestation sont souvent référencés « E... » pour « *embryonic day*... ».

Le placenta murin à terme est de morphologie discoïde, tout comme le placenta humain (**Figure 19**). Le placenta murin est de type histologique labyrinthique et hémotrichorial. Cela signifie tout d'abord que la zone où ont lieu les échanges fœto-maternels constitue un labyrinthe : il s'agit d'un enchevêtrement de vaisseaux fœtaux bordés de cellules endothéliales, encerclant du sang maternel (**Figure 20**). Au sein de ce labyrinthe, il n'y a plus de cellules endothéliales maternelles et le tissu trophoblastique fœtal est bien au contact direct du sang maternel (placenta hémochorial). À la différence du placenta humain, les vaisseaux fœtaux sont séparés du sang maternel non pas par une mais par trois couches cellulaires : deux couches de syncytiotrophoblastes et une couche de trophoblastes mononucléés (**Figure 20**). Cependant, il semble que le sang maternel puisse accéder à la bicouche de syncytiotrophoblastes (Georgiades *et al.*, 2002).

Figure 19 : photos d'un utérus et d'un placenta murins normaux

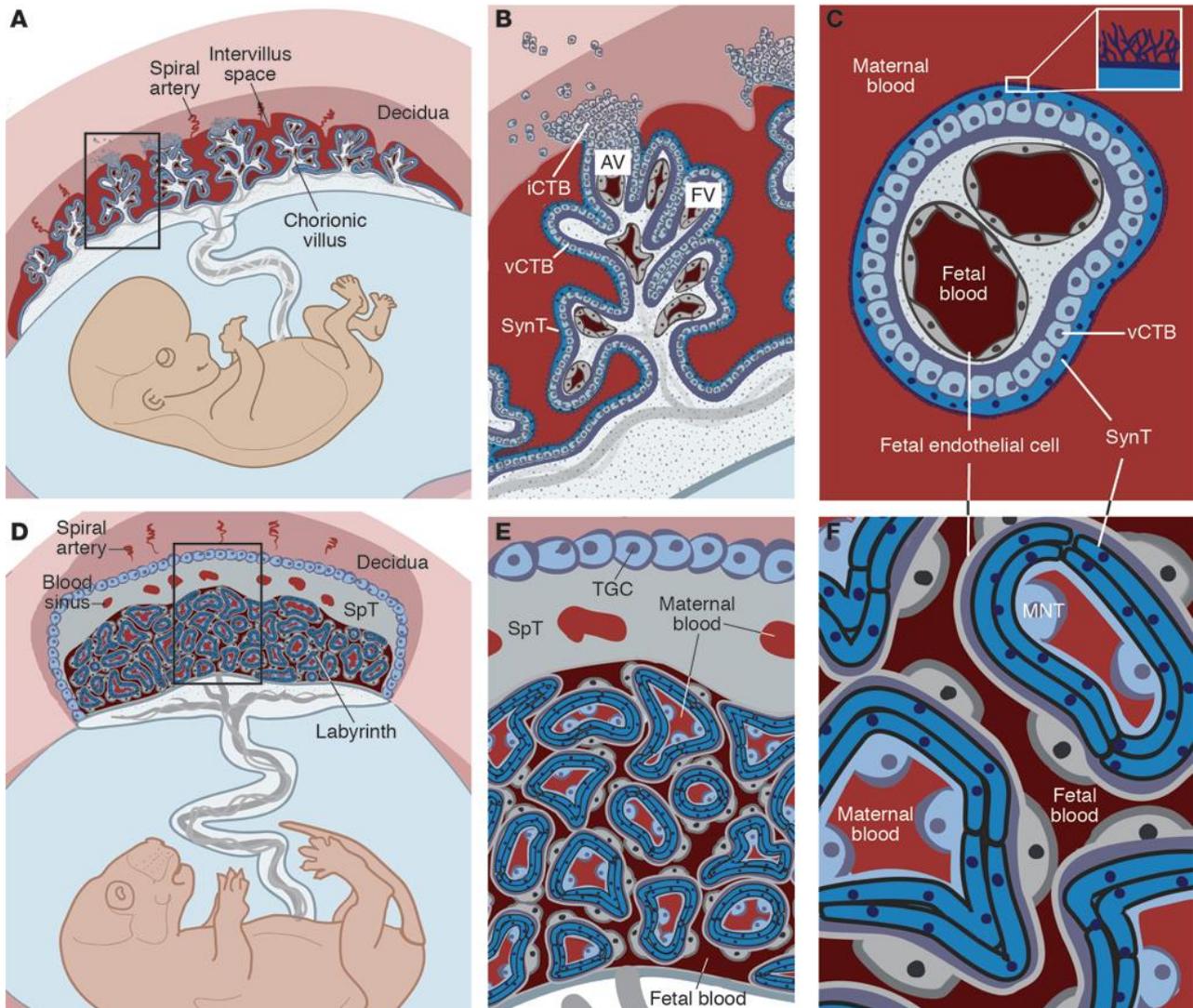


D'après Sharma *et al.*, 2012. À gauche, deux cornes utérines d'une souris en fin de gestation. À droite, vue de la face maternelle d'un placenta murin normal.

3.1.2. Circulation fœto-placentaire

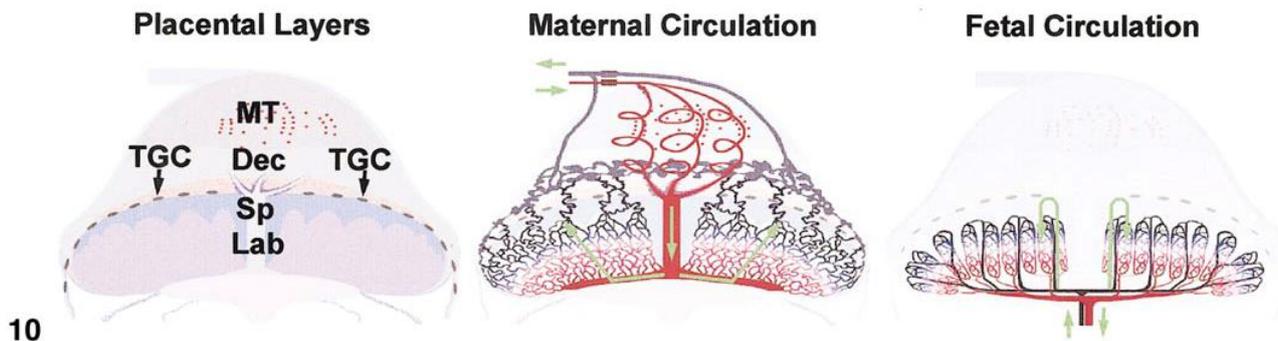
Le réseau complexe des circulations maternelle et fœtale au sein du placenta murin a pu être exploré à l'aide de moulages vasculaires plastiques et de coupes histologiques en série (Adamson *et al.*, 2002). Par ces techniques, ces deux circulations ont pu être distinguées ce qui montre que, tout comme dans le placenta humain, le réseau fœto-placentaire murin est un système clos : le sang fœtal n'est jamais en contact avec le sang maternel qui circule dans le labyrinthe. Les auteurs ont observé que le réseau vasculaire fœtal croisait le flux sanguin maternel à contre-courant (**Figure 21**). Les artères fœtales partent du cordon ombilical jusqu'à atteindre la ligne de cellules géantes, puis se ramifient dans le labyrinthe pour récupérer l'oxygène du sang maternel. Tous les rameaux se rejoignent ensuite en une veine ombilicale rejoignant le cordon ombilical qui regagne le fœtus. Le flux sanguin maternel effectue le chemin en sens inverse, en s'insinuant entre les ramifications du réseau de vaisseaux fœtaux créé.

Figure 20 : anatomie comparée des placentas humain et murin



D'après Maltepe *et al.*, 2010, modifié de Robbins *et al.*, 2010. Dans les placentas hémochoriaux humain (A-C) et murin (D-F), les vaisseaux maternels sont envahis et colonisés par des trophoblastes invasifs (non figurés sur les dessins). (A) Ainsi, chez l'homme, les artères spiralées utérines perfusent les villosités chorales qui tapissent l'espace intervilloux. (B) dans les villosités flottantes (FV), une couche continue de syncytiotrophoblaste est baignée par le sang maternel. En-dessous demeure une population progénitrice de cytotrophoblastes villositaires (vCTB). Au niveau de la paroi utérine, des cytotrophoblastes invasifs (iCTB) se différencient le long de la voie invasive pour former une villosité chorale (AV). Un sous-ensemble de cytotrophoblastes invasifs atteignent les artères spiralées utérines et se différencient en cytotrophoblastes de sous-type endovasculaire qui va remplacer l'endothélium maternel résident (non représenté sur la figure). (C) Anatomie d'une coupe transversale d'une villosité flottante montre que les surfaces apicales des syncytiotrophoblastes sont couvertes de microvillosités ramifiées qui maximisent leur surface pour les échanges de gaz, de nutriments et de déchets. Les vaisseaux sanguins qui se ramifient à travers le stroma villositaire transportent le sang embryonnaire puis fœtal. (D) Chez la souris, le sang maternel provenant des artères spiralées utérines s'écoule à travers les sinus sanguins dans la couche de spongiositrophoblastes pour atteindre le labyrinthe. (E) Les cellules géantes trophoblastiques (TGCs), comme les cytotrophoblastes invasifs, fixent le placenta à l'utérus et envahissent les artères spiralées utérines (non représenté sur la figure). (F) Chez la souris, le sang maternel est en contact direct avec une couche de trophoblastes mononucléés (MNTs) elle-même entourée d'une bicouche de syncytiotrophoblastes très proches des capillaires fœtaux.

Figure 21 : circulations maternelle et fœtale au sein du placenta murin à terme



D'après Adamson *et al.*, 2002. Ce schéma met en évidence la relation en contre-courant des deux circulations. Le rouge représente le sang le plus oxygéné et le bleu représente le sang le moins oxygéné. Les flèches vertes indiquent la direction du flux sanguin. Dec : *decidua basalis* ; Lab : labyrinthe ; MT : *metrial triangle*, triangle métrial ; Sp : spongiotrophoblaste ; TGC : *trophoblast giant cells*, cellules géantes trophoblastiques.

3.2. Mécanismes de la placentation murine

3.2.1. Implantation et développement du labyrinthe

L'implantation chez la souris a lieu à E4.5. Les cellules du trophoctoderme, couche épithéliale externe du blastocyste, prolifèrent pour donner l'ectoderme extra-embryonnaire et le cône ectoplacentaire (**Figure 22**). Les cellules du trophoctoderme vont ensuite réaliser des endomitoses (ou endoréplifications de leur ADN) pour former les cellules géantes trophoblastiques qui vont venir entourer complètement le conceptus. L'ectoderme extra-embryonnaire va ensuite former le chorion (*chorionic epithelium*) qui va par la suite fusionner avec l'allantoïde, dérivé du mésoderme. Des plis apparaissent dans le chorion. Ces plis marquent les sites où les vaisseaux sanguins fœtaux vont être créés à partir de l'allantoïde pour former le réseau dense labyrinthique. Dans le même temps, les cellules trophoblastiques du chorion donnent les deux couches cellulaires de syncytiotrophoblastes, qui vont être apposées aux cellules endothéliales fœtales. La fonction et l'origine de la troisième couche cellulaire accolée aux cellules endothéliales – les trophoblastes mononucléés – restent inconnues (Rossant et Cross, 2001).

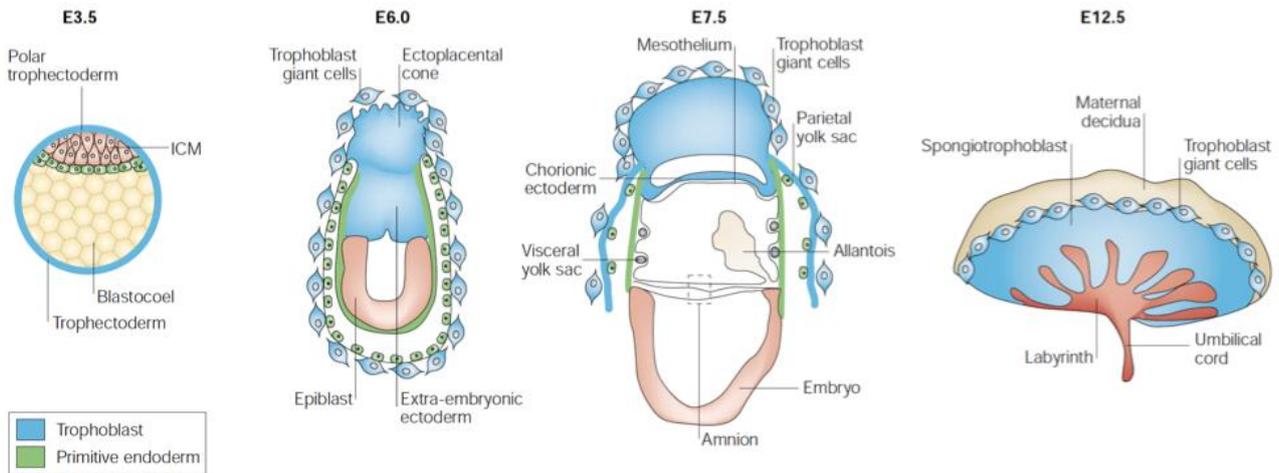
Au cours de son développement, le labyrinthe est supporté par le spongiotrophoblaste, qui forme une couche de cellules non-syncytiales entre le labyrinthe et les cellules géantes externes, appelée zone jonctionnelle. Les spongiotrophoblastes dériveraient essentiellement des cellules du cône ectoplacentaire. Le sang maternel traverse à travers les spongiotrophoblastes par de larges sinus artériels centraux, dans lesquels les cellules endothéliales maternelles sont détruites et remplacées par des cellules trophoblastiques. Le sang maternel entre dans les tortueux et étroits passages du labyrinthe où il va baigner directement les villosités fœtales, assurant les échanges de matières entre les deux systèmes sanguins (Rossant et Cross, 2001).

Ces processus sont accompagnés de modifications morphologiques et structurales de l'utérus : la décidualisation (**Figure 23**).

3.2.2. Le remodelage des artères spiralées utérines

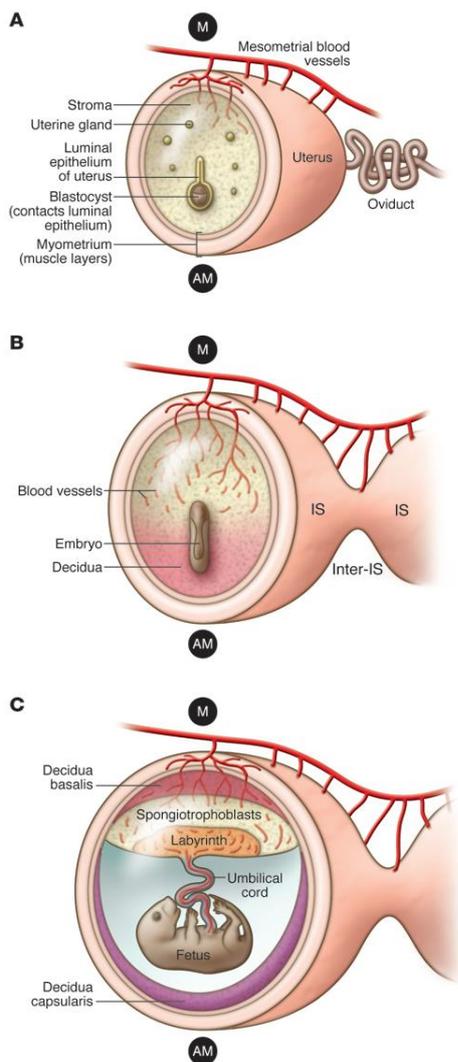
Comme dans la placentation humaine, on observe un remodelage des artères spiralées utérines au cours de la placentation murine (**Figure 24**), utilisant des processus moléculaires similaires.

Figure 22 : développement du placenta murin



D'après Rossant et Cross, 2001. Développement précoce de l'embryon de souris, de E3.5 à E12.5, montrant les origines des lignées extra-embryonnaires et les composants du placenta. ICM : *inner cell mass*, masse cellulaire interne.

Figure 23 : décidualisation et placentation murine



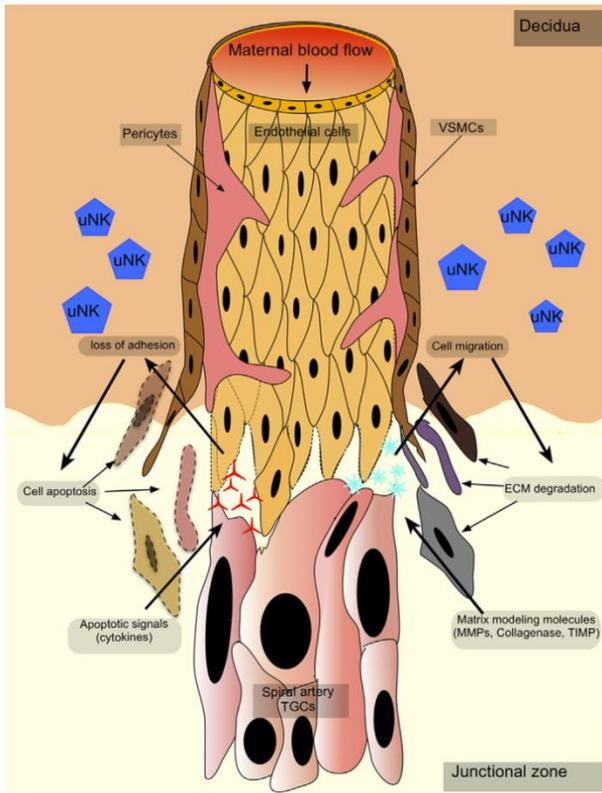
D'après Lim et Wang, 2010. Illustrations décrivant les coupes transversales des sites d'implantation à E4, E7 et E13.

(A) À E4, l'épithélium luminal se ferme sur un blastocyste implanté. Le trophoblaste mural, situé à l'opposé de la masse cellulaire interne, touche l'épithélium au niveau du côté antimésométrial (AM). La réponse déciduale commence également du côté antimésométrial (non représentée ici). M : côté mésométrial.

(B) À E7, l'embryon est plus gros, et le cône ectoplacentaire a pénétré la décidue mésométriale enrichie en vaisseaux sanguins. Les cellules déciduales différenciées occupent désormais la majeure partie du site d'implantation (IS). Il est à noter que la décidualisation n'a pas lieu aux endroits où il n'y a pas eu d'implantation.

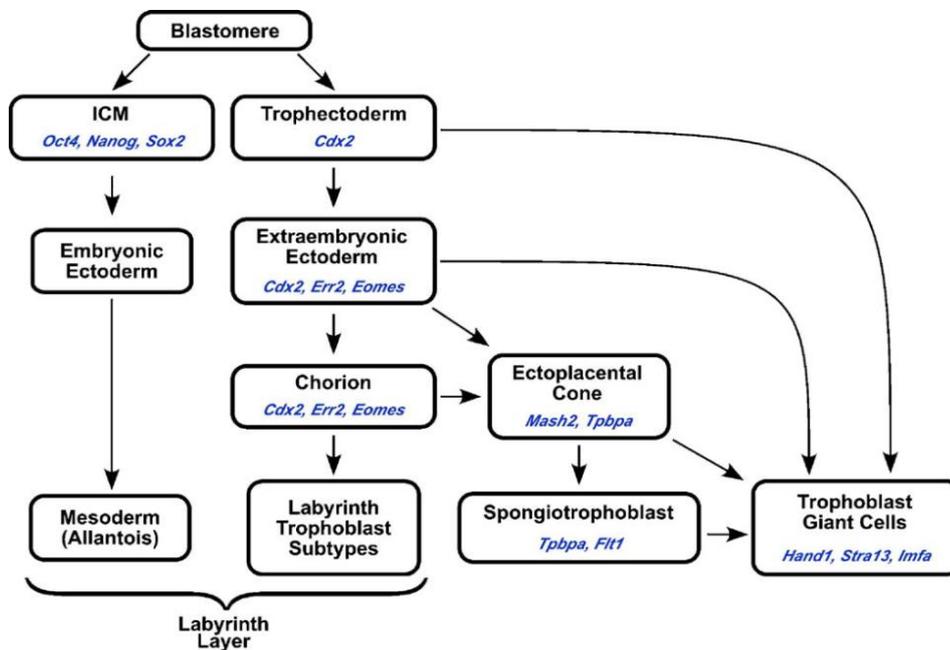
(C) À E13, le placenta s'est développé et la décidue a régressé en couches fines autour du placenta et de l'embryon, appelées *decidua basalis* et *decidua capsularis* respectivement.

Figure 24 : remodelage des artères spiralées utérines au cours de la placentation murine



D'après Rai et Cross, 2014. Invasion vasculaire et remplacement des cellules endothéliales par les cellules trophoblastiques dans les artères spiralées murines. Le remodelage des artères spiralées se produit soit par apoptose cellulaire, soit par dégradation de la matrice extracellulaire induite par les trophoblastes intravasculaires. Certaines molécules signal seraient aussi sécrétées par les *natural killer* utérines (uNK) dans la décidue. VSMCs : *vascular smooth muscle cells*, cellules musculaires lisses vasculaires ; MMPs : *matrix metalloproteinases*, métalloprotéinases matricielles ; TIMP : *tissue inhibitor of metalloproteinases*, inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases.

Figure 25 : vue d'ensemble des lignées trophoblastiques murines et de leurs gènes spécifiques



D'après Simmons et Cross, 2005.

3.2.3. Différenciations et spécialisations cellulaires au cours de la placentation

Comme chez l'homme, le processus de placentation chez la souris est le siège de nombreuses différenciations et spécialisations cellulaires (**Figure 25**). La souris, en tant qu'animal de laboratoire, a permis en plus la découverte de gènes gouvernant la différenciation des trophoblastes au cours de la placentation.

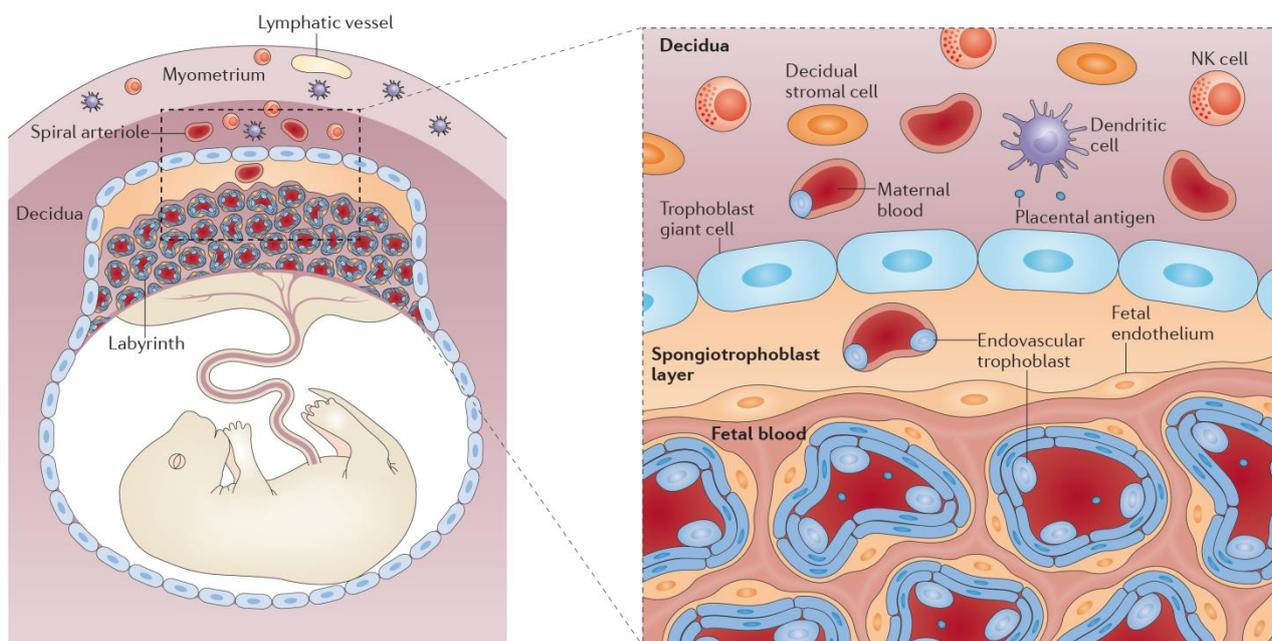
3.2.4. Immunité et placentation

Il a été montré, comme chez l'homme, que la placentation murine impliquait des mécanismes immunitaires faisant intervenir :

- une expression trophoblastique des antigènes du CMH particulière (Madeja *et al.*, 2011) ;
- des cellules immunitaires maternelles particulières dans la décidue (**Figure 26**), en particulier des cellules *natural killer* utérines et des cellules T régulatrices (Erlebacher, 2013).

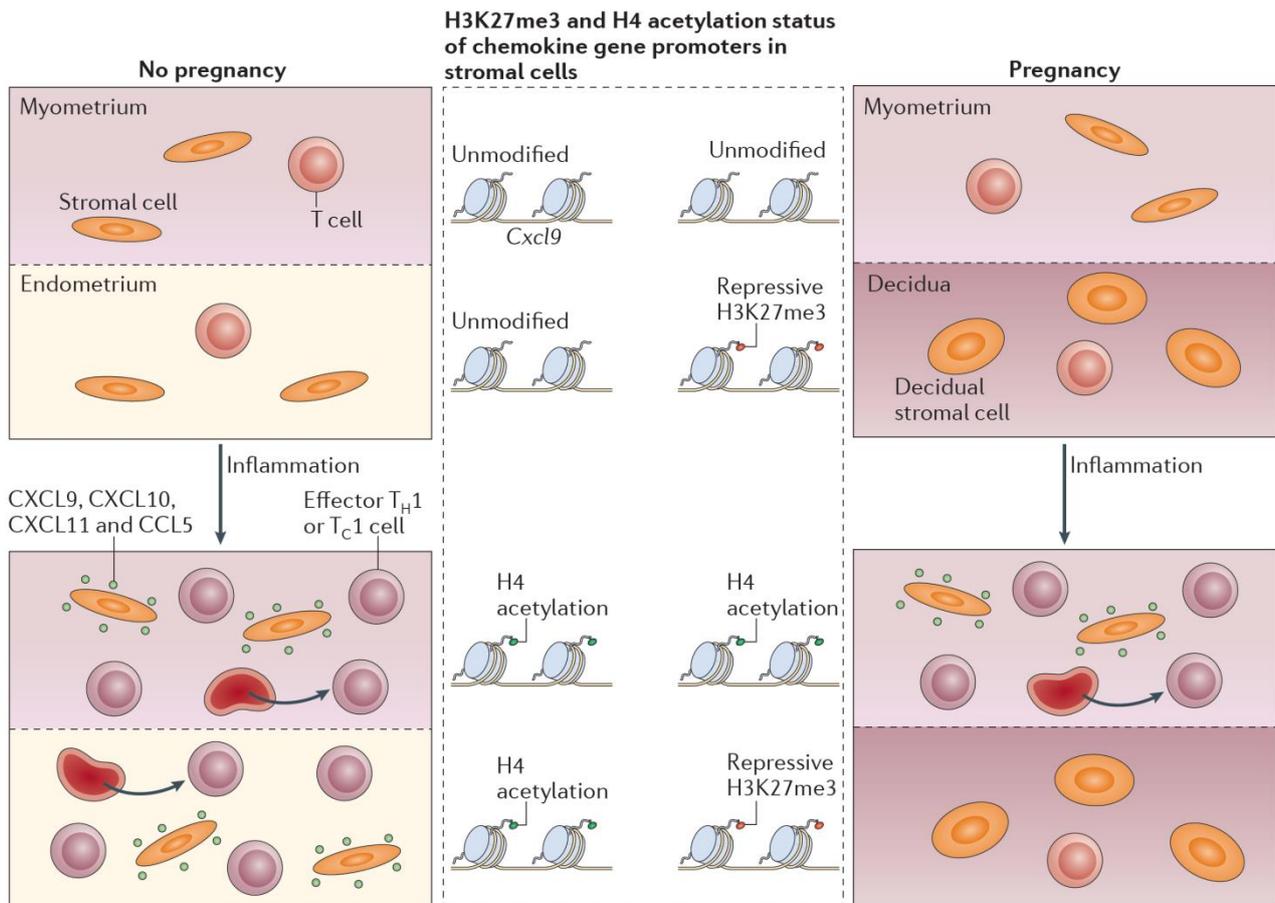
Le modèle murin a apporté des réponses quant aux mécanismes moléculaires sous-jacents. Il a notamment été montré que la tolérance fœto-maternelle pourrait passer par la régulation de l'expression des gènes codant des chimiokines inflammatoires telles que CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL5 (**Figure 27**).

Figure 26 : populations cellulaires présentes à l'interface fœto-maternel du placenta murin



D'après Erlebacher, 2013. La figure montre une coupe sagittale d'un site d'implantation à E11.5. Le placenta murin comprend trois principales portions : le labyrinthe, où ont lieu les échanges de nutriments et de gaz entre les capillaires fœtaux et le sang maternel, la couche de spongio-trophoblastes et une couche externe composée en partie de cellules géantes trophoblastiques. La couche formée par ces cellules géantes trophoblastiques s'étend tout autour du conceptus et de ses annexes. L'implantation de l'embryon induit la formation de la décidue, tissu stromal spécialisé dérivé de l'endomètre utérin. Cette structure renferme entièrement le conceptus et contient les diverses sous-populations de leucocytes maternels qui peuplent l'interface fœto-maternel. La formation de la décidue implique la transformation de cellules stromales endométriales en cellules stromales déciduales. La décidue voit déboucher les artères spiralées utérines, dont la couche endothéliale est substituée par des cellules trophoblastiques (placentaires) adoptant un phénotype endothélial. Ces cellules sont a priori susceptibles de libérer des antigènes placentaires dans la circulation maternelle. Les vaisseaux lymphatiques restent dans le myomètre (les muscles lisses constituant le périmètre de l'utérus). NK : *natural killer*.

Figure 27 : mécanismes de régulation des gènes codant des chimiokines inflammatoires au cours de la placentation



D'après Erlebacher, 2013. Dans l'utérus non gestant, les promoteurs des gènes *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11* et *Ccl5* dans les cellules stromales sont associés avec une configuration chromatinienne permettant l'induction de leur transcription suite une induction par la voie du TNF (*tumor necrosis factor*) ou de l'IFN γ (interféron gamma). Ainsi, en réponse à l'inflammation, l'endomètre et le myomètre induit l'expression de CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CCL5, qui en retour promeuvent l'extravasation et l'accumulation de cellules T activées dans les deux couches cellulaires. L'induction transcriptionnelle est associée à l'accumulation d'histone H4 acétylé au niveau du promoteur de ces gènes. Après décidualisation, les cellules stromales déciduales active un programme épigénétique qui cible les quatre gènes vers l'accumulation de marques répressives d'histones H3K27me3 (histone H3 triméthylé sur la lysine 27). Ainsi, au niveau du site d'implantation, le myomètre devient le seul tissu pouvant exprimer *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Cxcl11* et *Ccl5* en réponse à une inflammation et donc le seul tissu montrant une accumulation de cellules T. Ce mécanisme limite l'infiltration dans la décidue de cellules *T helper 1* (T_H1) et T cytotoxiques 1 (T_C1), y compris les cellules non-spécifiques des antigènes du conceptus.

4. CONCLUSION DE CE PREMIER CHAPITRE : LE PLACENTA, UN ORGANES PLURIFONCTIONNEL ENCORE MÉCONNU

Le placenta est un organe spécifique des mammifères euthériens où s'établissent les échanges fœto-maternels qui permettront le développement embryonnaire puis fœtal. Chez ces mammifères, les structures placentaires présentent une extrême diversité, ce qui oblige une grande prudence quant à toute extrapolation des résultats d'une espèce à une autre (Evain-Brion et Malassiné, 2010).

Le placenta hémomonochorial humain se caractérise par une réaction déciduale globale de l'utérus et une invasion maximale du trophoblaste. De la qualité du développement placentaire et de la mise en place des circulations fœtale et maternelle dépendent directement l'évolution de la grossesse et le développement embryonnaire et fœtal. Le remodelage des artères spiralées par le trophoblaste semble être un processus physiologique crucial au cours de ce processus (Evain-Brion et Malassiné, 2010).

Le placenta, et particulièrement le placenta humain, reste un organe méconnu. La placentation murine, de type hémotrichorial, ressemble par certains côtés à la placentation humaine, en particulier dans l'intimité du contact entre les circulations maternelles et fœtales. Ceci justifie que la souris soit un modèle utilisé dans la recherche des mécanismes moléculaires de la mise en place et du développement placentaire, ainsi que dans l'étude des maladies humaines de la grossesse.

CHAPITRE II. LA PRÉÉCLAMPSIE

1. DÉFINITIONS

La prééclampsie fait partie des maladies hypertensives de la grossesse (Dubar *et al.*, 2012). Il existe de multiples définitions de la prééclampsie, y compris dans les critères de caractérisation de sa forme typique, et aucune ne se suffit à elle seule (Redman, 2011). Chaque société savante consacrée à l'étude de l'hypertension artérielle au cours de la grossesse en a donné une. Les définitions présentées ici sont celles de la conférence d'experts de la Société Française d'Anesthésie-Réanimation de 2008 (Société française d'anesthésie et de réanimation *et al.*, 2009).

- L'hypertension artérielle gravidique ou gestationnelle est définie par une pression artérielle systolique égale ou supérieure à 140 mmHg et/ou une diastolique égale ou supérieure à 90 mmHg, survenant après 20 semaines d'aménorrhée (SA) et disparaissant avant la fin de la 6^e semaine du postpartum. La coexistence de tous ces critères est indispensable pour distinguer la prééclampsie de l'hypertension artérielle chronique.
- La prééclampsie est définie de façon simpliste mais pragmatique : la simple association d'une hypertension artérielle gravidique à une protéinurie apparue après 20 SA et dépassant 0,3 g/24 h suffit à affirmer une prééclampsie.
- L'hypertension artérielle chronique correspond à une hypertension artérielle préalable à la grossesse ou diagnostiquée avant la vingtième semaine d'aménorrhée ou bien persistant six semaines après la fin de la grossesse.
- La prééclampsie surajoutée correspond à l'apparition d'une protéinurie significative chez une patiente hypertendue chronique.

La prééclampsie est caractérisée par un très grand polymorphisme clinique : ainsi, il existe des prééclampsies sévères ou modérées, typiques ou atypiques, compliquées ou non compliquées, précoces ou tardives, qui ont chacune leur définition (Dubar *et al.*, 2012 ; Société française d'anesthésie et de réanimation *et al.*, 2009). C'est pourquoi la prééclampsie n'est habituellement pas considérée comme une maladie au sens strict, définie par une cause unique et des mécanismes physiopathologiques univoques (Redman, 2011), mais plutôt comme un syndrome particulièrement complexe, spécifique de la grossesse (Roberts *et al.*, 1989).

2. HISTORIQUE

L'historique de la prééclampsie est en réalité jeune : le terme prééclampsie fut introduit vers la fin du 19^e siècle pour décrire l'état précédant l'éclampsie (Lindheimer *et al.*, 2015). L'éclampsie, elle, est en revanche décrite depuis plus longtemps puisqu'on trouve des papyrus égyptiens décrivant ces crises convulsives (Bell, 2010).

Le mot « éclampsie » est dérivé du mot grec « *eklampsis* » qui signifie « lumière éclatante, jet de lumière », reflétant le caractère soudain de l'apparition de ces crises convulsives chez les femmes enceintes. Il fut introduit par François Boissier de la Croix de Sauvages en référence à l'occurrence subite des convulsions chez les patientes (Lindheimer *et al.*, 2015).

Le mot « éclampsie » a d'ailleurs été utilisé pour désigner d'autres entités pathologiques dans le monde animal. L'éclampsie puerpérale chez la vache par exemple désigne une parésie voire une paralysie des membres survenant généralement chez des vaches fortes productrices ayant déjà mis bas au moins deux fois. Cette crise est due à une hypocalcémie sévère liée à un manque de mobilisation du calcium osseux par hypersécrétion de calcitonine (Kahn, 2010). L'éclampsie puerpérale a pris par la suite d'autres appellations plus employées aujourd'hui : fièvre de lait, fièvre du part, hypocalcémie vitulaire, paralysie vitulaire, parésie de parturition, parésie puerpérale, tétanie puerpérale, etc. Parallèlement, l'éclampsie est également un syndrome convulsif aigu survenant sur une chienne, et parfois mais plus rarement sur une chatte, en lactation, quelquefois en fin de gestation. Cette crise est également due à une hypocalcémie.

Si l'éclampsie semble donc être une entité pathologique retrouvée dans le monde animal, ce n'est pas le cas de la prééclampsie. En effet, il n'y a à ce jour aucune description de symptômes prééclamptiques spontanés chez les animaux, y compris les bonobos (*Pan paniscus*), chimpanzés considérés comme les plus proches phylogénétiquement de l'Homme. La prééclampsie semble donc restreinte à l'espèce humaine (Doridot *et al.*, 2012). Cette affirmation est probablement vraie, au vu du nombre d'études scientifiques réalisées sur les chimpanzés. Cependant, il serait plus exact de dire que la prééclampsie est très rare ou ne peut être qu'induite dans les autres espèces en dehors de l'espèce humaine. En effet, deux articles des années 1970 décrivent des symptômes comparables à la prééclampsie chez le Patas (*Erythrocebus patas*), appelé aussi Singe rouge ou Singe roux ou Singe pleureur (Gille *et al.*, 1977 ; Palmer *et al.*, 1979). Il est toutefois à souligner que ces gestations prééclamptiques ont été observées au cours d'études de carcinogènes, ce qui fausse probablement la réalité biologique.

En supposant que la question de la spécificité humaine de la prééclampsie reste en suspens, on peut néanmoins dire que la prééclampsie est suffisamment exceptionnelle dans le règne animal pour avoir freiné les recherches (voir également le chapitre sur les modèles animaux).

3. ÉPIDÉMIOLOGIE

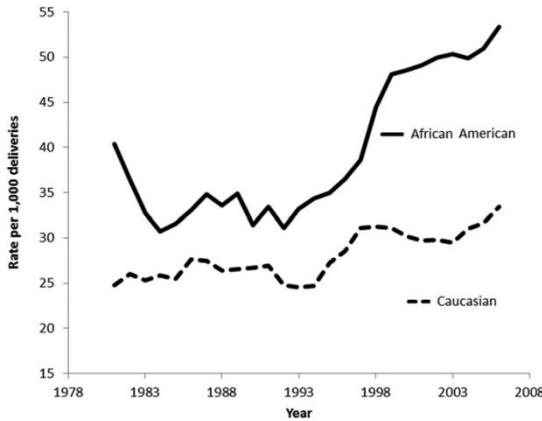
3.1. Incidence de la prééclampsie

En France, l'incidence de la prééclampsie est estimée entre 1 et 3 % des grossesses pour les patientes nullipares, et entre 0,5 et 1,5 % des grossesses pour les multipares (Subtil *et al.*, 2003).

Cette incidence est sensiblement plus élevée dans les pays anglo-saxons où elle peut atteindre 5 à 7 % chez les patientes nullipares (Zhang *et al.*, 1997). Cette différence d'incidence selon les pays peut être attribuable non seulement à des différences dans la composition de la population, les caractéristiques démographiques et obstétricales, ou l'incidence réelle de la maladie, mais aussi à des différences dans la définition, notamment des différences de seuils de tension pour caractériser la prééclampsie (World Health Organization, 1988 ; Zhang *et al.*, 1997).

L'incidence de la prééclampsie pourrait également dépendre de l'origine ethnique de la mère (**Figure 28**), mais des controverses existent encore à ce sujet. En effet, le système de déclaration raciale peut avoir des erreurs en sous-estimant la race ou en rapportant une race incorrecte (parfois l'origine ethnique ne peut pas être déterminée). Cependant, des différences raciales de prévalence de l'obésité et du syndrome métabolique sont connues. Ces maladies étant des facteurs de risque de la prééclampsie, leur plus forte prévalence dans une ethnie pourrait expliquer une divergence du taux de prééclampsie (Bodnar *et al.*, 2007 ; Mozumdar et Liguori, 2011 ; Ogden et Carroll, 2010).

Figure 28 : taux de prééclampsie selon l'origine ethnique de la mère



D'après Breathett *et al.*, 2014. Le taux de prééclampsie est calculé en effectuant une moyenne sur trois années consécutives. Les mères américaines d'origine africaine sont représentées en trait plein, les mères américaines d'origine caucasienne sont représentées en pointillés. De 1976 à 2006, l'incidence de la prééclampsie a persisté à des niveaux plus élevés pour les femmes afro-américaines. Cette disparité diminue au cours de la période 1979-1988, peut-être à cause des définitions cliniques changeantes de la prééclampsie, de l'augmentation de l'accès aux soins prénatals ou des changements dans les rapports d'origines ethniques au sein de la population. Cette même disparité augmente à partir des années 1990, probablement à cause de la prévalence croissante de l'obésité et du syndrome métabolique chez les femmes afro-américaines.

Tableau 1 : facteurs de risque de la prééclampsie

Facteurs préconceptionnels et/ou facteurs de risque chroniques	<p>Facteurs physiologiques liés au père : Nulliparité/primiparité Faible exposition au sperme paternel avant conception Procréation médicalement assistée : insémination avec don de sperme Homme ayant induit une prééclampsie chez une autre femme</p> <p>Facteurs physiologiques liés à la mère : Grossesse après 40 ans Grossesse chez l'adolescente Grossesse prééclamptique antérieure Intervalles longs entre les grossesses Historique familial de prééclampsie Procréation médicalement assistée avec don d'ovocytes</p> <p>Facteurs pathologiques liés à la mère : Hypertension chronique Maladie rénale Obésité Résistance à l'insuline Bas poids de naissance de la mère Diabète sucré de type 1 Résistance à la protéine C activée (mutation de Leiden du facteur V de la coagulation) Déficit en protéine S Anticorps antiphospholipides Hyperhomocystéinémie</p> <p>Facteurs environnementaux : Tabagisme (effet protecteur) Stress/pression psychosociale au travail</p>
Facteurs de risques associés à la grossesse	Grossesse multiple Infection du tractus urinaire Anomalies congénitales Diabète gestationnel Hydrops fœtal Anomalies chromosomiques (triploïdies comme la trisomie 21) Mômes hydatiformes

D'après Dekker et Sibai, 2001 et Duckitt et Harrington, 2005. Les facteurs écrits en rouge peuvent être considérés comme des facteurs immunologiques, tandis que les facteurs écrits en bleu peuvent être considérés comme des facteurs génétiques.

3.1. Incidence de l'éclampsie

L'éclampsie complique 1 % à 2 % des prééclampsies sévères (Sibai, 2006). Une surveillance clinique régulière au cours de la grossesse et l'extraction fœtale en cas de prééclampsie sévère minorent ce risque. L'incidence de la maladie est nettement plus élevée dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés (Collange *et al.*, 2010).

4. ÉTIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUES

Comme évoqué ci-avant, la prééclampsie n'est habituellement pas considérée comme une maladie au sens strict, définie par une cause unique et des mécanismes physiopathologiques univoques (Redman, 2011), mais plutôt comme un syndrome particulièrement complexe spécifique de la grossesse (Roberts *et al.*, 1989). Cette définition complique finalement la recherche des causes de la prééclampsie. En effet, la prééclampsie a très probablement des causes particulières associées à chacune de ses formes cliniques – précoce, tardive, etc. – mais chaque forme clinique de prééclampsie a encore probablement plusieurs causes différentes possibles. Il n'y a donc pas une cause mais des causes possibles à la prééclampsie.

4.1. Facteurs de risques de la prééclampsie

À ce jour, les causes exactes de la prééclampsie sont inconnues. Seuls les facteurs de risques sont bien caractérisés. Or les facteurs de risques sont en réalité des corrélations entre des paramètres et l'apparition du syndrome, ils ne constituent donc pas des preuves de causalité. Cependant, tous ces facteurs constituent des pistes pour la recherche des causes du syndrome. Plusieurs exemples de facteurs de risques sont présentés dans le **Tableau 1**.

Tous ces facteurs de risque renseignent ainsi sur les éventuels facteurs biologiques sous-tendant les mécanismes d'apparition de la prééclampsie. Ainsi, des facteurs comme la nulliparité – le fait qu'une femme n'a jamais eu d'enfants – ou la primiparité – première grossesse d'un couple donné – ont orienté les chercheurs vers une hypothèse immunologique de la prééclampsie. En effet, le conflit entre la mère et les antigènes d'origine fœtale – donc d'origine paternelle pour moitié – serait en effet plus fréquent et plus grave au cours de la première grossesse (Dubar *et al.*, 2012). Plusieurs facteurs de risque, comme un historique familial de prééclampsie, ont quant à eux orienté les chercheurs vers des causes génétiques. De plus, le fait que certaines maladies chroniques, ayant elles-mêmes des prédispositions génétiques, soient associées à la prééclampsie renforce l'idée d'un impact génétique dans ce syndrome.

4.2. Génétique de la prééclampsie

De très nombreuses études génétiques ont été conduites autour de la prééclampsie et des maladies hypertensives de la grossesse en général. Les premières études datent du début du 20^e siècle, lorsque le docteur Chesley a mis en évidence l'implication de facteurs familiaux dans l'étiologie de la maladie (Chesley, 1980). Plusieurs types d'études génétiques ont été utilisés pour essayer de résoudre le mystère de la prééclampsie, notamment des études familiales (Arngrimsson *et al.*, 1990 ; Cnattingius *et al.*, 2004), des études sur les jumeaux (Laivuori, 2007), des analyses de ségrégation (Laivuori, 2007 ; van Dijk *et al.*, 2005), des analyses de liaison (Moses *et al.*, 2006), des études d'association (Buurma *et al.*, 2013 ; Staines-Urias *et al.*, 2012 ; L. Zhao *et al.*, 2013) et des études à partir de séquençage nouvelle-génération (Ding *et al.*, 2012). Grâce à ces études, la prééclampsie est connue depuis longtemps comme étant un syndrome multifactoriel qui a une base génétique polygénique, et une héritabilité estimée à environ 55 % à partir de l'analyse de grandes cohortes scandinaves (Cnattingius *et al.*, 2004).

Cependant, déterminer un gène responsable de l'apparition d'un syndrome ne consiste pas uniquement en la recherche d'un polymorphisme ou d'une mutation causale. Parfois, seul le taux d'expression d'un gène peut être l'élément causal. C'est pourquoi de nombreux auteurs se sont penchés sur des études transcriptomiques placentaires (Enquobahrie *et al.*, 2008 ; S A Founds *et al.*, 2009 ; Oudejans et van Dijk, 2008 ; Söber *et al.*, 2015 ; Winn *et al.*, 2009) ou des études de la méthylation (Hogg *et al.*, 2013) pour rechercher des gènes causaux.

Le résumé de ces recherches est donc difficile à faire : plusieurs polymorphismes ont été trouvés au sein de plusieurs populations différentes, les gènes ou régions génomiques trouvées ne se croisent pas souvent, et les gènes trouvés sont impliqués dans des voies biologiques très diverses. Pour refléter cette diversité, on peut par exemple citer :

- le gène de l'angiotensinogène (*AGT*), facteur impliqué dans la régulation de la pression artérielle (Ward *et al.*, 1993) ;
- le gène du facteur V de Leiden (*FVL*), facteur de la coagulation impliqué dans les thrombophilies (Dizon-Townson *et al.*, 1996) ;
- le gène de l'époxyde hydrolase (*EPHX*), qui est une enzyme antioxydante (Zusterzeel *et al.*, 2001) ;
- le gène *HLA-G* (*human leucocyte antigen G*), codant une protéine de surface responsable de l'identité cellulaire et impliquée dans les réponses immunitaires (O'Brien *et al.*, 2001) ;
- le gène *STOX1* (*storkhead box 1*), impliqué dans la migration et la fusion cellulaire (van Dijk *et al.*, 2005).

Des régions chromosomiques de susceptibilité ainsi que des gènes candidats trouvés dans différentes études sont présentés en **Figure 29**.

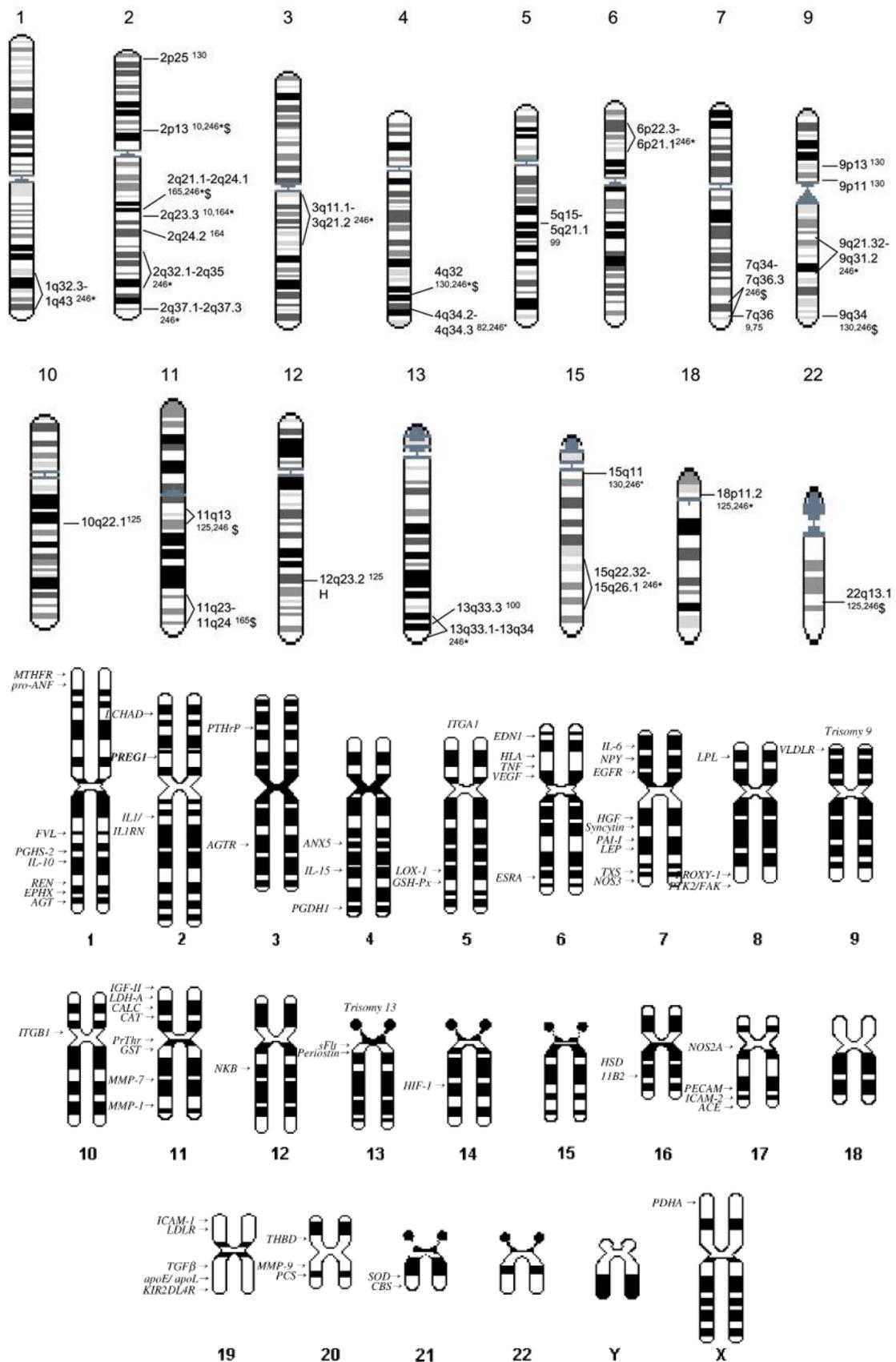
L'autre difficulté dans ces analyses est d'en ressortir des conclusions quant à l'étiologie de la prééclampsie. En effet, parmi tous ces gènes, certains sont peut-être à l'origine de l'établissement du syndrome mais d'autres peuvent seulement constituer des facteurs aggravants ou des facteurs de risque.

En définitive, la prééclampsie peut être vue comme un trouble familial impliquant visiblement plusieurs gènes appartenant à de multiples voies biologiques. Les études pangénomiques semblent être le futur de la recherche génétique autour de la prééclampsie mais des efforts pour définir des sous-ensembles cliniques sont nécessaires pour que ces études puissent rendre compte de l'hétérogénéité du syndrome (Ward et Taylor, 2015). Ces recherches pourraient mener au développement de tests sanguins, à une meilleure compréhension de sa physiopathologie et au développement de traitements curatifs ou préventifs (Ward et Taylor, 2015).

4.3. Facteurs de risque de l'éclampsie

L'un des facteurs de risque majeur de l'éclampsie est le mauvais suivi de la grossesse, c'est pourquoi, pensent les experts, l'incidence de la maladie est nettement plus élevée dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés (Collange *et al.*, 2010). Les autres facteurs de risque d'éclampsie communément cités sont l'âge inférieur à 20 ans, la femme primigeste – enceinte pour la première fois –, l'obésité, le diabète et l'infection urinaire (Collange *et al.*, 2010).

Figure 29 : positions chromosomiques de quelques régions de susceptibilité et de quelques gènes candidats pour la prééclampsie



D'après Mütze *et al.*, 2008 et Lachmeijer *et al.*, 2002. Localisation chromosomique de régions de susceptibilité ou de gènes trouvés pour la prééclampsie par analyses pangénomiques et études d'association. * critère général (étude incluant également des patientes atteinte d'hypertension gestationnelle sans protéinurie) ; § critère strict ; H : HELLP syndrome.

5. SYMPTÔMES, COMPLICATIONS ET LÉSIONS

5.1. Symptômes maternels

En dehors de l'hypertension et de la protéinurie, on peut noter (Dubar *et al.*, 2012) :

- des signes neurologiques comme des céphalées, des troubles visuels, des troubles auditifs, des somnolences ;
- des douleurs épigastriques en barre ;
- des nausées ou vomissements ;
- des œdèmes, qui sont particulièrement caractéristiques lorsque leur apparition est rapide – associés alors à une prise de poids brutale – et lorsqu'ils touchent la partie supérieure du corps comme visage ou les mains ;
- des réflexes ostéotendineux vifs ou polycinétiques.

5.2. Complications fœtales

L'ischémie placentaire est à l'origine d'une hypoxie tissulaire chronique du fœtus. Cette hypoxie peut entraîner un retard de croissance intra-utérin, diminution des mouvements actifs fœtaux, des anomalies du rythme cardiaque fœtal à l'enregistrement cardiotocographique, une souffrance fœtale chronique, une souffrance fœtale aiguë, voire une mort fœtale in utero. La surveillance du fœtus et son adaptation à cette hypoxie chronique est réalisée par l'analyse du rythme cardiaque fœtal et par l'échographie : biométrie, évaluation de la quantité de liquide amniotique, Dopplers utérins, Dopplers artériels ombilicaux et cérébraux (Dubar *et al.*, 2012).

La prééclampsie est également fréquemment à l'origine d'une prématurité parfois sévère, entraînant des conséquences sur la morbidité et la mortalité néonatales. Cette prématurité peut être spontanée ou induite pour sauvetage maternel et/ou fœtal (Dubar *et al.*, 2012).

5.3. Le syndrome HELLP

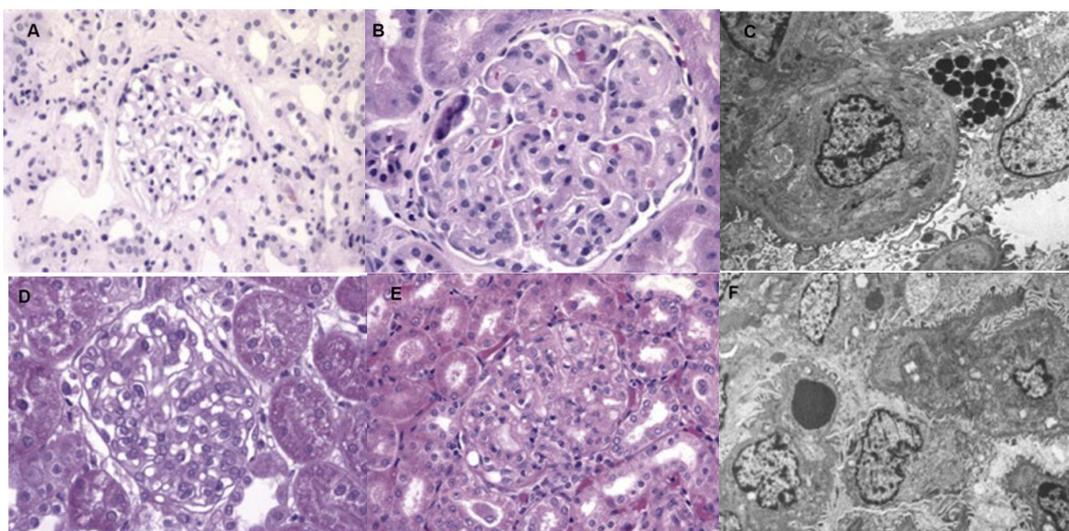
Le syndrome HELLP – acronyme de *hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets count* – complique 5 % à 20 % des prééclampsies. Sa définition est purement biologique et repose sur l'association d'un taux de plaquettes inférieur à $100\,000\text{.mm}^{-3}$, d'une cytolysé hépatique avec des ASAT supérieures à 70 UI.L^{-1} et d'une hémolyse diagnostiquée par une bilirubinémie totale supérieure à 12 mg.L^{-1} ou par un taux de LDH supérieur à 600 UI.L^{-1} avec la présence de schizocytes, c'est-à-dire des fragments de globules rouges (Sibai, 1990). Il existe également des formes incomplètes ne comprenant pas les quatre altérations décrites. Le HELLP est le témoin biologique de la microangiopathie thrombotique maternelle pouvant survenir au cours de la prééclampsie. La lésion de l'endothélium au cours de la prééclampsie provoque une atteinte microvasculaire provoquant une vasoconstriction et une activation de la coagulation à l'origine de microthrombi disséminés (Baxter et Weinstein, 2004). L'hémolyse est ainsi la conséquence de la destruction des hématies sur les dépôts endothéliaux de fibrine. La thrombopénie est due à l'agrégation et à la consommation des plaquettes au contact des lésions endothéliales. La cytolysé hépatique traduit pour sa part la nécrose hépatocytaire. Cette nécrose, essentiellement péri-portale, est la conséquence ischémique des dépôts intravasculaires de fibrine à l'intérieur des sinusoides hépatiques. Des lésions hépatiques hémorragiques peuvent également être observées, causées par l'hyperpression intra-parenchymateuse, et pouvant exceptionnellement être à l'origine d'un hématome sous capsulaire du foie, voire d'une rupture hépatique.

5.4. Complications et lésions rénales

En plus de la protéinurie, les caractéristiques du retentissement rénal de la prééclampsie sont une diminution du débit sanguin rénal, du débit de filtration glomérulaire et de la fraction de filtration (Jeyabalan et Conrad, 2007).

L'atteinte histologique rénale typique est une endothéliose glomérulaire (**Figure 30**), dont la protéinurie est la traduction clinique. Cette atteinte glomérulaire est réversible et disparaît dans les 3 mois suivant l'accouchement. Dans de rares cas, l'atteinte rénale peut progresser jusqu'à la nécrose tubulaire aiguë, voire la nécrose corticale, en raison de l'hypoperfusion rénale prolongée que l'on peut observer dans les prééclampsies sévères.

Figure 30 : lésions d'endothéliose glomérulaire



D'après Karumanchi *et al.*, 2005. (A) Glomérule rénal humain normal. (B) Glomérule prééclampsique d'une femme de 33 ans gestante de jumeaux et atteinte d'une prééclampsie sévère à 26 semaines de grossesse. Le ratio protéines / créatinine était de 26 au moment de la biopsie. (C) Microscopie électronique d'un glomérule de la même patiente. Noter l'occlusion des lumières des capillaires à cause du gonflement du cytoplasme des cellules endothéliales. Le cytoplasme des podocytes montre des gouttelettes protéiques mais des pédicelles intacts. Grossissement : X1500. (D) Glomérule de rat normal : noter la densité normale en nombre et en qualité de cellules composant le tissu. (E) Glomérule de rat traité par sFlt-1 (voir paragraphes suivants, il s'agit d'un modèle animal de prééclampsie) : noter l'occlusion similaire des lumières capillaires à cause du gonflement des cellules endothéliales, avec peu d'augmentation de la densité cellulaire. (F) Microscopie électronique d'un glomérule de rat traité par sFlt-1 : noter l'occlusion similaire des anses capillaires à cause du gonflement du cytoplasme des cellules endothéliales accompagné d'une préservation relative des pédicelles. Grossissement : X2500. Les coupes histologiques observées en microscopie optique ont été colorées en HE classique, et ont été prise avec le même grossissement de X40.

5.5. Complications et lésions cardiorespiratoires

L'augmentation de la perméabilité capillaire au cours de la prééclampsie, causée par les lésions diffuses de l'endothélium vasculaire, et la baisse de la pression oncotique favorisent un mouvement liquidien du secteur intravasculaire vers le secteur interstitiel, pouvant aboutir à un œdème pulmonaire. D'autres facteurs peuvent participer à la constitution de cet œdème, au premier rang desquels l'augmentation de la pression hydrostatique, liée à un remplissage trop important ou à la résorption vasculaire du liquide interstitiel en post-partum immédiat.

L'augmentation de la perméabilité capillaire peut également être à l'origine d'un œdème pharyngolaryngé. Cet œdème des voies respiratoires peut être une cause d'intubation difficile, voire, exceptionnellement, impossible. Il est susceptible de s'aggraver au cours du travail en cas d'accouchement par voie basse

5.6. L'éclampsie

L'éclampsie est définie par des convulsions généralisées et/ou des troubles de la conscience survenant au cours d'une prééclampsie et ne pouvant pas être rapportés à une pathologie neurologique préexistante (Collange *et al.*, 2010). Il s'agit de la complication neurologique majeure de la prééclampsie.

L'éclampsie survient la plupart du temps avant l'accouchement ou en post-partum immédiat. Des survenues plus tardives ont été décrites au cours des deux premières semaines suivant l'accouchement. Les crises convulsives sont très souvent précédées de prodromes dans les jours avant leur apparition. Les prodromes les plus significatifs sont les céphalées et les troubles visuels comme phosphènes ou cécité corticale – perte plus ou moins complète de la vision alors que les réflexes photomoteurs sont conservés –, mais aussi d'autres signes de souffrance neurologique comme une hyperréflexie ostéo-tendineuse, une somnolence, une confusion mentale, des clonies des extrémités, ou une ascension rapide de la pression artérielle, en particulier systolique (Collange *et al.*, 2010). Dans un cas sur cinq, il n'existe aucun prodrome (Knight et UKOSS, 2007). La crise convulsive est tonico-clonique généralisée, sans particularités spécifiques. Dans la moitié des cas, elle est unique (Dubar *et al.*, 2012).

L'hypothèse physiopathologique a pu être précisée ces dernières années grâce à l'apport des nouvelles techniques d'imagerie, en particulier l'IRM (Dubar *et al.*, 2012). Ainsi, l'éclampsie résulterait plutôt d'un œdème vasogénique provoqué par un dépassement de l'autorégulation cérébrale avec rupture de la barrière hémato-encéphalique lors d'une poussée hypertensive. Cet œdème vasogénique serait également favorisé par la perturbation endothéliale fragilisant la barrière hémato-encéphalique et augmentant la perméabilité vasculaire (Collange *et al.*, 2010).

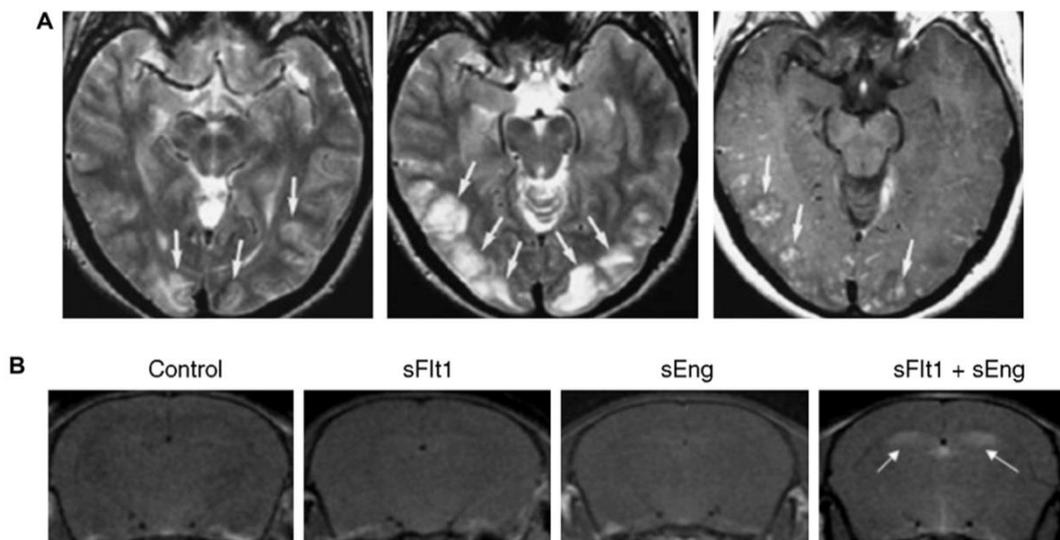
En IRM standard, les lésions correspondent à un œdème de topographie habituellement postérieure (**Figure 31**). La localisation préférentiellement postérieure des lésions s'explique par la faiblesse de l'innervation vasculaire sympathique dans ce territoire, le rendant plus vulnérable à la poussée hypertensive (Dubar *et al.*, 2012). Ces lésions régressent habituellement sans séquelles (Collange *et al.*, 2010). Des lésions ischémiques, voire hémorragiques, peuvent néanmoins apparaître secondairement et sont alors souvent irréversibles.

5.7. Autres complications

L'hématome rétroplacentaire complique 4 % des prééclampsies sévères. Il est défini comme le décollement prématuré d'un placenta normalement inséré. Sa présentation typique est celle d'une douleur abdominale aiguë d'apparition brutale associée à une hypertonie utérine (« ventre de bois »), des métrorragies noirâtres, des anomalies sévères du rythme cardiaque fœtal ou une mort fœtale *in utero*, une CIVD (coagulation intravasculaire disséminée). D'autres présentations cliniques sont possibles.

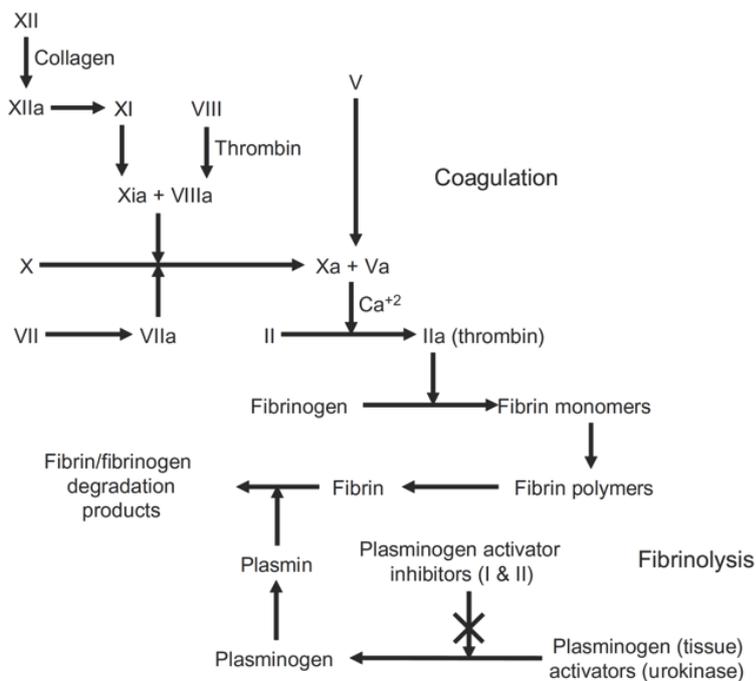
Parmi les patientes atteintes de prééclampsies sévères, 25 à 50 % vont développer un état d'activation pathologique de l'hémostase (Ducloy-Bouthors, 2010). Dans un premier temps, cet état d'activation est compensé par une activation plaquettaire et endothéliale. La thrombine est générée en excès, mais sa formation est compensée par les inhibiteurs physiologiques aboutissant à une élévation du taux de complexes thrombine-antithrombine (**Figure 32**). L'état d'activation pathologique de l'hémostase peut ensuite décompenser sur le mode thrombotique lorsque les inhibiteurs physiologiques de la coagulation sont dépassés ou lorsqu'ils font défaut dans le cadre d'une thrombophilie. La symptomatologie clinique est celle de microthromboses placentaires et maternelles. On parle alors de CIVD chronique. À un stade ultime, la CIVD devient hémorragique à la faveur d'une complication comme un hématome rétroplacentaire. Cette évolution est liée à la consommation des facteurs de la coagulation ou à une fibrinolyse excessive (Dubar *et al.*, 2012).

Figure 31 : œdème cérébral chez des patientes prééclamptiques et des modèles animaux de prééclampsie/éclampsie



(A) D'après Schwartz *et al.*, 2000. Série d'images IRM (imagerie par résonance magnétique) obtenue sur le cerveau d'une patiente ayant développé une éclampsie deux jours après l'accouchement. Le panneau de gauche (IRM à l'admission) et du milieu (obtenu au moment des manifestations cliniques les plus intenses) montre un œdème cérébral dans le cortex cérébral postérieur (correspondant aux aires de plus forte intensité de signal indiquées par des flèches blanches). Le panneau de droite est une image de la même patiente obtenue après injection intraveineuse de produit de contraste à base de gadolinium, et montre une rupture de la barrière hémato-encéphalique. (B) D'après Maharaj *et al.*, 2008. Images IRM de cerveaux de souris surexprimant sFlt-1 ou sEng ou les deux (voir paragraphes suivants, il s'agit de modèles animaux de prééclampsie). Les animaux exposés à la fois à sFlt-1 et sEng présentent un œdème dans la partie cérébrale postérieure du cortex (flèches blanches).

Figure 32 : cascades physiologiques de la coagulation et de la fibrinolyse



D'après Kenny *et al.*, 2015.

6. DIAGNOSTIC ET DÉPISTAGE

6.1. Diagnostic usuel

Le diagnostic est essentiellement clinique, au cours des rendez-vous réguliers de la femme enceinte avec son gynécologue. Si la patiente présente des signes évocateurs – hypertension, œdèmes, prise de poids brutale par exemple – un bilan biologique est effectué, permettant d’apprécier le retentissement viscéral et la sévérité de la prééclampsie (Dubar *et al.*, 2012).

- Hémolyse : numération formule sanguine, lactico-déshydrogénase (LDH), haptoglobine, recherche de schizocytes.
- Rein : ionogramme sanguin, urée, créatininémie, uricémie, protidémie, albuminémie, protéinurie des 24 heures.
- Foie : aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT), bilirubine, glycémie.
- Hémostase : plaquettes, taux de prothrombine, temps de céphaline activée, fibrinogène.

Ce bilan est complété par la détermination du groupe sanguin et du rhésus, ainsi que par la recherche d’agglutinines irrégulières. L’échographie obstétricale permet de dépister l’hypotrophie fœtale ou le retard de croissance intra-utérin, et d’évaluer le volume du liquide amniotique. Des Dopplers utérins et fœtaux (ombilical, cérébral) sont systématiquement réalisés (Dubar *et al.*, 2012).

Enfin les examens d’imagerie peuvent retrouver des images évocatrices d’éclampsie. Ils ont également pour intérêt majeur d’éliminer les autres diagnostics différentiels. L’imagerie cérébrale est l’examen clé et élimine la plupart des diagnostics différentiels de l’éclampsie (Dubar *et al.*, 2012).

6.2. Dépistage de la prééclampsie

Le dépistage fait référence à un test réalisé sur des individus asymptomatiques, ayant pour but l’évaluation de la probabilité de développer une maladie. Le dépistage de la prééclampsie est d’intérêt car l’identification des patients à risque pourrait permettre une détection plus précoce de la maladie, une prise en charge plus rapide de la mère et du fœtus, et une mise en place plus rapide de soins préventifs. En effet, la prééclampsie étant associée à une augmentation de la morbidité et mortalité maternelle et périnatale, les interventions visant à prévenir la prééclampsie, comme l’administration d’aspirine à faible dose ou de calcium, pourraient avoir des bénéfices faibles à modérés intéressants pour les femmes à risque. De plus, une surveillance maternelle et fœtale accrue ou des interventions plus précoces pourraient diminuer la sévérité ou la mortalité de la maladie (Conde-Agudelo *et al.*, 2015).

Il n’existe à l’heure actuelle aucun moyen efficace pour dépister les patientes qui feront une prééclampsie au cours de leur grossesse. De nombreux tests cliniques, échographiques, biologiques, choisis sur la base de mécanismes biologiques supposés comme intervenants dans la physiopathologie de la prééclampsie, ont en effet été proposés, mais aucun, pris de manière isolée, ne remplit les standards d’un test de dépistage, que ce soit chez les patientes à faible ou à haut risque. Le **Tableau 2** présente certains de ces tests.

Tableau 2 : tests de dépistage proposés pour la prééclampsie

Tests relatifs à la dysfonction de la perfusion placentaire ou de la résistance vasculaire

Test de Gant ou *roll-over test*
 Exercice de poignée de main isométrique
 Test au froid ou *cold pressor test* ou *Hines-Brown test*
 Test du seuil critique de fusion du papillotement (*Flicker-fusion threshold test*)
 Réponse de la pression artérielle à un exercice
 Injection intraveineuse d'angiotensine II
 Pression artérielle moyenne
 Évaluation de la rigidité artérielle
Platelet angiotensin II binding
 Production de calcium plaquettaire en réponse à l'arginine-vasopressine
 Taux de rénine
 Monitoring de la pression artérielle en ambulatoire pendant 24 heures
 Vélométrie du Doppler transcrânien
 Vélométrie du Doppler de l'artère ophthalmique
 Évaluation du volume, de la localisation et de la vascularisation placentaire par échographie
 Doppler 3D de la circulation utéroplacentaire
 Vélométrie du Doppler de l'artère utérine

Tests relatifs à l'endocrinologie de l'unité fœto-placentaire

hCG
 Alpha-fœtoprotéine
 Estriol
 2-Méthoxyestradiol
 Inhibine A
Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A)
 Activine A
Placental protein 13 (PP-13)
 Corticolibérine (CRH, *corticotrophin-releasing hormone*)
A disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM-12)
 Kisséptine
Pregnancy-specific β 1-glycoprotein (SP1)

Tests relatifs à la dysfonction rénale

Acide urique sérique
 Microalbuminurie
 Excrétion calcique urinaire
 Kallikréine urinaire
 Microtransferrinurie
 N-acetyl- β -glucosaminidase
 Cystatine C
 Podocyturie

Tests relatifs au stress endothélial ou oxydatif

Numération et volume plaquettaire
 Fibronectine
 Endothéline
 Neurokinine B
 Prostacycline
 Thromboxane
 Protéine C-réactive
 Cytokines
 Isoprostanes

Matrix métalloprotéinase-9 (MMP-9)
 Homocystéine
 Lipides sériques
 Céruloplasmine
 Résistance à l'insuline
 Adiponectine
 Résistine
 Phosphoglycans d'inositol de type P
 Anticorps antiphospholipides
 Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
 Leptine
 Diméthylarginine
 Pentraxine 3
 Paraoxonase 1
 Tryptophane
 Molécules endothéliales d'adhésion cellulaire : sélectine E et P, *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)*, *intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*.
 Facteurs angiogéniques : placental growth factor (PlGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), fms-like tyrosine kinase receptor-1 (sFlt-1), endogline, angiopoïétine.

Autres tests

Hématocrite
 Carboxyhémoglobine
 Protéines totales
 Antithrombine III
 Magnésium
 Calcium
 Ferritine
 Transferrine
 Haptoglobine
 Peptide atrial natriurétique
 β 2-microglobuline
High temperature requirement A3 (HtrA3)
 25-Hydroxyvitamine D
 Tests de la fonction thyroïdienne
 Tests de la fonction hépatique
Histidine-rich glycoprotein (HRG)
 Test du micronoyau *in vitro* sur lymphocyte (aberrations chromosomiques maternelle)
 17-bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase-1
 Testostérone
 ADN fœtal libre
 Insulin-like growth factors (IGFs)
 Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1)
 Marqueurs protéomiques, métabolomiques et transcriptomiques
 Combinaison de tests précédents et de paramètres cliniques maternelles

D'après Conde-Agudelo *et al.*, 2015.

La prééclampsie étant considérée comme un trouble multifactoriel, de nombreux scientifiques pensent qu'aucun test unique ne serait capable de dépister tous les cas de prééclampsie. Ainsi une approche combinée, basée sur l'association de critères cliniques, échographiques et biologiques, pourrait être plus prometteuse (Boucoiran *et al.*, 2013 ; Steegers *et al.*, 2010). Cependant, des études prospectives à large échelle sont nécessaires pour valider ces modèles. De plus, la validation d'un test nécessite également des études cliniques ainsi que des études coût/efficacité avant son éventuelle commercialisation, ce qui est important à évaluer pour les pays en voie de développement qui ont de faibles ressources mais une grande morbidité et mortalité associées à la prééclampsie (Conde-Agudelo *et al.*, 2015).

Certains auteurs pensent qu'il est nécessaire de mieux caractériser le phénotype des patientes afin de développer des tests plus précis (Rana *et al.*, 2014). Il semble également de plus en plus nécessaire de regarder l'évolution des marqueurs biologiques au cours de la grossesse, qui pourrait être un indice plus intéressant qu'un taux brut (Conde-Agudelo *et al.*, 2015). Par exemple, il a été montré que les femmes ayant des taux bas de PIGF précocement dans leur grossesse avaient aussi des taux bas au moment du diagnostic de prééclampsie, alors que les femmes ayant des concentrations normales de PIGF précocement dans leur grossesse conservaient des concentrations normales de PIGF au moment du diagnostic (Powers *et al.*, 2012).

7. PRISE EN CHARGE ET TRAITEMENTS

7.1. Prise en charge générale

L'hospitalisation est souvent nécessaire lorsque le diagnostic de prééclampsie est posé. Elle permet de faire le bilan des complications maternelles et fœtales et d'assurer une surveillance étroite de la patiente jusqu'à l'accouchement. L'hospitalisation à domicile des formes non sévères est parfois pratiquée mais reste à évaluer en France (Winer *et al.*, 2010). Le terme de la patiente et la sévérité de la prééclampsie déterminent alors le lieu d'hospitalisation, afin de s'assurer d'une prise en charge néonatale et, en cas de prééclampsie sévère, de la proximité immédiate d'un service de réanimation maternelle ou de lits de soins intensifs (Dubar *et al.*, 2012).

En cas de prééclampsie modérée, la prise en charge repose sur le repos, éventuellement associé à un traitement antihypertenseur. L'obtention d'une pression artérielle systolique entre 140 et 150 mmHg et d'une pression artérielle diastolique entre 85 et 95 mmHg semble être un objectif raisonnable (Diemunsch *et al.*, 2010).

7.2. Traitements antihypertenseurs

L'objectif du traitement antihypertenseur est de réduire le risque d'hypertension artérielle sévère afin de prévenir les complications maternelles de l'hypertension artérielle comme l'hémorragie cérébrale, l'éclampsie et l'œdème pulmonaire. En revanche, le traitement antihypertenseur n'a pas montré son bénéfice sur la diminution des complications fœtales (Dubar *et al.*, 2012).

Il est recommandé de débiter un traitement antihypertenseur lorsque la pression artérielle diastolique est supérieure à 110 mmHg ou lorsque la pression artérielle systolique est supérieure à 160 mmHg (**Figure 33**). En cas de prééclampsie sévère, le choix et la posologie du traitement hypertenseur sont guidés par l'algorithme présenté sur la Figure. Le traitement est habituellement initié par voie intraveineuse avec pour objectifs une pression artérielle systolique comprise entre 140 et 160 mmHg et une pression artérielle moyenne comprise entre 100 et 120 mmHg. Il faut éviter toute chute brutale ou importante de la pression artérielle, susceptible alors de compromettre la circulation utéroplacentaire et de provoquer des anomalies du rythme cardiaque fœtal. En France, les médicaments antihypertenseurs habituellement prescrits en première intention dans le cadre de

la prééclampsie sévère sont la nicardipine et le labétalol. La nicardipine (Loxen®) est un inhibiteur calcique, c'est-à-dire un vasodilatateur de la musculature lisse artérielle. Son utilisation en obstétrique bénéficie d'un recul important puisqu'il est régulièrement utilisé dans les cadres de l'hypertension artérielle gravidique et de la menace d'accouchement prématuré. Son passage transplacentaire et dans le lait maternel est faible, expliquant en partie sa bonne tolérance fœtale et néonatale (Bartels *et al.*, 2007 ; Frishman *et al.*, 2006). Le labétalol (Trandate®) est un antihypertenseur alpha-bêta-bloquant. Il permet de diminuer la pression artérielle maternelle sans modification du Doppler fœtal (Baggio *et al.*, 2011). Il ne semble pas avoir d'effet sur la croissance fœtale, et est également bien toléré sur le plan néonatal (Pickles *et al.*, 1989).

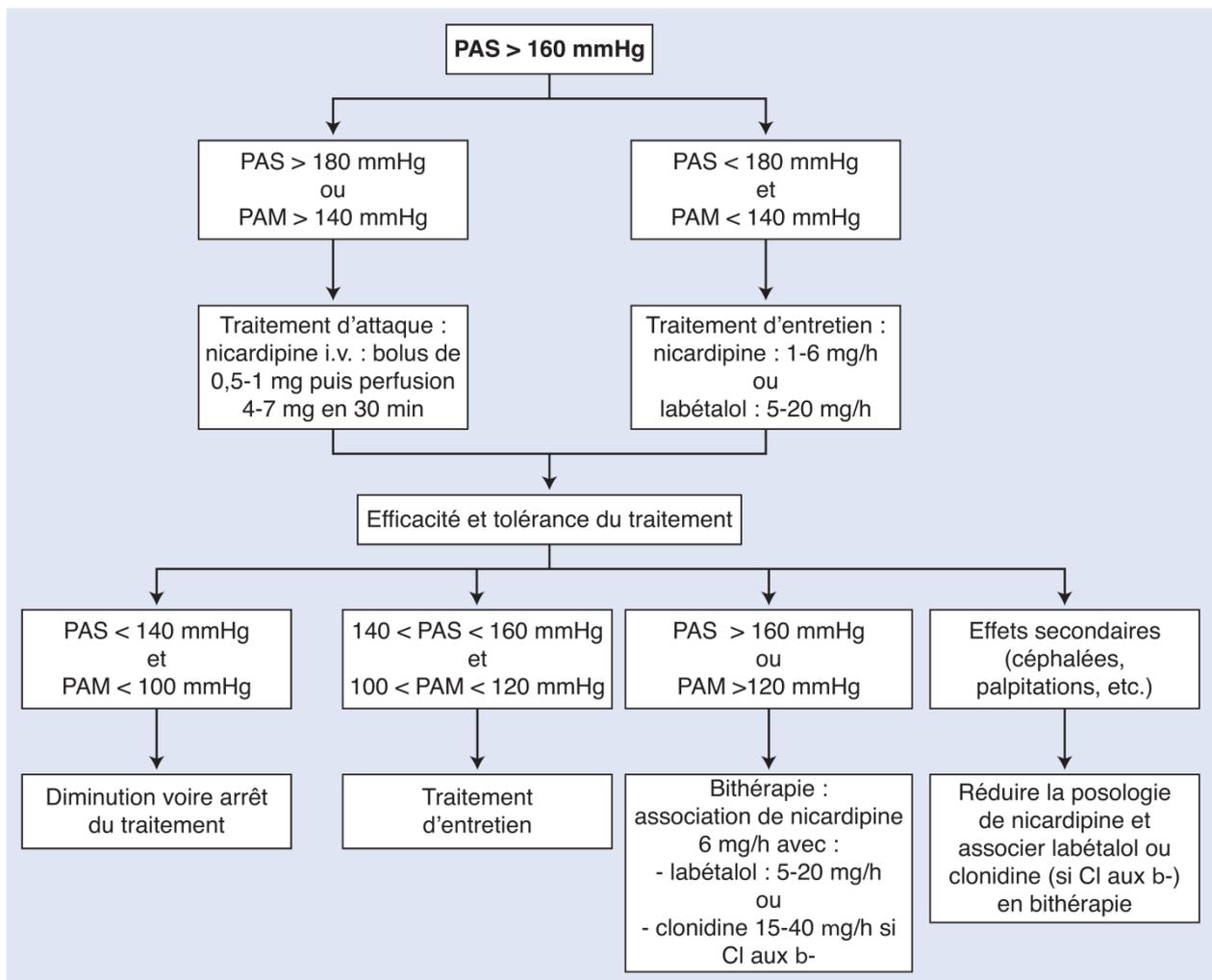
En cas d'échec de la monothérapie, un deuxième médicament antihypertenseur est associé, habituellement le labétalol ou la nicardipine suivant le traitement prescrit en première intention. La clonidine ou l'urapidil peuvent être employés en bithérapie en cas de contre-indication ou d'intolérance à la nicardipine ou au labétalol, ou en trithérapie, associés à la nicardipine et au labétalol dans les formes les plus sévères. La clonidine (Catapressan®) est un agoniste des récepteurs alpha-2 centraux. Il s'agit d'un médicament relativement sûr au cours de la grossesse (Ghanem et Movahed, 2008). L'urapidil (Eupressyl®) est un médicament antihypertenseur d'action à la fois centrale, par la stimulation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A}, et périphérique, par le blocage des récepteurs alpha₁-adrénergiques. Bien que n'ayant pas l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans la prééclampsie, son emploi est de plus en plus souvent rapporté dans cette indication. Il s'agirait donc d'un antihypertenseur efficace et relativement maniable (Wacker *et al.*, 2006).

Un traitement d'attaque par nicardipine peut parfois être nécessaire lorsque la pression artérielle systolique est supérieure à 180 mmHg ou lorsque la pression artérielle moyenne est supérieure à 140 mmHg, pour prévenir les complications neurologiques maternelles.

Il est à noter que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II sont contre-indiqués au cours de la grossesse en raison de leur fœtotoxicité. De même, les diurétiques ne doivent pas être utilisés en dehors d'indications spécifiques car la déplétion hydrosodée majeure l'hypovolémie constante au cours de la prééclampsie (Dubar *et al.*, 2012).

7.3. Prise en charge de l'éclampsie

Le traitement à la phase aiguë de la crise convulsive d'éclampsie repose sur une réanimation classique : libération des voies aériennes, oxygénothérapie, injection d'une dose unique de benzodiazépine (Dubar *et al.*, 2012). Le sulfate de magnésium est le traitement de référence en prévention de la récurrence au décours de la première crise. En effet, par rapport au diazépam, le sulfate de magnésium est associé à une réduction de la mortalité maternelle et à une diminution de la récurrence des crises (Duley *et al.*, 2010b). Le mécanisme d'action du sulfate de magnésium dans le contexte de l'éclampsie n'est pas parfaitement connu. Les différentes hypothèses font intervenir, entre autres, son effet antagoniste du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) ou un effet inhibiteur calcique. Plusieurs études concernant la prévention primaire de l'éclampsie par le sulfate de magnésium montrent des résultats contradictoires (Altman *et al.*, 2002 ; Duley *et al.*, 2010a). Dans les dernières recommandations d'experts, la prévention primaire de l'éclampsie est ainsi recommandée en cas de prééclampsie sévère avec apparition de signes neurologiques persistants : céphalées rebelles, troubles visuels, réflexes ostéotendineux polycinétiques (Société française d'anesthésie et de réanimation *et al.*, 2009).

Figure 33 : algorithme de prescription du traitement antihypertenseur en cas de prééclampsie sévère

D'après Dubar *et al.*, 2012, modifié de Société française d'anesthésie et de réanimation *et al.*, 2009. PAS : pression artérielle systolique ; PAM : pression artérielle moyenne = $[PA \text{ Systolique} + 2 PA \text{ Diastolique}] / 3$; IV : voie intraveineuse ; CI : contre-indication ; β - : bêtabloquant.

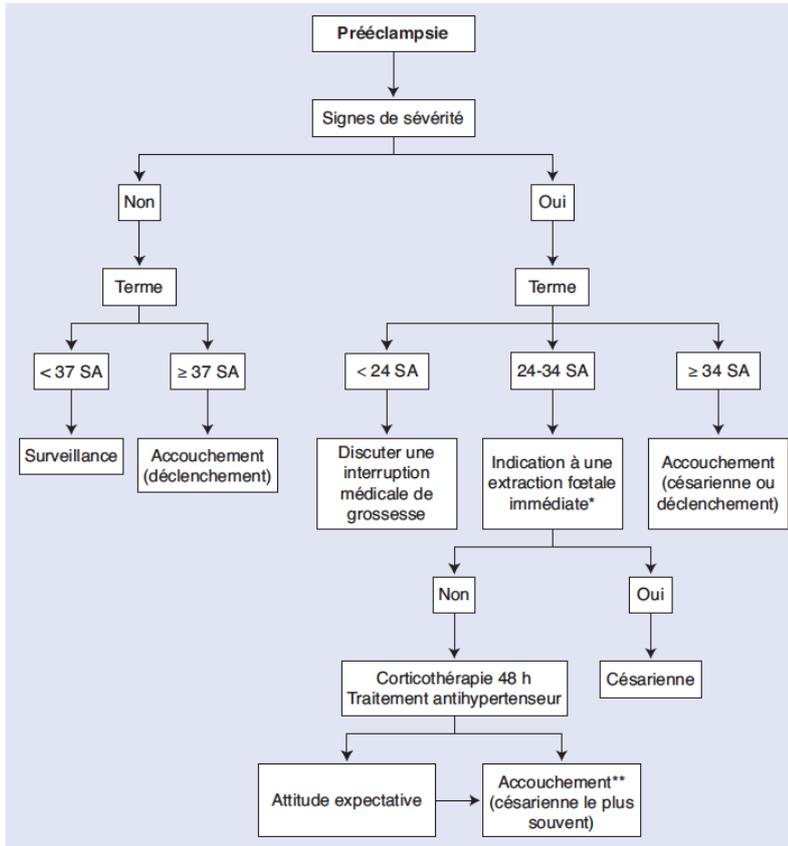
7.4. Traitements curatifs

Le seul traitement curatif de la prééclampsie est l'arrêt de la grossesse. La décision de poursuite ou non de la grossesse dépend de nombreux facteurs, dont les critères de gravité maternels ou fœtaux, et l'âge gestationnel. Les différentes options possibles sont résumées sur la **Figure 34**.

Il n'est habituellement pas recommandé d'interrompre la grossesse en cas de prééclampsie modérée avant 37 semaines d'aménorrhée. Le risque de progression vers une prééclampsie sévère est alors de 21 % (Barton *et al.*, 2001).

Concernant les formes sévères, qui mettent en jeu le pronostic maternel et/ou fœtal, l'attitude vis-à-vis de la grossesse dépend essentiellement de l'âge gestationnel du fœtus (**Figure 34**).

Figure 34 : arbre décisionnel pour l'arrêt de grossesse en cas de prééclampsie



D'après Dubar *et al.*, 2012 et Haddad *et al.*, 2010. SA : semaines d'aménorrhée.

* Indications à une extraction fœtale immédiate : hypertension artérielle non contrôlée, éclampsie, œdème aigu du poumon, hématome rétroplacentaire, hématome sous-capsulaire hépatique, thrombopénie inférieure à 50 000/mm³, anomalies sévères du rythme cardiaque fœtal.

** Indications d'arrêt de grossesse entre 24 et 34 SA après corticothérapie pour maturation fœtale : oligurie supérieure à 100 mL / 4 h et persistante malgré un remplissage vasculaire, créatininémie *de novo* supérieure à 120 µmol / L, signes d'imminence d'une éclampsie comme des céphalées ou des troubles visuels persistants, douleur épigastrique persistante, HELLP syndrome évolutif.

Tableau 3 : bilan de première intention après une prééclampsie

Bilan clinique	Pression artérielle, bandelette urinaire (protéinurie, hématurie)
	<p>Bilan rénal :</p> <ul style="list-style-type: none"> - ionogramme sanguin, urée, créatinine, protidémie, protéinurie des 24 heures - échographie rénale (si hypertension artérielle, protéinurie ou point d'appel) <p>Bilan hématologique et hépatique : numération formule sanguine-plaquettes, aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT), gamma glutamyl-transférase (γGT), phosphatases alcalines.</p>
Examens complémentaires	<p>Bilan de thrombophilie^a :</p> <ul style="list-style-type: none"> - dosage de l'antithrombine - dosage des protéines C et S - recherche d'une résistance à la protéine C activée - recherche des mutations du facteur V Leiden et du gène de la prothrombine - recherche d'un anticoagulant circulant - dosage de l'homocystéine <p>Bilan immunologique : dosage des anticorps anticardiolipines et anti-bêta2-GP1</p>

D'après Dubar *et al.*, 2012. Ce bilan est à adapter en fonction de la sévérité de la prééclampsie.

^a Si prééclampsie précoce, ou associée à un retard de croissance intra-utérin sévère, un hématome rétroplacentaire, une mort fœtale in utero, ou associée à des antécédents personnels ou familiaux de maladie veineuse thromboembolique.

Avant 24 semaines d'aménorrhée, une prééclampsie sévère doit faire discuter une interruption médicale de grossesse en raison d'un très mauvais pronostic périnatal et maternel en cas de poursuite de la grossesse. La mortalité périnatale est en effet dans ce cas très élevée (supérieure à 80 %) et on s'expose à l'apparition des complications maternelles les plus sévères comme une éclampsie, un hématome rétroplacentaire ou un décès (Gaugler-Senden *et al.*, 2006 ; Jenkins *et al.*, 2002).

Entre 24 et 34 semaines d'aménorrhée, en dehors des cas nécessitant une extraction fœtale immédiate, la patiente doit bénéficier de l'administration d'une corticothérapie pour maturation fœtale. Un transfert *in utero* dans un centre adapté à l'âge gestationnel est également nécessaire. L'aggravation de l'état maternel et/ou fœtal doit conduire à l'accouchement de la patiente, le plus souvent par césarienne (Haddad *et al.*, 2010). Cet accouchement est différé de 48 heures si possible, afin d'obtenir tout le bénéfice de la corticothérapie anténatale. En l'absence d'aggravation maternelle et/ou fœtale, il semble possible de prolonger la grossesse de 1 à 2 semaines afin d'améliorer le pronostic néonatal (Magee *et al.*, 2009). La morbidité et la mortalité néonatales sont en effet élevées avant 34 semaines d'aménorrhée, d'autant plus que le terme est précoce. Certaines complications nécessitent par ailleurs une extraction fœtale immédiate par césarienne : éclampsie, hématome rétroplacentaire, hématome sous-capsulaire du foie, hypertension artérielle non contrôlée, anomalies sévères du rythme cardiaque fœtal.

À partir de 34 semaines d'aménorrhée, il est légitime d'arrêter la grossesse en cas de prééclampsie sévère en raison du risque fœtal et maternel, le risque néonatal lié à la prématurité étant plus faible à partir de ce terme. Dans ce cas, si la prééclampsie n'impose pas un arrêt immédiat de la grossesse, si l'état du col de l'utérus est favorable, et s'il n'existe pas de contre-indication, l'accouchement peut être déclenché.

7.5. Prise en charge du post-partum

Au cours du post-partum, l'hypertension artérielle et les dysfonctions viscérales régressent lentement. Il existe cependant un risque d'aggravation au cours de la première semaine du post-partum, en général durant les 48 premières heures. L'hypertension artérielle peut ainsi s'aggraver au cours de cette période. Par ailleurs, l'œdème pulmonaire survient dans 70 % des cas au cours du post-partum. Le HELLP quant à lui se déclare dans 30 % des cas au cours du post-partum. L'éclampsie est également un risque à prendre en compte puisque survenant dans 30 à 40 % des cas au cours du post-partum. Tous ces risques nécessitent donc une surveillance étroite clinique (pression artérielle, apports hydriques, diurèse, poids) et biologique durant le post-partum (Dubar *et al.*, 2012).

Concernant le traitement antihypertenseur débuté éventuellement en ante-partum, celui-ci est poursuivi en post-partum et adapté aux valeurs de la tension artérielle. En cas d'allaitement, le labétalol et la nicardipine ne sont pas contre-indiqués. En cas d'hypertension artérielle sévère et rebelle aux traitements usuels, un inhibiteur de l'enzyme de conversion, contre-indiqué pendant la grossesse, peut être introduit. Certains inhibiteurs de l'enzyme de conversion sont compatibles avec l'allaitement, à condition que le nouveau-né ne soit pas prématuré et qu'il ne présente pas d'insuffisance rénale (Dubar *et al.*, 2012).

Des diurétiques comme le furosémide peuvent être employés en cas d'œdème pulmonaire (Dubar *et al.*, 2012).

Le sulfate de magnésium peut être prescrit ou poursuivi en post-partum. Lorsque le traitement a été débuté avant l'accouchement, il est habituellement recommandé de le poursuivre pendant 24 heures (Dubar *et al.*, 2012).

Concernant l'analgésie, les anti-inflammatoires doivent être prescrits avec prudence en raison des troubles potentiels de l'hémostase ou de la néphropathie latente (Dubar *et al.*, 2012).

7.6. Bilan après une prééclampsie

Idéalement, un bilan est nécessaire 3 mois après l'accouchement. Ce bilan a notamment pour objectifs de s'assurer de la disparition de l'hypertension artérielle et de la protéinurie, et de rechercher des facteurs de risques de la prééclampsie afin de mieux prendre en charge une nouvelle grossesse. Les différents aspects de ce bilan sont résumés dans le **Tableau 3**.

8. PRONOSTIC À MOYEN ET LONG TERME

8.1. Risque de récurrence de la prééclampsie

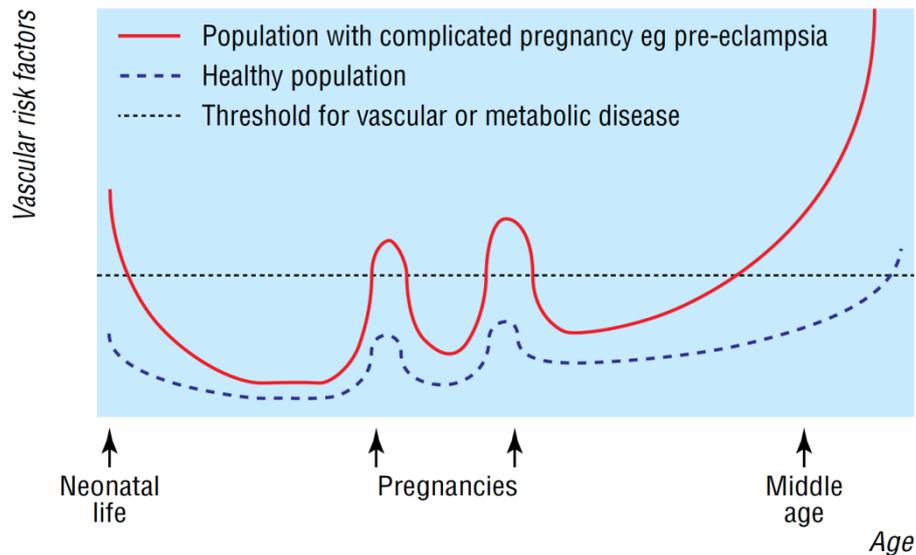
Les taux de récurrence de prééclampsie publiés dans la littérature varient de 5 % à 65 % (McDonald *et al.*, 2009) et il est admis que le risque de récurrence se situe aux environs de 10 % en cas de prééclampsie modérée lors de la grossesse antérieure et jusqu'à 40 % en cas de prééclampsie sévère (Stegers *et al.*, 2010). Le risque de récurrence est d'autant plus important que la prééclampsie est apparue précocement lors de la grossesse antérieure. Les taux publiés dans la plupart des études ne distinguent cependant pas les prééclampsies modérées des prééclampsies sévères lors de la récurrence. Récemment, une étude de cohorte a retrouvé un risque de prééclampsie sévère de 6,8 % lorsque la grossesse précédente s'était elle-même compliquée d'une prééclampsie sévère (McDonald *et al.*, 2009).

En cas de HELLP, il existe également un risque de récurrence lors d'une nouvelle grossesse. Des études observationnelles ont retrouvé ainsi un risque de HELLP de 3 % à 19 % ou de survenue d'une prééclampsie de 16 % à 52 % lors d'une grossesse ultérieure (Beucher *et al.*, 2008).

8.2. Pronostic cardiovasculaire et rénal à long terme

La prééclampsie n'est pas uniquement une maladie gravidique et les patientes atteintes sont à risque de voir apparaître ultérieurement des complications cardiovasculaires et rénales, d'autant plus si la prééclampsie a été sévère et précoce.

Sur le plan cardiovasculaire, une méta-analyse récente a retrouvé un doublement du risque d'être atteint d'une pathologie cardiaque à long terme chez les patientes ayant un antécédent de prééclampsie (McDonald *et al.*, 2008). Ces pathologies cardiaques peuvent être une cardiopathie ischémique, une coronaropathie, un infarctus du myocarde, une insuffisance cardiaque congestive ou un décès lié à l'une des pathologies précitées. Cette méta-analyse a également mis en évidence une relation significative entre la sévérité de la prééclampsie et l'augmentation du risque de complications cardiaques. Par ailleurs, le risque d'être atteint d'une pathologie cérébro-vasculaire ou d'une pathologie artérielle périphérique était également majoré, avec un risque relatif de 2 et 1,8 respectivement. Une autre méta-analyse retrouvait sensiblement les mêmes résultats (Bellamy *et al.*, 2007). Certains auteurs interprètent ce risque comme la traduction d'un risque déjà existant de développer des maladies cardiovasculaires (Powe *et al.*, 2011 ; Sattar et Greer, 2002) : pour ces auteurs, la prééclampsie pourrait être vue comme un état révélant le risque sous-jacent de ces femmes (**Figure 35**).

Figure 35 : facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires induits par la grossesse

D'après Sattar et Greer, 2002. Modèle proposé pour expliquer comment la grossesse peut constituer un stress pour l'induction d'une maladie cardiovasculaire à long terme. Ce modèle suggère que les femmes ayant développé une prééclampsie (trait plein rouge) ont de prime abord un risque plus grand de développer des maladies cardiovasculaires que les femmes ayant eu une grossesse non pathologique (trait bleu en pointillés). Ici deux grossesses sont présentées. À chaque grossesse, le risque cardiovasculaire se manifeste sous la forme d'une prééclampsie, tandis qu'à long terme ce risque se manifeste sous la forme d'une hypertension, d'une maladie cardiaque, d'accidents vasculaires cérébraux ou d'autres formes de maladies cardiovasculaires. Chez les femmes n'ayant pas ces facteurs de risque sous-jacents, la grossesse peut modérément augmenter le risque de développer des maladies cardiovasculaires, mais pas suffisamment pour provoquer une prééclampsie. Ces femmes ont donc un risque plus bas à la fois pendant la grossesse et également à long terme.

Sur le plan rénal, une autre méta-analyse récente (McDonald *et al.*, 2010), incluant 273 et 333 patientes avec et sans antécédent de prééclampsie respectivement, a retrouvé une augmentation du risque de microalbuminurie – multiplié par quatre en cas de prééclampsie modérée et par huit en cas de prééclampsie sévère – plusieurs années après la prééclampsie, en moyenne 7 ans. Ces résultats sont néanmoins à prendre avec précaution en raison de la faiblesse méthodologique des études incluses dans la méta-analyse : non prise en compte des facteurs confondants, période courte de suivi, faibles effectifs, faible nombre d'études incluses et biais de publications possibles. Une étude norvégienne, croisant les registres nationaux des données médicales liées à la naissance et ceux des patients en insuffisance rénale chronique terminale, a retrouvé une association entre la prééclampsie et le risque de développer une insuffisance rénale chronique terminale (Vikse *et al.*, 2008). Le risque absolu reste néanmoins faible : inférieur à 1 % sur 20 ans, mais le risque relatif approche 5 par rapport aux patientes contrôle.

L'association entre la prééclampsie et les complications à long terme pourrait relever de plusieurs mécanismes. Il pourrait ainsi exister un terrain commun entre les différents syndromes. Par exemple, la prééclampsie et les pathologies cardiovasculaires ou rénales peuvent être favorisées par une résistance à l'insuline et un syndrome métabolique (McDonald *et al.*, 2008 ; Vikse *et al.*, 2008). De même, d'autres facteurs de risques sont communs à la prééclampsie et aux maladies cardiovasculaires ou rénales, comme le diabète, l'obésité ou l'hypertension artérielle. La prééclampsie serait alors une conséquence précoce de ce terrain pathologique, lui-même associé à d'autres maladies plus tardivement au cours de la vie. La prééclampsie pourrait également avoir un effet propre sur le développement ultérieur de ces complications, en endommageant l'endothélium vasculaire ou les reins (McDonald *et al.*, 2008 ; Vikse *et al.*, 2008). Enfin, les deux mécanismes – terrain commun et effet propre de la prééclampsie – pourraient coexister.

9. PRÉVENTION

De nombreuses méthodes de prévention ont été publiées, avec pour objectif de réduire la probabilité de survenue ou la gravité de la prééclampsie. Très peu ont donné lieu à des résultats probants.

L'aspirine, qui est un inhibiteur de la cyclo-oxygénase, a pour effet d'inhiber la synthèse de thromboxane A₂. L'emploi d'aspirine à faible dose dans la prévention primaire de la prééclampsie a ainsi pour objectif de corriger le ratio prostacycline/thromboxane, dont le déséquilibre participe au vasospasme. Une méta-analyse, réalisée à partir des données individuelles de toutes les études comparant un agent antiplaquettaire, essentiellement l'aspirine à faible dose, à un placebo, a regroupé 32 217 patientes à partir de 31 essais randomisés (Askie *et al.*, 2007). Cette méta-analyse a retrouvé une réduction de 10 % du risque de prééclampsie en cas de prescription d'aspirine à faible dose. Le risque d'accouchement prématuré avant 34 semaines d'aménorrhée était également réduit de 10 %, de même que le risque de complication sévère. La prise d'aspirine apparaissait de plus particulièrement sûre pour la mère ou l'enfant. Le nombre de patientes à traiter pour éviter une prééclampsie était cependant relativement important : 56, 167 et 500 pour un risque de base de 18 %, 6 % et 2 % respectivement. Les recommandations actuelles sont donc de ne prescrire de l'aspirine à une faible dose (75-160 mg) qu'aux patientes à haut risque (Société française d'anesthésie et de réanimation *et al.*, 2009). En cas de faible risque, l'intérêt de la prévention de la prééclampsie par l'aspirine reste limité. Le traitement doit être institué avant 20 semaines d'aménorrhée – habituellement entre 12 et 14 semaines d'aménorrhée, c'est-à-dire en phase pré-symptomatique – et arrêté avant la 35^e semaine d'aménorrhée, pour éviter d'éventuels risques hémorragiques en péri-partum.

Les héparines de bas poids moléculaire ont été proposées dans la prévention de la prééclampsie, mais il n'existe pas à ce jour de preuves suffisantes pour recommander ce traitement. Leur indication se discute néanmoins en cas de thrombophilie (Dubar *et al.*, 2012).

Une supplémentation calcique pourrait réduire le risque de prééclampsie. En effet, de faibles apports calciques pourraient stimuler les hormones parathyroïdiennes et la libération de rénine, aboutissant à une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules musculaires lisses vasculaires et donc à une vasoconstriction. Une méta-analyse incluant 15 730 patientes a ainsi retrouvé une réduction de moitié du risque de prééclampsie après supplémentation calcique au cours de la grossesse (Hofmeyr *et al.*, 2010). L'effet était essentiellement retrouvé chez les patientes avec de faibles apports calciques nutritionnels de base et chez celles à haut risque de prééclampsie. L'effet n'était pas significatif chez les patientes ayant un apport alimentaire suffisant en calcium. L'administration de calcium (1,5 g/j) peut donc être recommandée en cas de carence calcique avérée (Société française d'anesthésie et de réanimation *et al.*, 2009), dès 15 semaines d'aménorrhée et tout au long de la grossesse.

Les autres méthodes évaluées en prévention de la prééclampsie n'ont pas fait la preuve de leur efficacité, notamment les antioxydants – vitamines C et E –, le zinc, les antihypertenseurs, les diurétiques et l'ail (Dubar *et al.*, 2012).

10. PHYSIOPATHOLOGIE

Aucune théorie actuelle ne permet d'expliquer tous les aspects de la prééclampsie de façon satisfaisante (Dubar *et al.*, 2012). Les difficultés dans la compréhension de la physiopathologie de la prééclampsie sont en grande partie dues à l'absence de modèle expérimental animal spontané, mais aussi au très grand polymorphisme clinique renfermant plusieurs maladies ayant probablement des origines différentes.

Malgré ces difficultés, il est admis que le placenta joue un rôle central dans la genèse de la maladie. Ceci est confirmé par la survenue de la maladie exclusivement au cours de la grossesse et sa disparition après l'accouchement. Par ailleurs l'implication de l'embryon semble peu probable puisque la survenue d'une prééclampsie est possible en cas de grossesse molaire (Dubar *et al.*, 2012).

En l'état actuel des connaissances, il semble que la physiopathologie de la prééclampsie fasse intervenir plusieurs étapes successives (Dubar *et al.*, 2012) :

- un défaut de placentation,
- une hypoxie placentaire et des phénomènes d'ischémie-reperfusion du placenta,
- un dysfonctionnement endothélial maternel.

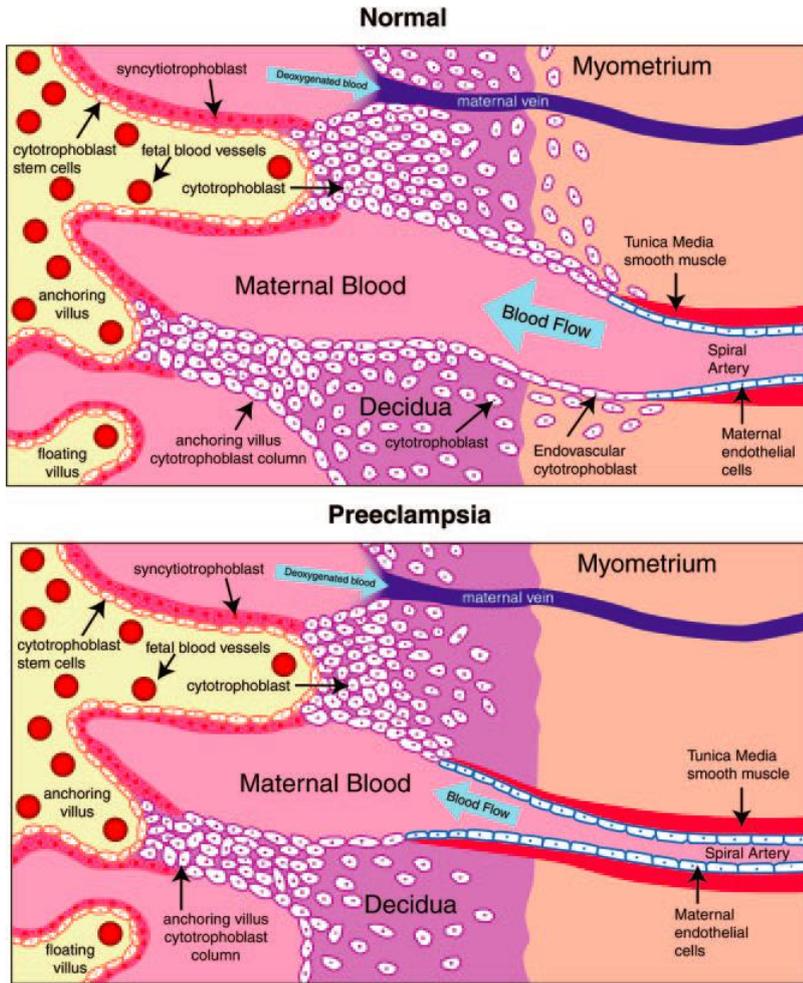
10.1. Défaut de placentation

Comme décrit précédemment, au début de la grossesse normale, les cellules trophoblastiques semi-allogéniques envahissent les artères spiralées utérines. À la fin du deuxième trimestre, les artères spiralées situées dans l'endomètre et le myomètre sont ainsi exclusivement bordées de cellules cytotrophoblastiques, qui prennent la place des cellules endothéliales. L'invasion trophoblastique de la paroi artérielle conduit également à la disparition de la tunique musculaire lisse, l'artère devenant alors insensible aux substances vasoactives. Indépendamment de l'invasion de la paroi des vaisseaux par les cellules trophoblastiques, il existe aussi un profond remodelage de l'ensemble de la vascularisation utérine sous l'effet de facteurs angiogéniques produits par le trophoblaste villositaire et extravillous, comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), le PIGF (*placental growth factor*), l'hCG (hormone chorionique gonadotrope ou gonadotropine) ou l'angiogénine. Au total ce remodelage des artères utérines entraîne la formation d'un système à faible résistance artériolaire, ce qui permet une augmentation massive du débit sanguin en direction du fœtus (Dubar *et al.*, 2012).

Au cours de la prééclampsie, l'invasion trophoblastique est défailante et 30 % à 50 % des artères spiralées du lit placentaire y échappent (**Figure 36**). Ces artères utérines conservent leur tunique vasculaire lisse et donc le pouvoir de répondre à des agents vasoconstricteurs (**Figure 37**). Le mécanisme aboutissant à une invasion trophoblastique défailante n'est pas encore complètement élucidé : il s'agit des causes inconnues de la prééclampsie. Il pourrait y avoir des causes immunologiques (Redman et Sargent, 2010) ou une protéolyse insuffisante, les enzymes protéolytiques sécrétées par les cellules trophoblastiques ayant pour rôle de permettre à ces dernières l'invasion des artères spiralées du myomètre (Dubar *et al.*, 2012). Il existe de plus un défaut de remodelage dans sa globalité du fait d'un pouvoir angiogénique inadapté. Tout ceci a pour conséquence une réduction de la perfusion utéroplacentaire et une hypoxie du placenta, à l'origine d'une dysfonction placentaire (Dubar *et al.*, 2012).

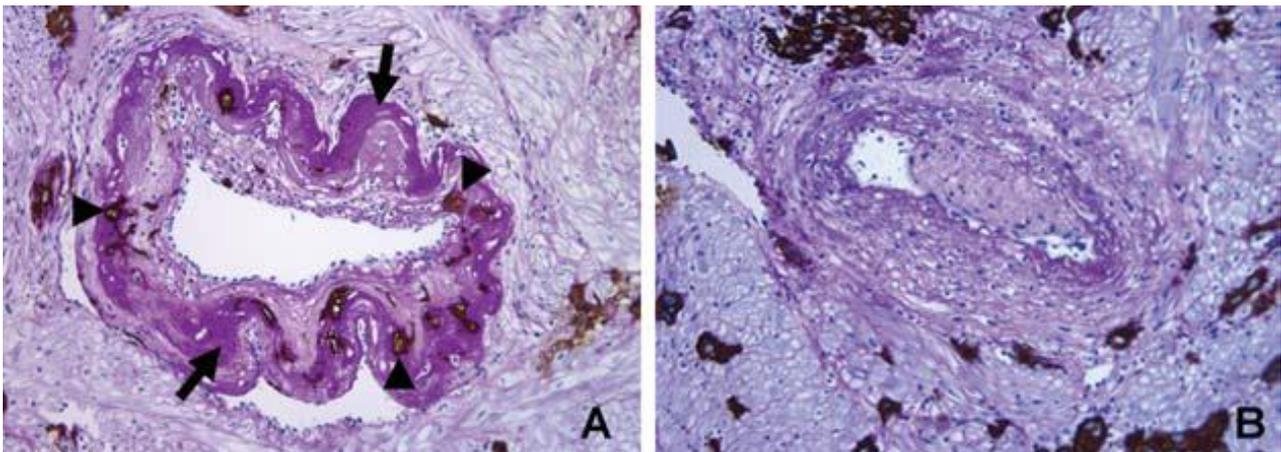
On pense ainsi que la spécificité de la prééclampsie dans l'espèce humaine est liée à la spécificité humaine concernant l'invasion profonde des trophoblastes humains dans le myomètre maternel.

Figure 36 : placentation anormale au cours de la prééclampsie



D'après Lam *et al.*, 2005. L'échange de dioxygène, de nutriments et de déchets entre le fœtus et la mère dépend d'une perfusion placentaire adéquate par les vaisseaux maternels. Au cours du développement placentaire normal, les cytotrophoblastes invasifs d'origine fœtale envahissent les artères spiralées maternelles, les faisant passer d'étroits vaisseaux résistants à de larges vaisseaux à grande capacité vasculaire, c'est-à-dire ayant une grande capacité d'augmenter le volume de sang qu'ils détiennent sans forte augmentation de la pression artérielle. Ce remodelage permet de fournir une perfusion placentaire adéquate pour soutenir la croissance du fœtus. Durant le processus d'invasion vasculaire, les cytotrophoblastes passent d'un phénotype épithélial à un phénotype endothélial, processus connu sous le nom de « pseudovasculogénèse » ou « mimique vasculaire » (panneau du haut). Dans la prééclampsie, les cytotrophoblastes n'adoptent pas un phénotype endothélial invasif. Les artères spiralées sont ainsi peu remodelées et restent étroites et résistantes (panneau du bas). Ce phénomène peut provoquer une ischémie placentaire.

Figure 37 : comparaison d'artères spiralées utérines remodelées ou non-remodelées



D'après Espinoza *et al.*, 2006. Les deux images sont coloré avec la cytotkératine 7 (marque les trophoblastes en marron) et à l'acide périodique de Schiff (marque en rose les polysaccharides présents dans certains tissus conjonctifs), grossissement X 200. À gauche : au sein du myomètre utérin, les artères spiralées remodelées sont caractérisées par la présence de trophoblastes (pointes de flèches) ainsi que des dégénérescences fibrineuses au sein de la paroi du vaisseau (flèches entières). À droite : les artères spiralées non-remodelées ne présentent ni trophoblastes, ni dégénérescence fibrineuse au sein de la paroi du vaisseau, et conservent des contours artériels intacts. On peut voir que des trophoblastes ont envahi le myomètre mais n'ont pas atteint la paroi du vaisseau.

10.2. Ischémie-reperfusion placentaire et dysfonction endothéliale maternelle

Des phénomènes d'ischémie-reperfusion, en rapport avec la dysfonction du placenta, entraînent un stress oxydatif placentaire (Hubel, 1999 ; Hung *et al.*, 2002) et un relargage de substances diverses dans la circulation maternelle, notamment des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS), des débris placentaires trophoblastiques apoptotiques et nécrotiques, des cytokines pro-inflammatoires, et des facteurs antiangiogéniques comme le récepteur soluble du VEGF (sVEGFR-1 ou sFLT-1) et l'endogline soluble (Levine *et al.*, 2004 ; Venkatesha *et al.*, 2006).

Ces différentes substances libérées dans la circulation maternelle, ainsi que l'activation des leucocytes circulants maternels lors de leur passage dans la chambre intervillieuse du placenta, sont responsables d'une réponse inflammatoire systémique et d'une altération de la fonction endothéliale. De nombreux travaux ont ainsi mis en évidence des marqueurs d'activation ou de lésion cellulaire endothéliale au cours de la prééclampsie dont, entre autres, l'augmentation dans la circulation maternelle du facteur von Willebrand, de l'endothéline, de la thrombomoduline et de la fibronectine (Roberts *et al.*, 1989).

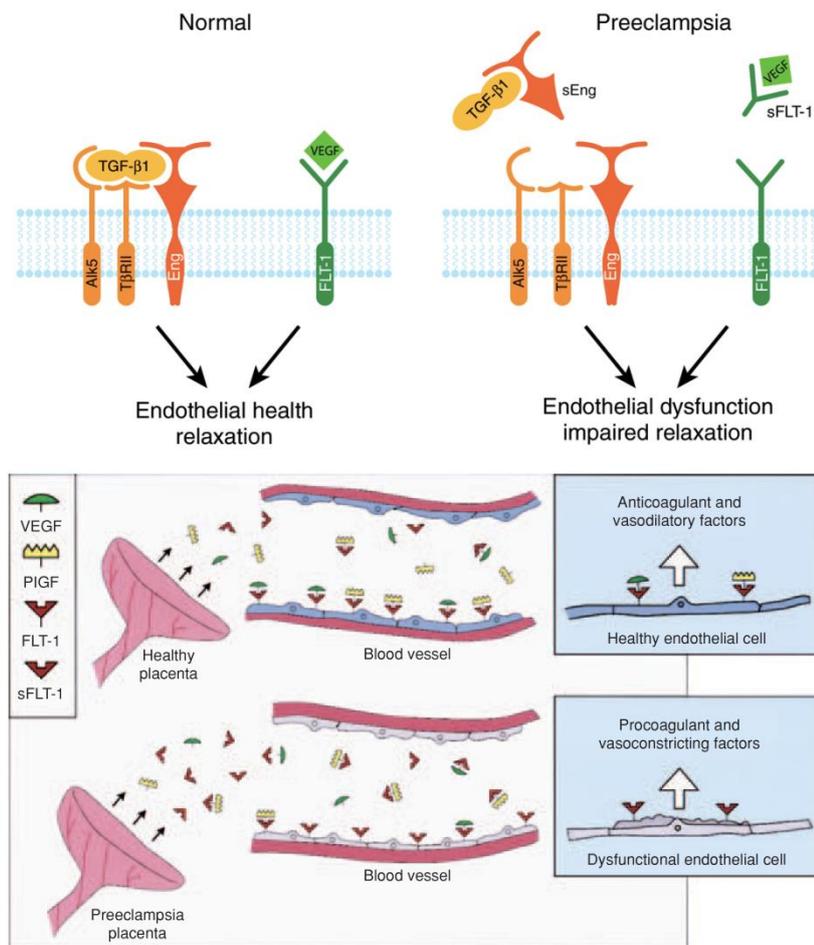
L'identification récente des récepteurs solubles du VEGF et de l'endogline, produits en quantité excessive au cours de la prééclampsie, a grandement contribué à faire le lien entre l'anomalie placentaire et le dysfonctionnement endothélial (**Figure 38**). Le récepteur soluble du VEGF fixe ses ligands que sont le VEGF et le PlGF, qui sont impliqués dans la survie des cellules endothéliales, la vasodilatation périphérique et l'intégrité de l'endothélium fenêtré glomérulaire au cours de la grossesse normale. Des taux circulants effondrés de VEGF et de PlGF libres sont ainsi habituellement retrouvés chez les patientes prééclamptiques, et sont associés à la dysfonction endothéliale maternelle et à la néphropathie glomérulaire (Levine *et al.*, 2004). L'endogline est le récepteur du TGF- β (*transforming growth factor beta*), protéine possédant une action sur l'homéostasie vasculaire par l'intermédiaire de la monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS). La forme soluble de l'endogline (sENG) prévient donc la liaison du TGF- β à ses récepteurs membranaires. Elle potentialise la dysfonction endothéliale induite par le récepteur soluble du VEGF, et contribue à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à l'hypertension artérielle. Elle joue un rôle, en association avec le récepteur soluble du VEGF, dans l'apparition des formes sévères de la maladie et semble également être impliquée dans la survenue du HELLP syndrome (Venkatesha *et al.*, 2006).

Les altérations cellulaires endothéliales, à la fois morphologiques et fonctionnelles, sont des éléments clés du retentissement de la prééclampsie sur les organes maternels. On observe ainsi une altération de la réponse vasomotrice conduisant à l'augmentation des résistances périphériques totales et à l'apparition d'une hypertension artérielle (Khalil et Granger, 2002). Cette altération de la réponse vasomotrice est liée en grande partie à une production accrue d'endothéline et de thromboxane A₂, qui sont des substances vasoconstrictrices, et à une inhibition de la production de NO et de prostacycline, qui sont des substances vasodilatatrices (**Figure 39**).

L'atteinte endothéliale, en altérant les propriétés antithrombotiques de l'endothélium, contribue d'autre part à l'activation de la coagulation au cours de la prééclampsie et à la formation de microthrombi disséminés qui, associés au vasospasme, participent au retentissement viscéral de la maladie. La perte de l'intégrité endothéliale entraîne également un trouble de la perméabilité vasculaire, aboutissant à l'apparition d'œdèmes par surcharge hydrosodée du tissu interstitiel. Enfin, au niveau rénal, les cellules endothéliales des capillaires glomérulaires accumulent les lipides et obstruent fréquemment la lumière de ces capillaires. Elles sont responsables d'une endothéliose glomérulaire, atteinte typique de la prééclampsie, à l'origine du dysfonctionnement rénal et de la protéinurie (Jeyabalan et Conrad, 2007).

Deux schémas bilans sont présentés en **Figure 40** et **Figure 41**.

Figure 38 : les molécules sFlt1 et sEng provoquent une dysfonction endothéliale en antagonisant la signalisation du VEGF, du PlGF et du TGF-β

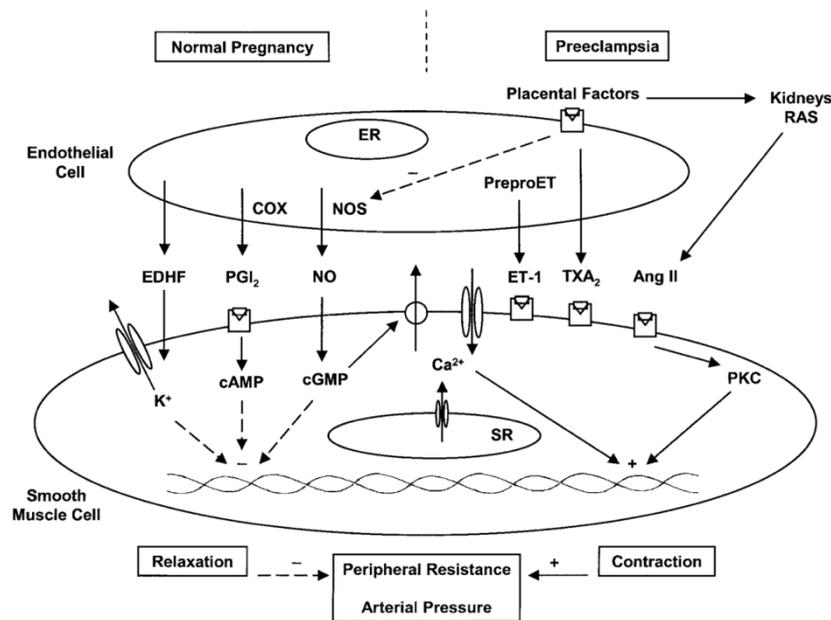


D'après Karumanchi et Epstein, 2007 et Karumanchi *et al.*, 2005. Il existe de plus en plus de preuves que le VEGF, le TGF-β1 et possiblement le PlGF, sont nécessaires pour maintenir la santé des cellules endothéliales au sein de plusieurs tissus, notamment le rein et peut-être le placenta. Au cours d'une grossesse normale, le placenta produit des concentrations modérées de VEGF, PlGF et sFlt-1, ce qui maintient une homéostasie vasculaire. Au cours d'une grossesse prééclampsique, les molécules sFlt-1 et sEng, deux protéines endogènes antiangiogéniques, sont produites en excès par le placenta et vont lier le VEGF, le PlGF et le TGF-β1 circulant et empêcher leur interaction avec leur récepteur membranaire respectif sur les cellules endothéliales. Il en résulte une dysfonction des cellules endothéliales, incluant une diminution de la production de prostacycline et de monoxyde d'azote, et un relargage de protéines procoagulantes comme le facteur von Willebrand, l'endothéline, la fibronectine et la thrombomoduline.

10.3. Autres concepts

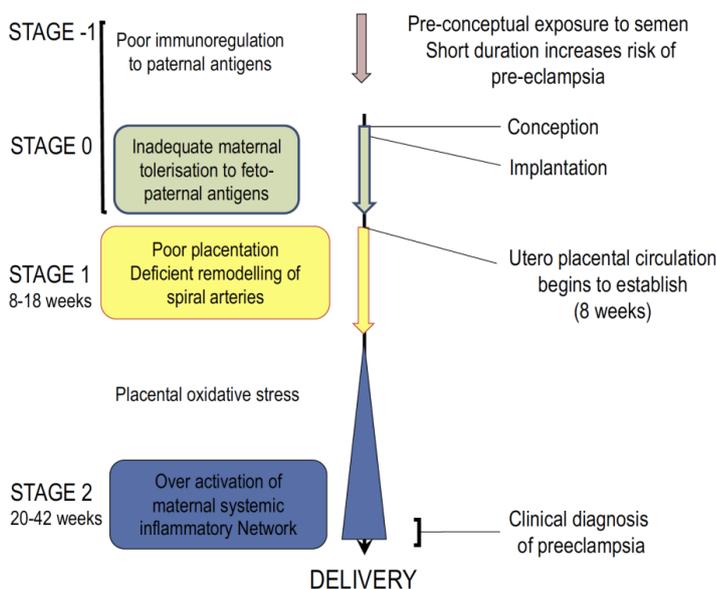
Le défaut de remodelage vasculaire utérin ne peut pas expliquer toutes les prééclampsies (Steegers *et al.*, 2010). Des prééclampsies peuvent en effet survenir chez des patientes présentant une vascularisation utéroplacentaire normale (Dopplers utérins normaux, pas de retard de croissance intra-utérin). C'est notamment souvent le cas lorsqu'une prééclampsie survient en présence d'une grossesse multiple (gros placenta), d'un diabète, d'un placenta post-mature ou d'une infection. Il s'agit en général de prééclampsies tardives et peu sévères. La dysfonction placentaire trouve donc son origine dans d'autres causes (Dubar *et al.*, 2012).

Figure 39 : modifications vasculaires au cours d'une grossesse normale et prééclampsiques



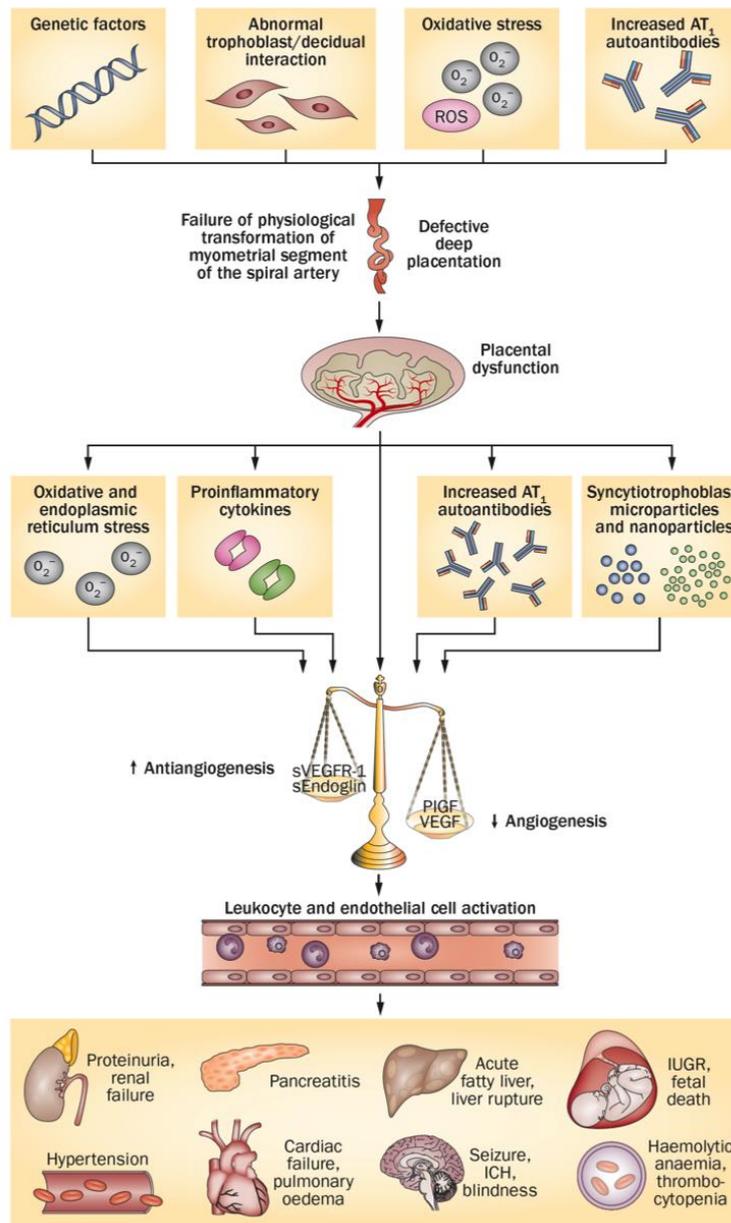
D'après Khalil et Granger, 2002. Au cours d'une grossesse normale il y a une augmentation de l'activité de la monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS) et de la cyclooxygénase (COX) ainsi qu'une augmentation de la production de NO, de prostacycline (PGI₂) et de l'EDHF (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*). Le NO augmente le cGMP et PGI₂ augmente le cAMP dans les cellules musculaires lisses, ce qui augmente la concentration intracellulaire de Ca²⁺ et la sensibilité des myofilaments au Ca²⁺. Également, l'EDHF ouvre les canaux K⁺ dans les cellules lisses, conduisant à une hyperpolarisation de la membrane. Ceci provoque la relaxation du muscle lisse et la diminution de la résistance périphérique et de la pression artérielle. Dans la prééclampsie, il y a une augmentation du relargage de cytokines placentaires qui inhibent la production de facteurs vasorelaxant par l'endothélium, ce qui diminue la relaxation des muscles lisses. Les cytokines stimulent également le relargage de facteurs vasopressants par l'endothélium comme l'endothéline (ET-1) et la thromboxane A2 (TXA₂) et pourraient activer le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) dans le rein, provoquant l'augmentation de l'angiotensine II (AngII). L'endothéline 1, la thromboxane A2 et l'angiotensine II stimulent des récepteurs spécifiques dans les muscles lisses conduisant à l'augmentation intracellulaire de Ca²⁺, à l'activité de la protéine kinase C, à la contraction des muscles lisses, et à une augmentation des résistances périphériques et de la pression artérielle. ER : *endoplasmic reticulum*, réticulum endoplasmique ; SR : *sarcoplasmic reticulum*, réticulum sarcoplasmique.

Figure 40 : stades du développement de la prééclampsie



D'après Redman, 2011. Les stades 1 et 2 de la prééclampsie sont acceptés par la communauté scientifique. Les stades plus précoces (0 et -1) sont hypothétiques. Le stade -1 comprend une tolérance maternelle préconceptionnelle aux antigènes paternels exprimés dans la semence ou sur les spermatozoïdes. Le stade 0 comprend des reconnaissances précoces par les cellules immunitaires déciduales utérines des antigènes paternels exprimés sur les trophoblastes immédiatement après l'implantation et ce jusqu'à ce que la circulation utéroplacentaire s'ouvre dans l'espace intervilloux. Il est proposé qu'une faible reconnaissance amène à un défaut de croissance des trophoblastes et du placenta.

Figure 41 : modèle intégré de la physiopathologie complexe de la prééclampsie



D'après Chaiworapongsa *et al.*, 2014. Des facteurs génétiques – notamment une incompatibilité des génotypes maternel et fœtal – et environnementaux – comme l'exposition préconceptionnelle aux antigènes paternels – perturbent l'immunomodulation induite par la grossesse et entraînent une affection des trophoblastes et de la décidua, une invasion endométriale peu profonde et un échec du remodelage physiologique des artères spiralées. Le degré d'ischémie utérine est déterminé par la sévérité du défaut de placentation et la demande du fœtus en approvisionnement de sang. Les troubles obstétricaux ont lieu lorsque ces deux facteurs sont dérégulés. Le moment et l'étendue du désordre détermine la présentation clinique : mort fœtale, prééclampsie avec retard de croissance intra-utérin, retard de croissance intra-utérin seul ou prééclampsie tardive. La prééclampsie survient suite à des réponses adaptatives impliquant le relargage dans la circulation maternelle de cytokines inflammatoires, d'auto-anticorps anti-AT1, de facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques et de particules dérivées des syncytiotrophoblastes. Ensemble, ces facteurs induisent une activation leucocytaire, une inflammation intravasculaire, une dysfonction des cellules endothéliales et une production excessive de thrombine. Les caractéristiques multiples de la prééclampsie résultent des conséquences de ces processus dans les divers organes touchés. AT1 : *type-1 angiotensin II receptor*, récepteur à l'angiotensine II de type 1 ; ICH : *intracerebral haemorrhage*, hémorragie intracérébrale ; IUGR : *intrauterine growth restriction*, retard de croissance intra-utérin ; PIGF : *placental growth factor* ; ROS : *reactive oxygen species*, espèces réactives de l'oxygène ; s : soluble ; VEGF : *vascular endothelial growth factor* ; VEGFR-1 : *vascular endothelial growth factor receptor 1*.

11. LES OUTILS D'ÉTUDES DE LA PRÉÉCLAMPISIE

La prééclampsie étant un syndrome de la grossesse, elle reste éthiquement difficile à étudier directement dans l'espèce humaine car nous n'avons accès qu'à des placentas à un terme avancé du syndrome, quand les causes et conséquences physiopathologiques sont indistinguables. C'est pourquoi des modèles sont indispensables pour investiguer les mécanismes physiopathologiques de ce syndrome et évaluer de nouveaux traitements.

11.1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont des outils précieux pour disséquer les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'apparition de la prééclampsie. Elles permettent notamment d'étudier la réponse moléculaire et cellulaire à des phénomènes d'hypoxie-reperfusion, plus difficile à faire chez l'animal. De plus, les modèles *in vitro* sont utiles pour tester des biomarqueurs ou des thérapeutiques avant leur utilisation sur l'animal et l'homme (Orendi *et al.*, 2011).

On peut étudier le syndrome prééclamptique à l'aide de deux types de lignées cellulaires : les lignées trophoblastiques, afin d'étudier les mécanismes placentaires, et les lignées de cellules endothéliales, afin d'étudier l'apparition de l'hypertension.

11.1.1. Lignées cellulaires trophoblastiques

Quelques exemples sont présentés ci-dessous (Orendi *et al.*, 2011).

- Les cultures primaires de trophoblastes villeux ou extravilleux isolés. L'inconvénient est qu'on ne peut pas les garder longtemps en culture.
- Les explants villositaires, c'est-à-dire des morceaux de tissu placentaire, voire un placenta entier. Deux principaux types d'expériences sont conduites avec les explants villositaires (Miller *et al.*, 2005) : (1) des explants de grossesse physiologique sont utilisés pour étudier les effets de facteurs externes sur la survie, la fonction et l'adaptation tissulaire ; (2) des explants de placentas de patientes atteintes de prééclampsie peuvent être comparés avec des explants contrôles d'un point de vue fonctionnel ou transcriptionnel.
- Les lignées immortalisées de trophoblastes, certaines obtenues par transfection avec le virus SV40, comme les lignées SGHPL, HTR-8/SVneo, d'autre obtenues par dérivation de choriocarcinomes, c'est-à-dire de tumeurs placentaires, comme les BeWo, Jeg-3, Jar. Ces lignées ont l'avantage de pouvoir être gardées indéfiniment en culture. Les propriétés de ces cellules diffèrent d'une lignée à une autre. Par exemple, certaines comme les SGHPL5 et les BeWo ont la capacité de fusionner et constituent pour cette raison un modèle de cytotrophoblastes villeux. Les lignées n'ayant pas cette capacité comme les Jeg-3 ou les Jar sont en général plus proches des cytotrophoblastes extravilleux.

Ces outils permettent de disséquer le rôle moléculaire et cellulaire d'un gène particulier dans un contexte placentaire, en étudiant son impact sur le transcriptome (Zhou *et al.*, 2013), le taux de fusion (Kudo *et al.*, 2003), la migration cellulaire ou autre (van Dijk *et al.*, 2010c). Ils permettent également d'étudier la réponse à l'hypoxie (Hu *et al.*, 2007).

11.1.2. Lignées de cellules endothéliales

Comme décrit dans les paragraphes précédents, l'endothélium a un rôle central dans le développement du syndrome maternel de la prééclampsie (Calicchio *et al.*, 2013). Pour étudier la dysfonction endothéliale qui a lieu au cours du syndrome, des modèles *in vitro* de ce type cellulaire sont nécessaires. Pour cela, il est possible d'effectuer des cultures primaires ou d'utiliser des lignées immortalisées, dont certaines sont présentées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : quelques lignées de cellules endothéliales humaines

Abréviation	Signification	Origine tissulaire (Français)
HAOEC	<i>Human aortic endothelial cells</i>	Aorte
HBcAEC	<i>Human brachiocephalic artery endothelial cells</i>	Artère brachiocéphalique
HCtAEC	<i>Human carotid artery endothelial cells</i>	Artère carotide
HCAEC	<i>Human coronary Artery Endothelial cells</i>	Artère coronaire
HDLMVEC	<i>Human dermal Lymphatic Microvascular Endothelial cells</i>	Micro-vaisseaux lymphatiques
CADMEC/HMVEC	<i>Human dermal Microvascular Endothelial cells</i>	Micro-vaisseaux du derme
HITAEC	<i>Human internal Thoracic Artery Endothelial cells</i>	Artère thoracique interne
HLMVEC	<i>Human lung Microvascular Endothelial cells</i>	Micro-vaisseaux des poumons
HPAEC	<i>Human pulmonary Artery Endothelial cells</i>	Artère pulmonaire
HScAEC	<i>Human subclavian Artery Endothelial cells</i>	Artère subclavière
HUAEC	<i>Human umbilical Artery Endothelial cells</i>	Artère ombilicale
HUVEC	<i>Human umbilical Vein Endothelial cells</i>	Veine ombilicale

D'après le site de Cell Applications, Inc. [<http://www.cellapplications.com/primary-cells-cell/endothelial-cells>]

Ces outils permettent entre autres d'étudier la réponse cellulaire et moléculaire d'un facteur circulant ou suite à l'incubation avec des plasma de femmes ayant vécu un épisode de prééclampsie, par exemple (Calicchio *et al.*, 2013).

11.2. Modèles animaux

Les modèles animaux sont des outils précieux pour l'étude d'une maladie. Ils permettent de décrypter la physiopathologie, de disséquer les différents stades et de mettre en place de nouveaux traitements. Comme souligné dans les paragraphes précédents, la difficulté concernant la prééclampsie est qu'il n'existe pas de modèle animal spontané. Malgré cet obstacle, plusieurs modèles animaux ont été développés pour approcher au mieux la réalité de la prééclampsie dans l'espèce humaine. Les scientifiques se sont basés sur l'altération d'éléments clés de la physiopathologie de la placentation et de la prééclampsie (Doridot *et al.*, 2012) : les équilibres de substances vasoactives comme sFlt1 (Maynard *et al.*, 2003 ; Sugimoto *et al.*, 2003), l'hypertension chronique et le système rénine-angiotensine-aldostérone (Falcao *et al.*, 2009), l'immunité (Zenclussen *et al.*, 2004) et l'auto-immunité (Herse et LaMarca, 2013 ; Zhou *et al.*, 2008), l'hypoxie (Gilbert *et al.*, 2009), le stress oxydatif (Banerjee *et al.*, 2009) ou les gènes soumis à empreinte parentale par exemple (Kanayama *et al.*, 2002). Les principales espèces utilisées sont la souris, le rat, le babouin, le lapin et le mouton. Plusieurs exemples sont présentés dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : présentation de modèles animaux pour la prééclampsie

Mécanisme d'obtention du modèle	Espèce d'étude	Stade 1	Stade 2	Thérapeutique utilisée	
Spontané	Souris	BPH/5		Tempol	
	Souris	BPH/5		Inhibition du complément	
	Souris	BPH/5		VEGF	
	Rat	Dahl S			
Chirurgical	Rat		RUPP	STS	
	Rat		RUPP	17-HPC	
	Babouin		RUPP		
Pharmacologique	Souris		L-NAME	Sildenafil	
	Rat		L-NAME	Sildenafil	
	Rat		L-NAME	Resveratrol	
	Souris		AVP		
	Souris		β 2GPI		
	Souris		Activine A	Inhibiteur	
	Lapin		HbF	A1M	
	Mouton		Famine	A1M	
	Babouin		Inhibiteur du NO		
	Babouin		Anti-IL10		
	Babouin		TNF α		
	Génétique	Souris		IDO (ko)	
		Souris		IL4 (ko)	
Souris		IL10 (ko)			
Souris		HtrA1 (ko)			
Rat			Angio/ Renin(tg)	Induction des cellules Treg	
Souris		STOX1 (tg)		Aspirine	
Souris			sFlt1 (vecteur)	VEGF	
Rat			sFlt1 (vecteur)		

D'après Erlandsson *et al.*, 2016. Quatre catégories de modèles animaux pour la prééclampsie permettent d'aborder son étiologie et/ou ses thérapeutiques. Les stades 1 et 2 correspondent aux stades physiopathologiques de la prééclampsie, le stade 1 étant le défaut de placentation, et le stade 2 étant l'apparition du syndrome maternel. β 2GPI : bêta 2-glycoprotéine I ; A1M : alpha1-microglobuline ; AVP : arginine vasopressine ; HtrA1 : *high temperature requirement A1* ; HbF : hémoglobine fœtale ; 17-HPC : 17- α -hydroxyprogestérone caproate ; IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase ; L-NAME : nitro-L-arginine methyl ester ; NO : *nitric oxide*, monoxyde d'azote ; NOS : *nitric oxide synthase* ; RUPP : *reduced uterine perfusion pressure* ; sFlt-1 : *soluble fms-like tyrosine kinase 1* ; STOX1 : *Storkhead box 1* ; STS : *sodium tanshinone IIA sulfonate* ; VEGF : *vascular endothelial growth factor*.

On remarque que les modèles peuvent être générés de plusieurs façons. En effet, il existe des modèles « spontanés », présentant cependant en général une hypertension constitutive pré-gestationnelle (Souris BPH/5), des modèles transgéniques et des modèles induits de manière chirurgicale ou par des substances pharmacologiques. Concernant les modèles spontanés, certaines lignées de souris présentent des symptômes prééclamptiques au cours de la gestation avec des degrés divers (Davisson *et al.*, 2002), mais il ne faut pas oublier que ces lignées de laboratoires ont été sélectionnées par l'homme, ce qui n'enlève donc pas l'observation initiale qu'il n'existe pas de prééclampsie spontanée dans l'espèce murine.

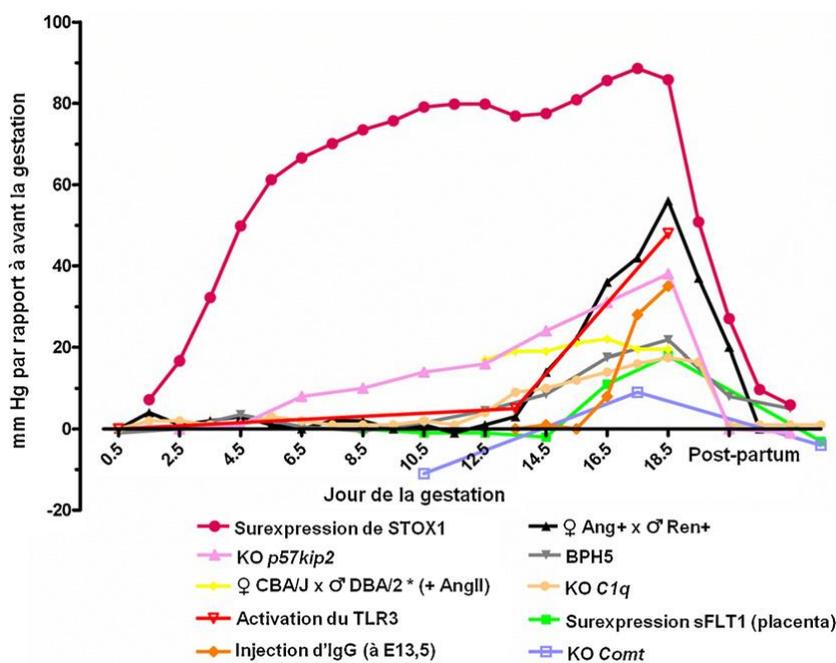
Les rongeurs constituent un modèle de choix pour l'étude de la prééclampsie. En effet, comme dans l'espèce humaine, ils développent un placenta discoïde d'origine maternelle et fœtale, de type hémochorial. Cependant, comme décrit précédemment dans le chapitre sur la placentation, le placenta humain est de sous-type monochorial, tandis que le placenta murin est de sous-type

trichorial. De plus, le placenta murin possède une structure spécifique où se font les échanges fœto-placentaires, le labyrinthe, 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 (Doridot *et al.*, 2012). 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) :

- 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 (Poon *et al.*, 2011) ;
- chez la souris, lorsque le remodelage des artères spiralées utérines est altéré, on n'observe pas d'hypoxie placentaire et 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 (Doridot *et al.*, 2012). En ce sens, de nombreuses tentatives pour obtenir de bons modèles de prééclampsie chez la souris ont été tentées. La **Figure 42** présente une comparaison de l'évolution de la pression artérielle dans différents modèles de souris.

Figure 42 : pression artérielle systolique au cours de la gestation dans différents modèles de souris prééclamptiques



D'après Doridot *et al.*, 2012. La pression artérielle indiquée 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).

Cependant, malgré le grand nombre de modèles animaux générés, aucun ne récapitule tous les aspects du syndrome (Erlandsson *et al.*, 2016), en particulier nombreux sont ceux qui n'ont pas de répercussions fœtales, et surtout aucun n'est caractérisé par un défaut d'invasion trophoblastique (McCarthy *et al.*, 2011). Ceci met en évidence la limite de ces modèles dans l'étude de la prééclampsie et donc l'extrapolation de ces données à l'espèce humaine doit être réservée (McCarthy *et al.*, 2011).

12. CONCLUSION DE CE DEUXIÈME CHAPITRE : LA PRÉÉCLAMPSIE, UN SYNDROME DE LA GROSSESSE ENCORE MÉCONNU

La prééclampsie n'est pas une maladie au sens strict, définie par une cause unique et des mécanismes physiopathologiques univoques (Redman, 2011). C'est un syndrome spécifique de la grossesse mais particulièrement complexe, dans lequel l'unité est liée à une atteinte endothéliale diffuse secondaire à un trouble circulatoire placentaire (Roberts *et al.*, 1989). Il est impossible de donner une définition unique de la PE (Redman, 2011). Elle est caractérisée par un très grand polymorphisme clinique, à la fois maternel et fœtal, de multiples facteurs de risque et une physiopathologie complexe. Le seul élément certain de définition de la prééclampsie est qu'elle est spécifique de la grossesse, due à la présence du placenta et guérie par l'ablation du celui-ci (Redman, 2011).

La prééclampsie occupe une place importante dans la morbidité et la mortalité maternelles en France. Elle peut en effet être à l'origine de complications viscérales graves susceptibles d'engager le pronostic vital maternel. Par ailleurs, le pronostic néonatal est souvent altéré, en particulier en raison de la prématurité induite dans les formes les plus sévères.

Sa physiopathologie, dorénavant mieux comprise, fait intervenir une dysfonction placentaire à l'origine d'une activation, voire d'une lésion, de l'endothélium maternel. L'origine de cette dysfonction placentaire est souvent un défaut d'invasion trophoblastique des artères utérines spiralées.

Le seul traitement curatif de la maladie demeure l'arrêt de la grossesse et la délivrance du placenta.

Si la prééclampsie peut être responsable de complications à court terme, elle peut également être à l'origine de complications à long terme, en particulier cardiovasculaires et rénales.

Il n'existe pas à ce jour de marqueur pertinent pour le dépistage précoce de la prééclampsie. De même, les moyens de prévention de la prééclampsie restent limités. L'aspirine à faible dose possède une efficacité modérée dans la prévention des récurrences de la maladie en réduisant le risque d'environ 10 %.

La combinaison de nombreux modèles animaux et de nombreuses études *in vitro* et *ex vivo* sur des explants placentaires nous permet d'espérer des possibilités synergiques pour approfondir la compréhension de l'étiologie de la prééclampsie ainsi que le développement de marqueurs prédictifs ou de nouveaux traitements préventifs dans les années à venir.

De nombreuses questions taraudent encore les scientifiques : quelle est l'origine de la prééclampsie ? Quels sont les signaux d'apparitions de l'hypertension maternelle ? Existe-t-il un moyen précoce de dépister la prééclampsie et si oui est-il possible d'éviter précocement l'avancement de la maladie ? Le syndrome est-il réversible ou a-t-on un point de non-retour ? Il s'ajoute à ces questions le fait qu'un pourcentage conséquent des crises d'éclampsie se déroule en post-partum, après le retour de la patiente dans son foyer (Cohen *et al.*, 2015).

1. CONCEPTS CHIMIQUES

1.1. Les radicaux libres

1.1.1. Définitions

Dans la structure des atomes et des molécules, les électrons sont généralement associés par paires, chaque paire étant en mouvement autour des noyaux dans une région de l'espace appelée orbitale atomique ou orbitale moléculaire. Un radical libre est une espèce chimique capable d'une existence indépendante (d'où le terme « libre ») et qui possède un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbitale (Halliwell, 2015). Le radical libre le plus simple est ainsi un atome de l'élément hydrogène avec un proton et un électron célibataire, que l'on écrit H•. Le point noté à côté de la formule chimique, symbolisant l'électron non-apparié ou électron célibataire, est placé de façon à indiquer, si possible, l'atome ayant la plus grande densité électronique, c'est-à-dire l'atome autour duquel l'électron célibataire a la plus grande probabilité de se trouver. L'atome possédant l'électron célibataire est dit atome central et est souvent en biologie un carbone, un oxygène ou un azote (McNaught et Wilkinson, 1997). Le terme « radical », par opposition à « radical libre », a été utilisé pour désigner les substituants attachés à une entité moléculaire. Aujourd'hui, un « radical libre » peut se nommer simplement « radical », tandis que pour les entités liées, on utilise « groupes » ou « substituants », mais on ne doit plus utiliser radical. On parle donc du radical hydroxyle pour désigner l'entité HO•, et du groupe hydroxyle pour désigner le groupe fonctionnel attaché à une structure moléculaire –OH (McNaught et Wilkinson, 1997), qui ne sont pas à confondre avec l'ion hydroxyle OH⁻.

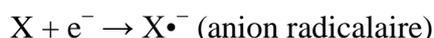
Les définitions ci-dessous aideront la compréhension de ce chapitre (Halliwell et Gutteridge, 2007 ; McNaught et Wilkinson, 1997).

- Oxydation : perte d'un ou de plusieurs électrons (ou perte d'un ou de plusieurs atomes d'hydrogène ou gain d'un ou de plusieurs atomes d'oxygène) d'une entité chimique.
- Réduction : gain d'un ou de plusieurs électrons (ou gain d'un ou de plusieurs atomes d'hydrogène ou perte d'un ou de plusieurs atomes d'oxygène) d'une entité chimique.
- Agent oxydant : agent capable d'oxyder une espèce chimique en lui prenant des électrons (ou en prenant de l'hydrogène, ou en ajoutant de l'oxygène).
- Agent réducteur : agent capable de réduire une espèce chimique en lui ajoutant des électrons (ou en lui ajoutant de l'hydrogène, ou en lui prenant de l'oxygène).

1.1.2. Génération

De nombreux radicaux libres existent en tant que tel dans les systèmes vivants. Cependant, de nombreux radicaux peuvent être formés par d'autres processus que l'on peut regrouper en deux classes (Halliwell et Gutteridge, 2007).

- Les transferts d'électron, c'est-à-dire les pertes (oxydation) ou les gains (réduction) d'un électron d'une molécule non radicalaire.



▪ Le clivage d'une liaison covalente d'une molécule. Un lien covalent est la mise en commun d'une paire d'électrons entre deux atomes pour construire une molécule (Vishal-Tandon *et al.*, 2005). Un seul type de clivage est capable de produire des radicaux libres : la fission homolytique, qui est une coupure symétrique de la liaison dans laquelle les deux atomes vont retenir chacun un électron. Ce type de clivage demande beaucoup d'énergie : haute température de 400-600°C, ultraviolets ou rayonnement ionisant par exemple.

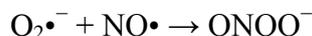


1.1.3. Réactivité chimique

Un radical libre possède un nombre impair d'électrons, ce qui en fait une molécule instable, de durée de vie courte, et très réactive (Vishal-Tandon *et al.*, 2005). Il peut ainsi réagir très vite avec d'autres composés en essayant de « capturer » l'électron manquant pour gagner en stabilité. Les radicaux libres sont donc par définition des espèces oxydantes, c'est-à-dire des espèces capables de capter un électron d'une autre molécule (Graves, 2012). Attention cependant, certains radicaux libres peuvent agir à la fois comme agent oxydant et comme agent réducteur comme, l'ion superoxyde $O_2\cdot^-$ (Halliwell et Gutteridge, 2007).

Les radicaux libres peuvent attaquer une molécule stable, non-radicalaire, ce qui est le cas de la plupart des molécules biologiques. Lorsque la molécule attaquée perd son électron elle devient un radical libre elle-même : ce phénomène peut entraîner une réaction en chaîne pouvant désorganiser une cellule vivante (Vishal-Tandon *et al.*, 2005).

Les radicaux libres peuvent également réagir ensemble : par exemple deux atomes d'hydrogène forment une molécule diatomique de dihydrogène, et l'ion superoxyde réagit avec le monoxyde d'azote pour former du peroxyde d'azote (Halliwell, 2015).



Dans ces cas-là une espèce non-radicalaire est formée. Celle-ci est généralement moins réactive que le radical libre parent, comme c'est le cas pour H_2 , mais pas toujours : par exemple, le peroxyde d'azote provoque plus de dommages tissulaires que ses deux radicaux libres parents (Radi, 2013).

1.2. Les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

L'expression « espèces réactives de l'oxygène » (ERO) a été utilisée pour définir tous les agents plus réactifs que l' O_2 , et inclut à la fois les radicaux libres de l'oxygène, comme l'ion superoxyde ($O_2\cdot^-$), et à la fois certaines espèces non-radicalaires qui sont des agents oxydants et/ou sont facilement convertis en radicaux libres comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En somme, tous les radicaux libres de l'oxygène sont des espèces réactives mais toutes les espèces réactives de l'oxygène ne sont pas des radicaux libres (Halliwell, 2015). On peut employer indifféremment l'expression « espèces réactives de l'oxygène » (ERO) ou « dérivés réactifs de l'oxygène » (DRO), ou bien plus souvent l'expression anglaise « *reactive oxygen species* » (ROS). Certains auteurs (Graves, 2012) utilisent également l'expression « *reactive oxygen intermediates* » (ROI).

L'expression « espèces réactives de l'azote » (ERA) est similaire et inclut des espèces radicalaires, comme le $NO\cdot$, ainsi que des espèces non-radicalaires, comme HNO_2 (Halliwell, 2015). Symétriquement, on peut employer indifféremment l'expression française « espèces réactives de l'azote » (ERA) ou « dérivés réactifs de l'azote » (DRA) ou bien plus souvent l'expression anglaise « *reactive nitrogen species* » (RNS). Certains auteurs (Graves, 2012) utilisent également l'expression « *reactive nitrogen intermediates* » (RNI).

On regroupe parfois les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote sous l'expression « *reactive oxygen and nitrogen species* » (RONS).

Pour plus de lisibilité, j'utiliserai uniquement les abréviations ROS, RNS et RONS. Certaines de ces molécules sont regroupées dans le **Tableau 6**.

Le terme « réactive » n'est pas toujours approprié. Par exemple H_2O_2 , $\text{NO}\cdot$ et $\text{O}_2\cdot^-$ réagissent rapidement mais avec peu de molécules, tandis que $\text{HO}\cdot$ réagit rapidement avec de nombreux composés, et que d'autres entités comme $\text{RO}_2\cdot$, $\text{NO}_3\cdot$, $\text{RO}\cdot$, HOCl , HOBr , $\text{CO}_3\cdot^-$, $\text{CO}_2\cdot^-$, $\text{NO}_2\cdot$, ONOO^- ou NO_2^+ ont des activités intermédiaires (Halliwell, 2015).

Il est à noter qu'il existe également des espèces réactives du chlore, du brome et du soufre (Halliwell, 2015), que je ne détaille pas ici.

La demi-vie de ces espèces réactives varie considérablement et va de quelques nanosecondes pour les composés les plus réactifs comme $\text{HO}\cdot$, à quelques heures pour les plus stables comme l'acide hypochloreux HOCl (Martínez et Andriantsitohaina, 2009).

Tableau 6 : exemples d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

	Espèces réactives de l'oxygène (ROS)	Espèces réactives de l'azote (RNS)
Radicaux libres	Ion superoxyde $\text{O}_2\cdot^-$ Radical hydroxyle (ou oxhydrile) $\text{OH}\cdot$ Radical hydroperoxyde (ou perhydroxyle) $\text{HO}_2\cdot$ Radical carbonate $\text{CO}_3\cdot^-$ Radical peroxyde $\text{RO}_2\cdot$ (a) Radical alkoxyde $\text{RO}\cdot$ (a) Oxygène singulet $\text{O}_2 \Sigma g^+$ (b)	Monoxyde d'azote $\text{NO}\cdot$ Dioxyde d'azote $\text{NO}_2\cdot$ Radical nitrate $\text{NO}_3\cdot$
Espèces non-radicalaires	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 Acide hypobromeux HOBr Acide hypochloreux HOCl Oxygène singulet $\text{O}_2 \Delta g$ (b) Peroxyde organique ROOH Ion peroxydinitrite ONOO^- (c) Acide peroxydinitreux ONOOH (c)	Acide nitreux HNO_2 Ion nitrosonium (ou nitrosyle) NO^+ Ion nitroxyle NO^- Peroxyde d'azote (ou tétraoxyde de diazote) N_2O_4 Ion peroxydinitrite ONOO^- (c) Acide peroxydinitreux ONOOH (c) Trioxyde d'azote N_2O_3 Ion nitronium (ou nitrile) NO_2^+ Chlorure de nitrile NO_2Cl

(a) R désigne une chaîne carbonée.

(b) L'état fondamental de la molécule de dioxygène est appelée oxygène triplet et est notée Σg^- . Cette notation thermodynamique correspond à un état où la molécule présente une configuration électronique stable. Il existe deux formes métastables de la molécule de dioxygène, obtenues après excitation, regroupées sous le terme d'oxygène singulet et notées Δg et Σg^+ . Ces deux formes présentent des configurations électroniques particulières conférant des propriétés différentes, notamment la propriété d'être un radical.

(c) ONOO^- et ONOOH sont souvent inclus à la fois dans les ROS et les RNS.

D'après Halliwell, 2015.

2. BIOLOGIE DES RONS DANS LE RÈGNE ANIMAL

Je me focaliserai ici sur les rôles de ces molécules dans les cellules eucaryotes animales, même si elles ont été décrites dans d'autres règnes comme le règne végétal (Graves, 2012).

2.1. Histoire évolutive : utilisation de l'oxygène par les organismes aérobies et production de RONS

L'oxygène est apparu dans l'atmosphère il y a 2,2 milliards d'années grâce aux premières cyanobactéries réalisant la photosynthèse. L'augmentation du taux d'oxygène dans l'atmosphère au cours des âges a entraîné la formation de la couche d'ozone de la stratosphère qui filtre la plupart des rayons ultra-violet UV-C. Cette couche de protection a favorisé la colonisation des terres par des organismes vivants, qui étaient cependant anaérobies. Au fur et à mesure que les organismes vivants colonisaient les terres, le taux de dioxygène dans l'atmosphère continuait de croître en parallèle, ce qui a eu des effets toxiques. En effet, le dioxygène provoque en réalité des oxydations délétères voire létales des composants cellulaires comme les enzymes, ce qui altère leur action et le métabolisme entier de la cellule. L'augmentation du taux de dioxygène dans l'air a ainsi eu des effets sélectifs différents. Certains organismes n'ont pas survécu. D'autres se sont restreints à des environnements anaérobies. Enfin, d'autres se sont adaptés à ces taux croissants en développant des mécanismes de défense antioxydants pour se protéger de la toxicité du dioxygène (Halliwell et Gutteridge, 2007).

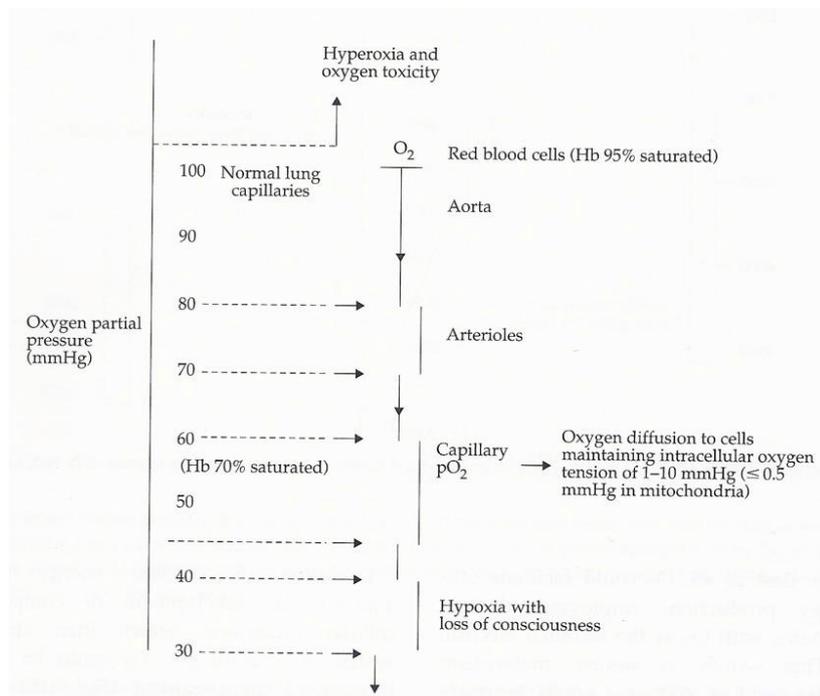
En parlant du dioxygène comme d'une ressource indispensable aux êtres vivants, on en oublie de dire qu'il s'agit également d'un gaz toxique, mutagène, capable d'enclencher un feu dans la nature. Or, malgré ses nombreux avantages, seulement 21 % de dioxygène dans l'air endommage les cellules aérobies. Les scientifiques s'en sont rendu compte lorsqu'ils ont étudié les dommages cellulaires oxydatifs sous air ambiant ou en exposant les organismes à des taux de dioxygène plus élevés (hyperoxie). Des taux de dioxygène supérieurs à 21 % sont connus depuis des décennies pour être toxiques pour les animaux, mais aussi pour les plantes et les bactéries. Par exemple, des rats adultes développent de sévères hémorragies pulmonaires lorsqu'ils ont été exposés à de fortes pressions en oxygène (Van Den Brenk et Jamieson, 1962). La toxicité du dioxygène varie selon l'espèce – les poissons étant plus sensibles que les mammifères par exemple –, l'âge, l'état physiologique, le régime alimentaire et le type cellulaire. On a longtemps pensé que le dioxygène était le responsable direct de ces dommages oxydatifs car il est capable d'inactiver certaines enzymes du métabolisme. En réalité, la plupart des enzymes des organismes aérobies ne sont pas sensibles au dioxygène. Les effets toxiques de l'élévation du dioxygène ont été finalement liés aux effets toxiques des rayons ionisants, et il a été proposé que la toxicité du dioxygène soit due à la formation de radicaux libres (Gerschman *et al.*, 1954). L'augmentation du taux de dioxygène a donc provoqué l'augmentation de la production de ROS et ainsi les dommages cellulaires aux organismes aérobies (Halliwell et Gutteridge, 2007).

Pourquoi ce choix d'utiliser le dioxygène comme source d'énergie malgré sa toxicité ? *A posteriori*, on peut dire que l'évolution a pris un chemin fructueux car l'utilisation du dioxygène dans les chaînes de transport d'électrons permet une oxydation plus efficace de la matière provenant de l'alimentation, ce qui a permis d'augmenter le taux d'ATP produit à partir des molécules apportées comme le glucose. Il a aussi permis plus de transformations métaboliques, comme la synthèse du collagène qui utilise une lysine hydroxylase (Halliwell et Gutteridge, 2007).

La mitochondrie participe via la chaîne respiratoire à la production de plus de 80 % de l'ATP par la cellule. La respiration aérobie grâce à la mitochondrie produit beaucoup plus d'énergie par unité de masse, ce qui a permis le développement d'organismes multicellulaires complexes, qui ont ainsi eu besoin d'un système assurant la distribution de dioxygène dans tout l'organisme. De tels systèmes ont l'avantage que la distribution du dioxygène peut être contrôlée. Ainsi, la plupart des cellules du corps humain ne sont jamais exposées à la pression atmosphérique du dioxygène mais à une plus faible pression (**Figure 43**). Les organismes pluricellulaires complexes comme les mammifères ont donc développé des mécanismes permettant d'assurer la distribution de dioxygène à toutes les cellules qui en ont besoin. Ces mécanismes comprennent le développement d'un système de « capture », le système respiratoire, d'une protéine de transport, l'hémoglobine, d'un système de distribution, la circulation sanguine, de systèmes de « stockage », telle la myoglobine musculaire, et d'un système de contrôle utilisant des senseurs de dioxygène (Halliwell et Gutteridge, 2007), comme les protéines HIFs (*hypoxia inducible factors*), facteurs de transcription qui promeuvent l'expression de gènes aidant la cellule ou l'organisme à répondre à un faible taux de dioxygène, comme des transporteurs de glucose ou le VEGF (*vascular endothelial growth factor*).

La production des RONS *in vivo* est donc inévitable pour les organismes terrestres. En effet, à l'exception de quelques espèces anaérobies et aérotoles, tous les organismes ont besoin de l'oxygène pour produire efficacement de l'énergie via des chaînes de transport d'électrons qui *in fine* vont donner des électrons au dioxygène, comme celle présente dans les mitochondries des cellules eucaryotes ou au sein des membranes cellulaires de nombreuses bactéries. Les RONS sont donc des productions inévitables du métabolisme de l'oxygène (Halliwell et Gutteridge, 2007) et sont constamment générés au sein des cellules du corps humain (Halliwell, 2015). Les RONS sont également produits au cours de réactions métaboliques essentielles pour la cellule eucaryote ainsi que par des enzymes spécifiques.

Figure 43 : concentrations de dioxygène approximatives dans le corps humain



D'après Halliwell et Gutteridge, 2007. Concentrations approximatives de dioxygène dans le corps humain. La plupart des cellules sont exposées à de relativement basses concentrations de dioxygène, ce qui peut être vu comme un mécanisme de défense antioxydant. La cornée et les voies respiratoires sont des exceptions notables. La peau, quant à elle, est protégée par la couche cornéenne de cellules mortes. Les cellules circulantes sanguines, à l'exception des érythrocytes, et les cellules de la paroi des vaisseaux, en particulier les cellules endothéliales vasculaires dotées d'une forte activité métabolique, consomment un peu du dioxygène relargué par l'hémoglobine avant qu'il ne diffuse jusqu'aux tissus.

2.2. Sources de production des ROS *in vivo*

2.2.1. La mitochondrie : source principale des ROS dans la cellule eucaryote

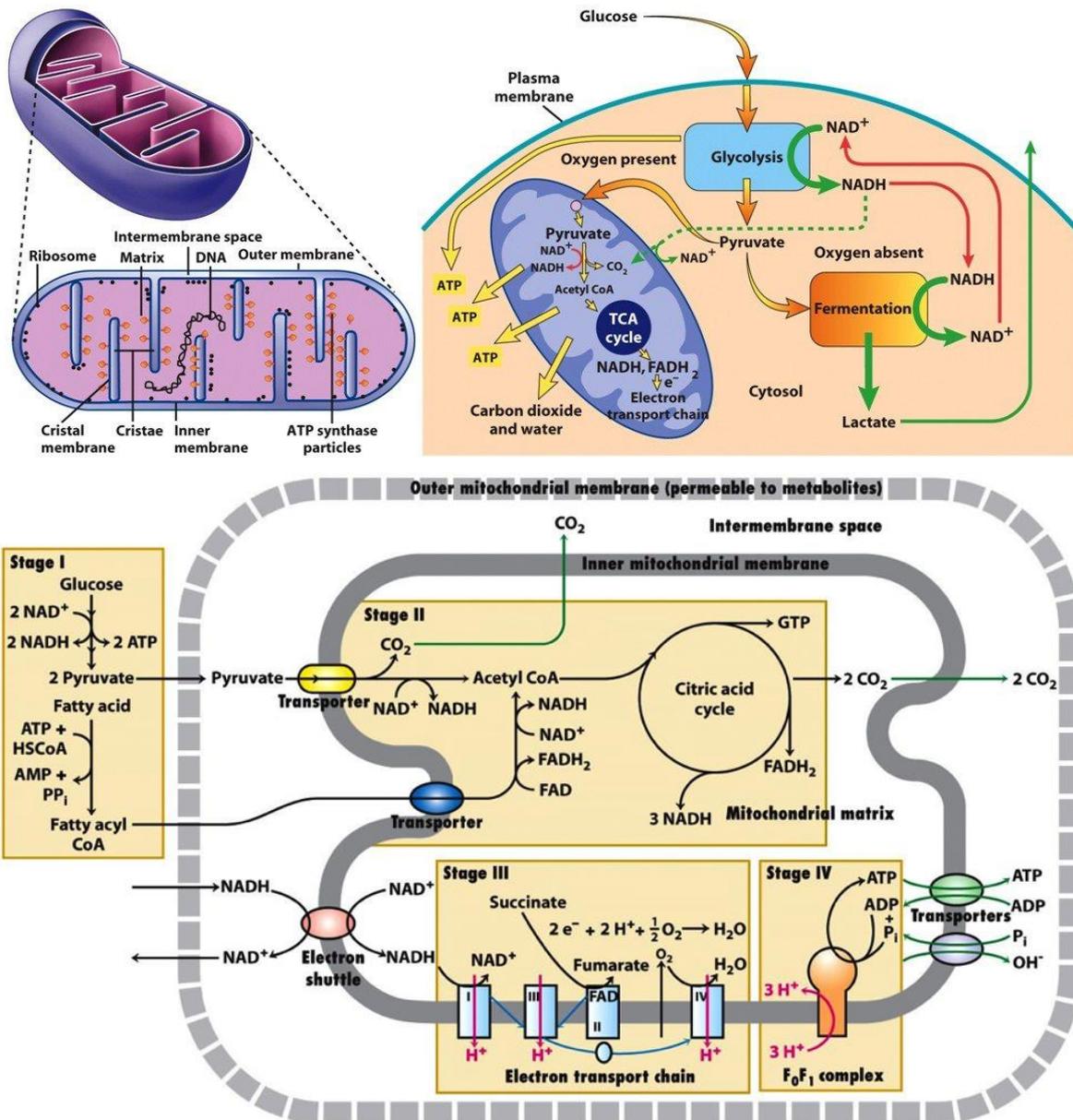
Les mitochondries occupent une partie importante du volume cytoplasmique des cellules eucaryotes et ont été essentielles pour l'évolution des animaux complexes. Les mitochondries sont généralement décrites comme des cylindres allongés et rigides, de diamètre compris entre 0,5 et 1 μm , ressemblant à une bactérie (**Figure 44**). Des études de microcinématographie de cellules vivantes montrent que les mitochondries sont des organites remarquablement mobiles et souples, capables de fusionner les unes avec les autres aussi bien que de fissionner. Lorsqu'elles se déplacent dans le cytoplasme, elles semblent souvent être associées aux microtubules, qui peuvent déterminer leur orientation particulière et leur distribution dans les différents types cellulaires (Alberts *et al.*, 2011).

Chaque mitochondrie est limitée par deux membranes hautement spécialisées de fonctions très différentes, formant ainsi deux compartiments : la matrice interne, et l'espace intermembranaire, beaucoup plus étroit (**Figure 44**). D'après la théorie de l'endosymbiose développée dans les années 1960 par Lynn Margulis, la mitochondrie serait le résultat d'une endocytose d'une bactérie par une autre cellule, générant ainsi les premières cellules eucaryotes. Au cours du temps, les gènes mitochondriaux (peut-être un millier au départ) ont été perdus et sont maintenant codés par le génome nucléaire. Après la traduction, les protéines sont importées du cytoplasme vers la mitochondrie par des translocases spécialisées de la membrane mitochondriale externe (TOM : *translocase of the outer membrane*) ou interne (TIM : *translocase of the inner membrane*). Au sein des cellules eucaryotes, la mitochondrie est donc dépendante de la cellule (Alberts *et al.*, 2011 ; Halliwell et Gutteridge, 2007).

La membrane externe contient de nombreuses copies d'une protéine de transport, la porine, qui forme de gros canaux. Cette membrane ressemble ainsi à un tamis perméable à toutes les molécules de 5 000 daltons ou moins, y compris les petites protéines. Si ces molécules peuvent entrer dans l'espace intermembranaire, la plupart d'entre elles ne peuvent pas traverser la membrane interne perméable. Ainsi, alors que l'espace intermembranaire est chimiquement équivalent au cytosol du point de vue des petites molécules qu'il contient, la matrice contient un ensemble fortement sélectionné de ces molécules.

Cet organite est le siège de la production d'énergie par la cellule sous forme d'ATP. Au cours de cette production, les produits de l'alimentation sont oxydés et perdent des électrons qui sont capturés par les transporteurs d'électrons, comme le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide), la FMN (flavine mononucléotide) ou le FAD (flavine adénine dinucléotide). Ces transporteurs sont réoxydés par le dioxygène dans la mitochondrie, produisant de grandes quantités d'ATP (**Figure 44**). La chaîne d'électron mitochondriale est capable de fonctionner à des taux de dioxygène inférieurs à 1 mmHg, ce qui est important pour les cellules localisées à distance des vaisseaux sanguins dans l'organisme, perfusées à 5-15 mmHg. Il est supposé qu'au moment de la genèse des cellules eucaryotes, la cellule originelle a endocyté une bactérie capable de phosphorylation oxydative et ayant déjà des mécanismes de défense antioxydants (Halliwell et Gutteridge, 2007).

Figure 44 : structure de la mitochondrie et rôle dans le métabolisme énergétique de la cellule eucaryote



D'après Karp, 2009 et Lodish, 2008. En haut, structure générale de la mitochondrie et intégration de sa fonction dans le métabolisme énergétique de la cellule. En bas, résumé de l'oxydation aérobie du pyruvate et des acides gras dans les mitochondries. La membrane externe est perméable à tous les métabolites, mais des protéines spécifiques de transport (ovales colorés) dans la membrane interne sont nécessaires pour importer du pyruvate (en jaune), de l'ADP (en vert) et du Pi (en bleu clair) dans la matrice et pour exporter de l'ATP (en vert). Le NADH produit dans le cytosol n'est pas transporté directement jusqu'à la matrice car la membrane interne est imperméable à NAD^+ et à NADH. À la place, un système de navette (en rouge) transporte des électrons du NADH cytosolique vers le NAD^+ présent dans la matrice. Le dioxygène diffuse dans la matrice et le dioxyde de carbone hors de celle-ci. Étape 1 : les groupements acides gras sont transférés depuis des acyl-CoA et transportés à travers la membrane interne par un transporteur spécial (ovale bleu) puis rattachés au CoA sur la face matricielle. Le pyruvate est converti en acétyl-CoA avec formation de NADH. Des acides gras (liés à du CoA) sont également convertis en acétyl-CoA avec la formation de NADH et de FADH_2 . L'oxydation de l'acétyl-CoA au cours du cycle de Krebs produit NADH et FADH_2 . Étape 2 : les électrons provenant de ces coenzymes réduites sont transférés vers le dioxygène par des complexes de transport d'électrons (rectangles bleus) en même temps que des ions H^+ sont transportés de la matrice vers l'espace intermembranaire, créant la force proton-motrice. Les électrons provenant de NADH passent directement du complexe I au complexe III, évitant le complexe II. Étape 3 : l'ATP synthétase, le complexe F_0F_1 (orange), utilise la force proton-motrice pour synthétiser de l'ATP. Les flèches bleues indiquent le flux d'électrons, les flèches rouges le déplacement transmembranaire des protons et les flèches vertes le transport des métabolites.

La mitochondrie est le principal contributeur de la production de ROS. Il peut y avoir une production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (**Figure 45**). Une augmentation de la force proton-motrice – c'est-à-dire la combinaison des gradients chimique (pH) et électrique à travers la membrane interne de la mitochondrie – est associée à une augmentation de la production de ROS, tandis qu'une diminution de la force proton-motrice est associée à une diminution de la production des ROS (Mailloux et Harper, 2012). Il a été montré que les niveaux de ROS augmentent aussi bien dans des conditions hypoxiques que hyperoxiques.

On estime qu'environ 1 à 3 % du dioxygène réduit par la mitochondrie va former de l'ion superoxyde (Ames *et al.*, 1993). Ce taux est sans doute moins élevé car la plupart des expériences ont été menées en exposant les mitochondries à l'air ambiant, ce qui est plutôt hyperoxique par rapport aux conditions tissulaires « standard », car au sein de la cellule, il y a un gradient décroissant de dioxygène de la membrane à la mitochondrie

2.2.2. NADPH oxydases

La famille des NADPH oxydases (ou NOX) est une famille d'enzymes qui utilisent l'électron de la molécule de NADPH (forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) pour produire des ROS (Holmström et Finkel, 2014). Ces enzymes tiennent une place importante dans la réponse immunitaire de l'hôte (**Figure 46**). En effet, certaines cellules immunitaires, notamment les neutrophiles, détruisent les microorganismes pathogènes en les internalisant dans des vésicules, appelées phagosomes, et en relarguant dans ces vésicules une quantité accrue de ROS produites par les NOX (Hampton *et al.*, 1998). Cette brusque augmentation de la production de ROS et de consommation d'oxygène pour les produire suite à l'activation d'une cellule immunitaire est appelée *burst* respiratoire ou *burst* oxydatif.

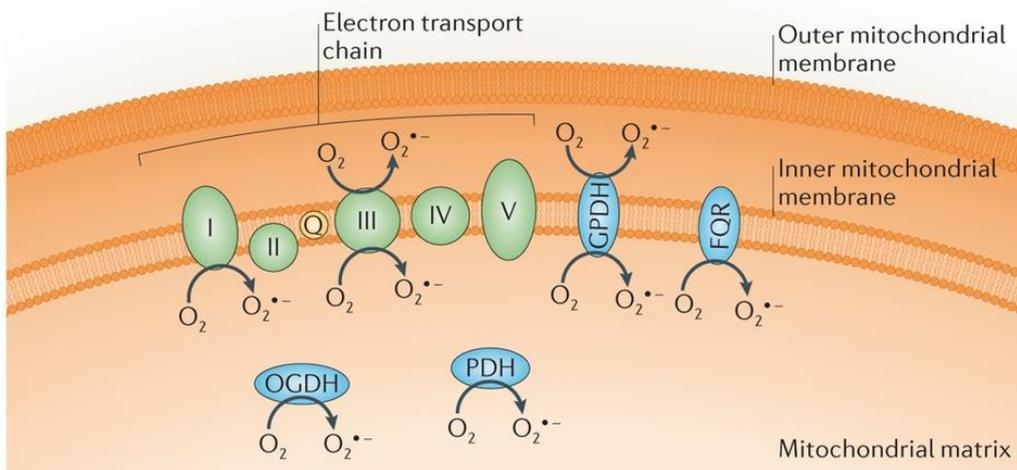
2.2.3. Autres enzymes

Plusieurs enzymes cytoplasmiques comme la xanthine oxydase, l'oxyde nitrique synthase (NOS, *nitric oxide synthase*), ou les cyclooxygénases cytosoliques produisent des ROS (**Figure 47**). La NOS notamment est exprimée dans la plupart des cellules de mammifères et rejette de l'ion superoxyde quand les niveaux de tétrahydrobioptérine et d'arginine sont bas (Vásquez-Vivar *et al.*, 2003 ; Xia *et al.*, 1998). La production d'ion superoxyde à partir de l'oxydation de la tétrahydrobioptérine peut parfois contribuer à une dysfonction vasculaire (Halliwell et Gutteridge, 2007).

Par ailleurs, en plus de la mitochondrie, d'autres organites comme les peroxysomes et le réticulum endoplasmique produisent des ROS. Dans le réticulum endoplasmique, des enzymes désaturases et des enzymes de la superfamille des CYP (cytochrome P450) produisent des ROS (Halliwell et Gutteridge, 2007). Dans les peroxysomes, les lipoxygénases oxydent les acides gras à longue chaîne et peuvent produire des ROS (Holmström et Finkel, 2014).

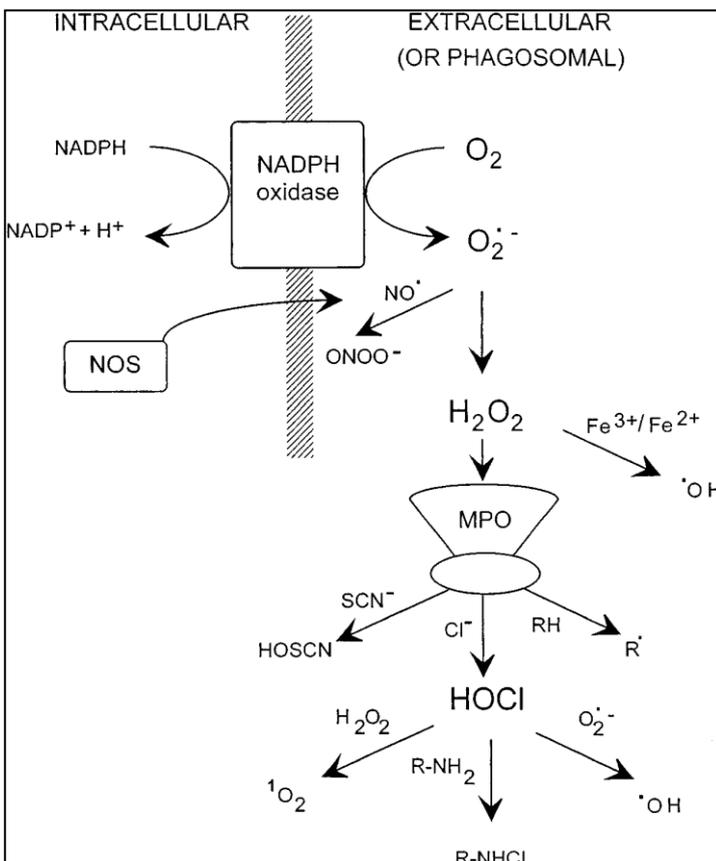
Les sources intracellulaires de ROS sont résumées dans la **Figure 47**.

Figure 45 : sites de production de ROS par la mitochondrie



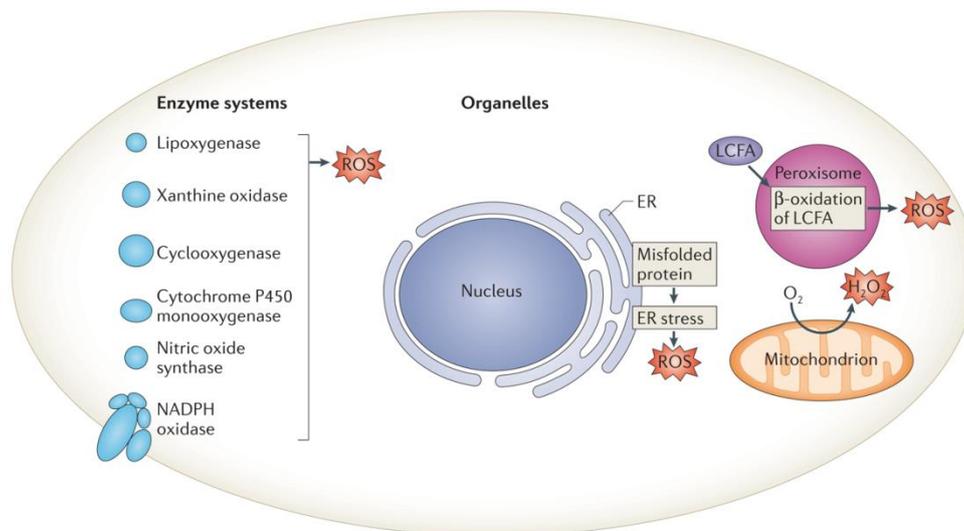
D'après Holmström et Finkel, 2014. Plusieurs sites de production d'ions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ont été identifiés au sein de la mitochondrie. De façon quantitative, les complexes I et III de la chaîne de transport d'électrons sont les sites majeurs de production d'oxydants, avec la génération d'ions superoxydes ayant lieu à la fois du côté de la matrice mitochondriale, et à la fois dans l'espace intermembranaire. Les acteurs de cette production contiennent également des enzymes métaboliques de la matrice mitochondriale, comme OGDH (2-oxoglutarate déshydrogénase), la PDH (pyruvate déshydrogénase), la forme mitochondriale membranaire de la GPD ou GPD2 (glycerol 3-phosphate déshydrogénase 2), et la FQR ou ETFDH (*electron-transferring-flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase*). Q : coenzyme Q10.

Figure 46 : modèle de la production de ROS dans les phagosomes des neutrophiles activés



D'après Hampton *et al.*, 1998. NOS : Nitric oxide synthase ; MPO : myélopéroxydase.

Figure 47 : vue d'ensemble des sources de productions intracellulaires de ROS



D'après Holmström et Finkel, 2014. Plusieurs organites de la cellule peuvent produire des ROS. La mitochondrie, le réticulum endoplasmique (ER) en particulier dans l'installation d'un stress du réticulum endoplasmique, les peroxysomes, à travers la bêta-oxydation des acides gras à longues chaînes (LCFA pour *long-chain fatty acids*). De plus, de nombreuses oxydases et des oxygénases produisent des ROS. La contribution de ces différentes sources dans la quantité totale de ROS varie d'un type cellulaire à l'autre.

2.3. Sources de production des RNS *in vivo*

Le $\text{NO}\cdot$ est à la fois le RNS le plus produit par les cellules et à la fois la principale source de formation des autres RNS (Martínez et Andriantsitohaina, 2009). Le $\text{NO}\cdot$ est produit par les oxyde nitrique synthases (NOS, *nitric oxide synthase*) à partir de la L-arginine et du dioxygène (**Figure 48**). Il diffuse rapidement à travers les membranes cellulaires, constituant un second messenger qui amène, par exemple, à la relaxation des cellules musculaires lisses des vaisseaux ou à une transmission synaptique. Les trois isoformes de NOS sont la NOS1 ou nNOS (pour neuronale), la NOS2 ou iNOS (pour inducible) et la NOS3 ou eNOS (pour endothéliale), qui catalysent la même réaction mais qui diffèrent par leur expression tissulaire, leur régulation et leurs rôles physiopathologiques (Liu et Huang, 2008).

Le $\text{NO}\cdot$ peut également être formé en conditions hypoxiques lors de la réduction du NO_2^- par la xanthine oxydase (Millar *et al.*, 1998). Le NO_2^- est lui un produit d'oxydation de l'activité de la NOS (Martínez et Andriantsitohaina, 2009). Certains auteurs pensent que l'albumine pourrait représenter un grand réservoir de NO et de ses oxydes (NO_x) contrôlant la dynamique des processus NO-dépendants dans le système vasculaire (Rafikova *et al.*, 2002).

Quelques exemples de réactions aboutissant à la formation de RNS sont présentés en **Figure 48**. On remarque que, contrairement à la production de ROS, les RNS sont générés par de nombreuses réactions non-enzymatiques.

En particulier, le monoxyde d'azote $\text{NO}\cdot$ et l'ion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ réagissent par le biais d'un mécanisme enzyme-indépendant pour former du peroxydinitrite ONOO^- (**Figure 49**), qui est un puissant oxydant réagissant avec la plupart des molécules biologiques, causant des dommages cellulaires (Martínez et Andriantsitohaina, 2009). Bien que le $\text{NO}\cdot$ et l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ à de basses concentrations ne sont pas toxiques dans un contexte physiologique, un déséquilibre dans la production de ces deux radicaux peut être partiellement responsable d'altérations des mécanismes moléculaires régulant la vie cellulaire. Ce déséquilibre est principalement dû à une diminution de l'élimination ou une augmentation de la production d'ion superoxyde, ou une réduction dans le relargage ou un plus grand recyclage de $\text{NO}\cdot$ (Martínez et Andriantsitohaina, 2009).

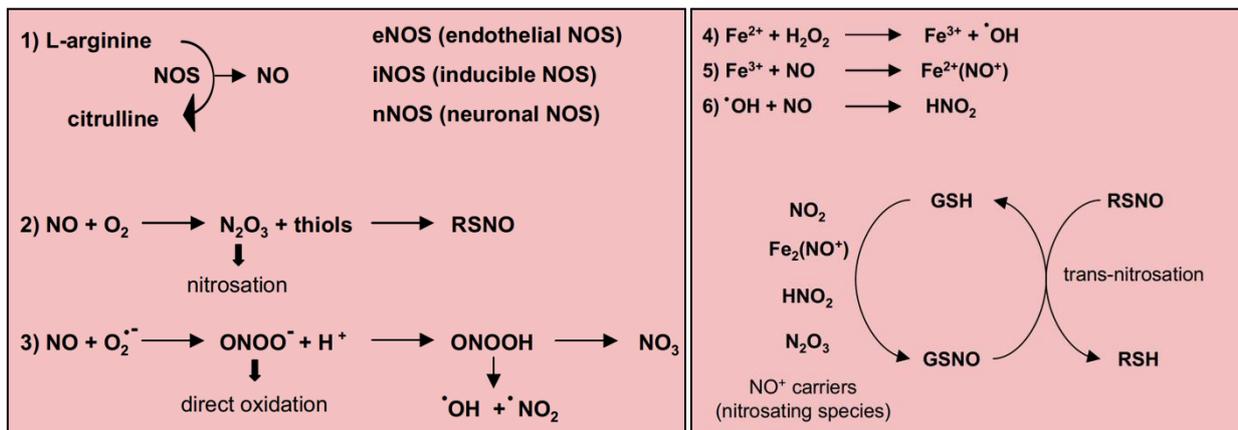
2.4. Sources extracellulaires de RONS

Le **Tableau 7** ci-après compare les sources intracellulaires et extracellulaires des RONS dans les systèmes biologiques (Vishal-Tandon *et al.*, 2005).

2.5. Cibles moléculaires des ROS

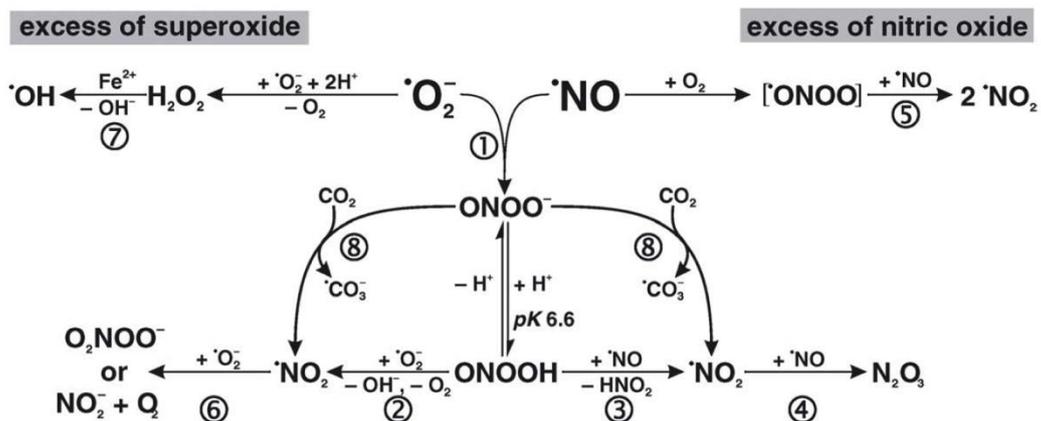
Les ROS sont des molécules oxydantes qui peuvent créer des dommages à tous les types de composants cellulaires : ADN, protéines, lipides. Quelques exemples sont donnés dans le **Tableau 8**.

Figure 48 : réactions intracellulaires menant à la génération du NO• et des RNS



D'après Novo et Parola, 2008. GSH : glutathion ; GSNO : S-nitrosoglutathion ; RSNO : nitroso-thiol ; RSH : thiol.

Figure 49 : réactions entre l'ion superoxyde et le monoxyde d'azote



D'après Frein *et al.*, 2005. (1) Le principal produit de la réaction entre des taux équivalents de monoxyde d'azote NO• et d'ion superoxyde l'O₂•⁻ est l'ion peroxynitrite ONOO⁻. (2, 3) Un faible excès d'une des espèces peut faire basculer le profil de réactions vers la production de radicaux de dioxydes d'azote (NO₂•). (4) Un plus grand excès de NO• entraîne la production de N₂O₃ et la nitrosation (addition de NO•). (5) L'oxydation du NO• par le dioxygène requière de grandes quantités des deux composés. (6) Si les concentrations de O₂•⁻ excèdent celles du NO•, il peut y avoir formation de peroxynitrate O₂NOO⁻ ou de nitrite NO₂⁻. (7) Un excès de dioxygène par rapport au NO• entraîne la réaction de Fenton et la formation du radical HO• très réactif, ce qui va initier un stress oxydatif. (8) De grandes concentrations de CO₂ (jusqu'à 1 mM dans les systèmes biologiques) déplace les voies de décomposition du peroxynitrite vers la formation de NO₂•.

Tableau 7 : comparaison des sources intracellulaires et extracellulaires des RONS

Sources intracellulaires de RONS : métabolisme cellulaire	Sources extracellulaires de RONS : environnement
Chaîne mitochondriale de transport d'électrons	Médicaments : halothane, paracétamol, bléomycine, doxorubicine, métronidazole, éthanol
Oxydations dans le réticulum endoplasmique	CCl ₄
Activité enzymatique : NADPH oxydase, xanthine oxydase, monoamine oxydase, tyrosine hydroxylase, L-amino oxydase, diamine oxydase, glycolate oxydase, alpha-hydroxyacide oxydase, L-gluconolactone oxydase, oxyde nitrique synthases (NOS), cytochrome P450	Pesticides
Synthèse des prostaglandines	Métaux de transition (Cu, Fe)
Autooxydation de l'adrénaline, de l'acide ascorbique (ou vitamine C)	Fumée de cigarette
La riboflavine réduite, FMNH ₂ , FADH ₂	Alcool
	Radiations : rayons X par la radiolyse de l'eau, lumière par photoionisation
	Haute température

D'après Vishal-Tandon *et al.*, 2005.

Tableau 8 : exemples de dommages liés aux ROS *in vivo*

Cible du dommage	Natures des dommages
ADN	De bas niveaux d'altérations oxydatives des bases azotées sont présents dans l'ADN isolé de toutes les cellules aérobies. Ces niveaux augmentent souvent chez les patients subissant un stress oxydatif, comme les fumeurs par exemple. Quelques produits d'altération sont excrétés dans l'urine, cette excrétion venant probablement d'un processus de réparation de l'ADN. Des niveaux élevés de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) sont fréquemment trouvés chez les fumeurs et chez les animaux traités avec des carcinogènes.
Protéines	L'attaque des ROS sur les protéines produit des composés carbonylés et d'autres modifications d'acides aminés comme la méthionine sulfoxyde, les hydroxydes de valine, la 2-oxohistidine, les peroxydes de protéines, l'hydroxylation de la tyrosine en L-DOPA (forme stéréo-isomérique lévogyre de la 3,4-dihydroxyphénylalanine), la conversion du tryptophane en N'-formylkynurénine. De bas niveaux de composés carbonylés et de certains produits comme l'ortho-tyrosine ont été détectés dans les tissus et les fluides corporels d'animaux sains. Les protéines oxydées sont dégradées par le protéasome et les systèmes d'autophagie. La faiblesse d'un de ces systèmes peut causer l'accumulation d'agrégats de protéines oxydées, ce qui est le cas dans certaines maladies neurodégénératives courantes.
Lipides	Les lipides exposés à HO• peuvent subir la peroxydation des lipides. On retrouve quelques produits finaux spécifiques de cette peroxydation, comme les isoprostanes, dans les fluides du corps, y compris l'urine. Ces niveaux augmentent dans le plasma en cas de stress oxydatif, par exemple chez les fumeurs, chez les animaux ayant reçu un traitement au CCl ₄ ou chez les bébés prématurés.

D'après Halliwell et Gutteridge, 2007.

2.6. Cibles moléculaires des RNS

2.6.1. Modifications post-traductionnelles des protéines

Les modifications des RNS sur les protéines altèrent leur structure, leur fonction et leurs interactions avec leurs cibles de signalisation en aval, celles-ci pouvant être activées ou inhibées. Trois grandes modifications post-traductionnelles peuvent être induites par les RNS : la S-nitrosylation, la glutathionylation et la nitration des tyrosines (**Figure 50**). En particulier, l'ion peroxy-nitrite est un puissant oxydant qui a pour action principale de nitrater les résidus tyrosine au cours de réactions non-enzymatiques (Martínez et Andriantsitohaina, 2009). De manière intéressante, des nitrotyrosines sont détectables dans des plasmas et des urines de patients sains. Les concentrations sont toutefois plus fortes dans les tissus et les fluides corporels de patients atteints de maladies chroniques inflammatoires (Halliwell et Gutteridge, 2007).

2.6.2. Lipides

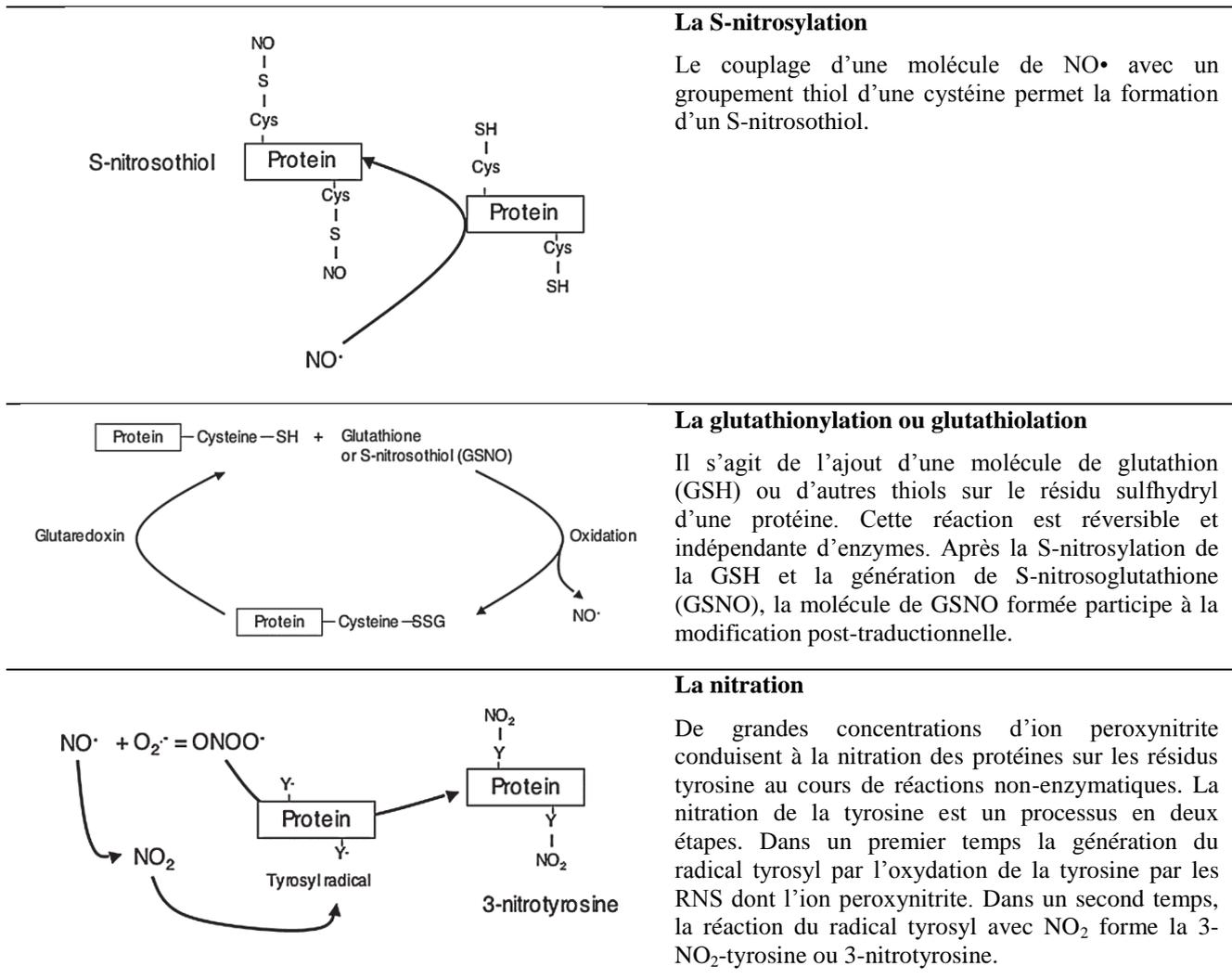
Il est intéressant de noter que, dans certaines conditions, les lipides réagissant avec les RNS deviennent des donneurs de NO• et, par voie de conséquence, n'ont pas d'effets délétères. Par exemple le LNO₂, un produit de la nitration NO-dépendante de l'acide linoléique, est l'oxyde d'azote le plus abondant et actif biologiquement dans le compartiment vasculaire humain (**Figure 51**). Le LNO₂ fonctionne comme un médiateur via une voie récepteur-dépendant et une voie récepteur-indépendant. Ainsi le LNO₂ est un ligand endogène spécifique et de haute affinité pour le récepteur PPAR γ (Martínez et Andriantsitohaina, 2009). Le LNO₂ pourrait avoir un rôle important dans la croissance des cellules musculaires lisses des vaisseaux et participer au développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique pour les maladies cardiovasculaires (Villacorta *et al.*, 2007).

2.6.3. ADN/ARN

Les dommages induits par les RNS à l'ADN peuvent contribuer à augmenter le taux de mutations, l'instabilité du génome, l'apoptose, la régénération tissulaire et la prolifération cellulaire, ce qui peut engendrer la carcinogénèse (**Figure 52**). L'ion peroxy-nitrite et les oxydes d'azote (NO_x) sont les principaux RNS impliqués dans les dommages de l'ADN et de l'ARN en induisant des modifications de bases et des coupures de brins (Sawa et Ohshima, 2006). En particulier, la réaction avec la guanine peut entraîner des transversions G \rightarrow T *in vitro* (Yermilov *et al.*, 1995).

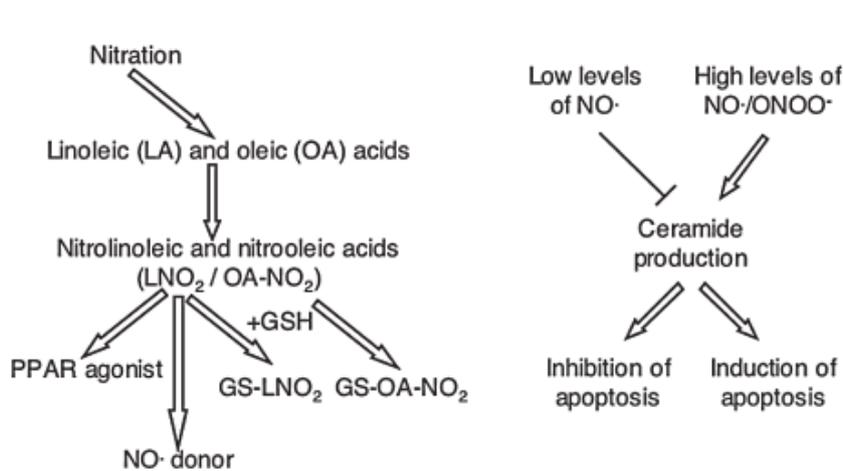
Par ailleurs, les RONS peuvent causer des dommages sur l'ADN mitochondrial. La mitochondrie contient jusqu'à 11 copies d'une molécule d'ADN circulaire double brin codant 13 protéines mitochondriales, 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiaux. Contrairement à l'ADN nucléaire l'ADN mitochondrial n'est pas enroulé autour de cœur d'histones et serait donc plus susceptible aux dommages créés par les RONS. Ainsi, les mutations dans l'ADN mitochondrial s'accumulent dans les tissus âgés (Anson et Bohr, 2000). Ces mutations sont associés à la vieillesse et fréquemment, mais peut-être faussement, attribuées aux dommages oxydatifs.

Figure 50 : modifications post-traductionnelles induites par les RNS



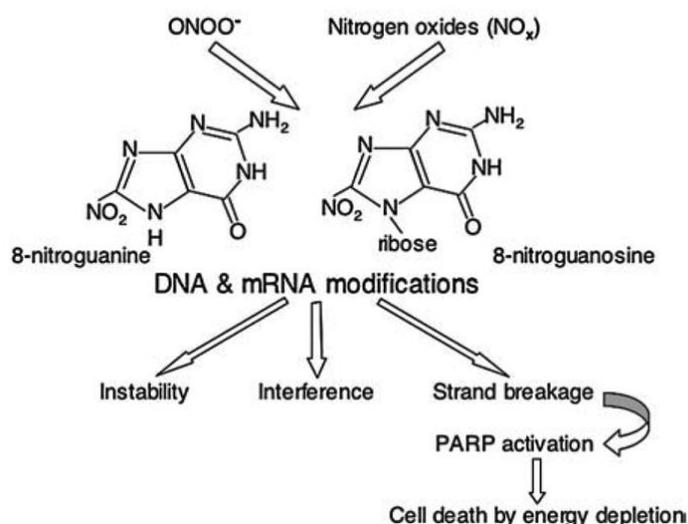
D'après Martínez et Andriantsitohaina, 2009.

Figure 51 : interaction des RNS avec les lipides



D'après Martínez et Andriantsitohaina, 2009. À travers la nitration des acides linoléique (LA) et oléique (OA), les lipides deviennent des donneurs de NO^\bullet . Les acides nitrolinoléique (LNO₂) et nitrooléique (OA-NO₂) protègent les cellules de l'inflammation à travers l'activation du PPAR γ . De plus, LNO₂ et OA-NO₂ peuvent réagir avec le glutathion et former GS-OA-NO₂ et GS-LNO₂. Les effets des RNS sur le métabolisme des céramides peuvent moduler l'apoptose cellulaire.

Figure 52 : effets délétères des RNS sur l'ADN et l'ARNm



D'après Martínez et Andriantsitohaina, 2009. L'action directe des RNS sur l'ADN et l'ARNm via la formation de 8-nitroguanine et 8-nitroguanosine, induit des changements du comportement cellulaire qui peut entraîner la carcinogénèse, et l'activation de la poly-ADP-ribose polymérase (PARP), induisant la mort cellulaire par déplétion d'énergie.

Tableau 9 : exemples de molécules antioxydantes

Composés chimiques de bas poids moléculaire dérivés de l'alimentation	Enzymes, protéines ou peptides endogènes
La vitamine C (acide ascorbique)	La superoxyde dismutase
Les différentes formes de la vitamine E : tocophérols alpha, bêta, gamma et delta, et tocotriénols alpha, bêta, gamma et delta	Les catalases
La vitamine A	Les peroxydases comme la myéloperoxydase phagocytaire ou la peroxydase de la thyroïde
Les différents thiols comme la N-acétylcystéine	La glutathion peroxydase (GPx)
L'ubiquinol-10 (forme réduite de la coenzyme Q-10)	Les peroxyrédoxines
Les flavonoïdes	La sulfirédoxine (réduit les acides sulfoniques en antioxydant thiolsulfoxyde)
Les salicylates (dérivés de l'aspirine) ou les anti-inflammatoires non-stéroïdiens	La transferrine et la lactoferrine
Les lazaroides et autres aminostéroïdes	La céruléoplasmine (ou céruloplasmine)
Le mannitol, le diméthylsulfoxyde, la diméthylthiourée	L'albumine
Différents médicaments comme le captopril, les bêtabloquants, amiodarone, carvedilol, épinéphrine, norépinéphrine, dopamine, etc.	La mélatonine
L'allopurinol et l'oxypurinol (ou alloxanthine), inhibiteurs de la xanthine oxydase	Les estrogènes
L'huile de poisson avec des acides gras riches en oméga 3	La bilirubine
Les polyphénols des fruits et légumes, du thé, etc.	Le glutathion
	Les urates, formes ioniques de l'acide urique

D'après Klandorf et Van, 2012.

2.7. L'homéostasie des RONS grâce aux antioxydants

Le terme « antioxydant » est un terme largement répandu mais de manière surprenante difficile à définir. Les scientifiques travaillant dans l'agroalimentaire définissent un bon antioxydant comme un composé capable d'inhiber la peroxydation des lipides, procédé qui cause le rancissement des aliments. En fonction du but recherché, la définition n'est ainsi pas la même pour un scientifique du plastique ou de l'industrie pétrochimique (Halliwell, 2015). Pour englober toute cette complexité, une définition générale peut être utilisée : « toute substance qui retarde, prévient ou élimine le dommage oxydatif d'une molécule cible » (Halliwell, 2015).

Chez les êtres vivants, de nombreux systèmes antioxydants existent et font partie de leur histoire évolutive pour leur permettre d'utiliser le dioxygène comme source d'énergie (voir chapitres précédents). En effet, nous venons de voir que les RONS sont produits entre autres au cours de réactions non enzymatiques. Sans système de détoxification, la production s'emballerait et provoquerait des dommages irréversibles aux cellules. Le réseau des défenses antioxydantes est complexe et comprend plusieurs stratégies (Halliwell, 2015 ; Riley, 1994 ; Sies, 1997) :

- (1) une compartimentation des molécules sensibles (comme l'ADN dans le noyau) ;
- (2) un système d'enzymes antioxydantes dont les produits éliminent les ROS et les RNS ;
- (3) la séquestration des métaux de transition par des molécules de transport ou de stockage comme la ferritine pour le fer ;
- (4) des composés chimiques de bas poids moléculaire permettant de recycler et/ou dégrader les ROS et les RNS ;
- (5) l'inhibition de processus vulnérables comme la réplication de l'ADN ;
- (6) le contrôle et la réparation, comme le système d'excision-réparation de lésion de l'ADN ;
- (7) l'induction de l'apoptose.

On observe que les organismes aérobies ont notamment développé des stratégies « physiques ». Par exemple, pour se protéger des ions fer ou cuivre qui sont des éléments très oxydants, les organismes ont soigneusement restreint la disponibilité de ces ions « catalytiques » en les enfermant dans le cœur des protéines à chaque fois que possible, ceci dans le but de minimiser les dommages oxydatifs par la réaction chimique ci-dessous (Halliwell et Gutteridge, 2007).

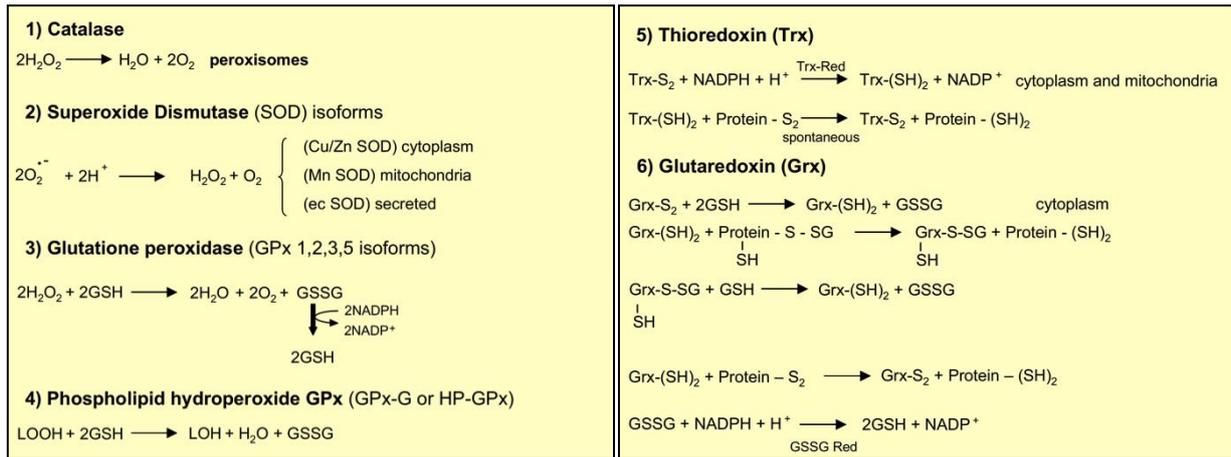


On observe également des stratégies « moléculaires » : les molécules antioxydantes. Celles-ci peuvent être enzymatiques ou non, synthétisées *in vivo* – molécules endogènes – ou dérivées de l'alimentation. Les principaux antioxydants du corps humain et de différentes espèces animales sont présentés dans le **Tableau 9**, la **Figure 53**, la **Figure 54** et la **Figure 55**.

La vitamine E est le recycleur des RONS le plus important dans les membranes. Il peut inhiber la peroxydation des lipides en éliminant les radicaux peroxy intermédiaires (Traber et Stevens, 2011).

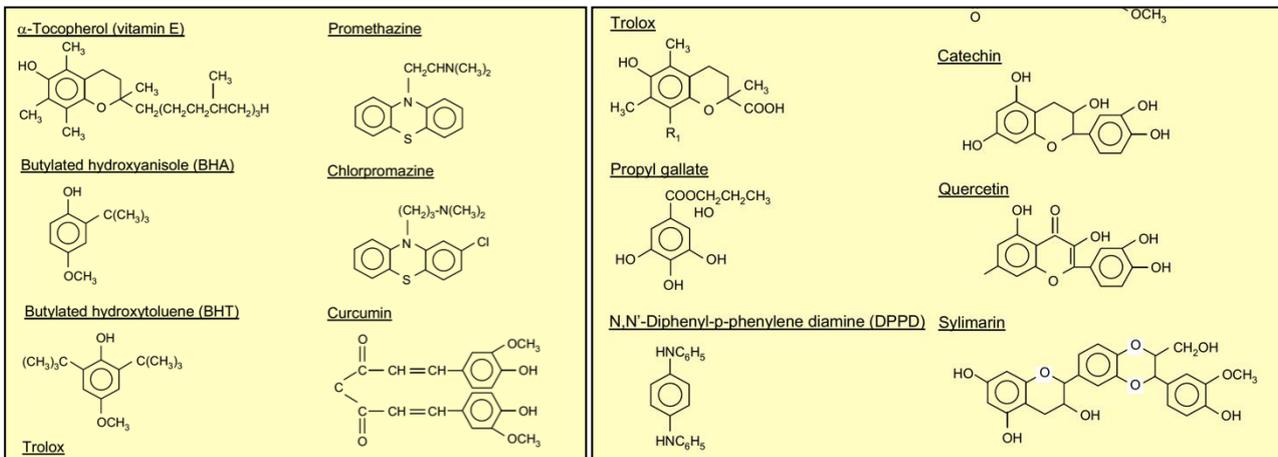
Le glutathion (**Figure 55**) et les glutathion peroxydases (**Figure 53**) sont les principaux antioxydants intracellulaires (Martínez et Andriantsitohaina, 2009) avec les SODs (superoxyde dismutases). Les SODs sont des métalloenzymes qui catalysent la conversion d'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, lequel va ensuite immédiatement devenir un substrat pour les catalases et d'autres, comme la glutathion peroxydase et les peroxyrédoxines. Jusqu'à présent, trois isoformes de SODs ont été décrites. Elles assurent la plupart des systèmes de recyclage du cytoplasme et du noyau (SOD1 ou CuZn-SOD), de la mitochondrie (SOD2 ou Mn-SOD) et de l'espace extracellulaire (SOD3 ou EC-SOD). La transcription des gènes correspondant est augmentée en réponse à un stress cellulaire (Johnson et Giulivi, 2005).

Figure 53 : vue d'ensemble des principales enzymes antioxydantes



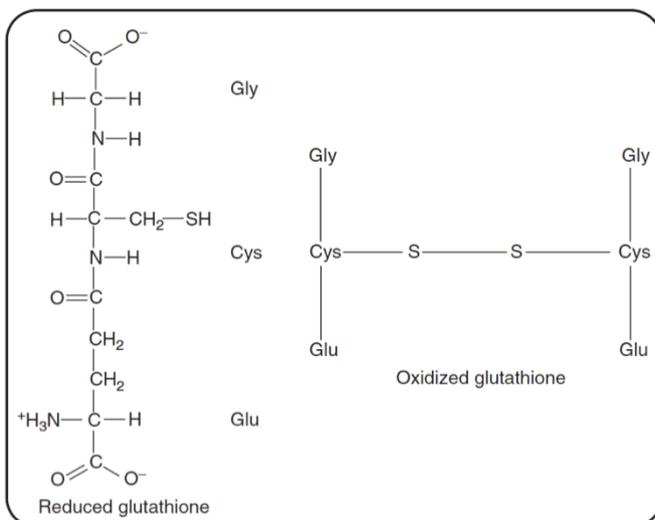
D'après Novo et Parola, 2008.

Figure 54 : structure chimique des antioxydants dérivés de l'alimentation les plus communs

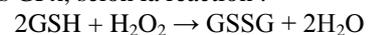


D'après Novo et Parola, 2008.

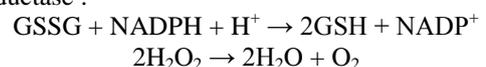
Figure 55 : structure du glutathion



D'après Halliwell, 2015. Structures de la forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG) du glutathion. Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Dans sa forme oxydée, deux molécules de glutathion sont réunies par un pont disulfure entre les deux groupes -SH des cystéines. Le glutathion peut détoxifier plusieurs RONS directement comme HO•, HOCl et ONOO⁻, mais aussi être un substrat pour les enzymes GPx, selon la réaction :



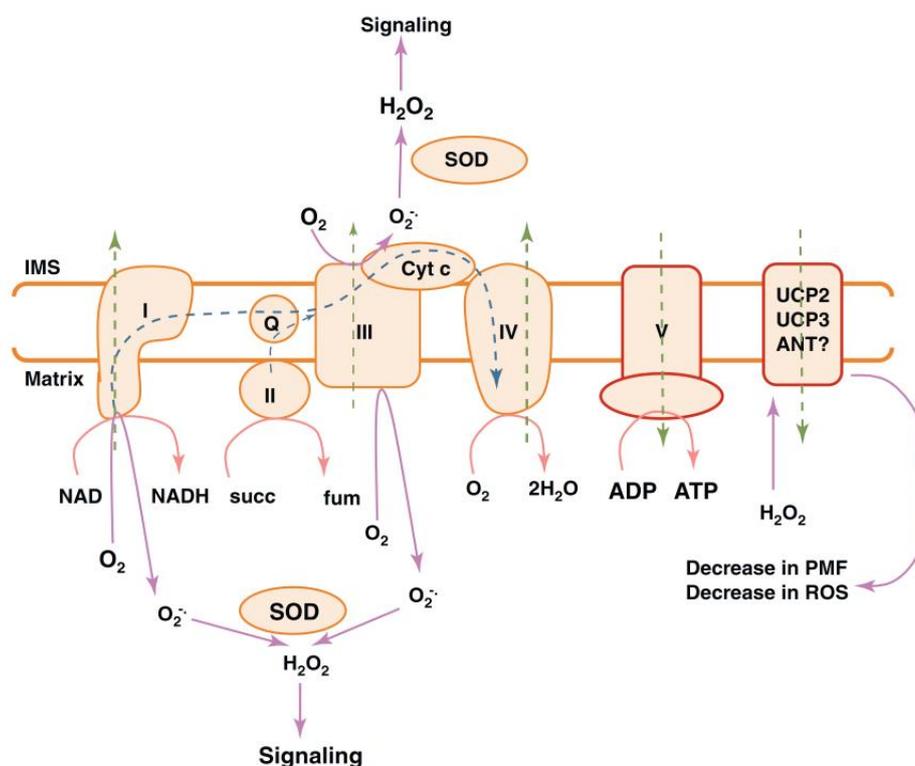
Le glutathion est ensuite régénéré par la glutathion réductase :



Parmi d'autres mécanismes originaux de défense antioxydante, il a été décrit que le NO• pourrait être stabilisé, transporté et relargué sous forme de S-nitroso-hémoglobine qui, en condition hypoxique, pourrait délivrer des S-nitrosothiols et induire la relaxation. Il a également été rapporté que la myoglobine, hémoprotéine liant l'oxygène intracellulaire importante dans le cœur et le muscle squelettique, peut être nitrée et pourrait jouer le rôle d'un recycleur de NO• et pourrait limiter les effets délétères des RNS (Nicolis *et al.*, 2006).

Les défenses antioxydantes existent sous la forme d'un système d'équilibre coordonné et intégré au sein des systèmes, comme par exemple au sein de la mitochondrie qui est une source importante de ROS (**Figure 56**). Ainsi, quand bien même la SOD est importante pour une fonction cellulaire normale, un excès de SOD peut être délétère. Par exemple dans le syndrome de Down, la trisomie du chromosome 21 entraîne des niveaux élevés de CuZnSOD, dont le gène est localisé sur ce chromosome surnuméraire (Halliwell et Gutteridge, 2007) et amène des désordres en ce sens.

Figure 56 : respiration aérobie et autorégulation de la production mitochondriale de ROS



D'après Mailloux et Harper, 2012. Suite à l'oxydation par la NADH (complexe I), le succinate (complexe II), et d'autres composés (acides gras ou l'oxydation du glyceraldehyde-3-phosphate qui donne des électrons directement au complexe Q), les électrons passent systématiquement à travers les complexes respiratoires (complexes III and IV) vers l'accepteur d'électrons terminal : le dioxygène O₂. La différence de potentiel redox entre les composants de la chaîne respiratoire permet l'extrusion de protons de la matrice aux complexes I, III et IV, ce qui établit une force proton-motrice (PMF, *proton motive force*). Cette dernière est ensuite utilisée pour entraîner la synthèse d'ATP à travers le complexe V (ATP synthétase). Lorsque la force proton-motrice est élevée et que les composants de la chaîne respiratoire sont essentiellement dans des états réduits, les électrons libérés des complexes I et III peuvent réduire l'O₂ en O₂•⁻. À l'inverse du complexe I, le complexe III génère des ROS à la fois vers l'espace intermembranaire (IMS, *intermembrane space*) et à la fois vers la matrice. La production d'O₂ par la mitochondrie est autorégulée par l'activation de protéines découplantes UCP2 et UCP3 (*uncoupling protein 2 and 3*) qui diminuent la force proton-motrice et ainsi diminuent la production de ROS. Le rôle du transporteur ANT (*adenine nucleotide translocator*) dans le contrôle de la production de ROS par la mitochondrie reste controversé et passerait peut-être par une fuite de protons. La direction du flux d'électrons est indiquée par la ligne bleue en pointillé. L'extrusion ou l'import de protons sont indiqués par des flèches vertes en pointillé.

Physiologiquement il existe donc approximativement un équilibre entre la production des RONS et les défenses antioxydantes. Cependant, tous les RONS ne sont pas éliminés par ce réseau. En effet, les antioxydants piègent et minimisent, mais n'évitent pas complètement les dommages oxydatifs de biomolécules (Halliwell, 2015). En témoignent les niveaux bas, mais non nuls, des produits d'attaques de RONS sur les biomolécules trouvés dans les tissus sains (voir **Tableau 8**). Une des raisons pour lesquelles les défenses antioxydantes ne détoxifient pas l'organisme de tous les RONS est que certains d'entre eux sont utiles, notamment pour les défenses immunitaires et la signalisation cellulaire (voir paragraphes suivants). Le système doit donc être très organisé et coordonné pour permettre ces fonctions sans causer trop de dommages (Halliwell, 2015). Ainsi, un système de réparation des lésions oxydatives existe dans les cellules, ce qui est en l'occurrence important pour prévenir les mutations de l'ADN (Hegde *et al.*, 2011). En effet, les dommages causés à l'ADN par HO• par exemple semblent avoir lieu dans toutes les cellules aérobies et sont largement incriminés dans le développement des cancers liés à l'âge (Halliwell et Gutteridge, 2007). Cette réparation de l'ADN passe notamment par une excision initiée par des enzymes ADN glycosylases (**Figure 57**). Il existe également un système de réparation pour les lésions oxydatives des protéines et des lipides. En effet, sans détoxification, les protéines oxydées peuvent s'agréger, affecter la fonction cellulaire (Nowotny *et al.*, 2014) et oxyder les lipides. Les cellules aérobies sont donc dotées en quelque sorte d'un système de prévention, comprenant notamment les stratégies « physiques » et les antioxydants, et d'un système de réparation.

Au vu de ce réseau complexe, on comprend que l'antioxydant universel parfait n'existe pas. Plusieurs antioxydants différents sont nécessaires pour protéger différentes biomolécules *in vivo* (Halliwell, 2015). Leur importance relative dépend de l'espèce, du tissu et de la cible moléculaire entre autre.

Il est à noter que le caractère indispensable de ce système a été controversé par certaines données. En effet, les souris knock-out pour la CuZn-SOD ou la glutathion peroxydase sont viables, bien que dans le premier cas des défauts de fertilité sont observés (Matzuk *et al.*, 1998) et que dans le second cas elles sont plus sensibles à certaines toxines (de Haan *et al.*, 1998).

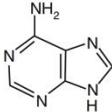
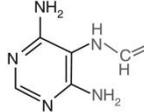
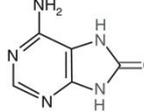
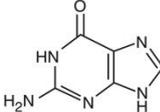
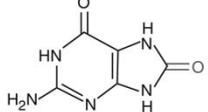
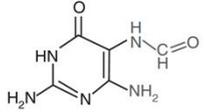
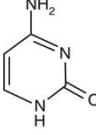
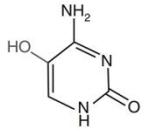
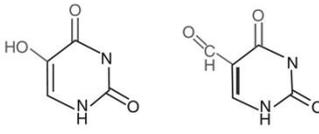
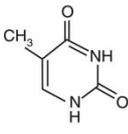
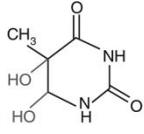
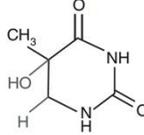
2.8. Processus biologiques faisant intervenir les RONS

Les RONS ont longtemps été considérés comme des molécules néfastes pour l'organisme. Aujourd'hui ils sont également reconnus comme d'importants médiateurs intervenants au cours de nombreux processus biologiques dans les cellules eucaryotes (Murphy *et al.*, 2011).

2.8.1. Rôle dans la signalisation cellulaire

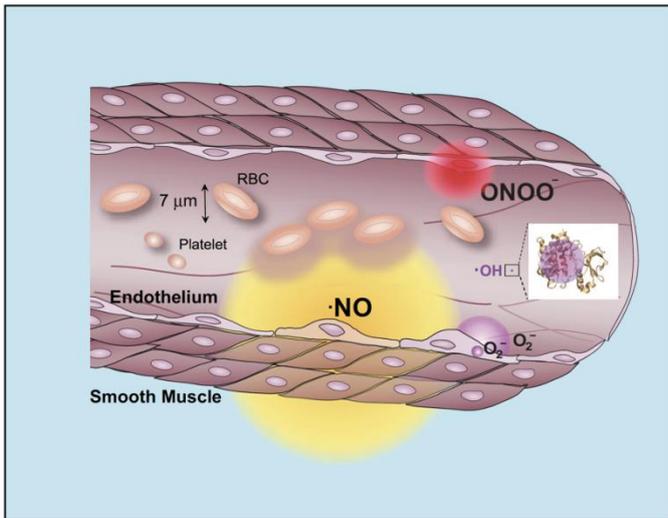
Plusieurs études ont maintenant montré que les RONS étaient impliqués dans d'importants processus de signalisation cellulaire. Il faut savoir cependant que la relativement forte réactivité de ces molécules limite l'étendue spatiale dans laquelle ils peuvent diffuser et donc avoir une action une fois formés (**Figure 58**). Les mécanismes exacts de cette signalisation constituent encore des sujets de recherche (Graves, 2012).

Figure 57 : principaux produits oxydatifs des bases d'ADN et ADN glycosylases (DG, DNA glycosylases) premièrement responsables de leur excision dans les cellules de mammifères

Normal DNA base	Oxidized DNA bases	DGs responsible for excision
1. Adenine 	i) Formamidoadenine (FapyA) 	NEIL1
	ii) 8-oxoadenine (8-oxoA) 	OGG1 (excises from 8-oxoA:C) Unknown DG for 8-oxoA:G pair
2. Guanine 	i) 8-oxoguanine 	OGG1 (and NEIL 1 in single-stranded DNA substrates)
	ii) Formamidoguanine (FapyG) 	OGG1, NEIL1
3. Cytosine 	i) 5-hydroxycytosine (5-OHC) 	NEIL1, NEIL2, NTH1
	ii) 5-hydroxyuracil (5-OHU)/ 5-formyluracil (5-formylU) 	NEIL1, NEIL2, NTH1 NTH1
4. Thymine 	i) Thymine glycol 	NTH1, NEIL1
	ii) 5-hydroxy-5,6-dihydrothymine 	NTH1 NEIL1?

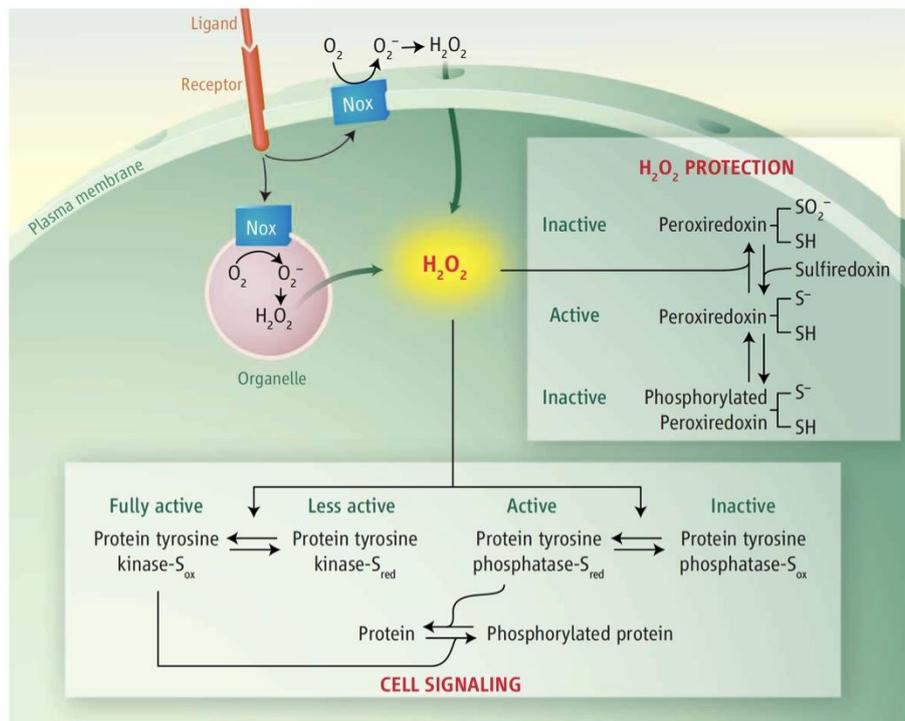
D'après Hegde *et al.*, 2011.

Figure 58 : distances de diffusion estimées du monoxyde d'azote, de l'ion peroxyneutre, du radical hydroxyle et de l'ion superoxyde dans un contexte vasculaire



D'après Pacher *et al.*, 2007. Les halos autour de chaque molécule représentent l'étendue de leur diffusion jusqu'à ce que leur concentration diminue de 50 % (distance calculée à partir de leur demi-vie estimée). Notez l'échelle du globule rouge autour de 7 µm. La distance de diffusion du radical hydroxyle est estimée n'être que de l'ordre de la taille d'une petite protéine et est 10 000 fois plus petite que celle du peroxyneutre. La faible demi-vie du NO•, d'environ une seconde *in vivo*, résulte principalement de sa diffusion dans les globules rouges. La faible diffusion du peroxyneutre provient de sa rapide réaction avec le dioxyde de carbone et avec les thiols intracellulaires. Toutes ces estimations proviennent de beaucoup d'approximations, mais la variation de ces demi-vies d'un facteur 10 n'altérerait la taille des diamètres d'un facteur 3,2 seulement (3,2 correspondant à la racine carrée de 10).

Figure 59 : production de H₂O₂ et rôles dans la protection et la signalisation intracellulaire



D'après Rhee, 2006. La liaison entre le récepteur et le ligand au niveau de la membrane cellulaire active l'enzyme NOX (NADPH oxydase), soit au niveau de la membrane plasmique soit dans une structure interne comme un endosome, et produit de l'H₂O₂. Pour fonctionner comme un messager intracellulaire, l' H₂O₂ doit être importé dans le cytosol. Une fois dans le cytosol, l' H₂O₂ inactive les tyrosine phosphatases tout en activant les tyrosine kinases, augmentant ainsi la phosphorylation des tyrosines. La protection transitoire du signal de l' H₂O₂ contre l'action de la peroxyrédoxine cytosolique abondante semble résulter de l'inactivation réversible de cette enzyme par hyperoxydation ou par phosphorylation.

Dans la signalisation cellulaire générale, l'information arrive à la cellule sous forme d'interactions ligand-récepteur. Une molécule (premier messager) va se fixer sur son récepteur extracellulaire et entraîner une série de réactions en cascade aboutissant à la réponse finale. Cette chaîne de réactions peut être des réactions d'échanges d'électrons, c'est-à-dire des réactions d'oxydoréduction, et impliquer des espèces réactives radicalaires ou non (Graves, 2012). L'effet de ces molécules peut passer par exemple par la modulation de phosphatases ou de kinases, c'est-à-dire la modulation de la phosphorylation, un des grands mécanismes de la signalisation cellulaire (Graves, 2012), comme c'est le cas du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (**Figure 59**). Il peut aussi inhiber les phosphatases et ainsi augmenter la phosphorylation protéique globale et promouvoir la signalisation intracellulaire (Forman *et al.*, 2010).

Le peroxyde d'hydrogène est considéré comme l'une des molécules de signalisation les plus importantes parmi les RONS (Rhee, 2006). Dans certains tissus par exemple, l'activation du facteur de transcription NF κ B par le TNF α (*tumour necrosis factor alpha*) nécessite de l' H_2O_2 .

2.8.2. Rôle dans l'inflammation

Les processus inflammatoire produisent des RONS (**Figure 60**), et les RONS en eux-mêmes peuvent induire des processus inflammatoires (**Figure 61**).

2.8.3. Rôle dans la défense immunitaire

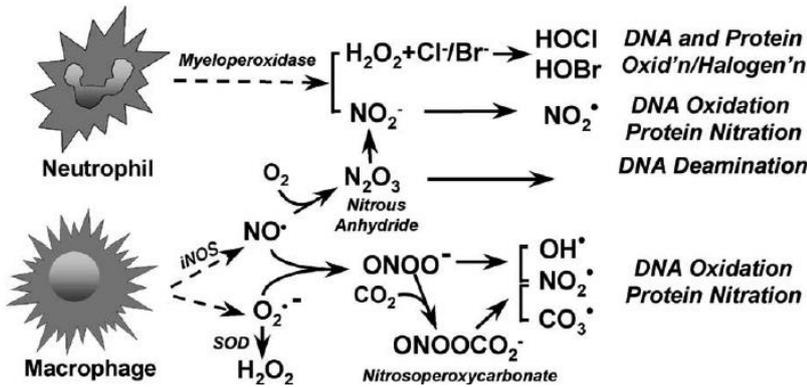
La réponse à une attaque microbienne est un rôle biologique commun des enzymes NADPH oxydases à travers l'évolution. De forts niveaux de ROS, comme générés par les phagocytes des mammifères par le système Nox2 (**Figure 46**), peuvent avoir une activité bactéricide directe. Cette activité antimicrobienne semble aussi avoir lieu dans la barrière épithéliale de *Caenorhabditis elegans*, de la drosophile, et d'autres vertébrés par l'action d'autres enzymes Nox (Lambeth et Neish, 2014).

2.8.4. Monoxyde d'azote et vasodilatation

Le shear-stress est un des plus importants stimuli pour la synthèse et le relargage du NO• (Busse et Fleming, 2006). L'action directe du NO• est limitée par sa demi-vie *in vivo* d'environ 1 seconde et par la relative courte distance que cette molécule peut traverser. La molécule NO• a été identifiée au départ comme étant l'EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*). Sous des conditions de stress physiologique, le NO• produit par les cellules endothéliales diffuse vers les cellules musculaires lisses adjacentes et se lie au fer de l'hème de la guanylyl cyclase (GC) pour activer la voie de la GMPc (guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique). Cette GMPc active des protéines kinases GMPc-dépendantes, ce qui provoque une phosphorylation protéique, une diminution du niveau de calcium cytosolique, la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Murad, 2006), pour aboutir à une relaxation et induire à plus grande échelle une vasodilatation (**Figure 62**). D'autres stimuli et molécules, comme l'insuline, sont capables d'induire la production de NO• par l'endothélium et la relaxation vasculaire (Hartell *et al.*, 2005).

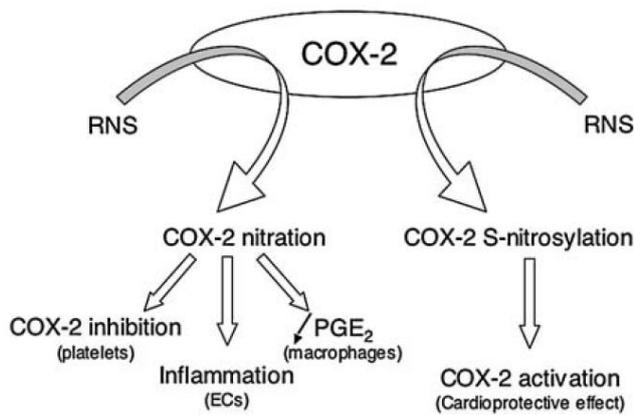
Le NO• semble également impliqué dans le contrôle de l'inflammation ainsi que dans l'attaque des microorganismes par les macrophages (Martínez et Andriantsitohaina, 2009).

Figure 60 : RONS produits durant l'inflammation



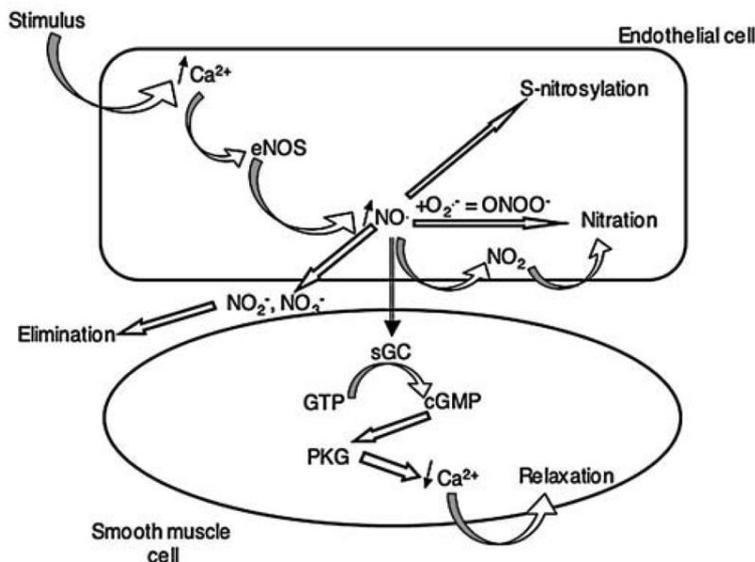
D'après Dedon et Tannenbaum, 2004. Effets des RONS générés par les phagocytes durant l'inflammation, mais sans montrer les effets sur l'ADN hôte ou d'autres réactions ultérieures.

Figure 61 : effets des RNS sur la cyclooxygénase COX-2



D'après Martínez et Andriantsitohaina, 2009. Les RNS affectent l'activité de l'enzyme COX-2 différemment selon le type cellulaire. La nitration de la COX-2 entraîne son inhibition dans les plaquettes, la diminution de la production de prostaglandine E2 (PGE_2) dans les macrophages, et l'augmentation des réponses inflammatoires dans les cellules endothéliales (EC, *endothelial cells*). À l'inverse, la S-nitrosylation de la COX-2 peut avoir un effet cardioprotecteur par augmentation de son activité.

Figure 62 : effets du NO^{\bullet} sur les cellules vasculaires



D'après Martínez et Andriantsitohaina, 2009. L'augmentation du NO^{\bullet} après l'activation de l'enzyme eNOS calcicum dépendante dans les cellules endothéliales est suivie par l'activation de la guanylyl cyclase soluble (sGC) dans les cellules musculaires lisses, qui va produire le second messenger GMPc. À travers l'activation de la protéine kinase G (PKG), la GMPc est capable de diminuer la concentration de Ca^{2+} intracellulaire et consécutivement la sensibilité de la cellule musculaire lisse pour le Ca^{2+} , ce qui produit la relaxation vasculaire. Dans les cellules endothéliales, le NO^{\bullet} peut réagir avec $O_2^{\bullet-}$ et générer du $ONOO^-$, ce qui provoque la nitration des protéines, mais il peut aussi induire directement la S-nitrosylation des protéines.

2.8.5. Rôles divers

Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ a plusieurs autres fonctions métaboliques utiles. Par exemple il est utilisé par l'enzyme thyroïde peroxydase pour produire les hormones thyroïdiennes (Forman *et al.*, 2010).

De nombreuses protéines sont les cibles cellulaires des RNS (Martínez et Andriantsitohaina, 2009) : des canaux ioniques, comme les canaux calcium voltage-dépendants, des protéines de structure comme l'actine, des métalloprotéinases matricielles comme MMP9, des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire, des facteurs nucléaires, des enzymes impliquées dans la production de prostaglandines, des protéines impliquées dans le cycle cellulaire ou la prolifération. Par exemple, l'angiotensine II induit la production d'ions peroxy-nitrites, entraînant la nitration des tyrosines et l'activation consécutive des protéines ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (Pinzar *et al.*, 2005). Enfin, p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) peut être nitraté dans les cellules endothéliales des patientes prééclamptiques et cela est associé à la réduction d'activité catalytique de la protéine p38 MAPK (Webster *et al.*, 2006).

Les RNS peuvent aussi toucher des protéines impliquées dans la mort cellulaire. Le NO• peut empêcher ou induire l'apoptose selon sa concentration, le type cellulaire ou l'état d'oxydation (Martínez et Andriantsitohaina, 2009).

Le rôle des RONS a aussi été décrit dans le contexte de la réparation tissulaire et l'induction des cellules souches (Graves, 2012).

3. PATHOLOGIE DES RONS

3.1. Concept du stress oxydatif et nitrosatif

Le concept de stress oxydatif a été utilisé pour la première fois par le professeur Helmut Sies qui l'a décrit comme « un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, amenant potentiellement des dommages » (Sies, 1997).

Comme vu dans le paragraphe sur les antioxydants, il y a normalement un équilibre entre la formation des radicaux libres et les mécanismes de défense antioxydants endogènes. L'expression « stress oxydatif » ou « stress oxydant » se réfère à la situation dans laquelle il existe un important déséquilibre entre la production de ROS et les défenses antioxydantes (Halliwell, 2015). Le stress oxydatif peut résulter de trois situations décrites ci-après (Halliwell, 2015 ; Vishal-Tandon *et al.*, 2005).

- Une diminution du niveau d'antioxydants. Il peut s'agir par exemple de mutations affectant des enzymes antioxydantes comme la CuZnSOD, des agents toxiques qui diminuent de telles défenses, ou des carences diététiques en antioxydants comme le syndrome de malnutrition protéino-énergétique kwashiorkor (Jahoor *et al.*, 2008).
- Une augmentation de la production des ROS. Cela peut être dû par exemple à une exposition à un niveau élevé de ROS comme le dioxyde d'azote gazeux (NO₂.) ou par un excès d'activation d'un système de production « naturel » de ROS comme dans le cas d'une activation excessive de cellules phagocytaires dans les maladies inflammatoires chroniques telle la polyarthrite rhumatoïde (Halliwell, 2015). Ce mécanisme est considéré comme le plus fréquent dans les maladies humaines et est fréquemment la cible visée de développement thérapeutique. Cependant, le statut des malades est souvent compromis, empirant le stress oxydatif.
- Une combinaison des deux phénomènes.

Les conséquences du stress oxydatif à l'échelle de l'organisme peuvent être de trois types (Halliwell, 2015).

- L'adaptation en augmentant les défenses antioxydantes. Par exemple, des rats adultes exposés graduellement à des taux élevés de dioxygène peuvent tolérer plus longtemps le dioxygène pur que des rats contrôles : cette observation serait due à une augmentation de la synthèse d'antioxydants et de GSH dans les poumons (Li *et al.*, 2008).
- La lésion tissulaire. Le stress oxydatif peut provoquer des blessures aussi bien sur les composants intracellulaires, comme les protéines, les glycoprotéines, les lipides ou les acides nucléiques, que sur les composants extracellulaires, comme le collagène ou l'acide hyaluronique (Vishal-Tandon *et al.*, 2005). Le stress oxydatif peut altérer la prolifération cellulaire, souvent enclenchée par les dommages à l'ADN et dans certains cas induire le vieillissement (Velarde *et al.*, 2012). De manière intéressante, le stress oxydatif à un bas niveau stimule la prolifération cellulaire dans certains types cellulaires (Halliwell et Gutteridge, 2007) et cet effet peut parfois contribuer à la maladie, notamment dans l'athérosclérose.
- La mort cellulaire. Elle peut survenir par le biais de nombreux mécanismes dont les deux principaux sont la nécrose et l'apoptose (Orrenius *et al.*, 2011). Au cours de la nécrose, la cellule éclate et relargue son contenu autour d'elle, affectant les cellules adjacentes. Les contenus peuvent inclure des antioxydants comme la GSH, ou des pro-oxydants comme des ions fer. Aussi, même si une cellule ne meurt pas à cause du stress oxydatif, sa nécrose peut provoquer un stress oxydatif dans son entourage. L'apoptose est au contraire une activation du « mécanisme de suicide intrinsèque » de la cellule. Les cellules apoptotiques ne rejettent pas, en général, leur contenu, il n'y a donc pas en général de stress oxydatif associé aux cellules alentours. Le mécanisme d'apoptose est accéléré dans certaines maladies, comme certaines maladies neurodégénératives où le stress oxydatif a été incriminé (Floyd *et al.*, 2011).

Par analogie avec les ROS et le stress oxydatif, lorsque la production de RNS dans un système excède sa capacité à le neutraliser et l'éliminer, on parle de stress nitrosatif (Ogino et Wang, 2007). De la même manière, si la production de RNS augmente et excède les défenses de l'hôte, cela peut induire des effets délétères touchant un grand nombre de voies impliquées dans la vie cellulaire (Martínez et Andriantsitohaina, 2009).

3.2. Maladies humaines liées aux ROS

Les ROS ont été incriminés dans la physiopathologie de presque toutes les maladies humaines telles que les colites ulcéraives, le choc hémorragique, la fibrose cystique, le SIDA, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie inflammatoire de l'intestin, le syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*), les emphysèmes, les cancers, l'athérosclérose, la démence sénile, la sclérose latérale amyotrophique (ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*), la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson, les blessures d'ischémie-reperfusion, le diabète, la vieillesse, entre autre (Halliwell, 2015 ; Klandorf et Van, 2012). En réalité, l'excès de radicaux libres n'a pas été établi comme la cause primaire de ces maladies.

Certaines maladies semblent effectivement causées par le stress oxydatif lui-même, comme la carence alimentaire chronique en sélénium, étant donné que le sélénium est un cofacteur essentiel des enzymes GPx et thioredoxine réductase (Rayman, 2012).

Cependant, l'augmentation de production de ROS est la plupart du temps une conséquence de la maladie, contribuant à l'aggravation des lésions tissulaires. Par exemple dans l'athérosclérose, le relargage de lipoprotéines oxydées par les macrophages participe au développement de la maladie alors que la lésion initiale est souvent une lésion de l'endothélium vasculaire causée par une infection virale (Libby *et al.*, 2011).

Bien que le stress oxydatif doive probablement intervenir dans toutes les maladies nommées plus haut, il n'est pas forcément important dans la physiopathologie. Il peut avoir lieu à un stade tardif de la maladie, accompagnant la mort cellulaire plutôt que l'induisant.

3.3. Maladies humaines liées aux RNS

Le cerveau et le système cardiovasculaire sont les plus grandes cibles des dommages du stress nitrosatif (Martínez et Andriantsitohaina, 2009).

Ainsi, le stress nitrosatif est lié aux maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Sultana *et al.*, 2006), la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique (ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*), ainsi qu'aux maladies à prions comme la maladie de Creutzfeldt-Jacob, l'ESB (encéphalopathie spongiforme bovine). La Mn-SOD peut être nitrée et inactivée au cours des maladies neurodégénératives, comme les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer, et pourrait entraîner le stress nitrosatif observé dans ces maladies (Aoyama *et al.*, 2000).

Le stress nitrosatif est également lié à des maladies cardiovasculaires comme l'arrêt cardiaque (Hare et Stamler, 2005), l'hypertension artérielle pulmonaire, l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle (Paravicini et Touyz, 2006). En particulier, les formations d'ion peroxy-nitrite et la nitration des protéines ont été trouvées élevées dans l'aorte de rats hypertendus (Ma *et al.*, 2001).

L'hypertension artérielle est principalement due à la présence excessive de vasoconstricteurs relativement aux vasodilatateurs (Vasdev *et al.*, 2007). Le principal vasoconstricteur connu est un peptide appelé l'angiotensine II et le principal vasodilatateur est le NO•. Le problème est que, ainsi que nous l'avons signalé plus haut, le NO• a une courte demi-vie d'environ une seconde. Il doit donc être produit en permanence dans le système vasculaire via les cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins. Le corps produit le NO• en oxydant l'acide aminé L-arginine à l'aide de dioxygène et d'une enzyme eNOS. Il doit donc y avoir un apport suffisant et continu de L-arginine. Des inhibiteurs de NO• synthases, comme la diméthyl-arginine asymétrique par exemple, diminuent la production de NO•, ce qui amène à l'hypertension. Si trop de vasoconstricteurs sont générés, l'hypertension peut également se développer. Ainsi, des suppléments de L-arginine longue action et des inhibiteurs de la production ou du récepteur de l'angiotensine II sont d'intéressants agents antihypertenseurs.

Plus particulièrement, plusieurs auteurs ont montré une activation et une dysfonction des cellules endothéliales dues au stress nitrosatif dans la prééclampsie (Harskamp et Zeeman, 2007). Bien que plusieurs marqueurs de la dysfonction endothéliale, comme la diminution de la relaxation endothélium-dépendante et de la production de NO•, ont été détectés, un nouveau mécanisme a récemment été suggéré. Les niveaux de microparticules, de petits fragments de membrane plasmique relargués de cellules circulantes apoptotiques ou activées ou de cellules vasculaires sont élevés dans la prééclampsie (Martínez *et al.*, 2005). Plus particulièrement, des particules membranaires libérées de leucocytes ou de plaquettes ont la capacité d'induire une inflammation et une hyporéactivité vasculaire qui sont associés à une augmentation de la production de NO• et une surexpression de l'enzyme iNOS (Meziani *et al.*, 2006). De manière intéressante, tandis que les microparticules des leucocytes et des plaquettes présentent du stress nitrosatif, seules les microparticules dérivées des leucocytes induisent l'activation de la voie COX2/PTGS2. Cela montre la pertinence du rôle physiopathologique que peuvent avoir les microparticules dérivées de plaquettes, qui sont pro-inflammatoires et amènent à des signes significatifs de stress nitrosatif dans les vaisseaux (**Figure 63**).

Enfin, le stress nitrosatif est lié à des maladies inflammatoires comme les maladies des voies respiratoires, le sepsis, les réponses immunitaires ou le cancer, et dans les maladies métaboliques comme le diabète. Le NO• est capable de réguler l'expression du VEGF (Singh et Agarwal, 2007) à travers l'enzyme iNOS (**Figure 64**). Cela pourrait être expliqué par le fait que, *in vitro*, le NO• stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales par la S-nitrosylation des tyrosines phosphatases et la réduction de leur activité (Bunderson *et al.*, 2002).

4. THÉRAPEUTIQUE AUTOUR DES RONS : OXYDANTS VERSUS ANTIOXYDANTS

Durant les années 1970-1980, on a pensé que les radicaux libres étaient la cause de nombreuses maladies et que la peroxydation des lipides était le mécanisme d'action principal de nombreuses toxines. L'espoir était qu'alors les antioxydants inhibant la peroxydation des lipides allaient avoir un potentiel thérapeutique important et général (Gutteridge et Halliwell, 2000).

Seulement, l'utilisation irrationnelle et non judicieuse des antioxydants peut augmenter le risque de potentielle toxicité, sachant que de nombreux antioxydants peuvent aussi agir comme prooxydants dans certaines circonstances. De plus, il est toujours difficile aujourd'hui de savoir si les radicaux libres sont la cause ou la conséquence de certaines maladies, c'est d'ailleurs pourquoi on trouve de nombreuses études contradictoires à propos de l'efficacité des antioxydants (Vishal-Tandon *et al.*, 2005).

Certains auteurs ont tenté d'établir une liste d'idées importantes concernant la commercialisation d'une thérapie antioxydante (Rice-Evans et Diplock, 1993) :

1. Le dommage oxydatif est-il associé à la maladie ?
2. Le stress oxydatif impliqué cause-t-il différentes maladies ?
3. Le dommage oxydatif a-t-il lieu dans la plupart des maladies ?
4. L'antioxydant peut-il atteindre le site du dommage de la maladie dans des concentrations suffisantes pour son action ?
5. Le ou les antioxydants utilisés seront-ils capables de prévenir ou stopper le processus oxydatif de la maladie *in vivo* ?
6. Les doses d'antioxydants utilisées pourront-elles être tolérées ?
7. Si la thérapie est chronique, les suppléments en antioxydants seront-elles sûres à long terme ?

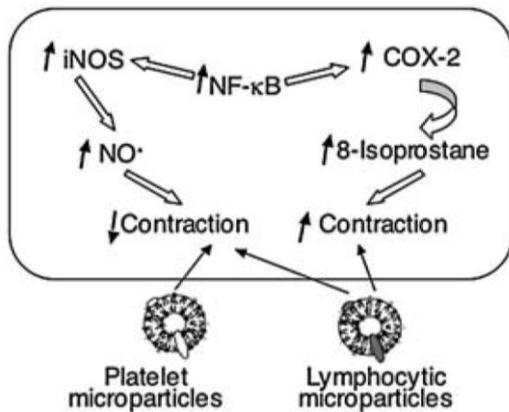
Pour d'autres auteurs, la meilleure recommandation est d'augmenter la prise alimentaire de vitamines constituants des antioxydants naturels, en consommant des céréales, des légumes à gousse, des noix, des fruits, des légumes (Vishal-Tandon *et al.*, 2005).

L'utilisation de NO• ou de donneurs de NO•, sous forme de nitroprussiate de sodium ou de nitroglycérine par exemple, en tant que vasodilatateur pulmonaire ou coronaire pour différentes affections, est maintenant routinier (Thatcher, 2005).

La thérapie autour des antioxydants est en plein essor, surtout pour les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Halliwell, 2015).

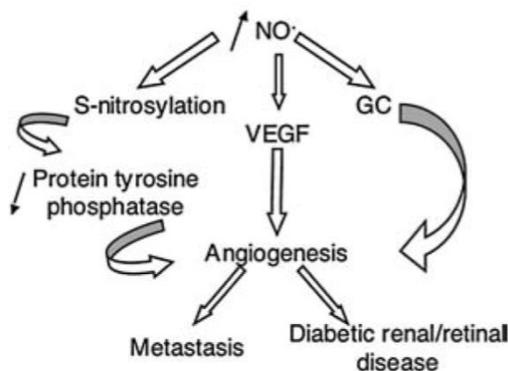
Au-delà de trouver une thérapie miracle à base d'antioxydants, certains auteurs se sont penchés sur la recherche de biomarqueurs liés au stress oxydatif ou nitrosatif afin de prévenir certaines maladies (**Figure 65**).

Figure 63 : les microparticules comme de nouveaux médiateurs du stress nitrosatif



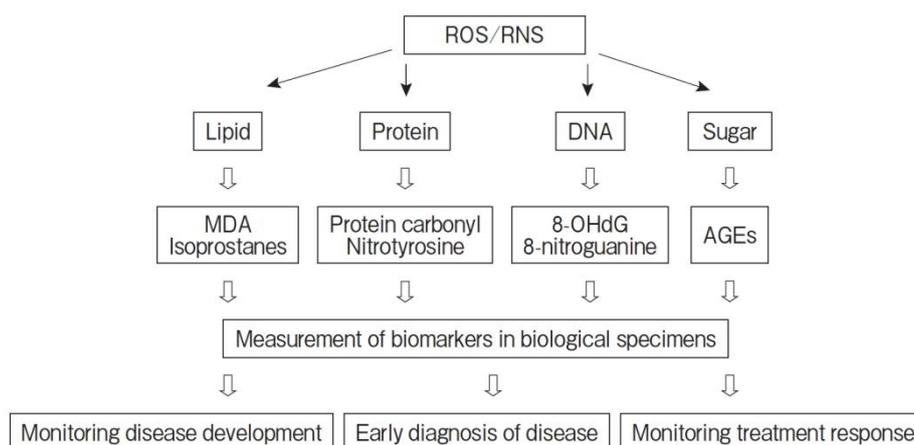
D'après Martínez et Andriantsitohaina, 2009. Dans la prééclampsie, les niveaux circulants de microparticules provenant des plaquettes et des lymphocytes sont élevés. Les deux types de microparticules induisent l'activation du facteur de transcription NF-κB, amenant à une surexpression de protéines pro-inflammatoires comme l'enzyme iNOS, expliquant la surproduction de NO• et l'hyporéactivité vasculaire. À l'inverse, seulement les microparticules provenant des lymphocytes sont capables de surexprimer la COX2/PTGS2 (cyclooxygénase 2/prostaglandin-endoperoxide synthase 2) et de générer du 8-isoprostane, qui est lié à une hyperréactivité. La balance entre les facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs relargués par l'endothélium vasculaire aboutit à une dysfonction endothéliale qui peut se retrouver dans la prééclampsie.

Figure 64 : NO• et angiogénèse



D'après Martínez et Andriantsitohaina, 2009. Le NO• promouvoir l'angiogénèse à travers plusieurs voies : en augmentant la production de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), en réduisant l'activité de la protéine tyrosine phosphatase par S-nitrosylation, ou en activant la guanylyl cyclase (GC). Les RNS semblent donc pouvoir jouer un rôle important dans le développement de métastases et dans certains symptômes des maladies diabétiques liés à des altérations des processus d'angiogénèse comme les rétinopathies et les néphropathies.

Figure 65 : apports potentiels de biomarqueurs liés au stress oxydatif ou nitrosatif dans la prévention de maladies



D'après Ogino et Wang, 2007. MDA : malondialdehyde ; 8-OHdG : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ; AGEs : advanced glycation end products.

5. CONCLUSION DE CE TROISIÈME CHAPITRE : LA DUALITÉ DES RONS, ENTRE EFFETS BÉNÉFIQUES ET EFFETS DÉLÉTÈRES.

Les RONS sont générés *in vivo*, certains par « accidents chimiques », d'autres pour leurs bénéfices métaboliques. Ils possèdent différents effets, bénéfiques ou délétères, variant selon leur origine cellulaire, la source enzymatique, leur concentration et finalement leur cible cellulaire (Martínez et Andriantsitohaina, 2009). Longtemps considérés comme toxiques, ils jouent des rôles importants, notamment dans la signalisation cellulaire et la défense contre les pathogènes. Leur niveau est régulé par un système de défenses antioxydantes, assisté d'un système de réparation. Un déséquilibre de la balance oxydants/antioxydants peut créer un stress oxydatif ou nitrosatif. L'augmentation du dommage oxydatif qui en résulte joue parfois un rôle important dans la physiopathologie de maladies humaines et devrait amener des thérapeutiques avec des antioxydants appropriés, sous réserve que ceux-ci puissent atteindre le site de dommage et soient efficaces pour réduire les lésions. Au vu des descriptions croissantes dans la littérature des rôles que semblent jouer les RONS dans les maladies humaines, la recherche autour des RONS et des antioxydants est au premier plan de la recherche biomédicale actuelle (Novo et Parola, 2008).

Les concepts de stress oxydatif et nitrosatif sont complexes à englober car leur étude est encore récente à l'échelle de la recherche. Ce sont des molécules fugaces et qui sont pour cela difficiles à étudier. Il existe ainsi à l'heure actuelle de nombreuses controverses quant à leurs rôles et leurs mécanismes, physiologiques ou pathologiques. C'est un domaine très à l'étude. Une meilleure compréhension des radicaux libres et de leurs interactions avec les antioxydants aiderait certainement à améliorer la prise en charge de certaines maladies ayant pour origine ou faisant intervenir le stress oxydatif ou nitrosatif.

À l'heure actuelle, un résumé ne faisant aucune controverse pourrait être la citation suivante : « *en fait, les antioxydants et les radicaux libres imprègnent toute la vie, en créant le domaine de la biologie redox. Les radicaux libres ne sont pas tous mauvais, de même que les antioxydants ne sont pas tous bons. La vie est un équilibre entre les deux : les antioxydants servent à maintenir les niveaux de radicaux libres bas, tout en leur permettant de réaliser des fonctions biologiques utiles sans trop de dommages.* » (Halliwell et Gutteridge, 2007)

CHAPITRE IV. LES PROTÉINES STOX1

1. DÉCOUVERTE

La première description du gène *STOX1* et de ses transcrits date de 2005 (van Dijk *et al.*, 2005). Ce gène a été découvert au cours des recherches de facteurs génétiques liés à la prééclampsie (voir aussi chapitre sur la prééclampsie).

La région chromosomique 10q22.1, dans laquelle se trouve le gène *STOX1*, a été tout d'abord décrite comme un locus de susceptibilité pour la prééclampsie. Ce locus a été trouvé grâce à des analyses de liaison effectuée au sein de familles hollandaises prédisposées à la prééclampsie (Lachmeijer *et al.*, 2001 ; Oudejans *et al.*, 2004). De manière intéressante, les sœurs touchées dans les familles partageaient les mêmes allèles maternels, ce qui suggérait que des gènes soumis à empreinte à expression maternelle pouvaient être responsables de l'apparition du syndrome lié au locus 10q22.1. Afin d'identifier ces gènes, l'expression des 17 gènes candidats de la région a été analysée dans des placentas et dans des môles hydatiformes. À noter que la môle hydatiforme, ou grossesse molaire, est une forme bénigne de maladie trophoblastiques gestationnelle caractérisée par une prolifération trophoblastique sans développement embryonnaire normal possible. Les môles résultent d'une anomalie de la fécondation avec excès de matériel chromosomique paternel. La môle complète dérive de la fécondation d'un ovule anucléé par un ou deux spermatozoïdes haploïdes (Golfier, 2011). C'est donc un tissu précieux pour étudier les gènes soumis à empreinte.

Ce crible a permis de réduire la région de susceptibilité à 444 kb. Cinq mutations faux-sens dans le gène *STOX1*, dont Y153H, ont été identifiées. De manière intéressante, ces mutations étaient identiques entre les sœurs affectées, coségrégeaient avec le phénotype prééclamptique et suivaient une transmission matrilinéaire. Les auteurs ont conclu que *STOX1* est un gène à effet maternel et que la perte de fonction de *STOX1* dans le placenta explique la prééclampsie dans cette population de femmes hollandaises (van Dijk *et al.*, 2005).

Pour l'anecdote, le nom du gène a été proposé par Cees Oudejans en 2005 (communication personnelle). Ayant trouvé qu'un des domaines protéiques de *STOX1* ressemblait aux domaines FOX, ou *forkhead box domains* (voir chapitres descriptifs suivants), l'auteur voulait donner un nom similaire. Et étant donné que *STOX1* a été identifié au cours d'une étude sur la prééclampsie, l'auteur a voulu intégrer un lien avec la symbolique de la naissance et a ainsi choisi de remplacer *fork* – « fourchette » en Anglais – par *stork* – « cigogne » en Anglais – pour faire référence à l'oiseau chargé d'apporter les bébés aux jeunes parents selon de vieilles légendes d'Europe du Nord.

Mentionnons que la découverte de *STOX1* dans le cadre de la prééclampsie s'est suivie de controverses. Certains auteurs ont argué que *STOX1* n'était pas soumis à empreinte dans le placenta (Iglesias-Platas *et al.*, 2007), d'autres n'ont pu trouver de lien significatif entre la mutation Y153H et la prééclampsie (Berends *et al.*, 2007 ; Fenstad *et al.*, 2010 ; Iglesias-Platas *et al.*, 2007) et d'autres enfin n'ont pas retrouvé le lien entre *STOX1* et la prééclampsie dans d'autres cohortes (Kivinen *et al.*, 2007). Cependant, certains auteurs identifient un biais significatif d'occurrence du variant Y153H dans les cas de prééclampsies familiales ($p=0.03$), en effectif limité (Berends *et al.*, 2007). La remise en cause de *STOX1* a quelque peu freiné les recherches sur ce gène jusqu'en 2008. Nous reviendrons plus longuement ci-après sur cette polémique et les éléments qui l'ont éteintes.

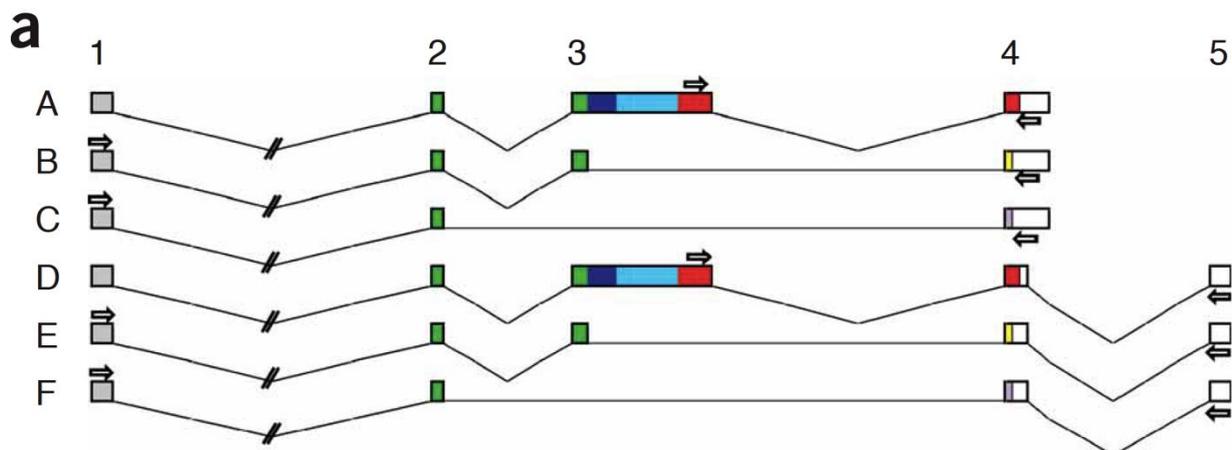
2. DESCRIPTION DU GÈNE HUMAIN

2.1. Transcrits et isoformes protéiques

Au moment de sa découverte, six transcrits codant trois isoformes ont été décrits (van Dijk *et al.*, 2005). Ces transcrits sont générés par épissage alternatif complet ou partiel de l'exon 3 et par l'utilisation alternative de l'exon 5 (**Figure 66**). Aujourd'hui, on ne trouve plus que quatre transcrits dans la base de données *Ensembl* (**Figure 67**). Les transcrits E et F de la **Figure 66** sont en réalité très minoritaires (**Figure 74**).

Les domaines fonctionnels des protéines STOX1 ont été prédits grâce à l'utilisation de plusieurs logiciels en ligne (van Dijk *et al.*, 2005). Ainsi, la comparaison avec d'autres protéines par analyse bio-informatique (**Figure 68**) a montré que les isoformes A et B contiennent un domaine proche du domaine de fixation à l'ADN des facteurs transcriptionnels de la famille FOX (*Forkhead box*), incluant des acides aminés chargés majoritairement positivement à pH neutre. L'isoforme A, la plus longue, contient également, d'après les logiciels de prédiction, un signal de localisation nucléaire ainsi qu'un domaine de transactivation (**Figure 66**). Cette étude bioinformatique menée au moment de la découverte du gène (van Dijk *et al.*, 2005) a amené les auteurs à définir la protéine STOX1A comme un facteur de transcription, c'est-à-dire une protéine ayant la capacité de se lier à des séquences d'ADN spécifiques et de réguler la transcription (R. Hughes, 2011).

Figure 66 : représentation des transcrits de STOX1 au moment de la découverte du gène



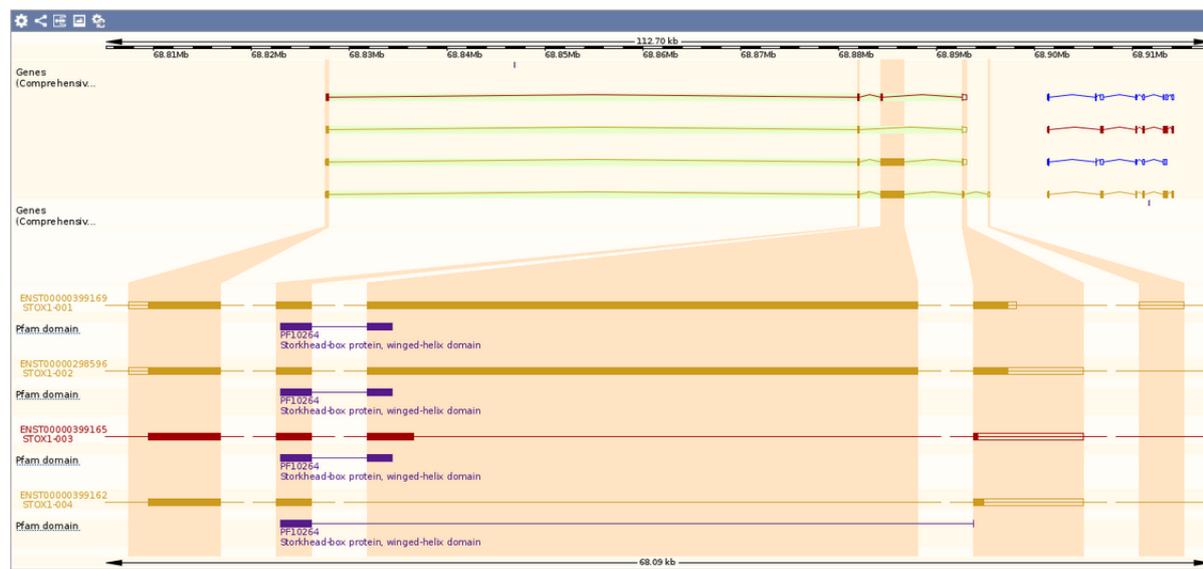
D'après van Dijk *et al.*, 2005. Le gène *STOX1* code trois isoformes protéiques : STOX1A (989 acides aminés, codé par les transcrits A et D), STOX1B (227 acides aminés, codé par les transcrits B et E) et STOX1C (169 acides aminés, codé par les transcrits C et F). Les couleurs à l'intérieur des exons indiquent des séquences protéiques particulières.

- NLS (*nuclear localization sequence*) : séquence de localisation nucléaire
- DBD (*DNA binding domain*) : domaine de liaison à l'ADN
- NES (*nuclear export signal*) : signal d'export nucléaire
- TA (*transactivator domain*) : domaine transactivateur

Les différentes couleurs des derniers exons indiquent que le site d'épissage est différent d'une isoforme à l'autre. L'isoforme A est la plus complète. Dans l'isoforme B, une modification post-transcriptionnelle de l'ARN utilisant un site donneur d'épissage provoque un décalage du cadre de lecture d'où la suppression du domaine transactivateur et la formation d'une isoforme plus courte avec une extrémité C-terminale distincte de l'isoforme A. Dans l'isoforme C, un épissage alternatif mène à la perte de l'extrémité 3' de l'ARN, d'où la formation d'une isoforme plus courte avec une partie du domaine de liaison à l'ADN clivée et une extrémité C-terminale distincte de l'isoforme A.

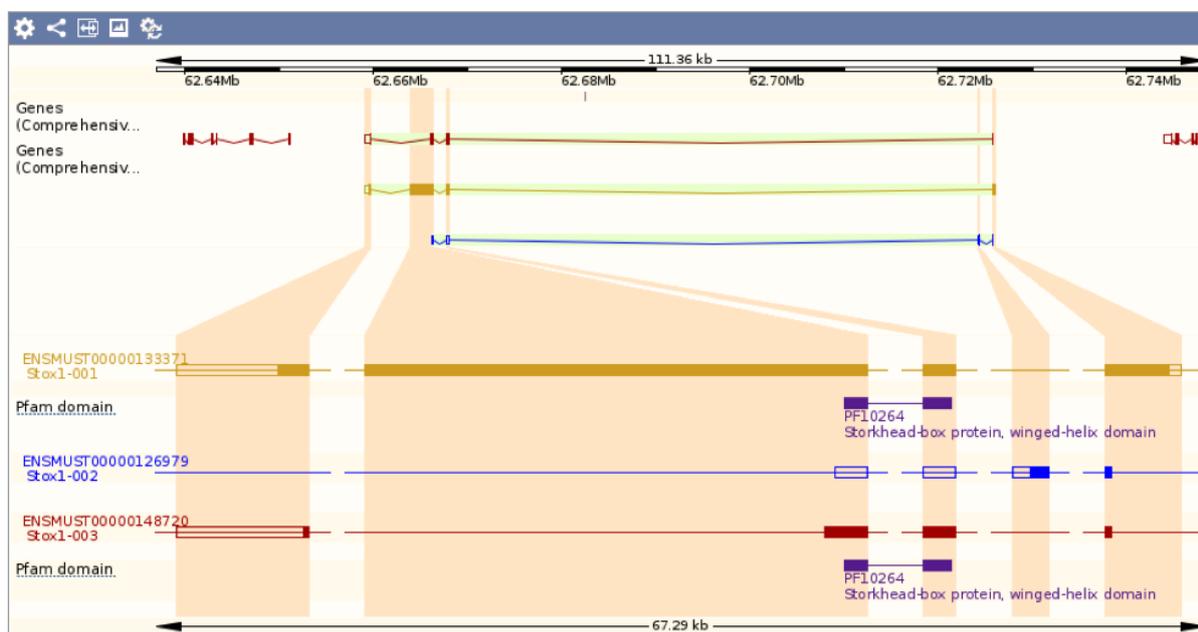
Figure 67 : captures d'écran des pages *Ensembl* actuelles des gènes *STOX1* humain et *Stox1* murin et caractéristiques des transcrits

***STOX1* humain**



Nom du transcrit dans <i>Ensembl</i>	Longueur du transcrit (en paires de bases)	Longueur de la protéine (en acides aminés)	Nom de l'isoforme protéique
STOX1-002	3 377	989	STOX1A
STOX1-001	3 281	989	STOX1A
STOX1-003	1 135	227	STOX1B
STOX1-004	935	169	STOX1C

***Stox1* murin**



Nom du transcrit dans <i>Ensembl</i>	Longueur du transcrit (en paires de bases)	Longueur de la protéine (en acides aminés)	Nom de l'isoforme protéique
Stox1-001	3 510	990	Stox1A
Stox1-002	507	39	<i>nonsense mediated decay</i>
Stox1-003	1 012	136	Stox1B

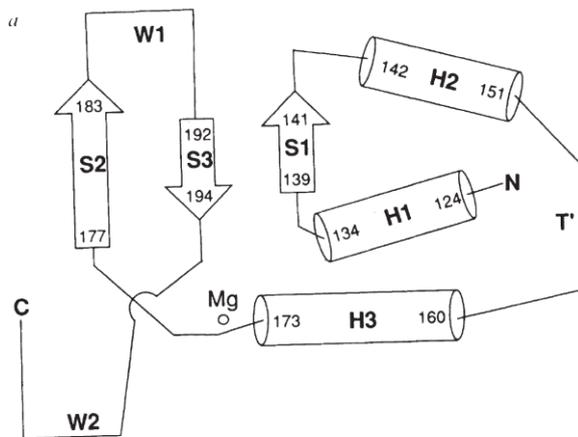
Figure 68 : alignement des séquences protéiques FOX avec la protéine STOX1

		HELIX 1	S1	HELIX 2	LOOP	HELIX 3	S2	WING1	S3	WING 2	
A	1	FOXN1	KPIYSYSILIFMALKNSKTGSLP	VSEIYNFMTEHFPYKTA	PDGWNKNSVRHNSLNKCE	EKVENKSGSSSRKGC	LWALNP	---	AKIDKMQEELQKWKRRKDPIA		
	2	FOXN4	KPIYSFSCLIAMALKNSKTGSLP	VSEIYSFMREHFPYKTA	PDGWNKNSVRHNSLNKCE	EKVENKSGSSSRKGC	LWALNP	---	ARIDKMEEMHKWKRRDLAA		
	3	FOXN2	KPPYSFSLIYMAIEHSPNKCLP	VKEIYSWILDHFPYKATA	PTGWNKNSVRHNSLNKCE	QKVERSH	---	GKVNKGKSLWCVDP	---	EYKPNLIQALKKQFPSSASS	
	4	FOXN3	KPPYSFSCLIAMALTEISPTKRL	VKDIYNWILIEHFPYKANA	PTGWNKNSVRHNSLNKCE	KKVKDER	---	SQSIGKGS	LWQIDP	---	EYRQNLQALKKTPYHPPH
	5	FOXF1	KPPYSYIALIVMAIQSSPTKRL	TLSEIYQFLQSRFPF	FRGYSYQGWKNSVRHNSLNCE	SIKLPKGL	---	GRPG	KGHWITDP	---	ASEFMEEGSFRRRRPRGFR
	6	FOXF2	KPPYSYIALIVMAIQSSPSKRL	TLSEIYQFLQARFP	FRGAYQGWKNSVRHNSLNCE	SIKLPKGL	---	GRPG	KGHWITDP	---	ASEFMEEGSFRRRRPRGFR
	7	FOXQ1	KPPYSYIALIAMARISAGRRL	TLAEINEYLMGKFP	FRGYSYQGWKNSVRHNSLNDC	SVKVRDP	---	SRPWGKDN	WMLNP	---	NSEYTFADGVFRRRRRLSH
	8	FOXA1	KPPYSYISLITMAIQCAPSKML	TLSEIYQWIMDLFPY	YRONQORWQNSIRHNSFNDC	SVKVARSP	---	DKPG	KGYSWTLHP	---	DSGNMFENGCLRRQKRFK
	9	FOXA3	KPPYSYISLITMAIQCAPGKML	TLSEIYQWIMDLFPY	YRENQORWQNSIRHNSFNDC	SVKVARSP	---	DKPG	KGYSWTLHP	---	SSGNMFENGCLRRQKRFK
	10	FOXA2	KPPYSYISLITMAIQSPNKML	TLSEIYQWIMDLFPY	YRONQORWQNSIRHNSFNDC	SVKVARSP	---	DKPG	KGYSWTLHP	---	DSGNMFENGCLRRQKRFK
	11	FOXB1	KPPYSYISLITMAIQSPKML	PLSEIYKFINDRFPY	YRENQORWQNSIRHNSFNDC	SIKIPRRP	---	DQPG	KGYSWTLHP	---	SCGDMFENGSLRRRKRFKV
	12	FOXB2	KPPYSYISLITMAIQSAEKML	PLSDIYKFIMDRFPY	YREHTRQWQNSLRHNSFNDC	SIKIPRRP	---	DQPG	KGYSWTLHP	---	DCGDMFENGSLRRRKRFKV
	13	FOXD1	KPPYSYIALITMAIQSPKRL	TLSEICEFISGRFPY	YREHTRQWQNSIRHNSLNDC	SVKIPREP	---	GNPG	KGYSWTLDP	---	ESADMFDNGSFLRRRKRFRK
	14	FOXD2	KPPYSYIALITMAIQSPKRL	TLSEICEFISGRFPY	YREHTRQWQNSIRHNSLNDC	SVKIPREP	---	GNPG	KGYSWTLDP	---	ESADMFDNGSFLRRRKRFRK
	15	FOXD3	KPPYSYIALITMAIQSPQKLL	TLSEICEFISGRFPY	YREHTRQWQNSIRHNSLNDC	SVKIPREP	---	GNPG	KGYSWTLDP	---	QSEDMFDNGSFLRRRKRFRK
	16	FOXD4	KPPYSYIALITMAIQSPHKRL	TLSEIGCAFISDRFPY	YRRHTRQWQNSIRHNSLNDC	SVKIPREP	---	GRPG	KGYSWTLDP	---	ASQDMFDNGSFLRRRKRFRQ
	17	FOXE1	KPPYSYIALIAMATAHAPERR	LLTGGIYKFIATERFPY	YRDNPQWQNSIRHNSLNDC	SLKIPREA	---	GRPG	KGYSWTLDP	---	NAEDMFESGFLRRRKRFRK
	18	FOXE3	KPPYSYIALIAMALAHAPRR	LLTAAIYRFITERFAFY	RDSPRWQNSIRHNSLNDC	SVKIPREP	---	GNPG	KGYSWTLDP	---	AAADMFDNGSFLRRRKRFRK
	19	FOXC1	KPPYSYIALITMAIQNAPDK	KKITLNGIYQFINDRFPY	YRDNPQWQNSIRHNSLNDC	SVKIPREP	---	KKPG	KGYSWTLDP	---	DSYNMFENGSLRRRKRFRK
	20	FOXC2	KPPYSYIALITMAIQNAPDK	KKITLNGIYQFINDRFPY	YRDNPQWQNSIRHNSLNDC	SVKIPREP	---	KKPG	KGYSWTLDP	---	DSYNMFENGSLRRRKRFRK
	21	FOXL1	KPPYSYIALIAMALQDAPEQR	VTLNGIYQFINDRFPY	YHNRQWQNSIRHNSLNDC	SVKIPREP	---	GRPG	KGYSWTLDP	---	RCLDMFENGYRRRKRKPKP
	22	FOXG1A	KPPFSYNALIMMAMRQSP	EKRLLTNGIYEFIMKFPY	YRENKQGWQNSIRHNSLNKCE	SVKVRPHY	---	DDPG	KGYSWTLDP	---	SSDDVFIGTGLKRSTT
	23	FOXG1B	KPPFSYNALIMMAMRQSP	EKRLLTNGIYEFIMKFPY	YRENKQGWQNSIRHNSLNKCE	SVKVRPHY	---	DDPG	KGYSWTLDP	---	SSDDVFIGTGLKRSTT
	24	FOXI1	RPPYSYALIAMATHGAPDK	RLLTSGIYQVADNFPY	YKSKAGWQNSIRHNSLNDC	SVKIPREP	---	DDPG	KGYSWTLDP	---	NCEKMFNGSFLRRRKRKSD
	25	FOXL2	KPPYSYVALIAMATHGAPDK	RLLTSGIYQVADNFPY	YKSKAGWQNSIRHNSLNDC	SVKIPREP	---	DDPG	KGYSWTLDP	---	NCEKMFNGSFLRRRKRKSD
	26	FOXJ1	KPPYSYATLICMAMQASKAT	KITLSAIYKWIIDNFCY	ERHADPTWQNSIRHNSLNKCE	SIKIPREP	---	DEPG	KGYSWTLDP	---	QYABRLLSGAFKRRRPPVH
	27	FOXJ3	KPPYSYASLITFAINSPP	PKKMTLSEIYQWIDNFPY	YREAGSGWQNSIRHNSLNKCE	SVKIPREP	---	DDPG	KGYSWTLDP	---	NPKEDVLPTRPKRARSVER
	28	FOXK1	KPPFSYAQLIVQALISSAQ	DRQLTSGIYAHITKHYPY	YRTADKQWQNSIRHNSLNRYE	SIKIPREP	---	EEPG	KGYSWTLDP	---	ASEAKLVEQAFRRRKRKSD
	29	FOXK2	KPPFSYAQLIVQALISSAQ	DRQLTSGIYAHITKHYPY	YRTADKQWQNSIRHNSLNRYE	SIKIPREP	---	EEPG	KGYSWTLDP	---	ASEAKLVEQAFRRRKRKSD
	30	FOXH1	KPPYTYLAMALIVQALISSA	QDRQLTSGIYAHITKHYPY	YRTADKQWQNSIRHNSLNRYE	SIKIPREP	---	EEPG	KGYSWTLDP	---	ASEAKLVEQAFRRRKRKSD
	34	FOXF2	RPPFTYALIRQALLESADR	QLTNEIYSWFTRTFAY	ERRNAATWKNNAVRHNSLHKG	SVRVENV	---	KGAVWTVDE	---	REYQKRRSPKMTGSPTL	
	35	FOXF4	RPPFTYALIRQALLESADR	QLTNEIYSWFTRTFAY	ERRNAATWKNNAVRHNSLHKG	SVRVENV	---	KGAVWTVDE	---	REYQKRRSPKMTGSPTL	
	36	FOXF1	RPPFTYALIRQALLESADR	QLTNEIYSWFTRTFAY	ERRNAATWKNNAVRHNSLHKG	SVRVENV	---	KGAVWTVDE	---	VEFQKRRPQKISGNPSL	
	37	FOXF3	RPPFTYALIRQALLESADR	QLTNEIYSWFTRTFAY	ERRNAATWKNNAVRHNSLHKG	SVRVENV	---	KGAVWTVDE	---	LEFRKRSQRPSRCSNP	
	38	FOXR1	RPPLNYPHLIALALRNSS	PCGLWQIYFTRKHP	FFRTPAPEGWKNTVRHNSLGR	FRDSEKVPVSMQGGASTR	PSCLWLLTEEG	---	HRRFABEARALASTRLES		
	39	FOXR2	RPPLNCSHLIALALRNSS	PCGLWQIYFTRKHP	FFRTPAPEGWKNTVRHNSLGR	FRDSEKVPVSMQGGASTR	PSCLWLLTEEG	---	HRRFWEETRVLAFQQRER		
B		Rat_A	EVLCCVIAIDMNAQAV	VTQEAALLEHLKHP	PGIAVSPDILYSTLGT	LIQQRKIYHTGEGYFIVTP	PNTYFIINTNTM	QGNKRALLSDE		XP_228160	
		Mouse_A	EVLCCVIAIDMNAQAV	VTQEAALLEHLKHP	PGIAVSPDILYSTLGT	LQQRKIYHTGEGYFIVTP	PNTYFIINTNTM	QGNKRALLSDE		XP_125685	
		Human_A	EVLCCVIAIDMNAQAV	VTQEAALLEHLKHP	PGIAVSPDILYSTLGT	LQQRKIYHTGEGYFIVTP	PNTYFIINTNTM	QGNKRALLSDE		This study	
		Gallus_A	EGICHTISDMNADQ	MVTQKTLVEQLK	YRPGIAVSPQKILYN	ILGTLLKERRKIYHTGEGYFIVTP	PNTYFVFNDA	AAYNKRVQKDS		XP_421573	
		Mouse_B	EILCLAIASAMNSAR	KPVTQEAALMEHL	TCRPGVPTPSQELR	HRTLNTLVRRERKIYPTPDGYFIVTP	PQYFIITPSL	IRTNSKWHLDE		BAC98156	
		Rat_B	EILCLAIASAMNSAR	KPVTQEAALMEHL	TCRPGVPTPSQELR	HRTLNTLVRRERKIYPTPDGYFIVTP	PQYFIITPSL	IRTNSKWHLDE		XP_224852	
		Human_B	EILCLAIASAMNSAR	KPVTQEAALMEHL	TCRPGVPTPSQELR	HRTLNTLVRRERKIYPTPDGYFIVTP	PQYFIITPSL	IRTNSKWHLDE		XP_048721	
		Xenopus_B	EILCVIAIALNSAR	KPVNQEALIDHL	TRFPGVPTPSQELR	HRTLNTLVRRERKIYPTPDGYFIVTP	PQYFIITPSL	IRTNSKWHLDE		AAH77530	
		Drosophila_B	EALCIVIMDLTAEQ	SATIEHVRSKL	SRPHMTTPEATEVI	YDLSLAQLMQEQKIYQTSKGYFITP	PERRRSRSRPSRNH	HQLNGSLA		AAT94440	

D'après van Dijk *et al.*, 2005. A. L'alignement du domaine de l'hélice ailée des protéines FOX chez l'Homme montre une conservation des acides aminés hydrophiles (en gris) qui contrôlent la stabilité de l'aile 2 et ainsi contrôle la spécificité de liaison à l'ADN. En outre, toutes les protéines FOX suivent un schéma Y/FY/F-6-W-7-L-4-F absolument conservé (marqué en noir). Dans le cas des protéines FOXO, ce schéma est Y/FY/F-11-W-7-L-4-F (omis dans le tableau pour plus de clarté). B. La protéine STOX1 (Human_A) a une structure secondaire similaire, caractéristique d'un domaine à hélice ailée (*winged helix domain*) comprenant la conservation de ces acides aminés hydrophobes. La règle Y/F spécifique pour les protéines FOX est absente dans STOX1 et ses homologues, ce qui indique que ce gène représente un nouveau membre de la famille des protéines à « winged helix ». Le paralogue humain (DKFZp762K222) sur 4q35 est indiqué par Human_B (il s'agit de STOX2). Le SNP identifié comme lié à la prééclampsie est indiqué en rouge : cette mutation (Y153H) implique le remplacement d'un acide aminé très conservé au cours de l'évolution comme en atteste cet alignement (Y ou F) et trouvé dans 46 des 48 femmes prééclampsiques.

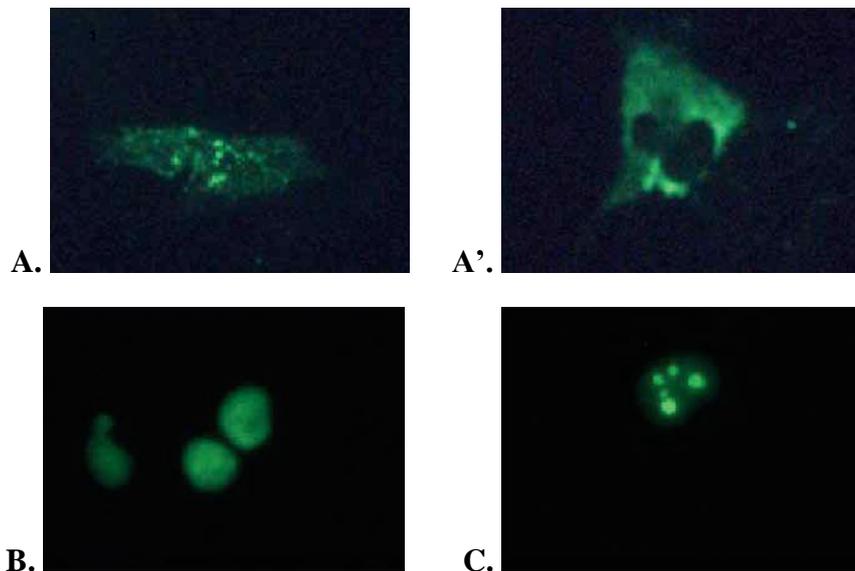
D'après la séquence de son domaine de liaison à l'ADN résumé, la protéine STOX1A fera partie de la famille des protéines à hélice ailée (*winged helix protein*) qui constitue une sous-famille de la superfamille des facteurs de transcription à motif hélice-tour-hélice (*helix-turn-helix*), dont font aussi partie les protéines FOX (Gajiwala et Burley, 2000). La structure tridimensionnelle de ce domaine (Figure 69) a été déterminée par cristallographie aux rayons X à partir de la protéine HNF-3γ, première protéine de cette famille à avoir été fonctionnellement étudiée (Clark *et al.*, 1993). On peut supposer que la structure du domaine de liaison à l'ADN de STOX1A (et STOX1B) est similaire. Néanmoins l'alignement avec les protéines FOX (Figure 68) semble montrer des particularités de séquence pour STOX1. Pour cette raison, les premiers auteurs ont classé STOX1 dans une nouvelle famille : la famille des *Storkhead box domain*. À ce jour, seules les protéines STOX1 et STOX2 font partie de cette famille.

Figure 69 : structure du domaine de liaison à l'ADN des facteurs de transcription à « hélice ailée »



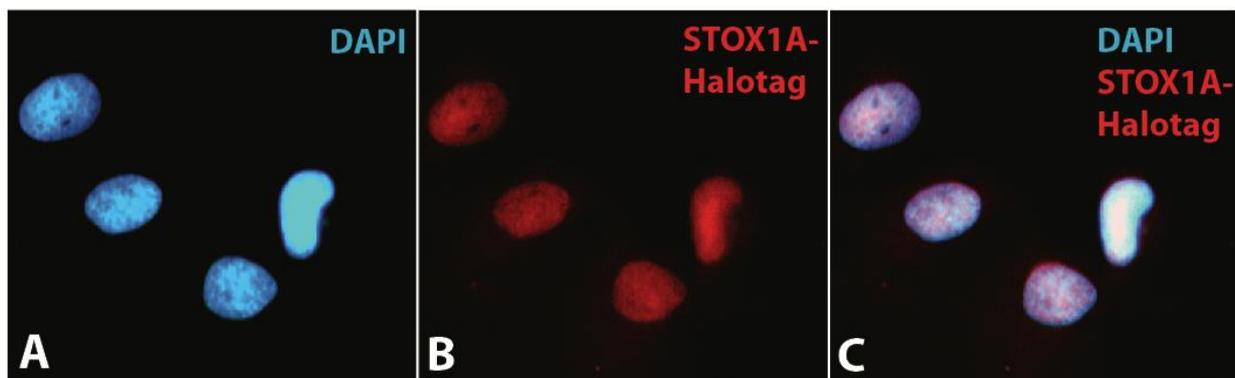
D'après Gajiwala et Burley, 2000. Représentation schématique de la structure secondaire du domaine de liaison à l'ADN des protéines à « hélice ailée » déterminée par cristallographie aux rayons X du domaine de la protéine HNF-3 γ (acides aminés 107-223). Les hélices alpha sont représentées comme des cylindres (H1, H2 et H3 pour *helix 1*, *helix 2* et *helix 3*) et les feuillets bêta (S1, S2 et S3 pour *strand 1*, *strand 2* et *strand 3*) comme des flèches. La région entre H2 et H3 est appelée T', et les régions en forme de boucle entre S2 et S3 et entre S3 et la partie C-terminale sont nommées W1 et W2 respectivement (pour *wing 1* et *wing 2*). La façon dont sont disposées les sous-structures W1 et W2 de part et d'autre de l'hélice H3 a fait penser à un papillon, d'où le nom donné à ce motif par les premiers auteurs.

Figure 70 : localisation cellulaire des différentes isoformes de *STOX1* humain dans des cellules SGHPL5



D'après van Dijk *et al.*, 2005. Analyse de la localisation cellulaire des différentes isoformes de *STOX1* dans des cellules SGHPL5 (cytotrophoblastes extravilloux diploïdes normaux immortalisés par une transformation avec SV40, ayant la capacité de fusionner) par couplage à la GFP. L'expression nucléaire de l'isoforme A dans les cytotrophoblastes extravilloux est restreinte aux cellules polyploïdes (A), l'expression cytoplasmique, aux cellules diploïdes (A'). L'expression nucléaire et cytoplasmique est exclusive. Les isoformes B (B) et C (C) sont localisés dans les noyaux seulement. L'isoforme C est localisée dans le nucléole.

Figure 71 : localisation cellulaire de la protéine *STOX1A* dans des cellules U-373

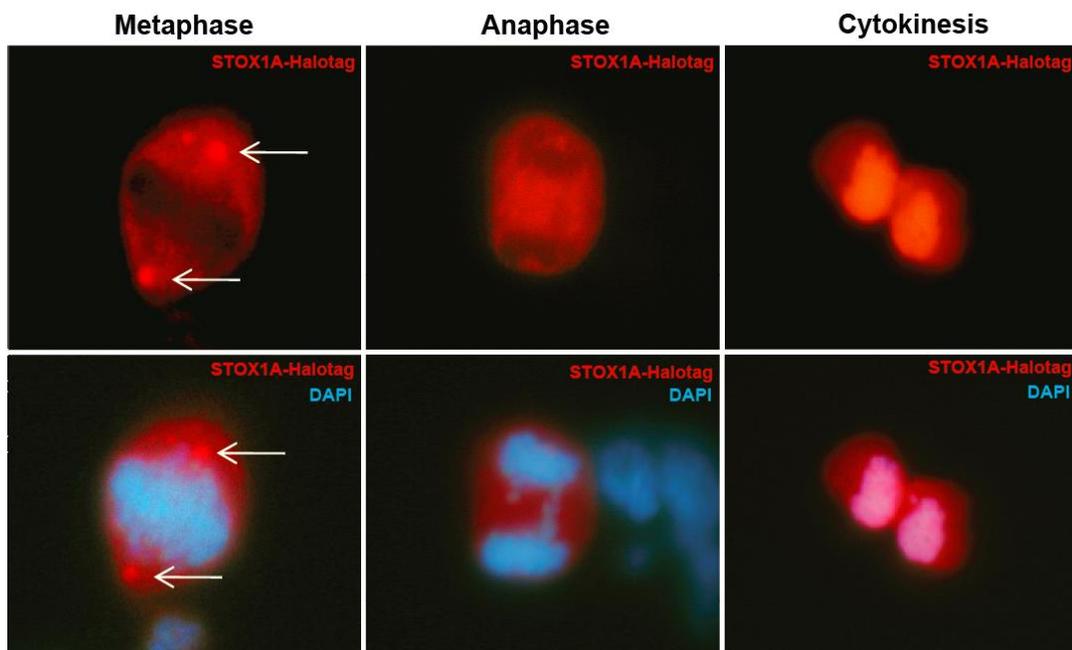


D'après van Abel *et al.*, 2011. Cette immunofluorescence montre le marquage nucléaire d'une protéine Halotag-*STOX1A* transfectée stablement dans des cellules U-373 (cellules modèles d'astrocytes).

2.2. Localisation cellulaire

Les premiers auteurs à décrire le gène ont également déterminé de manière expérimentale la localisation cellulaire des différentes isoformes dans un modèle de cellules placentaires (Figure 70). Les auteurs ont montré que les isoformes étaient situées dans différents compartiments cellulaires et que la localisation de l'isoforme A (noyau ou cytoplasme) dépendait de l'état de ploïdie cellulaire (van Dijk *et al.*, 2005). Des études ultérieures ont confirmé que la protéine STOX1A était capable d'être adressée au noyau dans d'autres types cellulaires, ce qui concorde avec son rôle présumé de facteur de transcription (Figure 71 et Figure 72). D'après les quelques résultats générés à ce sujet, la localisation cytoplasmique ou nucléaire de cette isoforme serait exclusive. La protéine serait soit dans le cytoplasme, soit dans le noyau, mais jamais dans les deux compartiments à la fois. Ce résultat expérimental concorde avec l'homologie trouvée avec les protéines FOX. En effet, comme présumé pour la protéine STOX1A, les facteurs de transcription FOX possèdent deux séquences contrôlant la localisation cellulaire de la protéine : une séquence de localisation nucléaire et un signal d'export nucléaire (NLS et NES de la Figure 66). Ces séquences permettent « la navette » de ces protéines du cytoplasme vers le noyau. À l'état basal, le facteur de transcription est retenu dans le cytoplasme sous une forme inactive, jusqu'à ce qu'un stimulus conduise à un changement de conformation et à son entrée dans le noyau, sous sa forme active (Zhao *et al.*, 2004). La protéine STOX1A est présumée suivre le même mode de fonctionnement, mais le signal d'entrée de la protéine dans le noyau reste non déterminé à ce jour. Les premiers auteurs avaient émis l'hypothèse que ce signal faisait intervenir la voie PI3-Akt, comme pour les protéines FOX, car cette voie est activée au cours de la polyploïdisation (Kamei *et al.*, 2002 ; van Dijk *et al.*, 2005). Des résultats ultérieurs ont confirmé l'implication de cette voie (van Dijk *et al.*, 2010d). Enfin, de manière intéressante, l'orthologue de STOX1 chez *Caenorhabditis Elegans* (ham-1) a été retrouvé, selon le stade cellulaire, dans le cytoplasme et dans le noyau de neuroblastes (Feng *et al.*, 2013 ; Frank *et al.*, 2005).

Figure 72 : localisation cellulaire de la protéine STOX1A dans des cellules SH-SY5Y au cours d'une mitose



D'après van Abel *et al.*, 2012a. Immunofluorescence de cellules SH-SY5Y (cellules modèles de neuroblastes) transfectée stablement avec une protéine Halotag-STOX1A au cours d'une mitose. On observe que la protéine STOX1A n'est pas au contact de l'ADN au cours de la métaphase et de l'anaphase, mais retourne dans le noyau à partir de la cytotidèrese.

Finalement, les protéines *STOX1B* et *STOX1C* semblent être exclusivement nucléaires tandis que les localisations cytoplasmique ou nucléaire de la protéine *STOX1A* semblent dépendre de l'état de la cellule. Certains logiciels comme *Locate* (<http://locate.imb.uq.edu.au/>) prédisent également une localisation de *STOX1A* dans les peroxysomes ou les mitochondries. Si le rôle de *STOX1A* dans le noyau pourrait correspondre à son rôle présumé de facteur de transcription, son rôle dans le cytoplasme reste encore très hypothétique, même si certains auteurs supposent qu'il interagit avec les centrosomes (van Abel *et al.*, 2012a).

2.3. Expression tissulaire

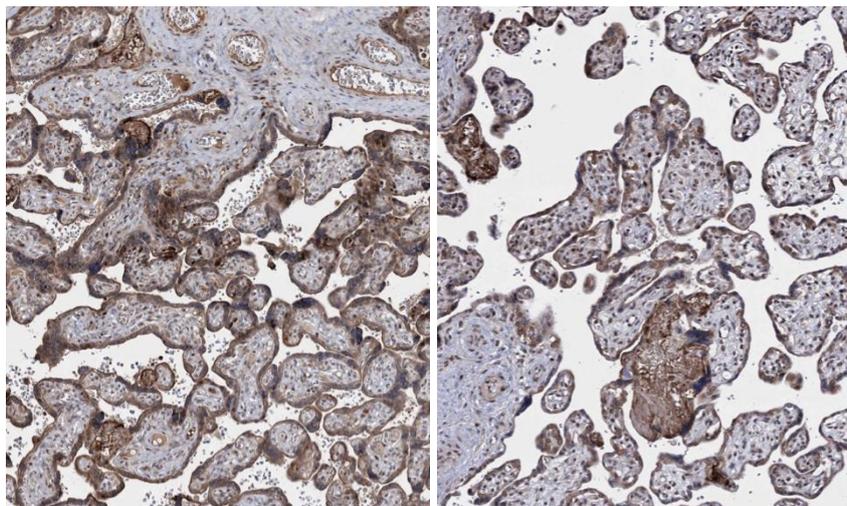
De nombreux sites web permettent de donner l'expression tissulaire de *STOX1* :

- *Expression Atlas* (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/home>),
- *GeneHub-Gepis* (<http://research-public.gene.com/Research/genentech/genehub-gepis/genehub-gepis-search.html>),
- *BioGPS* (<http://biogps.org/#goto=searchresult>),
- *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/nucest/>).

Ces sites présentent essentiellement des résultats transcriptionnels d'expression. Un site permet cependant de voir l'expression protéique de *STOX1* dans les tissus : *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>). Même si quelques différences sont observables entre les bases de données, on peut toutefois dire que *STOX1* est globalement un gène ubiquitaire, avec de forts taux d'expression dans le cerveau et les organes reproducteurs. La difficulté de ces sites reste qu'on ne connaît pas la spécificité des taux d'expression vis-à-vis des isoformes de *STOX1*, ou vis-à-vis du paralogue *STOX2* : les sondes d'expression sont-elles spécifiques pour certains transcrits ? Les anticorps utilisés sont-ils spécifiques du transcrit et du paralogue ?

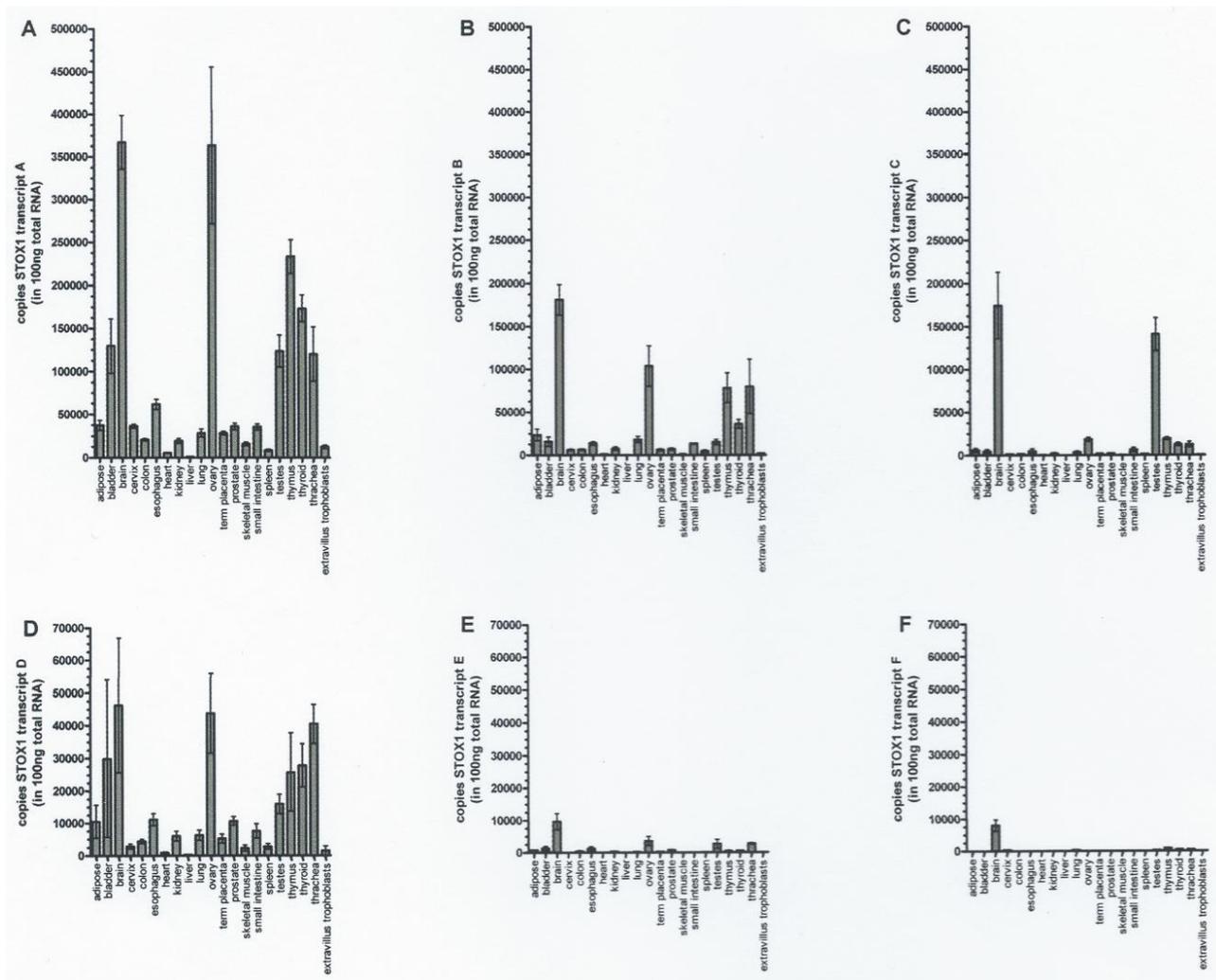
Une étude exhaustive a tenté de répondre à la question en mesurant le taux d'expression tissulaire en qPCR avec des sondes spécifiques d'isoformes (**Figure 74**). De forts taux d'expression sont ainsi observés pour le transcrit A dans le cerveau et l'ovaire (environ 400 000 copies pour 100 ng d'ARN total). Pour le transcrit B, on observe de forts taux d'expression dans le cerveau et l'ovaire, et pour le transcrit C dans le cerveau et le testicule.

Figure 73 : expression protéique de *STOX1* dans le placenta humain



Immunohistochimie anti-*STOX1* dans le placenta humain d'après le site *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>). On observe un marquage nucléaire et cytoplasmique.

Figure 74 : expression tissulaire des isoformes de *STOX1* chez l'homme



D'après van Dijk *et al.*, 2010b. Cette figure provient d'expériences de qRT-PCR réalisées sur les six transcrits de *STOX1* décrits jusqu'en 2010 (A-F) à partir d'ARN de 20 tissus adultes (de gauche à droite sur les histogrammes) : tissu adipeux, vessie, cerveau, col utérin, colon, œsophage, cœur, rein, foie, poumon, ovaire, placenta à terme, prostate, muscle squelettique, intestin grêle, rate, testicule, thymus, thyroïde, trachée, trophoblaste extravilleux. Les transcrits A, B et C correspondent aux transcrits majoritaires codant respectivement les isoformes *STOX1A*, *STOX1B* et *STOX1C*. Les transcrits D, E et F diffèrent respectivement des transcrits A, B et C par leur région 3'-UTR mais codent les mêmes isoformes. Ils sont exprimés à un niveau bas. L'ordonnée est donnée en nombre de copies pour 100 ng total d'ARN et figure en « moyenne +/- SEM ».

3. PARALOGUES ET ORTHOLOGUES

3.1. Le gène paralogue *STOX2*

Le gène *STOX1* possède un gène paralogue sur le chromosome 4 (région 4q35.1) : le gène *STOX2*. De manière intéressante, ce paralogue est situé à côté d'une région chromosomique liée à la prééclampsie dans une population australienne (Harrison *et al.*, 1997). Il a d'ailleurs été rapporté une diminution d'expression de ce gène dans la décidue de femmes développant une prééclampsie compliquée d'un retard de croissance intra-utérin (Fenstad *et al.*, 2010). En dehors de ces quelques données, les connaissances sur ce gène sont presque entièrement hypothétiques. Symétriquement à *STOX1*, il code 3 isoformes protéiques, dont deux possèdent un domaine de liaison présumé à l'ADN (Figure 75), homologue à celui des protéines *STOX1* (Tableau 10), mais aucune donnée expérimentale n'a mis en évidence un potentiel rôle en tant que facteur de transcription. D'après le site *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/>), il serait très peu exprimé dans les tissus et de localisation plutôt cytoplasmique. Une hypothèse probable est une duplication ancestrale donnant *STOX1* et *STOX2*. Du fait de la redondance fonctionnelle entre les deux gènes, *STOX2* a pu dériver, finir par être moins exprimé et peut-être perdre sa fonction.

3.2. Orthologues de *STOX1* et *STOX2* humains

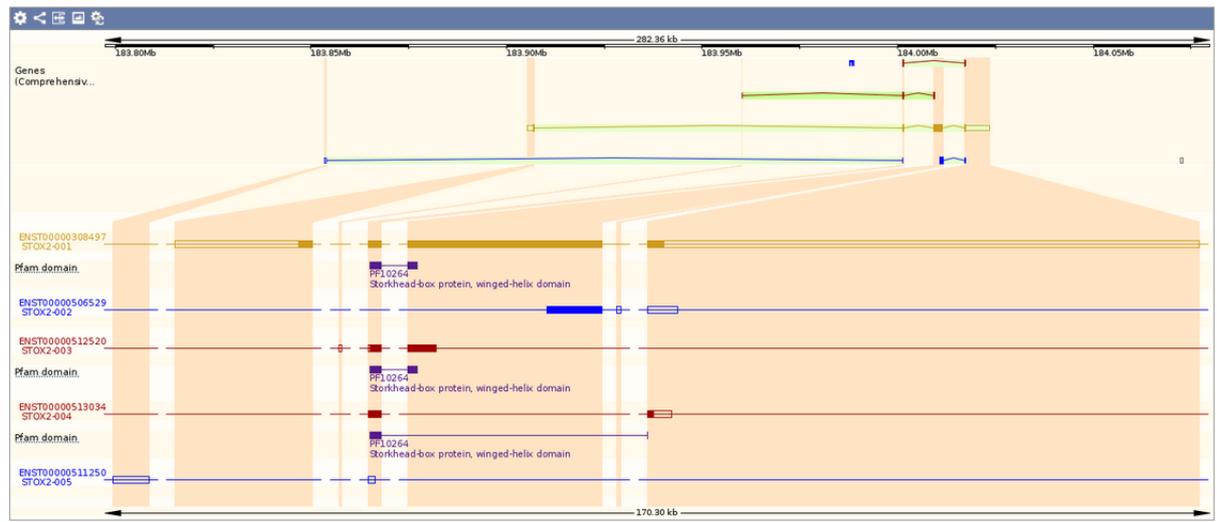
Dans la base de données *Ensembl*, *STOX1* possède 63 orthologues et *STOX2* possède 75 orthologues. Tous ces gènes sont retrouvés dans plusieurs classes d'organismes vertébrés, ainsi que dans deux classes d'organismes invertébrés (Figure 76). On peut observer une homologie de séquence, plus marquée au niveau du domaine de liaison à l'ADN présumé (Tableau 10), ainsi qu'une homologie d'organisation génomique (**Tableau 11**).

Le gène *Stox1* a été très peu étudié en dehors de l'espèce humaine. Chez la souris, nos observations personnelles (non publiées) semblent indiquer que le gène n'est pas soumis à empreinte dans le placenta et l'embryon. D'autres auteurs ont mis en évidence un rôle de ce gène dans la prolifération des cellules épithéliales de l'oreille interne (Nie *et al.*, 2015). En revanche, les orthologues de *Stox1* chez la drosophile et le nématode ont été étudiés bien avant que le gène ne soit dénommé *Stox1* en 2005. Chez la drosophile, le gène *ko* (*knockout*) code une protéine exprimée dans plusieurs tissus embryonnaires et serait notamment nécessaire à l'établissement de certaines jonctions neuromusculaires (Hartmann *et al.*, 1997). Chez le nématode, le gène *ham-1* (*hermaphrodite specific motorneurons abnormal migration 1*) doit son nom à sa fonction car il régule la position du plan de clivage, l'apoptose et la mitose de certains neuroblastes au cours de leurs divisions cellulaires asymétriques (Desai *et al.*, 1988 ; Feng *et al.*, 2013 ; Frank *et al.*, 2005). Enfin, de très intéressantes données ont été publiées chez la poule (*Gallus gallus*) et le xénope (*Xenopus laevis*). En recherchant des orthologues de gènes impliqués dans la migration des cellules de la crête neurale chez le nématode, des auteurs ont pu mettre en évidence la présence de *ham-1/Stox1* dans ces cellules et ont montré que sa surexpression dans des embryons de xénope entraînait une diminution de migration de ces mêmes cellules (Kee *et al.*, 2007). *Stox1* semble donc avoir un rôle dans la migration cellulaire qui a été conservé au cours de l'évolution.

Le gène *Stox2* n'a pas été étudié en dehors de l'espèce humaine.

Ces données sont plutôt en faveur d'un rôle conservé des gènes *Stox1* et *Stox2* au cours de l'évolution.

Figure 75 : capture d'écran de la page *Ensembl* actuelle du gène *STOX2* humain et caractéristiques des transcrits



Nom du transcrit dans <i>Ensembl</i>	Longueur du transcrit (en paires de bases)	Longueur de la protéine (en acides aminés)	Nom de l'isoforme protéique
STOX2-001	10458	926	STOX2A
STOX2-003	518	155	STOX2B
STOX2-004	443	74	STOX2C
STOX2-002	1055	219	<i>nonsense mediated decay</i>
STOX2-005	496	0	<i>processed transcript</i>

Tableau 10 : homologies entre quelques séquences de *STOX1* et *STOX2*

	Protéine entière	Site de liaison à l'ADN présumé (<i>Storkhead domain</i>)
Homologie STOX2A/STOX1A	26 % (39 %)	63 % (81 %)
Homologie mStox1a/hSTOX1A	60 % (71 %)	77 % (87 %)
Homologie mStox1b/STOX1B	72 % (81 %)	77 % (87 %)
Homologie ko/hSTOX1A	21 % (33 %)	38 % (56 %)
Homologie Ham1/hSTOX1A	12 % (20 %)	26 % (56 %)

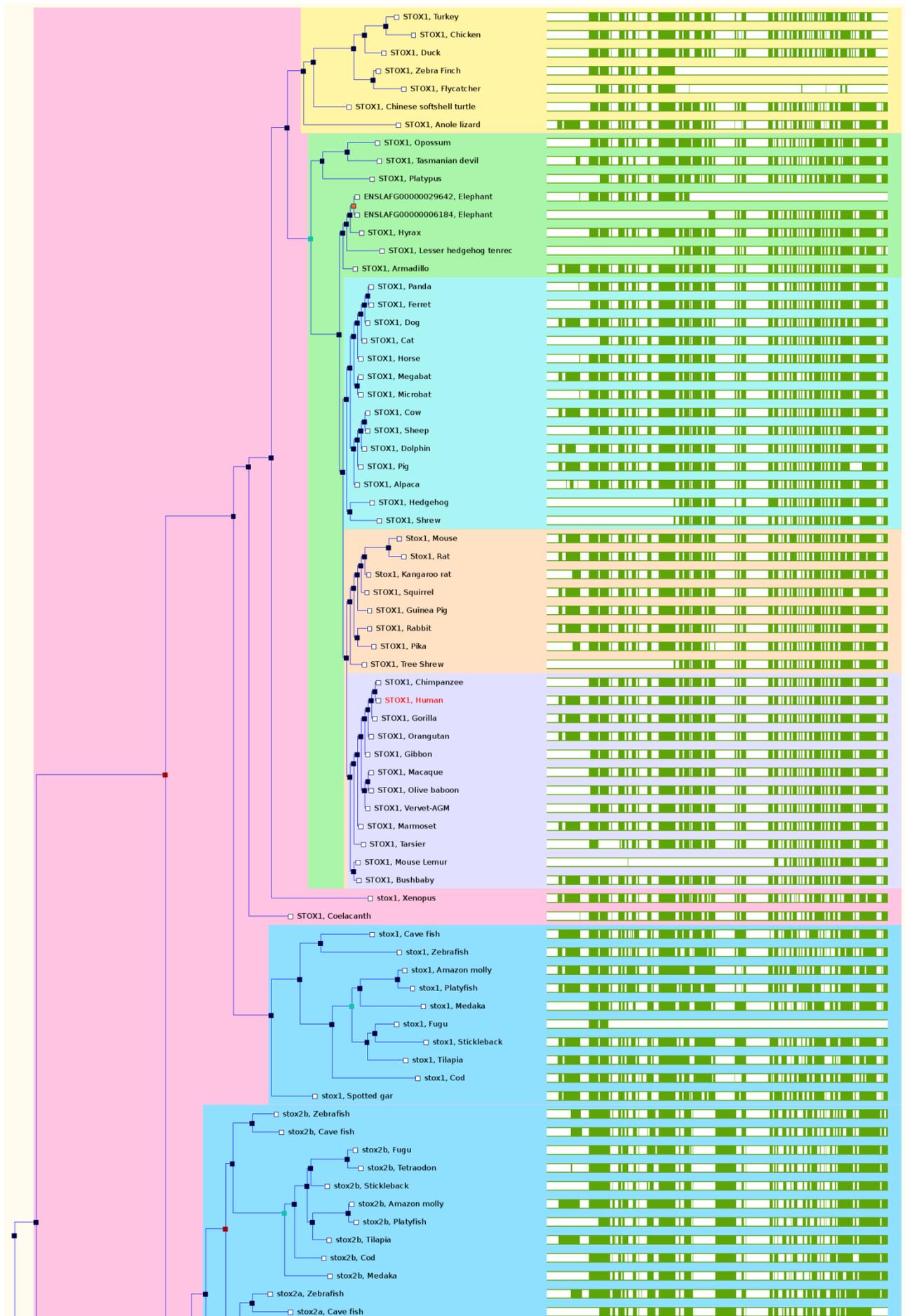
Données générées par le logiciel en ligne *EMBOSS Needle* (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Le pourcentage indiqué en premier en caractère gras correspond au pourcentage d'acides aminés strictement identiques, tandis que le pourcentage indiqué en-dessous entre parenthèses correspond au pourcentage d'acides aminés similaires, par exemple de même charge ou de même hydrophobicité. ko : knockout (homologue de *STOX1* chez la *Drosophile*) ; ham-1 : HSN (hermaphrodite specific motorneurons) abnormal migration 1 (homologue de *STOX1* chez le nématode).

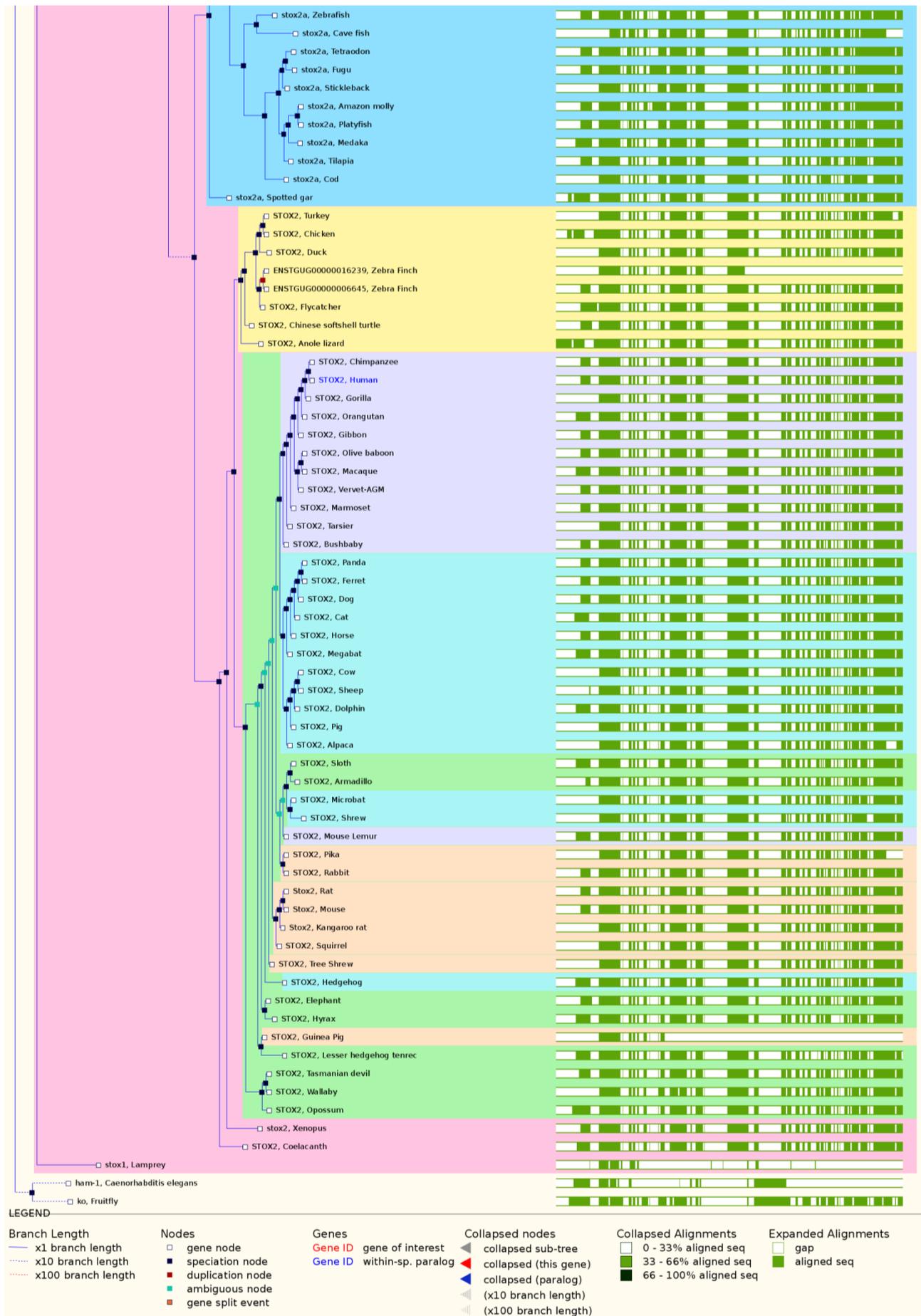
Tableau 11 : caractéristiques génomiques de quelques gènes paralogues et orthologues de *STOX1* humain

Nom du gène (Symbole)	<i>Storkhead box 1</i> (<i>STOX1</i>)	<i>Storkhead box 1</i> (<i>Stox1</i>)	<i>Knockout</i> (<i>ko</i>)	<i>HSN</i> (<i>hermaphrodite</i> <i>specific</i> <i>motorneurons</i>) <i>abnormal</i> <i>migration 1</i> (<i>ham-1</i>)	<i>Storkhead box 2</i> (<i>STOX2</i>)
Espèce	Homme (<i>Homo sapiens</i>)	Souris domestique (<i>Mus musculus</i>)	Drosophile (<i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>)	Nématode (<i>Caenorhabditis</i> <i>elegans</i>)	Homme (<i>Homo sapiens</i>)
Anciens noms	C10orf24 (<i>chromosome 10</i> <i>open reading</i> <i>frame 24</i>), PEE4 (<i>preeclampsia/ec</i> <i>lampsia 4</i>), FLJ25162	Gm63, 4732470K04Rik	Dmel\CG10573, CG10573, FBgn0020294	-	-
Localisation chromosomique	Chromosome 10 (région 10q22.1)	Chromosome 10	Chromosome 3L	Chromosome IV	Chromosome 4 (région 4q35.1)
N° base de début	68 827 541	62 659 043	21 075 581	12 542 034	183 853 431
N° base de fin	68 895 432	62 726 128	21 131 159	12 545 724	184 023 526
Nombre total de paires de base	67 892	67 086	55 578	3 690	170 096
Nombre d'exons et lecture	5 exons sur le brin <i>forward</i>	5 exons sur le brin <i>reverse</i>	8 exons sur le brin <i>reverse</i>	5 exons sur le brin <i>forward</i>	7 exons sur le brin <i>forward</i>
Nombre de transcrits	4	3	2	1	5
Nombre d'isoformes protéiques	3	2	Une seule isoforme de 1 049 acides aminés	Une seule isoforme de 414 acides aminés	3
Nombre de polymorphismes décrits	3 730 SNPs	1 828 SNPs	2 078 SNPs	?	9 215 SNPs
Nombre de paralogues décrits (Symbole)	1 (<i>STOX2</i>)	1 (<i>Stox2</i>)	0	0	1 (<i>STOX1</i>)
Nombre d'éléments régulateurs référéncés dans <i>Ensembl</i>	11	18	0	0	33

Données obtenues à partir du site de *The European Bioinformatics Institute, part of the European Molecular Biology Laboratory* (<http://www.ebi.ac.uk/>) et de la base de données *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Figure 76 : arbre phylogénétique des gènes *Stox1* et *Stox2* d'après la base de données *Ensembl*





4. CONNAISSANCES SCIENTIFIQUES SUR *STOX1*

Aujourd'hui la recherche d'informations sur *STOX1* dans la base de données *Pubmed* nous donne 30 articles scientifiques à consulter, dont certains ont été générés pendant ma thèse. Les recherches autour de ce gène ont pris plusieurs axes, mais on connaît encore peu de choses sur la biochimie des protéines qu'il code.

4.1. *STOX1A* facteur de transcription

Nous avons vu que la protéine *STOX1A* a été définie comme un facteur de transcription, c'est-à-dire une protéine ayant la capacité de se lier à des séquences d'ADN spécifiques et de réguler la transcription. Cependant, on ne connaît ni les séquences avec lesquelles il interagit, ni les gènes qu'il régule directement. Plusieurs équipes ont tenté de répondre à cette question.

En 2008, l'équipe de Daniel Vaiman a surexprimé l'isoforme *STOX1A* dans un modèle cellulaire de choriocarcinomes. Il a été observé de fortes dérégulations transcriptomiques (Rigourd *et al.*, 2008). Des analyses de ChIP-qPCR montrent que l'ADN correspondant à certains promoteurs, comme celui de *TNFSF10* peuvent être co-immunoprécipités avec un anticorps dirigé contre *STOX1A*, ce qui ouvre la voie de cibles putatives directes de *STOX1A*.

En 2010, l'équipe de Oudejans a montré par des expériences de ChIP dans des cellules *SGHPL5* que *STOX1* se liait au promoteur de l'alpha-caténine (*CTNNA3*, *cadherin-associated protein alpha 3*) et que cette interaction était modulée par la phosphorylation (van Dijk *et al.*, 2010d).

Plusieurs auteurs ont déterminé d'autres cibles directes de *STOX1* par ChIP : *CTNNA3* (van Dijk *et al.*, 2010d), *SFRS7* (van Abel *et al.*, 2011), *CCNB1* (van Abel *et al.*, 2012a), *CNTNAP2* (van Abel *et al.*, 2012c).

4.2. *STOX1* et la prééclampsie

Comme vu dans le paragraphe d'introduction, l'implication de *STOX1* dans la prééclampsie a été controversée par plusieurs auteurs. Malgré cela, plusieurs études ont montré, par des expériences *in vitro* ou *in vivo* plus poussées, que ce gène pouvait être lié aux symptômes de la prééclampsie.

En 2008, il a été montré que la surexpression du gène dans une lignée de choriocarcinomes humains (JEG-3) entraînait des altérations transcriptomiques très significativement corrélées à celles observées dans des placentas prééclamptiques (Rigourd *et al.*, 2008).

En 2009, une analyse du transcriptome de biopsies placentaires du premier trimestre de la grossesse a révélé que l'expression de *STOX1* était significativement plus importante (2,1 fois) dans les villosités chorales de femmes qui ont ensuite développé une prééclampsie (S. A. Founds *et al.*, 2009). L'augmentation d'expression protéique de *STOX1* dans des placentas prééclamptiques a été trouvée plus tard dans d'autres cohortes (G. Zhao *et al.*, 2013).

En 2010, l'équipe de Oudejans a montré par des expériences *in vitro* et *ex vivo* que *STOX1* augmentait l'expression du gène de l'alpha-caténine (*CTNNA3*, *cadherin-associated protein alpha 3*), protéine d'adhésion cellulaire, et diminuait alors l'invasion trophoblastique (van Dijk *et al.*, 2010d). Ce fut la première fois qu'un lien physiopathologique a été établi entre *STOX1* et la prééclampsie, en particulier concernant la modulation directe d'un des premiers stades du syndrome qu'est le défaut d'invasion des trophoblastes extravilleux au cours du premier trimestre. Ainsi, la surexpression précoce de *STOX1* pourrait être une caractéristique d'une placentation anormale conduisant à la prééclampsie. Il a d'ailleurs été montré plus tard que la surexpression de l'alpha-

caténine dans le placenta causait des défauts d'invasion trophoblastiques, même si cette surexpression ne cause pas de mort embryonnaire (Tyberghein *et al.*, 2012).

En 2013, l'équipe de Marie van Dijk a montré que le rôle de *STOX1* dans la prééclampsie passait peut-être par l'action du gène *NODAL* (Thulluru *et al.*, 2013). Par des expériences *ex vivo*, il a été montré que la répression de *NODAL* dans la décidue pouvait augmenter l'expression de *NODAL* et de *STOX1* dans le modèle cellulaire de trophoblastes extravilleux SGHPL5, et que cette induction pourrait passer par l'augmentation de l'expression de l'activine-A (*INHBA*) dans la décidue. Or *NODAL* et *INHBA* sont deux gènes qui ont été impliqués dans la prééclampsie. *NODAL* a été trouvé surexprimé dans les placentas prééclamptiques (Nadeem *et al.*, 2011) et l'activine-A a été retrouvée augmentée dans le sérum de patientes prééclamptiques (Giguère *et al.*, 2010).

Enfin, en 2013, l'équipe de Daniel Vaiman a montré dans un modèle murin que la surexpression de *STOX1* dans l'unité foeto-placentaire induit un phénotype prééclamptique sévère comprenant : une hypertension gestationnelle apparaissant *de novo*, une protéinurie, des altérations histologiques placentaires et rénales, et des taux sériques élevés de sFlt1 (*soluble fms-like tyrosine kinase 1*) et de sEng (endogline soluble) qui sont deux marqueurs sériques retrouvés également chez les femmes prééclamptiques (Doridot *et al.*, 2013). L'équipe a également pu montrer que ces symptômes étaient prévenus ou atténués par un traitement à l'aspirine. Ces dernières données ont permis d'asseoir enfin le rôle du gène *STOX1* dans la prééclampsie.

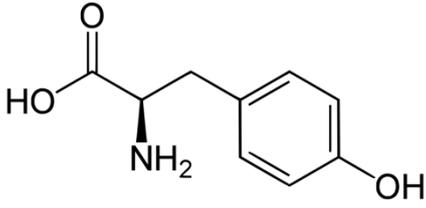
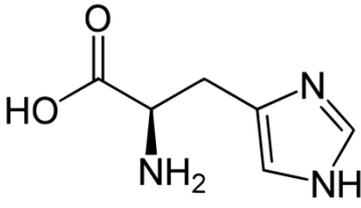
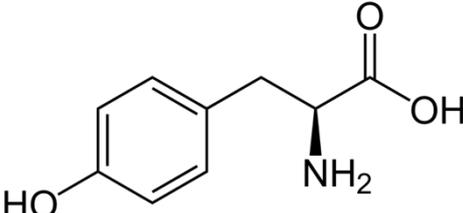
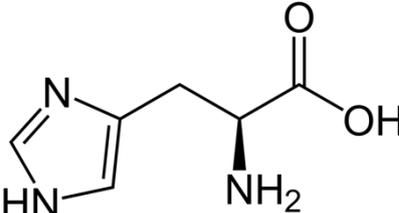
4.3. Le polymorphisme Y153H

STOX1 est le premier gène dont un variant (Y153H) a été associé à cette maladie (van Dijk *et al.*, 2005). Cette association indiquait que des femmes enceintes ayant un génotype HH ou YH avaient un plus grand risque de développer une prééclampsie que les femmes ayant un génotype YY. Cette corrélation a initié une polémique autour du lien entre *STOX1* et la prééclampsie car ce polymorphisme est en réalité fréquent dans plusieurs populations. Lorsque l'on regarde par exemple dans la base de données dbSNP de NCBI on trouve les deux polymorphismes à des fréquences supérieures à 10 % dans les populations étudiées, ce qui est peu compatible avec l'épidémiologie de la prééclampsie (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1341667). C'est pourquoi plusieurs auteurs n'ont pas retrouvé de lien significatif entre le polymorphisme Y153H et la prééclampsie (Berends *et al.*, 2007 ; Fenstad *et al.*, 2010 ; Iglesias-Platas *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2009). Malgré ces données, les premiers auteurs ont montré par des études fonctionnelles que ce polymorphisme pouvait modifier le rôle de la protéine *STOX1* et donc être lié à la prééclampsie (van Dijk *et al.*, 2010c).

Tout d'abord, au moment de la découverte du gène, le polymorphisme a été décrit comme mutagène car il touche une région du domaine de liaison à l'ADN fortement conservée dans les autres espèces (**Figure 68**). De plus, d'après les caractéristiques biochimiques des deux acides aminés (**Tableau 12**), on peut supposer que le passage d'un acide aminé neutre – tyrosine – à un acide aminé chargé – histidine – à pH7 peut changer l'interaction de la protéine avec l'ADN.

En 2010, l'équipe de Oudejans a montré par des expériences *in vitro* et *ex vivo* que les effets de *STOX1* sur l'expression du gène de l'alpha-caténine (*CTNNA3*, *cadherin-associated protein alpha 3*) et sur l'invasion trophoblastique étaient plus importants pour le génotype HH que pour le génotype YY (van Dijk *et al.*, 2010d), faisant penser à un effet de suractivation du génotype HH par rapport au génotype YY. Il a également été montré la même année que ce polymorphisme pouvait conditionner la méthylation d'un îlot CpG dans l'intron 1 de *STOX1* (van Dijk *et al.*, 2010a).

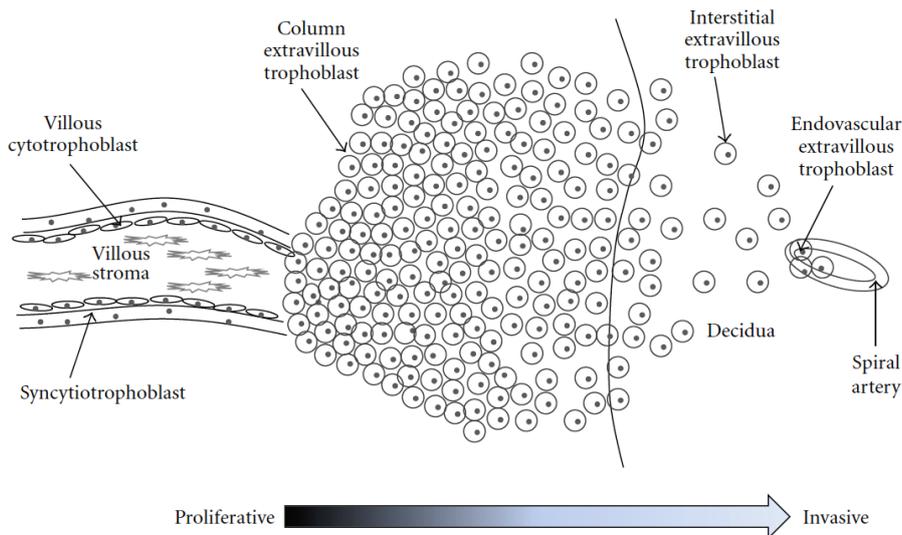
Tableau 12 : comparaison des caractéristiques biochimiques des acides aminés histidine et tyrosine

Acide aminé	Tyrosine	Histidine
Abréviation	Tyr	His
Code	Y	H
Masse molaire	181,1912	155,1563
pI	5,64	7,60
pKa (α -COOH)	2,20	1,80
pKb (α -NH ₃)	9,21	9,33
pKc (chaîne latérale)	10,46	6,04
Nature de la chaîne latérale	Polaire (hydrophile) et aromatique	Polaire (hydrophile) et basique (chargée positivement à pH neutre)
Codons d'ARN messager	UAU UAC	CAU CAC
Occurrence (% dans les protéines humaines)	3,2	2,3
Structure D ou R(+)		
Structure L ou S(-)		

4.4. *STOX1* comme gène soumis à empreinte

La découverte du gène *STOX1* a amené les premiers auteurs à le définir comme un gène soumis à empreinte à expression maternelle (van Dijk *et al.*, 2005). Cette première affirmation a été remise en cause deux ans après la découverte du gène, lorsque des auteurs ont regardé l'expression du gène et la méthylation de son promoteur dans plusieurs tissus dont le placenta (Iglesias-Platas *et al.*, 2007) et n'ont observé ni expression allèle-spécifique ni méthylation différentielle. Cette remise en cause a amené les premiers auteurs à répondre en 2010 par un article décrivant une méthylation différentielle dans une autre région du gène (van Dijk *et al.*, 2010a). Les auteurs ont pu montrer la présence d'un îlot CpG dans l'intron 1 de *STOX1* contrôlant l'expression du gène, une diminution de l'expression étant observée en cas de méthylation de cette région. La méthylation de cette région dépendrait *in vivo* du polymorphisme Y153H. Enfin, il a été observé que l'allèle paternel de *STOX1* était méthylé dans les cytotrophoblastes extravilleux des colonnes. La région étudiée semble pouvoir expliquer l'observation des premiers auteurs dans les môles hydatiformes. Ces effets combinés peuvent être résumés dans la **Figure 77**.

Figure 77 : effets de la méthylation de *STOX1* dans les types cellulaires d'une villosité choriale



D'après van Dijk et Oudejans, 2011. Sous le schéma montrant différents types cellulaires au sein ou provenant de la villosité, un tableau montre le profil de méthylation de *STOX1*, observé ou hypothétique, dans les différents types cellulaires. YY : placenta homozygote pour l'allèle Y ; HH : placenta homozygote pour l'allèle HH ; uu : les deux allèles ne sont pas méthylés (*unmethylated*) ; mm : les deux allèles sont méthylés (*methylated*) ; um : empreinte (un seul allèle est méthylé).

	Villous stroma	Syncytiotrophoblast	Villous cytotrophoblast	Column extravillous trophoblast	Interstitial/endovascular extravillous trophoblast
YY	uu and mm	uu and mm	um	um	uu
HH	uu↓ and mm↑	uu↓ and mm↑	um	um	uu

Finalement, le statut d'empreinte de *STOX1* et sa méthylation ne sont pas encore complètement déterminés. Il semble toutefois que ces paramètres dépendent du tissu, voire du type cellulaire, et du polymorphisme qu'il porte.

4.5. *STOX1*, le système nerveux et la maladie d'Alzheimer

Bien que la prééclampsie et la maladie d'Alzheimer n'ont aucun point commun d'un point de vue clinique, la région chromosomique 10q22 a été associée à ces deux syndromes. Étant donné son taux d'expression dans le cerveau (voir paragraphes précédents), des auteurs ont voulu tester si le gène *STOX1* pouvait être impliqué dans la LOAD (*late-onset Alzheimer disease*, maladie d'Alzheimer tardive) et plus généralement s'il pouvait avoir un rôle dans les cellules nerveuses.

Les premiers auteurs ont montré que le taux d'expression du gène dans l'hippocampe cérébral était corrélé à la sévérité de la maladie (van Dijk *et al.*, 2010b). Par des approches *in vitro*, ils ont également montré que la surexpression de *STOX1* dans des cellules neuronales activait la transcription du gène *LRRTM3* (*Leucine Rich Repeat Transmembrane Neuronal 3*) et entraînait une activation de la voie de production de peptides bêta-amyloïdes, dont l'accumulation est un signe caractéristique de la maladie d'Alzheimer (van Dijk *et al.*, 2010b). Cette voie d'activation a d'ailleurs été retrouvée dans la lignée cellulaire trophoblastique SGHPL5.

D'autres auteurs ont montré par des expériences de ChIP-seq que *STOX1* était capable d'activer directement la transcription du gène *SFRS7* (*serine/arginine-rich splicing factor 7*) dans des cellules gliales SK-N-SH et U-373 MG (van Abel *et al.*, 2011). Cette surexpression a été associée à une modification de l'épissage ainsi qu'à une augmentation d'expression de la protéine tau (MAPT, *microtubule-associated protein tau*), protéine connue pour avoir un rôle dans les maladies neurodégénératives.

Il a été montré également par ChIP dans des cellules SK-N-SH que la protéine *STOX1A* pouvait avoir comme cible directe *CNTNAP2* (*contactin-associated protein-like 2*), qui est un gène codant

une protéine faisant partie de la famille des neurexines, molécules jouant un rôle d'adhésion cellulaire et de récepteur dans le système nerveux (van Abel *et al.*, 2012c). Il a été montré dans le même article que la surexpression de STOX1A diminuait l'expression du gène *CNTNAP2*, ce qui est également retrouvé dans l'hippocampe des patients atteints de LOAD.

Enfin, dans des cellules SH-SY5Y surexprimant STOX1A et la plus longue isoforme humaine de la protéine tau, il a été montré que STOX1A provoquait la phosphorylation de la protéine tau sur des résidus spécifiquement impliqués dans les dégénérescences neurofibrillaires retrouvés dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (van Abel *et al.*, 2012b).

4.6. *STOX1* et le cycle cellulaire

D'après les auteurs du papier princeps, *STOX1* pourrait contrôler la polyploïdisation (van Dijk *et al.*, 2005).

Des auteurs ont montré par la suite dans des cellules de neuroblastome SH-SY5Y transfectées stablement que *STOX1* dérégulait de nombreux gènes majeurs du cycle cellulaire (van Abel *et al.*, 2012a). Ils ont par ailleurs montré par ChIP que STOX1A se liait au promoteur de la cycline B1 (*CCNB1*), augmentait son expression et promouvait ainsi l'entrée des cellules en mitose.

D'autres auteurs ont également étudié Stox1 murin dans les cellules épithéliales de l'oreille interne et ont montré que sa surexpression augmentait la prolifération cellulaire et augmentait l'expression de gènes du cycle cellulaire comme PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), la cycline A et la cycline E (Nie *et al.*, 2015). De plus, cet effet prolifératif semble faire intervenir la voie Akt, supposée réguler l'entrée de la protéine Stox1 dans le noyau (van Dijk *et al.*, 2005).

5. CONCLUSION DE CE DERNIER CHAPITRE : *STOX1*, UN GÈNE PLURIFONCTION ?

Le rôle du gène *STOX1* s'éclaircit d'année en année mais reste toujours mystérieux. Il semble clairement impliqué dans la prééclampsie et la maladie d'Alzheimer et son rôle dans le système nerveux et le placenta semble bien établi. Si son rôle de facteur de transcription n'a pas encore été *stricto sensu* démontré, sa surexpression dans des modèles cellulaires modifie l'expression de nombreux gènes. Plusieurs voies cellulaires semblent régulées par *STOX1* comme la mitose, le cycle cellulaire, l'adhésion ou la migration cellulaire. En ce sens, l'étude des orthologues de *STOX1* semble intéressante car ces différentes fonctions sont retrouvées chez d'autres espèces même éloignées comme *Caenorhabditis elegans*.

STOX1 est donc un gène encore nouveau, dont les mécanismes d'action directe restent encore à découvrir. La recherche de la séquence consensus du site de fixation des protéines STOX1A et STOX1B, la recherche de leurs partenaires respectifs et une meilleure compréhension des signaux d'entrée dans le noyau de la protéine STOX1A feraient sans doute avancer les connaissances sur ce gène et ses isoformes.

DEUXIÈME PARTIE : DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

1. PRÉSENTATION DE L'ÉQUIPE

J'ai réalisé ma thèse à l'Institut Cochin de Paris, dans l'équipe du docteur Daniel Vaiman intitulée « Génomique, Épигénétique et Physiopathologie de la Reproduction ». Les travaux de l'équipe se situent à l'interface des études cliniques et fondamentales concernant les troubles de la reproduction humaine. Les programmes de recherche développés dans l'équipe visent à déchiffrer les bases scientifiques de divers aspects de la physiologie de la reproduction et à élucider les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les maladies de la reproduction les plus fréquentes. Ainsi, certains membres de l'équipe travaillent sur la stérilité résultant d'anomalies de la différenciation des spermatozoïdes, d'autres sur les maladies de la grossesse qui affectent la mère et/ou le fœtus, comme la prééclampsie (site de l'Institut Cochin : <http://cochin.inserm.fr/>). Les travaux du laboratoire sont essentiellement basés sur des modèles cellulaires ainsi que sur des matériels biologiques humains (ARNs placentaires, ADN de patientes, plasmas de patientes), mais aussi sur certains modèles de souris.

2. PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE RECHERCHE

2.1. Intégration de mon travail dans la thématique de l'équipe

Les membres de l'équipe avec qui j'ai travaillé s'intéressent essentiellement au rôle du placenta dans les maladies de la grossesse. Le placenta et le lien entre cet organe et l'endomètre, est d'un grand intérêt pour l'équipe car : (i) le placenta est un site majeur pour l'expression d'une catégorie de gènes des Mammifères appelés gènes soumis à empreinte, (ii) la dysfonction placentaire est associée à des maladies de la grossesse très fréquentes, dont le retard de croissance intra-utérin et la prééclampsie, qui constituent les deux principaux sujets du groupe (site de l'Institut Cochin).

Comme vu précédemment, il reste de nombreuses inconnues dans les mécanismes moléculaires physiopathologiques de la prééclampsie, avec néanmoins des facteurs de prédisposition génétique reconnus et démontrés (Cnattingius *et al.*, 2004). La recherche autour de la prééclampsie au laboratoire s'est focalisée sur l'étude des régulations génétiques – transcriptome – et épigénétiques – méthylation, miARN – dans le placenta, dans des modèles cellulaires ou des modèles animaux. Parmi les gènes ayant été impliqués dans la prééclampsie, le gène *STOX1* a retenu l'attention du groupe.

Je me suis intéressé au rôle de *STOX1* dans la physiopathologie de la prééclampsie, et plus généralement à sa fonction dans le placenta.

2.2. Objectifs de l'étude

L'objectif de ce travail peut se résumer par la question suivante : comment la surexpression de *STOX1* dans le placenta peut déclencher l'apparition d'une prééclampsie ? Plusieurs questions sous-jacentes émergent de cet objectif :

- Quelle est la fonction cellulaire physiologique de la protéine *STOX1* dans les trophoblastes ?
- Quelle fonction cellulaire de *STOX1* est impliquée dans les mécanismes physiopathologiques de la prééclampsie ?

- La protéine STOX1A (isoforme la plus longue) a-t-elle uniquement une fonction de facteur de transcription ? En tant que facteur transcriptionnel, quels sont ses gènes cibles directs ? Par ailleurs, quelle est sa fonction dans le cytoplasme et comment lié ces fonctions à la prééclampsie ?

2.3. Approches retenues

Pour traiter ces questions, nous avons choisi des approches de biologie cellulaire et moléculaire, en adéquation avec les domaines de compétences des membres de l'équipe, en collaborations au sein de l'Institut Cochin (équipes et plateformes) ou en dehors.

Les deux grandes approches retenues sont :

- une approche mécanistique (*in vitro*) dont le but est d'étudier le rôle moléculaire de STOX1 dans des cellules modèles trophoblastiques ;
- une approche biologique chez la souris (*in vivo*) dont le but est de mieux comprendre les mécanismes d'apparition du phénotype prééclampsique chez la souris. Ce modèle est à notre connaissance et à ce jour 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.

2.4. Collaborations

- Équipe « Modèles animaux et Différenciation Tissulaire » (MoDiT) dirigée par Jean-Luc Vilotte, INRA Jouy-en-Josas. Cette équipe analyse la fonction biologique de gènes impliqués dans le développement et la différenciation tissulaire et/ou récemment trouvés associés à des défauts du développement précoce, pouvant affecter le tissu nerveux. Leurs analyses s'appuient principalement sur la production sur place de modèles transgéniques souris (site de l'INRA : <http://www6.jouy.inra.fr/gabi/les-Recherches/Equipes-de-recherche/MoDiT>). Cette collaboration toujours d'actualité nous a permis de créer et d'étudier le modèle souris STOX1 au sein de leur animalerie, et de développer de nouveaux modèles murins par transgénèse d'un BAC humain contenant le gène entier. Ce dernier modèle est en cours d'étude.
- Groupe de Miria Ricchetti à l'Institut Pasteur. L'équipe travaille, au sein du département de Biologie du développement et cellules souches, sur les mécanismes moléculaire du vieillissement cellulaire en étudiant les cellules souches, les mitochondries, le stress oxydatif et la réparation de l'ADN dans le cadre de maladies humaines comme la progéria (vieillesse accélérée). Nous avons beaucoup travaillé avec un chercheur permanent de l'équipe, Laurent Châtre, pour étudier de nombreux aspects du stress oxydatif et des altérations mitochondriales liées à STOX1 dans les cellules trophoblastiques.
- Équipe « Expression génétique, Développement et Pathologies » dirigée par Marco Pontoglio à l'Institut Cochin. Cette équipe étudie la fonction d'une famille de facteurs de transcription, les facteurs HNF1alpha et beta, jouant un rôle important dans la morphogenèse et la différenciation des épithélia. Nous avons collaboré avec cette équipe afin d'étudier les relations entre les facteurs HNF, STOX1 et l'aspirine.
- Équipe « Stress oxydant, prolifération cellulaire et inflammation » dirigée par Frédéric Batteux à l'Institut Cochin. Ce groupe étudie le rôle des anomalies de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la physiopathologie des maladies caractérisées par une prolifération et/ou une inflammation excessive comme les cancers ou les hépatites. Nous avons récemment beaucoup travaillé avec un membre de l'équipe, Christiane Chéreau, pour étudier l'impact de drogues pro- ou anti-oxydantes sur des trophoblastes surexprimant STOX1.
- Lena Erlandsson, département d'obstétrique et gynécologie à l'université de Lund, Suède. Le département travaille sur divers aspects diagnostiques et thérapeutiques autour des maladies de la grossesse. En particulier, Lena Erlandsson travaille sur une molécule capable de lier et de dégrader

l'hème fœtal : l'alpha-1-microglobuline. Cette molécule est candidate pour le traitement de la prééclampsie car l'hémoglobine fœtale a été montrée comme augmentée dans les plasmas de femmes prééclamptiques (Olsson *et al.*, 2010). Nous avons collaboré avec l'équipe pour tester cette molécule sur les souris STOX1.

- L'équipe d'accueil « Gamètes, Implantation, Gestation (GIG) » co-dirigée par Marie-Noëlle Dieudonné à l'UFR des Sciences de la Santé Simone Veil à Montigny-le-Bretonneux. L'équipe travaille sur l'impact du micro-environnement (*in vivo* et *in vitro*) sur le développement embryonnaire et le déroulement de la grossesse. Elle peut avoir accès à des matériaux biologiques comme des échantillons de villosités chorales. Dans ce cadre, nous avons collaboré afin de réaliser des expériences de transfection de siARN dirigés contre STOX1/STOX2 dans des cytotrophoblastes villex issus de placentas de premier trimestre.

Notons également qu'en dehors de ces collaborations étroites, notre modèle souris a été envoyé à plusieurs équipes dans le monde qui vont travailler sur d'autres aspects de la prééclampsie : Espagne, Université de Salamanque (Dr Lopez-Novoa, intéressé par la pathologie rénale associée à la prééclampsie), Grande Bretagne, Université de Birmingham (équipe d'Asif Ahmed, étude de Hmox1), Japon, Jichi Medical University School of Medicine, Tochigi, Japan (Equipe de A Ohkuchi, intéressée par l'inflammosome dans la prééclampsie), Allemagne, Hôpital la Charité, Berlin (Pr Ralf Dechend, immunité de la prééclampsie).

3. DONNÉES PRÉLIMINAIRES ET MODÈLES D'ÉTUDE

Depuis 2005, l'équipe a généré de nombreuses données et modèles d'études pour STOX1. D'après les premières descriptions biochimiques (van Dijk *et al.*, 2005), il semblait que la prééclampsie soit associée à la surexpression de STOX1 plutôt qu'à sa répression dans le placenta. L'équipe a donc pris le parti d'étudier l'effet de la surexpression de STOX1 dans un modèle cellulaire et animal.

- L'équipe a généré un modèle cellulaire trophoblastique – cellules JEG-3 – surexprimant STOX1A. Le transcriptome de ces cellules a révélé que la surexpression de STOX1A engendré des dérégulation transcriptomiques corrélées à celles retrouvées dans des placentas prééclamptiques (Rigourd *et al.*, 2008).

- Suite à ces résultats et à d'autres publications confortant l'idée que la surexpression de STOX1 est associée à la prééclampsie (S A Founds *et al.*, 2009 ; van Dijk *et al.*, 2010e), l'équipe a généré un modèle de souris transgénique surexprimant STOX1. Lorsque des souris femelles sauvages sont croisées avec des mâles transgéniques (ce qui permet la restriction de l'expression du transgène à la sphère fœto-placentaire), les femelles gestantes développent un syndrome prééclamptique sévère, associant une hypertension sévère (pression artérielle systolique > 160 mmHg), une protéinurie, une élévation de marqueurs sériques de la prééclampsie (sFlt1 et sEng) et des dépôts de fibrine sur les glomérules rénaux (Doridot *et al.*, 2013). Tous ces symptômes sont absents lorsque les souris gestantes sont traitées à l'aspirine. Les modifications physiopathologiques observées chez les souris surexprimant *STOX1* dans l'unité fœto-placentaire 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 à notre connaissance et à ce jour 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.

4. PLAN DU TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

4.1. Étude du stress oxydatif *in vitro* et *in vivo*

Comme énoncé dans la première partie, le stress oxydatif est un mécanisme fortement incriminé au cours des mécanismes précoces de la prééclampsie. Mais l'origine de cette étude vient de l'analyse du transcriptome placentaire des souris transgéniques, dans lequel il a été observé une forte dérégulation de gènes liés à la mitochondrie. Plusieurs groupes de gènes parmi ceux trouvés étaient cohérents avec le transcriptome des cellules JEG surexprimant STOX1. Il a donc été décidé d'explorer les fonctions mitochondriales et la production de radicaux libres *in vitro* (dans les cellules JEG) et *in vivo* (dans les placentas de souris). Ce travail a été effectué en collaboration avec le groupe de Miria Ricchetti à l'Institut Pasteur, et a donné lieu à une publication début 2014.

4.2. Étude du phénotype des cellules endothéliales de souris gestantes

Après avoir caractérisé le modèle de souris nouvellement créé, nous avons voulu explorer les mécanismes physiopathologiques du syndrome dans ce modèle, en particulier concernant les conséquences cardiovasculaires, difficiles à étudier chez les patientes. Nous avons ainsi étudié le cœur et les cellules endothéliales de souris gestantes, au niveau transcriptomique et histologique. Comme décrit dans la première partie, les cellules endothéliales sont les cellules qui bordent l'intérieur des vaisseaux sanguins et qui sont en étroite relation à la fois avec les cellules musculaires lisses des vaisseaux et à la fois avec tous les constituants du sang. Ces cellules sont capables de moduler la contraction des cellules musculaires des vaisseaux, et donc potentiellement de générer une hypertension. La dysfonction endothéliale a ainsi été montrée comme une caractéristique de la prééclampsie (Sánchez-Aranguren *et al.*, 2014). Le modèle souris nous a permis d'extraire et de purifier des cellules endothéliales musculaires de souris gestantes et d'étudier leur transcriptome par RNAseq. Ce travail a donné lieu à une publication début 2016.

4.3. Étude du lien entre STOX1, les facteurs HNF et l'aspirine

L'analyse du transcriptome des placentas de souris traitées à l'aspirine nous a mis sur la voie des facteurs HNF : nous avons observé que les gènes dérégulés par l'aspirine étaient différents des gènes dérégulés par la surexpression de STOX1 et faisaient partie de la cascade de la coagulation. De plus, parmi les gènes dérégulés par l'aspirine, une analyse des promoteurs a révélé une prédominance de sites de fixation pour les facteurs de transcription de la famille HNF. Nous avons donc voulu explorer les potentielles relations moléculaires entre STOX1, les facteurs HNF et l'aspirine par des approches moléculaires et fonctionnelles. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Marco Pontoglio à l'Institut Cochin. Un article sur ces travaux est en cours d'écriture.

4.4. Autres travaux menés en parallèles

- Recherche du site de fixation à l'ADN de STOX1A et STOX1B
- Test de l'alpha-1-microglobuline sur le modèle de souris STOX1

Je détaillerai quelques-uns de ces résultats dans la partie « résultats non publiés »

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS

ARTICLE 1. NITROSO-REDOX BALANCE AND MITOCHONDRIAL HOMEOSTASIS ARE REGULATED BY *STOX1*, A PRE-ECLAMPSIA-ASSOCIATED GENE

ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING
Volume 21, Number 6, 2014
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ars.2013.5661



ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

Nitroso-Redox Balance and Mitochondrial Homeostasis Are Regulated by *STOX1*, a Pre-Eclampsia-Associated Gene

Ludivine Doridot^{1,2,*} Laurent Châtre^{3,4,*} Aurélien Ducat^{1,2} Jean-Luc Vilotte⁵ Anne Lombès^{1,2}
Céline Méhats^{1,2} Sandrine Barbaux^{1,2} Rosamaria Calicchio^{1,2} Miria Ricchetti^{3,4,†} and Daniel Vaiman^{1,2,†}

Abstract

Aims: Storkhead box 1 (*STOX1*) is a winged-helix transcription factor that is implicated in the genetic forms of a high-prevalence human gestational disease, pre-eclampsia. *STOX1* overexpression confers pre-eclampsia-like transcriptomic features to trophoblastic cell lines and pre-eclampsia symptoms to pregnant mice. The aim of this work was to evaluate the impact of *STOX1* on free radical equilibrium and mitochondrial function, both *in vitro* and *in vivo*. **Results:** Transcriptome analysis of *STOX1*-transgenic versus nontransgenic placentas at 16.5 days of gestation revealed alterations of mitochondria-related pathways. Placentas overexpressing *STOX1* displayed altered mitochondrial mass and were severely biased toward protein nitration, indicating nitroso-redox imbalance *in vivo*. Trophoblast cells overexpressing *STOX1* displayed an increased mitochondrial activity at 20% O₂ and in hypoxia, despite reduction of the mitochondrial mass in the former. *STOX1* overexpression is, therefore, associated with hyperactive mitochondria, resulting in increased free radical production. Moreover, nitric oxide (NO) production pathways were activated, resulting in peroxynitrite formation. At low oxygen pressure, *STOX1* overexpression switched the free radical balance from reactive oxygen species (ROS) to reactive nitrogen species (RNS) in the placenta as well as in a trophoblast cell line. **Innovation:** In pre-eclamptic placentas, NO interacts with ROS and generates peroxynitrite and nitrated proteins as end products. This process will deprive the maternal organism of NO, a crucial vasodilator molecule. **Conclusion:** Our data posit *STOX1* as a genetic switch in the ROS/RNS balance and suggest an explanation for elevated blood pressure in pre-eclampsia. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 819–834.

Introduction

PRE-ECLAMPSIA, A WIDESPREAD disease of pregnancy, affects 2%–8% of women (66) and is responsible for 50,000 maternal deaths worldwide (9). This syndrome, characterized by *de novo* hypertension and proteinuria, is considered to originate from placental defects (35). Usually, uterine arteries are invaded by extra-villous cytotrophoblasts that reach the first third of the myometrium, replace maternal endothelial cells and, ultimately, adopt an endothelial phenotype. Consistently, oxygen pressure progresses from 1.5–2% during early gestation to around 10% at late time points

(33). In pre-eclamptic pregnancies, maternal uterine arteries are not deeply colonized, resulting in insufficient or irregular blood flow to the fetus (25). A landmark of hypoxia, the hypoxia-inducible miRNA miR-210 (15), is up-regulated in pre-eclampsia (32). Transitory local hypoxic/hyperoxic changes exceedingly erode the syncytiotrophoblast and shed debris into maternal circulation. These debris release vasoactive substances such as endothelin 1 (55) and anti-angiogenic factors (notably sFLT-1 and sENG), thus contributing to the maternal systemic endothelial injury.

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) have been associated with pre-eclampsia (46,

¹Department of Development, Reproduction, and Cancer, Institut Cochin, INSERM U1016, Paris, France.

²CNRS UMR8104, Faculté Paris Descartes, Paris, France.

³Unité de Génétique Moléculaire des Levures, Institut Pasteur, Paris, France.

⁴Team Stability of Nuclear and Mitochondrial DNA, CNRS UMR 3525, Paris, France.

⁵INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, France.

*These authors contributed equally to the experiments presented in this article.

†These authors contributed equally to the management of the research presented in this article.

Innovation

In this study, we show that a unique transcription factor, storkhead box 1 (STOX1), induces opposite O₂-dependent effects on reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) production *in vitro* as well as *in vivo* in a murine model of pre-eclampsia. We show a striking predominance of RNS in STOX1 transgenic placentas, suggesting that NO is rapidly associated with ROS and generates ONOO⁻. This would deprive endothelial cells from the essential vasodilating action of NO, thereby giving a rationale to the systemic hypertension of mice with transgenic (pre-eclamptic) placentas. Nitroso-redox imbalance could be considered the causative element in pre-eclampsia-induced hypertension and other vascular diseases. These observations may have implications for human pathogenesis and therapeutics.

57, 74). Mitochondrial mass (mitochondria being major sources of ROS/RNS) is increased in pre-eclamptic placentas (72). However, when cytotrophoblast cells are isolated from these defective placentas, the expression of mtDNA and nuclear respiratory factor 1 (NRF1) (linked to the mitochondrial mass) is abnormally low (43). Proteomics analysis of severe pre-eclamptic placentas revealed altered mitochondria-related pathways such as fatty acid oxidation (4), ROS generation, and oxidative stress (64).

Overexpression of the storkhead box 1 (STOX1) transcription factor (71) induces transcriptome alteration, mimicking pre-eclampsia in choriocarcinoma JEG-3 cells, used as proxies for trophoblast cells (56), and induces a pre-eclampsia-like syndrome *in vivo* in a transgenic mouse model (18). Major transcriptome alterations in cells overexpressing STOX1 involve several cellular pathways, among which the mitochondrial function is highly represented (56). This prompted us to further investigate how STOX1 regulates the mitochondrial function and ROS/RNS balance. In the present study, STOX1 overexpression in transgenic placentas and trophoblast cells strongly altered the ROS/RNS metabolism and mitochondrial function. The novel transcription factor STOX1 appears as a major regulator of the nitroso-redox balance and mitochondrial homeostasis, possibly depriving the maternal vascular system of nitric oxide (NO), a major agent of endothelium health. In cells overexpressing STOX1, the major hypoxamir miR-210 (29) is virtually extinguished, suggesting that trophoblast cells become unable to adapt to low O₂ concentration.

Results*STOX1 placentas display massive deregulation of genes involved in mitochondrial function*

The transcriptomes of 16.5 days post fertilization (dpc) transgenic *versus* wild-type (WT) placentas were compared, using Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, see Materials and Methods section). Among 962 gene groups or pathways analyzed, 373 were identified as significant (false discovery rate [FDR] <0.25). Strikingly, 12 out of 13 mitochondria-related pathways belonged to this group ($p = 6.6 \times 10^{-5}$, with FDR ranging from 0.017 to 0.21). The list of pathways and

gene groups is provided in Supplementary Table S1 (Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/ars). As an example, genes relevant to the cluster "Mitochondrial Part" are listed in Supplementary Figure S1, and Supplementary Table S2. In sum, major alterations of gene expression in STOX1 transgenic placentas at 16.5 days of gestation clearly targeted mitochondria, confirming the data obtained in the cellular model.

STOX1 overexpression in transgenic placentas induces altered mitochondrial mass and nitroso-redox imbalance

The mitochondrial mass, evaluated by the steady-state immunofluorescence of the outer membrane mitochondrial marker TOM22 (39), was significantly higher (approximately fourfold) in pre-eclamptic than in control placentas, at least in the Labyrinth and the Junctional zone (Fig. 1A, B), similar to what is observed in human pre-eclamptic placentas (43). TOM22 (and porine voltage-dependent anion channel [VDAC]) global increase in pre-eclamptic placentas was confirmed by Western blots (Fig. 1C). This result prompted us to analyze free radical production in placentas. For this, we evaluated the steady-state levels of protein oxidative adducts, either (ROS-dependent) carbonylation or (RNS-dependent) nitration (65, 69), using dinitrophenyl or 3-nitrotyrosine immunostaining, respectively. We observed a striking signal inversion between transgenic and nontransgenic placentas (Fig. 1D, E). Transgenic placentas displayed dramatically higher levels of nitrated proteins and lower levels of carbonylated proteins than controls, in each placental compartment. These *in vivo* results point to STOX1 as a crucial regulator of the nitroso-redox balance in the placenta.

STOX1 overexpression deregulates genes involved in the response to hypoxia, redox balance, nitric oxide, and energy metabolism

We then analyzed gene expression in JEG-3 trophoblasts [control and STOX1^{High}, obtained in a previous study (56)] by RT-qPCR; primers are described in Supplementary Table S3. Since oxygen is a signaling molecule in trophoblasts (11), we cultivated both cell types at either 2% or 20% O₂. Two percent O₂ is compatible with oxygen concentrations of early gestation. Twenty percent O₂, higher than natural oxygen concentrations, was, nevertheless, chosen to compare our results with most available studies based on trophoblasts cultivated at atmospheric pressure. STOX1^{High} cells expressed *STOX1* at a high level in both conditions (Fig. 2A).

STOX1^{High} cells in hypoxia recapitulated metabolic alterations observed in pre-eclampsia, as decreased DNA damage response (DDR) (Supplementary Fig. S2A), and decreased expression of genes involved in cholesterol metabolism, *SREBP1A*, and *SREBP1C* (28) (Supplementary Fig. S2B).

At 2% O₂, expression of the two crucial modulators of the hypoxia response *HIF1 α* and *HIF1 β* was moderately affected by hypoxia (Fig. 2A). The hypoxamir miR-210 levels were not altered in STOX1 overexpressing cells at 20% O₂. Strikingly, however, at 2% O₂ miR-210 expression increased by ~6-fold in control cells and decreased by ~30-fold in STOX1^{High} cells compared with 20% O₂, resulting in a dramatically reduced level (~180-fold) of miR-210 in STOX1^{High} cells under hypoxia.

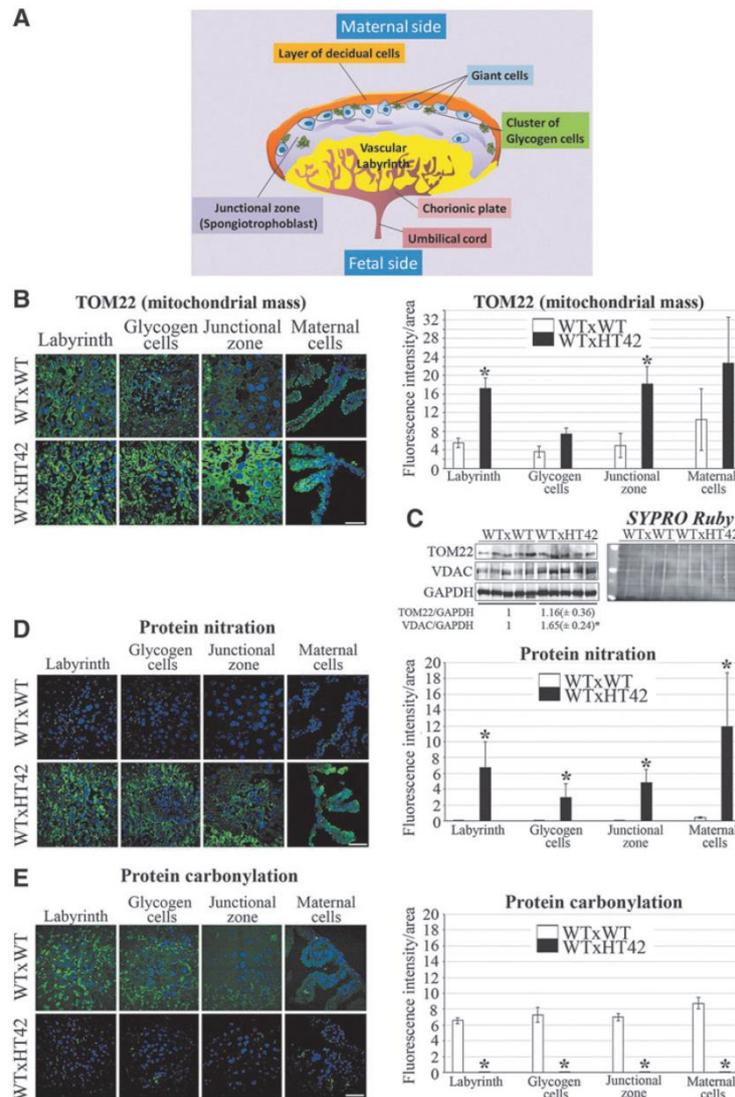


FIG. 1. *In vivo* alterations of mitochondria and nitroso-redox balance in transgenic STOX1 overexpressing placentas. (A) Structure of the murine placenta. (B) Three-dimensional-reconstructed placenta regions (Labyrinth, Glycogen cells, Junctional zone, and Maternal cells) stained with TOM22 (green) and counterstained with Hoechst in mice from WT×WT and WT×TgSTOX42 crosses. *Right panels* indicate fluorescence intensity quantification per surface (area) analyzed; identical surfaces were assessed in all samples; $n = 500$ surfaces (Labyrinth), and $n = 100$ surfaces (Glycogen cells, Junctional zone, and Maternal cells) per tissue section. Scale bar = $50 \mu\text{m}$. (C) Western blot of mitochondrial markers TOM22 and VDAC, of internal reference GAPDH, and of stained membrane with loading control SYPRO Ruby on protein extracts from five WT×WT and five WT×HT42 placentas, with quantification by densitometry. Despite the blurring due to the presence of several cell types in the placentas, the difference was significant at $p < 0.05$ with VDAC (*asterisk*). (D, E) Three-dimensional-reconstructed placenta regions (Labyrinth, Glycogen cells, Junctional zone, and Maternal cells) stained with (D) 3-nitrotyrosine antibody to detect protein nitration, or (E) treated with DNPH and stained with anti-DNP to detect protein carbonylation, and counterstained with Hoechst in mice from WT×WT and WT×TgSTOX42 crosses (*left panels*). *Right panels* indicate fluorescence intensity quantification per surface (area) analyzed; identical surfaces were assessed in all samples; $n = 500$ surfaces (Labyrinth), and $n = 100$ surfaces (Glycogen cells, Junctional zone, and Maternal cells) per tissue section. Scale bar = $50 \mu\text{m}$. Quantifications are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.001$ for *t*-test; (WT×TgSTOX42 vs. WT×WT). DNPH, 2, 4-dinitrophenylhydrazine; SD, standard deviation; STOX1, storkhead box 1; VDAC, voltage-dependent anion channel; WT, wild-type. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars

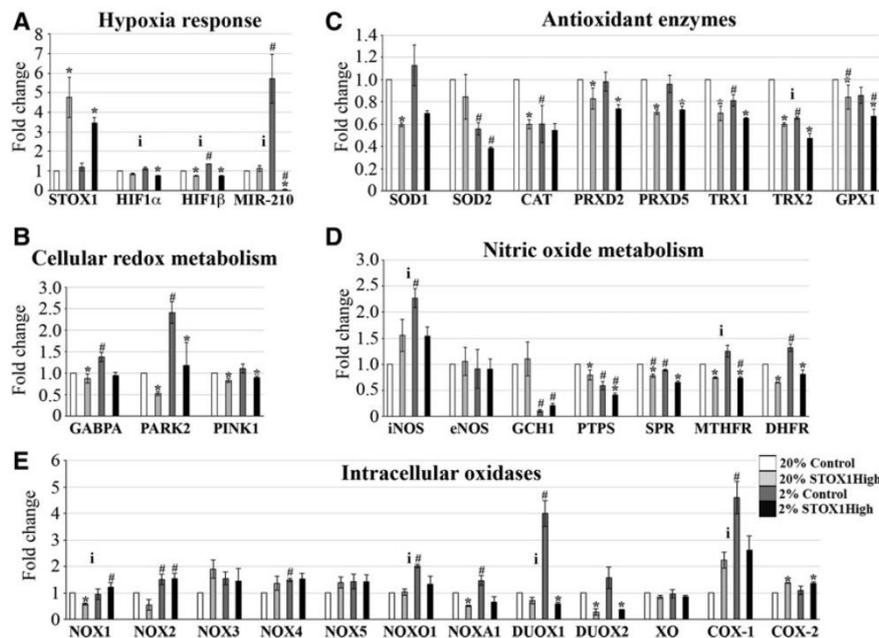


FIG. 2. Deregulation by STOX1 overexpression of the expression of genes involved in hypoxia response, antioxidant defense, and nitric oxide metabolism. Quantitative RT-qPCR measurement of key genes involved in response to hypoxia (A), antioxidant defense/cellular redox metabolism (B), antioxidant enzymes (C), nitric oxide metabolism (D), and coding for intracellular oxidases (E) in control and STOX1High cells at 20% O_2 (white and light grey bars, respectively) and at 2% (dark grey and black bars, respectively). Statistical analysis was performed by full factorial ANOVA on two factors (oxygen concentration and STOX1 level). * $p < 0.01$ for the effects of STOX1 expression relative to control (control cells at 20% O_2), # $p < 0.01$ for the effects of oxygen, $^i p < 0.01$ for an interaction effect, that is, for instance a differential effect of oxygen according to the STOX1 expression level. Results are expressed as mean \pm SD. Statistical details are given for each gene in Supplementary Table S4. RT-qPCR, reverse transcription quantitative PCR.

We then examined the cellular redox metabolism. Expression levels of *GABPA*, encoding a factor involved in mitochondrial biogenesis (7), and Parkinson protein 2 (*PARK2*) encoding Parkin, a E3 ubiquitin-protein ligase important for antioxidant defence (76), were increased by hypoxia in control cells, which was not the case in STOX1-High cells (Fig. 2B). Furthermore, STOX1 overexpression was associated with a decrease of *PINK1* expression, a mitochondrial serine/threonine protein kinase that prevents oxidative damage (26). Accordingly, most sirtuins [known to be induced in response to hypoxia (23) and to inhibit HIF-mediated hypoxia response (30)], and their downstream effectors, *FOXO1* and *FOXO3a*, which are activated in the presence of oxidative stress, were highly expressed in control cells in hypoxia (19); whereas their levels were reduced in STOX1High cells at a low O_2 concentration (Supplementary Fig. S2C, D). Moreover, expression levels of antioxidant enzymes that constitute the main line of defence against nitrosative and oxidative stresses (73), such as superoxide dismutases *SOD1* (Cu/Zn-SOD) and *SOD2* (Mn-SOD), peroxiredoxins *PRDX2* and *PRDX5*, thioredoxins *TRX1* and *TRX2*, and glutathione peroxidase *GPX1*, were lower in STOX1High compared with control cells at 2% O_2 (Fig. 2C).

In addition, at 2% O_2 the hypoxia-induced expression of iNOS was repressed in STOX1High cells (Fig. 2D). STOX1 also reduced the expression of *PTPS*, *SPR*, *DHFR*, and *MTHFR*, encoding for enzymes involved in tetrahydrobiopterin (BH4) metabolism, which is indispensable for the transformation of L-arginine to L-citrulline and NO (75). Altogether, these observations suggest altered NO production in STOX1High compared with control cells, and particularly in hypoxia. By contrast, *SOD2* and *GCH1*, which encodes an early enzyme in BH4 synthesis, were relatively insensitive to STOX1 but down-regulated by hypoxia (Fig. 2C, D).

The expressions of intracellular oxidases, responsible for superoxide generation and oxidative stress (5), such as the NADPH oxidase organizer 1 (*NOXO1*), the NOX activator 1 (*NOXA1*), and the dual oxidases (*DUOX1* and *DUOX2*), were no longer induced by hypoxia when STOX1 was overexpressed (Fig. 2E). In contrast, the expression of several NOXs was mildly induced by hypoxia, while it was rather insensitive to the STOX1 status. To note, we recently reported that pre-eclamptic plasma affects *NOX4* expression in endothelial cells (10). Moreover, STOX1 inhibited hypoxia-induced expression of the cyclooxygenase-1 (*COX-1*), and induced *COX-2* expression (Fig. 2E). Taken together, the

expression of these genes indicates multiple levels of alteration of NO metabolic pathways on STOX1 overexpression, including hypoxia-dependent alterations.

In sum, under hypoxia, genes coding for enzymes implicated in free radical production are overall reduced after STOX1 overexpression; whereas the detoxifying machinery appears less active, raising questions on the physiological outcome and balance of these alterations.

STOX1 overexpression affects the mitochondrial mass

We assessed the mitochondrial mass by immunofluorescent staining of TOM22 and VDAC on fixed cells and by labeling living cells with MitoTracker Green™, a chemical dye that labels active mitochondria using the mitochondrial membrane potential (MMP) (1). These three distinct measurements showed that in control cells the mitochondrial mass was reduced in hypoxia (Fig. 3A, B and Supplementary Fig. S3, $p > 0.05$, $p = 4.4 \times 10^{-12}$, and 7.5×10^{-23} , for TOM22, VDAC, and MitoTracker, respectively, comparing 20% O₂ and hypoxia). On the contrary, in STOX1High cells, the mitochondrial mass increased about twofold in hypoxia (Fig. 3A and Supplementary Fig. S3; $p = 5.1 \times 10^{-6}$, > 0.05 and 2.1×10^{-15} , for TOM22, VDAC, and MitoTracker, respectively comparing 20% O₂ and hypoxia).

Consistently, control cells in hypoxia showed a reduced expression of master regulators of mitochondrial biogenesis, *PGC1 α* , *PGC1 β* , and *NRF1* [but not *GABPA (NRF2A)* and *GABPB1*, Fig. 3C]. A similar decrease of *PGC1 β* and *NRF1* was also observed in STOX1High cells despite increased mitochondrial mass (see Fig. 3A and Supplementary Fig. S3), suggesting that in these cells the steady-state mitochondrial mass is not primarily dependent on organelle biogenesis.

The mitochondrial mass can be reduced by autophagy, a nonselective bulk degradation of cytoplasm and organelles, or by selective autophagy (mitophagy), which eliminates damaged mitochondria and may result in cell death (54). Immunofluorescence levels of MAP1LC3B (LC3B), an autophagy factor that comprises the inactive (LC3B-I) and the autophagosome-associated active (LC3B-II) forms, were reduced by hypoxia, and the decrease was larger in STOX1High cells than in controls (Fig. 3D). Interestingly, the ratio LC3B-II/LC3B-I, an indicator of autophagy activation (47), was significantly higher in STOX1High cells than in controls independently of the oxygen pressure [1.88 ± 0.06 vs. 1.23 ± 0.01 at 20% oxygen ($p = 2.7 \times 10^{-4}$) and 1.85 ± 0.05 vs. 1.37 ± 0.03 at 2% oxygen ($p = 7.0 \times 10^{-5}$); Fig. 3E].

Global mitochondrial fragmentation, which is required before the LC3B-II-mediated mitochondria engulfment into autophagosomes in mitophagy, increased under hypoxia but was not influenced by STOX1 overexpression (Supplementary Fig. S4A). Strikingly, at 20% O₂, dynamin-related protein 1 (DRP1) (encoding a master regulator of mitochondrial fission, and inhibitor of autophagosome targeting of mitochondria) was ~30-fold lower in STOX1High cells than in control cells. DRP1 reduction may compensate for decreased mitochondrial content in STOX1High cells. By hypoxia, DRP1 expression was reduced in control cells (approximately threefold), whereas it increased in STOX1High cells (approximately ninefold) (Supplementary Fig. S4B, C). DRP1 decrease and the apparent absence of mitochondrial

fragmentation suggest the inhibition of mitophagy in STOX1High cells at 20% O₂. These findings concur with decreased *PARK2* expression in STOX1High cells (as shown above, in Fig. 2B, Expression of genes involved in cellular redox metabolism), *PARK2* translocation to mitochondria being involved in mitophagy (76). Optic atrophy 1 (OPA1), a key regulator of mitochondrial fusion, was unaltered (Supplementary Fig. S4D, E).

In conclusion, a decrease of the mitochondrial mass in STOX1High cells at 20% O₂ may depend on activated autophagy rather than mitophagy.

STOX1 overexpression affects mitochondrial function and energy metabolism

The MMP is the driving force for mitochondrial proteins import, substrates and ions transport, and, consequently, for mitochondrial activities (49). A decrease in oxygen pressure led to a 30% reduction of MMP measured by tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) fluorescence in control cells (59) (Fig. 4A), which was consistent with a decrease in mitochondrial mass (as shown above, in Supplementary Fig. S3). Conversely, STOX1High cells display the highest MMP values in hypoxia. When normalized to the mitochondrial mass (TOM22), the MMP of STOX1High cells was always higher than control cells (hypoxia $p = 1.3 \times 10^{-9}$, 20% O₂ $p = 1 \times 10^{-4}$, Fig. 4B), indicating more mitochondrial activity in STOX1High than in control cells.

Global cellular oxidative phosphorylation capacity was assessed at 20% O₂. STOX1High cells maintained normal respiration rate and cellular adenosine triphosphate (ATP) concentration (Fig. 4C, D). Consequently, ATP levels normalized to the mitochondrial mass (TOM22) are almost threefold higher in STOX1High than in control cells (Fig. 4E). Altogether, at both O₂ concentrations, mitochondria appear more active in STOX1High than in control cells.

Compared with the other conditions, STOX1High cells at 2% O₂ showed a 50% decrease of the mtDNA content (Fig. 4F), but increased levels of TFAM, a factor involved in mtDNA transcription, replication, and maintenance (Supplementary Fig. S5A–C), with an approximately fourfold higher ratio of TFAM/mtDNA. POLG, the DNA polymerase that replicates mtDNA, was affected by hypoxia (Supplementary Fig. S5D, E). Thus, STOX1High cells displayed higher levels of POLG relative to the mitochondrial mass than control cells (POLG/TOM22, 1.7-fold in hypoxia and 3.2-fold at 20% O₂) (Supplementary Fig. S5F).

We also evaluated mtDNA maintenance using a novel validated imaging fluorescence *in situ* hybridization approach, mitochondrial transcription, and replication imaging protocol (mTRIP) to assess mtDNA initiation of replication (13, 14). The levels of mitochondrial replication marker (mREP) (a probe that signals the D-loop opening for mtDNA replication) per cell were similar in all situations (Supplementary Fig. S5G, H), as were the levels of a mixture of probes that target several mitochondrial RNAs (mTRANS; Supplementary Fig. S6A, B). mtDNA-encoded genes were expressed at normal levels in STOX1High cells in hypoxia (Supplementary Fig. S6C) despite lower mtDNA content. Taking into account the reduced TOM22 levels, STOX1High cells at 20% O₂ displayed a two- to three-fold higher mREP and mTRANS

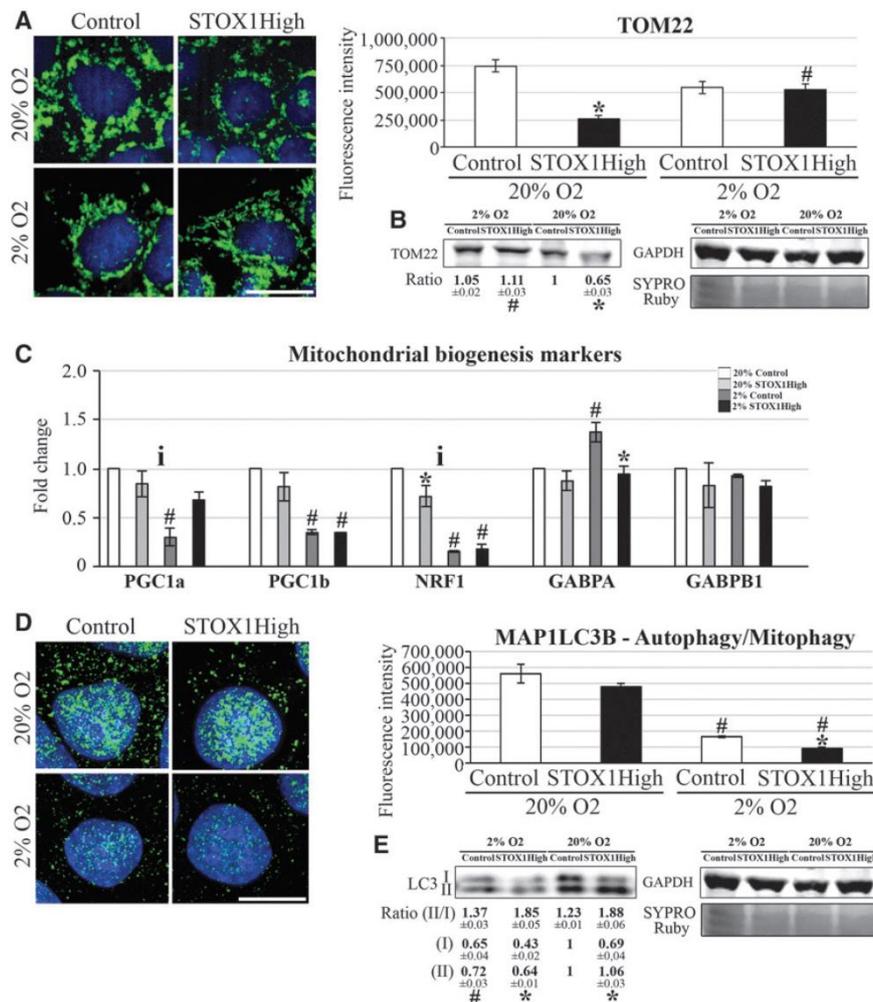


FIG. 3. Mitochondrial mass, mitochondrial biogenesis markers, and mitophagy/autophagy in STOX1 over-expressing cells. (A) Three-dimensional-reconstructed cells immunostained with anti-TOM22 (green) to detect the mitochondrial mass; nuclei are stained with Hoechst (blue). *Right panel*, fluorescence intensity quantification of TOM22 per cell. (B) Western blot of TOM22, internal reference GAPDH, and loading control SYPRO Ruby. The ratio of TOM22 signal normalized first to GAPDH and then to control cells at 2% O₂ is indicated; $n = 3$ experiments, \pm SD. (C) Quantitative RT-qPCR of mitochondrial biogenesis factors *PGC1 α* , *PGC1 β* , *NRF1*, *GABPA*, and *GABPB1*. Statistical analysis was performed as described for Figure 2. *i* = interaction effect between the factor "STOX1 expression" and the factor "Hypoxia" estimated by Analysis of Variance as described in Material and Methods, section "Statistical Analysis." (D) Three-dimensional-reconstructed cells immunostained with anti-MAP1LC3B (microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B; or LC3B, green) and counterstained with Hoechst (blue). *Right panel*, fluorescence intensity quantification of MAP1LC3B per cell. (E) Western blot of inactive (I) and active (II) forms of LC3B-I, internal reference GAPDH, and loading control SYPRO Ruby. The ratio of either LC3B-I or LC3B-II signal normalized first to GAPDH and then to control cells is normalized to 1 at 20% O₂. The ratio of LC3B-II/I is calculated after normalization of the two forms to GAPDH; $n = 3$ experiments, \pm SD. Scale bar = 10 μ m. Immunofluorescence, $n = 30$ cells from three independent experiments, per condition. *t*-Tests were used in these experiments; * $p < 0.001$ STOX1High versus control cells; # $p < 0.001$ 20% versus 2% O₂. TOM22, LC3B, VDAC (Supplementary Fig. S3A), and GAPDH were revealed from the same blot (molecular weight, 22, 14–16, 30, and 37 kDa, respectively). Quantifications are expressed as mean \pm SD. NRF1, nuclear respiratory factor 1. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars

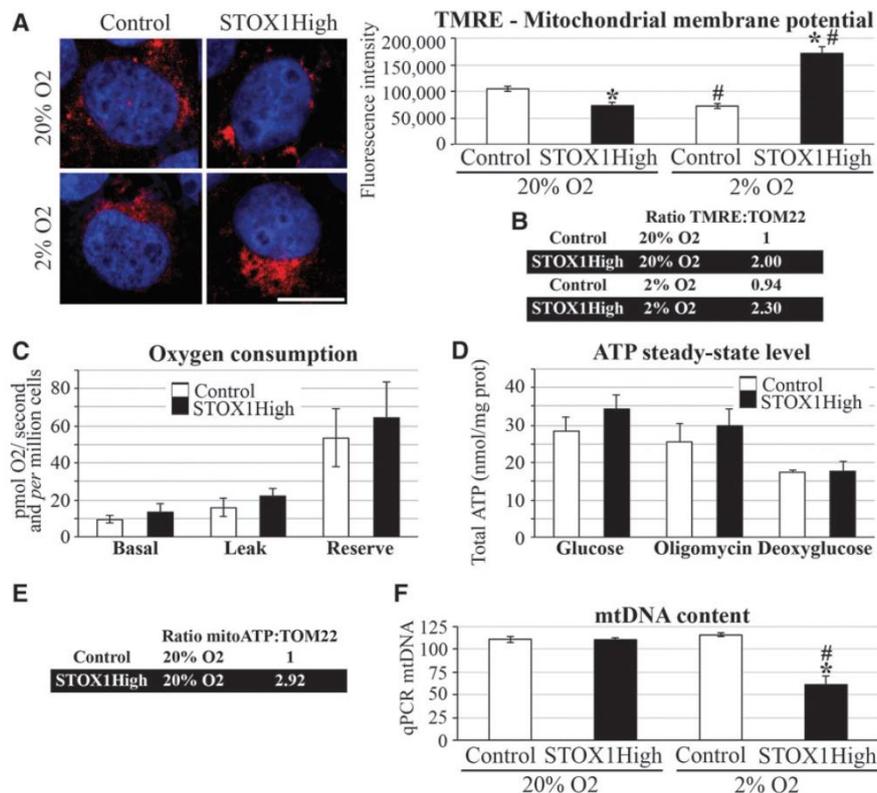


FIG. 4. Mitochondrial metabolism in STOX1 overexpressing cells. (A) Three-dimensional-reconstructed cells stained with TMRE (red) to detect the mitochondrial membrane potential; nuclei (blue) are stained with Hoechst. *Right panel*, fluorescence intensity quantification of TMRE per cell. $n = 30$ cells from three independent experiments, per condition; scale bar = $10 \mu\text{m}$. (B) Ratio of TMRE/TOM22 (for each factor, average value of three independent experiments; values of TOM22 are from Fig. 3A normalized to control cells at 20% O₂). (C) Oxygen consumption, pmol O₂ per second and per million cells. $n = 3$ experiments per condition. (D) ATP steady-state level, mmol per mg protein. $n = 3$ experiments per condition. (E) Ratio of mitoATP (deoxyglucose)/TOM22 (for each factor, average value of three independent experiments; values of TOM22 are from Fig. 3A), normalized to control cells at 2% O₂. (F) MtDNA content of cells analyzed by qPCR in the 12S region. $n = 3$ experiments. Quantifications are expressed as mean \pm SD. * Significant effect of STOX1, # significant effect of O₂. ATP, adenosine triphosphate; TMRE, tetramethylrhodamine ethyl ester. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars

signal per mitochondrial mass than control cells (Supplementary Figs. S5H and S6B).

The expression of key genes involved in mtDNA maintenance and mitochondrial transcription (Supplementary Fig. S6D, E) was not correlated with the levels of mtDNA transcription. Rather, the expression of these factors increased in control cells in hypoxia, but not in STOX1High cells, indicating a failure of STOX1High cells to adapt to hypoxia by varying the expression of mtDNA processing factors.

In summary, under hypoxia, STOX1High cells maintain mitochondrial mass despite an apparent lack of adaptation. These cells display reduced mtDNA content and increased MMP. At 20% O₂, STOX1High cells maintain ATP production, O₂ consumption, and mtDNA content despite reduced mitochondrial mass and MMP.

In support of the notion that hypoxia is associated with increased oxidative stress in our system, we observed alterations of key mitochondrial factors (immunofluorescence of TOM22, TFAM, POLG, and DRP1) comparable to those observed in hypoxia when STOX1High cells at 20% Oxygen were treated with H₂O₂ (Supplementary Table S5).

STOX1 overexpression induces nitroso-redox imbalance

We then analyzed oxidative stress in STOX1High cells in hypoxia and at 20% O₂ using dihydrorhodamine 123 (DHR123) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate DCFH-DA, two fluorescent probes with preferential sensitivity for RNS and ROS, respectively (22). In control cells, the

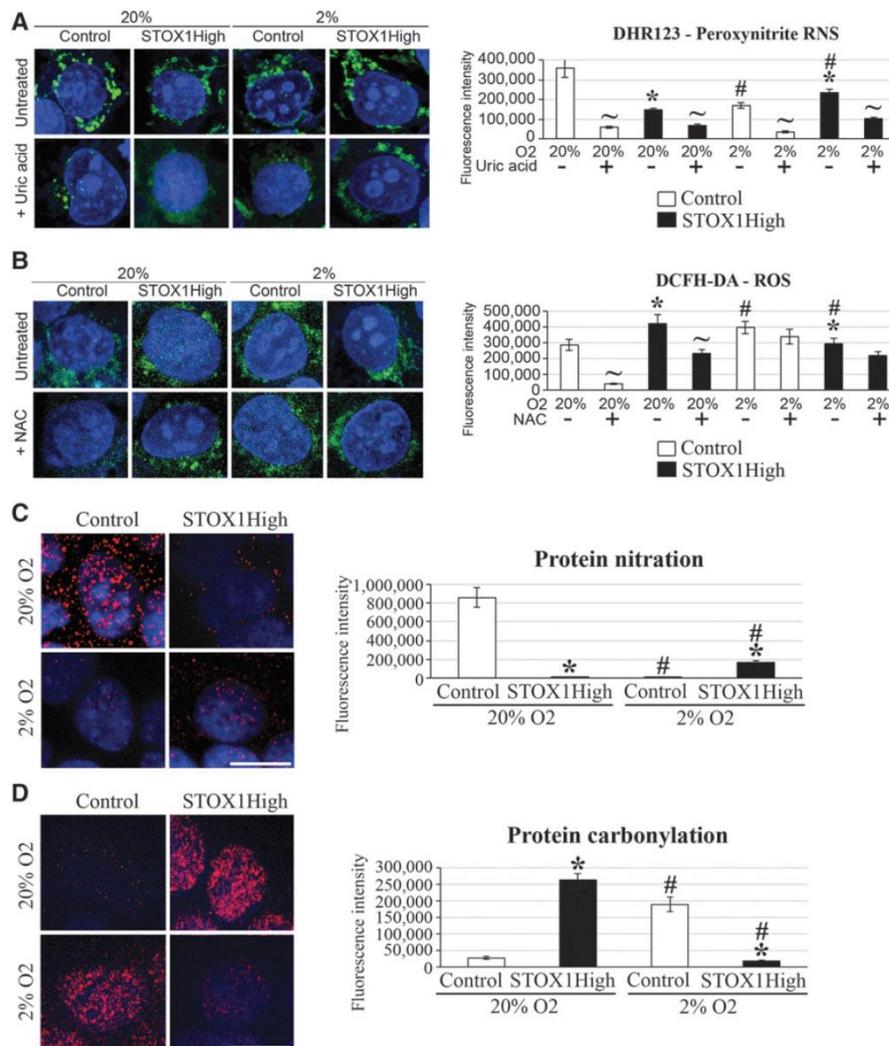


FIG. 5. Imbalanced nitroso-redox equilibrium in STOX1 overexpressing cells. (A) Three-dimensional-reconstructed cells stained with DHR123 (green) for the determination of a relative enrichment in intracellular peroxynitrites with or without treatment of the RNS scavenger uric acid at $300 \mu\text{M}$. *Right panel*, fluorescence intensity quantification of rhodamine 123 per cell (control cells in white and STOX1High cells in black). Each experiment was performed in triplicate. “~” Marks significant Student’s *t*-test for the effect of each scavenger *versus* its absence. “#” Marks significant oxygen effects and “*” marks significant effect of STOX1 overexpression, in (A, B). (B) Three-dimensional-reconstructed cells stained with DCFH-DA (green) for the determination of relative enrichment in intracellular ROS with or without treatment with the ROS scavenger NAC. *Right panel*, fluorescence intensity quantification of DCF per cell (control cells in white and STOX1High cells in black). (C) Three-dimensional-reconstructed cells stained with anti-3-nitrotyrosine (red) to detect protein nitration. *Right panel*, fluorescence intensity quantification of nitrated proteins per cell. (D) Three-dimensional-reconstructed cells stained with DNP and anti-DNP (red). *Right panel*, fluorescence intensity quantification of carbonylated proteins per cell. Nuclei are stained with Hoechst (blue). Scale bar = $10 \mu\text{m}$. $n=30$ cells from three independent experiments per condition. Quantifications are expressed as mean \pm SD. For the Student’s *t*-test: * stands for significant effect of STOX1 overexpression, # for significant oxygen effect, and ~ for significant effect of each scavenger. DCFH-DA, 2,2'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; DHR123, dihydrorhodamine 123; NAC, *N*-acetyl cysteine; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars

DHR123 signal increased at higher oxygen pressure; whereas the reverse was observed with DCFH-DA (Fig. 5A, B). The profile was strictly opposite in STOX1^{High} cells. The switch from ROS to RNS signal (or *vice versa*) is compatible with ROS and NO competitively targeting Cys residues (42). The specificity of ROS and RNS labeling by DCFH-DA and DHR123, respectively, was analyzed at 20% O₂ and hypoxia in the presence of the RNS scavenger uric acid and the ROS inhibitor *N*-acetyl cysteine (NAC). We observed a systematic decrease of ROS and RNS labeling using the specific scavenger although, curiously, the decrease was not significant for NAC in hypoxia. It is possible that this cell line harbors resistance to NAC in hypoxia, although to our knowledge this has not been assessed. Altogether, these analyses confirm opposite ROS and RNS profiles in STOX1^{High} *versus* control cells according to the oxygen pressure.

We then evaluated the steady-state levels of protein oxidative adducts, either nitration (due to RNS) or carbonylation (due to ROS) (65, 66) (Fig. 5C, D). STOX1^{High} cells in hypoxia displayed a higher level of protein nitration and lower level of carbonylation than control cells, whereas the reverse pattern was observed at 20% O₂. These results were confirmed by Western blot (Supplementary Fig. S7A, B). The nitroso-redox balance, thus, appears dependent on oxygen pressure, and it is strongly modified by STOX1 overexpression.

Discussion

In the present study, we uncover a novel function of the pre-eclampsia-associated transcription factor STOX1 as a master regulator of the oxygen-dependent nitroso-redox balance. Although after the discovery of this gene the role of STOX1 in pre-eclampsia has been questioned (31), the original study (71) and a more recent one (6) concur to observe an association between STOX1 and the familial forms of pre-eclampsia. Briefly, the original study (71) identified the more abundant STOX1 Y153H polymorphism in a sub-population of Dutch where pre-eclampsia and gestational hypertension had a strong familial component. Moreover, the study of Berends *et al.* (6), focusing on a “familial” sub-population of samples, observed an association between STOX1 and the forms of pre-eclampsia with a strong familial component. In contrast, this polymorphism was not found to be associated with the disease in other populations where the pre-eclampsia was sporadic (31, 37). Moreover, the imprinted status of STOX1 was questioned at the global placental level (31); whereas mono-allelic methylation and expression of this gene were detected in specific cell types of the placenta (extravillous column cytotrophoblasts) (70), and an independent study showed interindividual variation in the imprinting status of STOX1 (15). In agreement with the implication of STOX1 in pre-eclampsia, overexpression of STOX1 was observed in early placental biopsies in gestations, eventually progressing to pre-eclampsia [GSE12767 in Founds *et al.* (20)]. Furthermore, we induced pre-eclampsia-like symptoms in two independent mouse strains overexpressing STOX1 (TgSTOX13 and TgSTOX42) (18). In the present study, we focused on the strain harboring the most severe phenotype, TgSTOX42.

We show here that hypoxia affects trophoblasts in culture, and that STOX1 overexpression exacerbates this effect, thereby suggesting a double-hit model, where in excess of

STOX1, trophoblasts do not adapt to hypoxic conditions. We found a striking down-regulation of miR-210 in JEG-3 hypoxic cells overexpressing STOX1. MiR-210 is increased in pre-eclampsia; our data, thus, suggest that STOX1 overexpression mitigates an adaptive process mediated by miR-210. STOX1 overexpression triggers a reduced expression of genes involved in DDR and cholesterol metabolism, two pathways that are altered in pre-eclampsia. However, the most striking effect is the imbalance of ROS and RNS induced by STOX1 overexpression in cells and placentas. The capture of NO by STOX1 overexpressing placentas is proposed here as a mechanism to explain increased blood pressure in pre-eclampsia, consistently with existing literature (34, 63). In human gestation, the blood flow in the placenta near term is around 600 ml/min, which is theoretically able to drive a rapid and strong decrease of NO in the whole maternal body during pre-eclampsia. Modulating the ROS/RNS balance could be considered an innovative strategy to treat pre-eclampsia, possibly by BH4 treatment or uric acid precursors (60). In this case, our mouse model is a potentially excellent platform for testing therapeutic approaches in the future.

An abundant literature exists on oxidant molecules associated with pre-eclampsia (48). RNS and ROS stresses are generally treated as a whole (17). It is widely assumed that the sites of peroxynitrite generation are spatially associated with the sources of superoxide production (such as mitochondria) in the context of hypoxia and inflammation (51). Peroxynitrite ions nitrate tyrosine residues and have been shown to be elevated in pre-eclampsia (45). Peroxynitrite is associated with biological toxic effects that are also found in pre-eclampsia (62) such as antioxidant depletion (68), deregulation of COXs (3), NOS uncoupling (58), lipid peroxidation (24), insulin resistance (52), imbalance of pro- and anti-inflammatory mediators (12), neuro-inflammatory disease/stroke (52), DNA damage (21), mitochondrial dysfunction (50), and renal injury associated with proteinuria and high plasma uric acid level (52). Nitrotyrosine strongly marks the vasculature of pre-eclamptic placentas (8). Recently, uric acid has been reported to mark hypertension and endothelial damage in pre-eclampsia (41). Thus, uric acid could be considered a physiological protective response against peroxynitrite accumulation, as it is a natural strong peroxynitrite scavenger that inhibits inflammation (27). Peroxynitrite also affects the BH4 pathway and produces a vicious circle of peroxynitrite generation.

Finally, nitrosative and oxidative stresses target mitochondria (53), which we analyzed by multiple approaches, especially integrative methods of quantitative immunofluorescence (13, 14). At low oxygen pressure, overexpression of STOX1 did not change the mitochondrial mass in the cells, which increased in transgenic placentas, suggesting that homeostatic processes at work in the organs are absent in the cells. This discrepancy is consistent with recent literature (43). Similarly, VDAC was found to be increased by proteomic analysis in the pre-eclamptic placenta (36), which is consistent with our data (Fig. 1C); whereas it was not altered in cells at low oxygen pressure and even reduced at high oxygen pressure.

Views of the immunohistochemical alterations that characterize the control *versus* STOX1^{High} cells are presented as a Principal Component Analysis in Figure 6A. Control cells at 2% O₂ present intermediate features between STOX1^{High} cells at 2% and 20% O₂, suggesting that STOX1

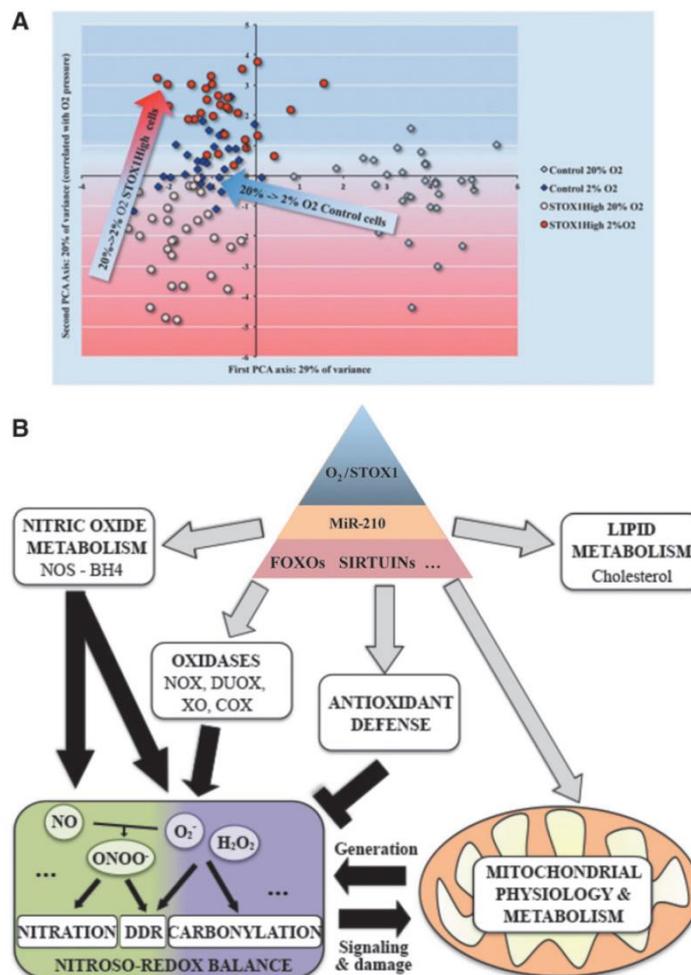


FIG. 6. Meta-analysis of STOX1 overexpressing cells. (A) Principal Component Analysis with the quantitative immunofluorescence data from peroxynitrite, ROS, protein nitration, protein carbonylation, TOM22, TFAM, mtDNA content, POLG, mREP, mTRANS, OPA1, DRP1, LC3B, and TMRE. The two first axes represent more than 49% (29% + 20%) of the overall variation. It clearly appears that STOX1High cells are not able to respond adequately to hypoxia and are close to control cells which are already in hypoxic conditions. (B) Proposed model in normal physiology and pre-eclampsia/STOX1 overexpressing cells representing the cellular and molecular bases of the effects of STOX1 (see also text). First, for many genes, the effects of STOX1 depend on the oxygen pressure, as shown by significant interaction effects. STOX1 overexpression down-regulates the expression of key hypoxia regulators, such as *HIF1 α* , *HIF1 β* and drastically miR-210, possibly inducing a defective response to hypoxia both *in vitro* and *in vivo*. Key transcription factors, including FOXOs and Sirtuins, that are involved in lipid metabolism, nitric oxide metabolism, oxidases, antioxidant defense, and mitochondrial function are dramatically altered. The combined deregulation of these factors and STOX1 overexpression affect the nitric oxide metabolism [NOS uncoupling, NO bioavailability, and ONOO⁻ generation: alteration of BH4 destabilizes NOS, which uncoupled, will alternatively produce O₂⁻ and NO, and form highly reactive peroxynitrite ions (ONOO⁻)] (2, 75), oxidant generation (O₂⁻), antioxidant defense, mitochondrial function and metabolism, DDR, and cholesterol metabolism. This analysis suggests a mechanism by which STOX1 overexpression activates a powerful NO pump that may deprive the maternal endothelium of this molecule, thereby contributing to the pre-eclamptic phenotype. DDR, DNA damage response. BH4, tetrahydrobiopterin; DRP1, dynamin-related protein 1; mREP, mitochondrial replication marker; mTRANS, a mixture of probes that target several mitochondrial RNAs; NOS, nitric oxide synthase; OPA1, optic atrophy 1; POLG, polymerase (DNA directed), gamma; TFAM, transcription factor A, mitochondrial. To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertpub.com/ars

overexpression interferes with oxygen sensors and somehow putting the cells in an artificial “hypoxic” state.

In agreement with these findings, and underscoring the misregulation of oxidative stress management when STOX1 is overexpressed, we observed comparable effects on mitochondrial factors in STOX1High cells grown either under hypoxia or at 20% O₂ in the presence of the highly oxidizing factor H₂O₂. Moreover, in the presence of H₂O₂, STOX1-High cells displayed a global increase of mitochondrial parameters; whereas it was the opposite for control cells.

In hypoxia, STOX1High cells contain a damaging and toxic cocktail with accumulation of peroxynitrite and relatively high level of ROS. The mtDNA content is reduced but appears highly protected by TFAM, and the mitochondrial mass is not affected, probably resulting from the balance between increased mitochondrial biogenesis (marker PGC1 α) and increased level of the autophagy (LC3B-II/I). At high oxygen pressure, STOX1High cells have nearly the same damaging cocktail except that peroxynitrite levels decrease and the ROS levels increase. The mitochondrial mass is also dramatically reduced due to a strong increase of LC3B, which activates autophagy, and to DRP1 deficiency. However, to maintain stable total ATP level, the remaining mitochondria appear hyper-activated (increased membrane (Fig. 6B) potential, increased mtDNA replication, and transcription levels per mitochondrial mass unit). This led us to a model (Fig. 6B) presenting cellular and molecular bases of STOX1 effects in the context of mitochondrial function and pre-eclampsia.

Materials and Methods

Mouse placentas and microarray experiment

Four- to eight-month-old male and female mice with the FVB/N genetic background were used throughout this study, bred in the animal facility of Institut National de Recherche Agronomique (INRA, Jouy en Josas, France) in a controlled environment (light/dark cycle, temperature, free access to food and water) in accordance with local ethical regulations. RNA was extracted from placentas in TriZol™ following classical protocols at 16.5 dpc from three different mice of each group as previously described (18). Quality control of the RNA, preparation of the probes, and hybridization on Nimblegen Mouse Expression Arrays MM8 were performed at the genom'IC platform (Cochin Institute, Paris, France) according to standard protocols. Data from this experiment, fulfilling the Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) criteria, were deposited in the functional genomics ArrayExpress database of the EMBL-EBI web server (accession number E-MTAB-1970). Data were analyzed using GSEA (www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp). This program compares the experimental dataset with a series of pathways (67), analyzes the distribution of the genes of the dataset present in the given pathways, and tests by simulation the randomness of their distribution. Generally, the program is set to a FDR of 0.25.

Cell culture and hypoxia

Modified JEG-3 cells (control cells, stably transfected with an empty pCMX vector, and STOX1High cells, stably transfected with a pCMX-STOX1A vector) (56) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium Glutamax (Life

Technologies™, Carlsbad, CA) with 10% of heat-inactivated fetal calf serum (Life Technologies), 1% penicillin/streptomycin, and 1% of geneticin at 37°C in the presence of 5% CO₂. Cells seeded overnight in wells containing glass dishes, on sterile glass slides, were placed in a Lwoff chamber at 37°C and exposed to an oxygen-depleted atmosphere for 24 h (2% O₂, 5% CO₂) or maintained at 37°C in a humidified normal atmosphere (20% O₂, 5% CO₂) for 24 h. The experiments were performed independently thrice, each in triplicate. When indicated, cells were grown in 20% O₂ in the presence of 150 μ m H₂O₂ for 24 h.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

Total RNA was isolated and reverse transcribed according to standard protocols. RT-qPCR was performed using LightCycler® 480 SYBR Green I Master containing FastStart Taq DNA Polymerase, and the rate of dye incorporation was monitored using a LightCycler 480 Instrument II and the LightCycler software (Roche, Basel, Switzerland) in the exponential phase of the PCR reaction. Each RT-qPCR was carried out in technical duplicates from a pool of three biological replicates, using TBP transcript levels for normalization. RT-qPCR CT values were analyzed using the 2^{- Δ ACT} method to calculate the fold expression (40). Primers used for amplifications are listed in Supplementary Table S3 with the corresponding references.

Quantification of miRNA-210 followed the protocol of Sdassi *et al.* (61). A polyA tail was added to RNA by Poly-A polymerase treatment (Life Technologies). After phenol-chloroform treatment in the presence of glycogen as a carrier, and isopropanol precipitation, reverse transcription was carried out from a universal primer 5'-CGAATTCTAGAGCTCGAGGCAGGCGACATGGCTGGCTAGTTAAGCTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'. Quantitative PCR was performed using the Universal and miR-210-specific primers (5'-CGAATTCTAGAGCTCGAGGCAGG-3' and 5'-CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA-3', which is identical for humans and mice), using 5S RNA as a reporter gene.

mtDNA content analysis by qPCR

DNA was extracted under standard procedures. Quantitative PCR was performed in duplicates from three biological replicates using LightCycler 480 SYBR Green I Master containing FastStart Taq DNA Polymerase, LightCycler 480 Instrument II, and LightCycler software (Roche). The region tested on mtDNA was included in the 12S gene. 18S rRNA gene was used as a reference. The level of mtDNA was calculated using the Δ CT of average CT of mtDNA and nuclear DNA (Δ CT = CT nDNA - CT mtDNA) as 2^{Δ CT}. Primers used for amplifications are listed in Supplementary Table S3.

Immunofluorescence, reagents, and antibodies

Cells seeded on slides were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized with 0.5% Triton X-100. Slides were incubated in blocking buffer (5% bovine serum albumin [BSA] in phosphate-buffered saline [PBS]) overnight at 4°C, then with the primary antibody for 1 h at room temperature (RT), and, finally, with the secondary antibody

and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Hoechst 33342 for 1 h at RT. Atto488-conjugated anti-TOM22, anti-MAP1LC3B, and Hoechst 33342 were from Sigma-Aldrich (St Louis, MI); TFAM, Pol γ , VDAC 1/2/3 (sc-98708), OPA1, DRP1, and GAPDH antibodies were from SantaCruz Biotechnology (Dallas, TX); and MitoTracker[®] Green FM, Alexa[®] Fluor 555, and Alexa[®] Fluor 488-conjugated secondary antibodies were from Life Technologies.

MMP was measured with 200 nM TMRE (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C, 5% CO₂, and 2% or 20% O₂.

Immunohistochemistry of placentas was performed on WT or transgenic placentas (expressing the human STOX1 under the control of the cytomegalovirus promoter) (18). Mice were sacrificed near the end of gestation (E16.5). Four WT placentas from two (WT \times WT) crosses and seven placentas from four (WT \times TgSTOX42) crosses were analyzed for TOM22 immunofluorescence, and for protein nitration and carbonylation. Placental regions, ascertained by periodic acid Schiff staining of adjacent sections, were analyzed by immunostaining on slides from paraffin-embedded placentas (5 μm). Placental sections were dewaxed in 2% DishWasher Soap, 1 \times PBS for 5 min at 70°C, and then prepared according to the specific immunofluorescence procedure.

Detection of peroxynitrite, ROS, and protein oxidation and carbonylation

Peroxyntirite was detected after treatment of the cells at 10 μM of the cell-permeant nonfluorescent DHR123 (Sigma-Aldrich) oxidized in green fluorescent rhodamine in the presence of peroxynitrite. ROS (mainly O₂⁻ and H₂O₂) were detected after treatment with 10 μM of the cell-permeable nonfluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma), oxidized to form green fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), in the presence of ROS (16).

Protein nitration was detected with the 3-nitrotyrosine-specific antibody (Ref: A21285; Life Technologies/Invitrogen). Protein carbonylation was detected by dinitrophenyl treatment, followed by labeling with the DNP-specific antibody using standard procedures (44). Slides were treated with 0.01% (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Sigma-Aldrich) in 2 N HCl for 1 h at RT in the dark, washed seven times with PBS, blocked with 5% BSA in PBS overnight at 4°C, then treated with the primary anti-DNP antibody (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) for 1 h at RT, and, finally, with the secondary antibody and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Hoechst 33342 for 1 h at RT. When mentioned, the cells were treated for 24 h with uric acid (300 μM final), or with NAC (2 mM final), both of which had been purchased from Sigma-Aldrich.

Mitochondrial transcription and replication imaging protocol

DNA probes (mREP and mTRANS) for the fluorescence *in situ* hybridization protocol called mTRIP were labeled by nick translation of PCR products, incorporating Atto550-dUTP (Atto550 NT Labeling kit; Jena Bioscience, Jena, Germany), as described (14). Forty nanograms of labeled probes were mixed with 400 ng of sonicated salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich) in the hybridization buffer [50% formamide, 10% dextran sulfate, in 2 \times saline-sodium citrate (SSC) buffer pH 7.0], denatured at 80°C for 10 min, and then maintained at 37°C for 30 min. Cells seeded on slides were

fixed with 2% PFA, permeabilized with 0.5% Triton X-100, incubated in 50% formamide/2 \times SSC pH 7.0 for 30 min at RT, and denatured in 70% formamide/2 \times SSC for 4 min at 75°C. Hybridization was performed with 40 ng of probe for 16 h at 37°C. Slides were washed in SSC, and nuclei were counterstained with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Hoechst 33342.

Three-dimensional confocal acquisition, reconstruction, and quantification

Confocal acquisition was performed using an inverted laser-scanning confocal microscope Zeiss Axiovert 200M with a spinning-disk Perkin-Elmer Ultraview RS Nipkow Disk, an Achromat 63 \times /1.4 oil objective for fixed cells or an 25 \times oil objective for mice placenta section, and a Hamamatsu ORCA-II-ER camera (Imagopole, PFID; Institut Pasteur, Paris, France). Optical slices were taken every 200-nm interval along the z-axis covering the whole depth of the cell, at a resolution of 1.024/1.024 pixels. Three-dimensional reconstruction was achieved using the IMARIS software (Bitplane, South Windsor, CT). Post-acquisition analysis and fluorescence quantification were done using a single-imaging frame collection and ImageJ 1.38 \times software. For each sample, 30 cells were analyzed from three independent experiments.

Oxygen consumption and total ATP steady-state level

High-resolution respirometry was performed on 106 intact cells per ml of culture medium at 20% O₂ (38). Subsequent sequential additions were as follows: 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligomycin to measure leaks, successive 1 μM doses of the protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (cccp) up to the maximal respiration rate, and, finally, 1 mM KCN to evaluate nonrespiratory oxygen consumption. Reserve respiration was defined as the difference between maximal and basal respiration rate.

ATP steady-state level was measured by the ATP chemiluminescent assay (Roche, Mannheim, Germany) and normalized to the amount of cellular protein. Cells were incubated in the culture medium (basal) for 15 h with 1 μM oligomycin to inhibit mitochondrial ATP synthesis or without glucose but with 10 mM deoxyglucose to inhibit glycolysis.

Protein extraction and immunoblot

Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, and protease inhibitor cocktail. Thirty micrograms of protein, estimated by Bradford reactions (Sigma-Aldrich), were loaded for SDS-PAGE. After blotting, Hybond ECL nitrocellulose filters were probed with primary antibodies, then with IRDye secondary antibodies. Detection was performed using Odyssey Infrared Imaging system scanner and Odyssey application software v3.0 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). OPA1, DRP1, and TFAM (Supplementary Fig. S5) were revealed from the same blot as well as GAPDH and the loading test by SYPRO Ruby (molecular weight, 92, 80, 28, and 37 kDa, respectively).

Protein bands were quantified, normalized to GAPDH, and then normalized to control cells grown at 20% O₂. Since GAPDH may vary under hypoxia, a second normalization was done with SYPRO Ruby Protein Blot Stain according to the manufacturer's protocol (Life Technologies). Experiments

were done in triplicate, and a representative Western blot was presented. For the carbonylated protein level (DNPH derivatization), the protein extracts were treated according to the protocol of OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (Merck Millipore).

Statistical analysis

Statistical tests were performed using Statistix, a package running as an Add-in to Windows versions of Microsoft's Excel spreadsheet program. The RT-qPCR experiments were analyzed by Full Factorial ANOVA. The detailed statistical results are given in Supplementary Table S4 for 81 genes analyzed. The effect of STOX1 is reported as "STOX1 status," the effect of Oxygen (2% or 20%) as "Oxygen status," and the possible interaction between the two factors as "Oxygen status*Stox1 status." For immunohistochemistry and Western blots, Student's *t*-tests were performed. In the figures, significant effects of oxygen are represented with the symbol "#," whereas significant effects of STOX1 over-expression are indicated with the symbol "*." Significant interaction effects are indicated by "i."

Multidimensional analyses (Principal Component Analysis) were performed on quantifications of fluorescent data, for building Figure 6A.

In this study, $p < 0.001$ was considered significant for immunohistochemistry and Western blot experiments; $p < 0.01$ for RT-qPCR and qPCR (for mitochondrial DNA content).

Acknowledgments

The authors thank the "Imagopole" (PFID) of Institut Pasteur. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR 11 BSV2 025 02), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC SFI20111204038), and Association Française contre les Myopathies (AFM 16290). L.D. was a recipient of a PhD fellowship from the Ecole Normale Supérieure (Paris). A.D. was a PhD fellow from the Doctoral School GC21D.

Author Disclosure Statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- Agnello M, Morici G, and Rinaldi AM. A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology* 56: 145–149, 2008.
- Alp NJ and Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 413–420, 2004.
- Bachawaty T, Washington SL, and Walsh SW. Neutrophil expression of cyclooxygenase 2 in preeclampsia. *Reprod Sci* 17: 465–470, 2010.
- Bartha JL, Visiedo F, Fernandez-Deudero A, Bugatto F, and Perdomo G. Decreased mitochondrial fatty acid oxidation in placentas from women with preeclampsia. *Placenta* 33: 132–134, 2012.
- Bedard K and Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87: 245–313, 2007.
- Berends AL, Bertoli-Avella AM, de Groot CJ, van Duijn CM, Oostra BA, and Steegers EA. STOX1 gene in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *BJOG* 114: 1163–1167, 2007.
- Bishayee A, Bhatia D, Thoppil RJ, Darvesh AS, Nevo E, and Lansky EP. Pomegranate-mediated chemoprevention of experimental hepatocarcinogenesis involves Nrf2-regulated antioxidant mechanisms. *Carcinogenesis* 32: 888–896, 2011.
- Bosco C, Gonzalez J, Gutierrez R, Parra-Cordero M, Barja P, and Rodrigo R. Oxidative damage to pre-eclamptic placenta: immunohistochemical expression of VEGF, nitrotyrosine residues and von Willebrand factor. *J Matern Fetal Neonatal Med* 25: 2339–2345, 2012.
- Broughton Pipkin F. Risk factors for preeclampsia. *N Engl J Med* 344: 925–926, 2001.
- Calicchio R, Buffat C, Mathieu JR, Ben Salem N, Mehats C, Jacques S, Hertig A, Berkane N, Grevoul-Fresquet J, Simeoni U, Peyssonnaud C, Gavard J, Vaiman D, and Miralles F. Preeclamptic plasma induces transcription modifications involving the AP-1 transcriptional regulator JDP2 in endothelial cells. *Am J Pathol* 183: 1993–2006, 2013.
- Caniggia I and Winter JL. Adriana and Luisa Castellucci Award lecture 2001. Hypoxia inducible factor-1: oxygen regulation of trophoblast differentiation in normal and preeclamptic pregnancies—a review. *Placenta* 23 Suppl A: S47–S57, 2002.
- Catarino C, Santos-Silva A, Belo L, Rocha-Pereira P, Rocha S, Patricio B, Quintanilha A, and Rebelo I. Inflammatory disturbances in preeclampsia: relationship between maternal and umbilical cord blood. *J Pregnancy* 2012: 684384, 2012.
- Chatre L and Ricchetti M. Large heterogeneity of mitochondrial DNA transcription and initiation of replication exposed by single-cell imaging. *J Cell Sci* 126: 914–926, 2012.
- Chatre L and Ricchetti M. Prevalent coordination of mitochondrial DNA transcription and initiation of replication with the cell cycle. *Nucleic Acids Res* 41: 3068–3078, 2013.
- Cheung VG, Bruzel A, Burdick JT, Morley M, Devlin JL, and Spielman RS. Monozygotic twins reveal germline contribution to allelic expression differences. *Am J Hum Genet* 82: 1357–1360, 2008.
- Deng T, Xu K, Zhang L, and Zheng X. Dynamic determination of Ox-LDL-induced oxidative/nitrosative stress in single macrophage by using fluorescent probes. *Cell Biol Int* 32: 1425–1432, 2008.
- Domann FE. Aberrant free radical biology is a unifying theme in the etiology and pathogenesis of major human diseases. *Int J Mol Sci* 14: 8491–8495, 2013.
- 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, and Vaiman D. Preeclampsia-like symptoms induced in mice by fetoplacental expression of STOX1 are reversed by aspirin treatment. *Hypertension* 61: 662–668, 2013.
- Eijkelenboom A and Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 83–97, 2013.
- Founds SA, Conley YP, Lyons-Weiler JF, Jayabalan A, Allen Hogge W, and Conrad KP. Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. *Placenta* 30: 15–24, 2009.

21. Fujimaki A, Watanabe K, Mori T, Kimura C, Shinohara K, and Wakatsuki A. Placental oxidative DNA damage and its repair in preeclamptic women with fetal growth restriction. *Placenta* 32: 367–372, 2011.
22. Gomes A, Fernandes E, and Lima JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* 65: 45–80, 2005.
23. Guarani V and Potente M. SIRT1: a metabolic sensor that controls blood vessel growth. *Curr Opin Pharmacol* 10: 139–145, 2010.
24. Gupta S, Aziz N, Sekhon L, Agarwal R, Mansour G, Li J, and Agarwal A. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 64: 750–759, 2009.
25. Heazell AE, Moll SJ, Jones CJ, Baker PN, and Crocker IP. Formation of syncytial knots is increased by hyperoxia, hypoxia and reactive oxygen species. *Placenta* 28 Suppl A: S33–S40, 2007.
26. Hoepken HH, Gispert S, Morales B, Wingerter O, Del Turco D, Mulsch A, Nussbaum RL, Muller K, Drose S, Brandt U, Deller T, Wirth B, Kudin AP, Kunz WS, and Auburger G. Mitochondrial dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6. *Neurobiol Dis* 25: 401–411, 2007.
27. Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, and Spitsin SV. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J* 14: 691–698, 2000.
28. Houtkooper RH, Pirinen E, and Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 225–238, 2012.
29. Hsu P, Santner-Nanan B, Dahlstrom JE, Fadia M, Chandra A, Peek M, and Nanan R. Altered decidual DC-SIGN+ antigen-presenting cells and impaired regulatory T-cell induction in preeclampsia. *Am J Pathol* 181: 2149–2160, 2012.
30. Hubbi ME, Hu H, Kshitz, Gilkes DM, and Semenza GL. Sirtuin-7 inhibits the activity of hypoxia-inducible factors. *J Biol Chem* 288: 20768–20775, 2013.
31. Iglesias-Platas I, Monk D, Jebbink J, Buimer M, Boer K, van der Post J, Hills F, Apostolidou S, Ris-Stalpers C, Stanier P, and Moore GE. STOX1 is not imprinted and is not likely to be involved in preeclampsia. *Nat Genet* 39: 279–280, 2007.
32. Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, Kurashina R, Luo SS, Ishikawa T, Takizawa T, Hirashima C, Takahashi K, Migita M, Ishikawa G, Yoneyama K, Asakura H, Izumi A, Matsubara S, and Takeshita T. Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1 is dysregulated by miR-210 and miR-518c that are aberrantly expressed in preeclamptic placentas: a novel marker for predicting preeclampsia. *Hypertension* 59: 265–273, 2012.
33. Jauniaux E, Gulbis B, and Burton GJ. Physiological implications of the materno-fetal oxygen gradient in human early pregnancy. *Reprod Biomed Online* 7: 250–253, 2003.
34. Johal T, Lees CC, Everett TR, and Wilkinson IB. The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in preeclampsia. *Br J Clin Pharmacol* 2013. DOI: 10.1111/bcp.12301.
35. Kaufmann P, Black S, and Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 69: 1–7, 2003.
36. Kim YN, Kim HK, Warda M, Kim N, Park WS, Prince Adel B, Jeong DH, Lee DS, Kim KT, and Han J. Toward a better understanding of preeclampsia: comparative proteomic analysis of preeclamptic placentas. *Proteomics Clin Appl* 1: 1625–1636, 2007.
37. Kivinen K, Peterson H, Hiltunen L, Laiuori H, Heino S, Tiala I, Knuutila S, Rasi V, and Kere J. Evaluation of STOX1 as a preeclampsia candidate gene in a population-wide sample. *Eur J Hum Genet* 15: 494–497, 2007.
38. Kuznetsov AV, Strobl D, Ruttman E, Konigsrainer A, Margreiter R, and Gnaiger E. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. *Anal Biochem* 305: 186–194, 2002.
39. Latil M, Rocheteau P, Chatre L, Sanulli S, Memet S, Ricchetti M, Tajbakhsh S, and Chretien F. Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nat Commun* 3: 903, 2012.
40. Livak K and Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method. *Methods* 25: 402–408, 2001.
41. Loeffler LF, Navas-Acien A, Brady TM, Miller ER 3rd, and Fadrowski JJ. Uric acid level and elevated blood pressure in US adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2006. *Hypertension* 59: 811–817, 2012.
42. Lounifi I, Arc E, Molassiotis A, Job D, Rajjou L, and Tanou G. Interplay between protein carbonylation and nitrosylation in plants. *Proteomics* 13: 568–578, 2013.
43. Mando C, De Palma C, Stampalija T, Anelli GM, Figus M, Novielli C, Parisi F, Clementi E, and Ferrazzi E, Cetin I. Placental mitochondrial content and function in intrauterine growth restriction and preeclampsia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013.
44. Mathew SS, Bryant PW, and Burch AD. Accumulation of oxidized proteins in Herpesvirus infected cells. *Free Radic Biol Med* 49: 383–391, 2010.
45. Mazzanti L, Cecati M, Vignini A, D'Eusanio S, Emanuelli M, Giannubilo SR, Saccucci F, and Tranquilli AL. Placental expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase and nitric oxide levels in patients with HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 205: 236.e1–e7, 2011.
46. Mazzanti L, Raffaelli F, Vignini A, Nanetti L, Vitali P, Boscarato V, Giannubilo SR, and Tranquilli AL. Nitric oxide and peroxynitrite platelet levels in gestational hypertension and preeclampsia. *Platelets* 23: 26–35, 2012.
47. Melsers S, Chatelain EH, Lavie J, Mahfouf W, Jose C, Obre E, Goorden S, Prialut M, Elgersma Y, Rezvani HR, Rossignol R, and Benard G. Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell Metab* 17: 719–730, 2013.
48. Mishra N, Nugent WH, Mahavadi S, and Walsh SW. Mechanisms of enhanced vascular reactivity in preeclampsia. *Hypertension* 58: 867–873, 2011.
49. Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, and Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11960–11965, 2009.
50. Muralimanoharan S, Maloyan A, Mele J, Guo C, Myatt LG, and Myatt L. MIR-210 modulates mitochondrial respiration in placenta with preeclampsia. *Placenta* 33: 816–823, 2012.
51. Myatt L. Review: reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 31 Suppl: S66–S69, 2010.
52. Noris M, Perico N, and Remuzzi G. Mechanisms of disease: pre-eclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol* 1: 98–114, 2005; quiz 120.

53. Poyton RO, Ball KA, and Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 20: 332–340, 2009.
54. Rabinowitz JD and White E. Autophagy and metabolism. *Science* 330: 1344–1348, 2010.
55. Rajakumar A, Cerdeira AS, Rana S, Zsengeller Z, Edmunds L, Jeyabalan A, Hubel CA, Stillman IE, Parikh SM, and Karumanchi SA. Transcriptionally active syncytial aggregates in the maternal circulation may contribute to circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Hypertension* 59: 256–264, 2012.
56. Rigourd V, Chauvet C, Chelbi ST, Rebourcet R, Mondon F, Letourneur F, Mignot TM, Barbaux S, and Vaiman D. STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PLoS One* 3: e3905, 2008.
57. Roberts JM and Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet* 354: 788–789, 1999.
58. Sankaralingam S, Xu H, and Davidge ST. Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovasc Res* 85: 194–203, 2010.
59. Scaduto RC Jr., and Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 76: 469–477, 1999.
60. Schmidt TS, McNeill E, Douglas G, Crabtree MJ, Hale AB, Khoo J, O'Neill CA, Cheng A, Channon KM, and Alp NJ. Tetrahydrobiopterin supplementation reduces atherosclerosis and vascular inflammation in apolipoprotein E-knockout mice. *Clin Sci (Lond)* 119: 131–142, 2010.
61. Sdassi N, Silveri L, Laubier J, Tilly G, Costa J, Layani S, Vilotte JL, and Le Provost F. Identification and characterization of new miRNAs cloned from normal mouse mammary gland. *BMC Genomics* 10: 149, 2009.
62. Serdar Z, Gur E, Colakoethullary M, Develioethlu O, and Sarandol E. Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 268: 19–25, 2003.
63. Sertorio JT, Lacchini R, Amaral LM, Palei AC, Cavalli RC, Sandrim VC, Duarte G, and Tanus-Santos JE. Haptoglobin polymorphism affects nitric oxide bioavailability in preeclampsia. *J Hum Hypertens* 27: 349–354, 2013.
64. Shi Z, Long W, Zhao C, Guo X, Shen R, and Ding H. Comparative proteomics analysis suggests that placental mitochondria are involved in the development of preeclampsia. *PLoS One* 8: e64351, 2013.
65. Shimizu K, Ogawa F, Muroi E, Hara T, Komura K, Bae SJ, and Sato S. Increased serum levels of nitrotyrosine, a marker for peroxynitrite production, in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 25: 281–286, 2007.
66. Sibai BM. Thrombophilia and severe preeclampsia: time to screen and treat in future pregnancies? *Hypertension* 46: 1252–1253, 2005.
67. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, and Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15545–15550, 2005.
68. Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 6: 917–935, 2007.
69. Szabo C, Ischiropoulos H, and Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6: 662–680, 2007.
70. van Dijk M, Drewlo S, and Oudejans CB. Differential methylation of STOX1 in human placenta. *Epigenetics* 5: 736–742, 2010.
71. van Dijk M, Mulders J, Poutsma A, Konst AA, Lachmeijer AM, Dekker GA, Blankenstein MA, and Oudejans CB. Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet* 37: 514–519, 2005.
72. Wang Y and Walsh SW. Placental mitochondria as a source of oxidative stress in pre-eclampsia. *Placenta* 19: 581–586, 1998.
73. Wassmann S, Wassmann K, and Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44: 381–386, 2004.
74. Webster RP, Brockman D, and Myatt L. Nitration of p38 MAPK in the placenta: association of nitration with reduced catalytic activity of p38 MAPK in pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 12: 677–685, 2006.
75. Werner ER, Blau N, and Thony B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J* 438: 397–414, 2011.
76. Youle RJ and Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 9–14, 2011.

Address correspondence to:

Dr. Daniel Vaiman
Department of Development, Reproduction, and Cancer
Institut Cochin
INSERM U1016
24 Rue du Faubourg St. Jacques
Paris 75014
France

E-mail: daniel.vaiman@inserm.fr

Dr. Miria Ricchetti
Unité de Génétique Moléculaire des Levures
Institut Pasteur
25 Rue du Docteur Roux
Paris 75724 cedex 15
France

E-mail: mricch@pasteur.fr

Date of first submission to ARS Central, October 16, 2013; date of final revised submission, April 7, 2014; date of acceptance, April 14, 2014.

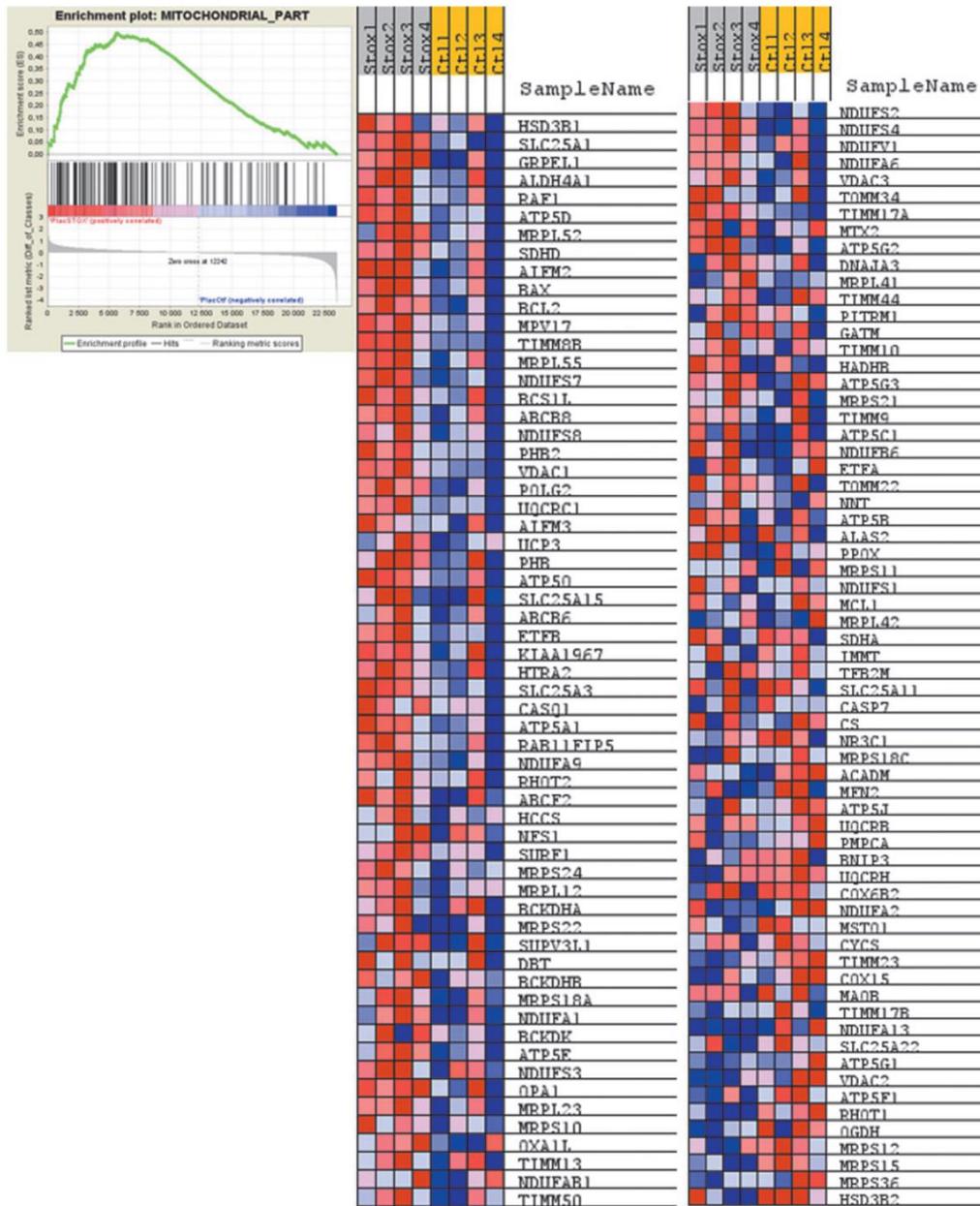
Abbreviations Used

ATP = adenosine triphosphate
BH4 = tetrahydrobiopterin
BSA = bovine serum albumin
COX = cyclooxygenase
DCFH-DA = 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DDR = DNA damage response
DHFR = dihydrofolate reductase
DHR123 = dihydrorhodamine 123
DNPH = 2,4-dinitrophenylhydrazine
DRP1 = dynamin related protein 1
DUOX = dual oxidase
FDR = false discovery rate
FOXO1 = forkhead box protein O1

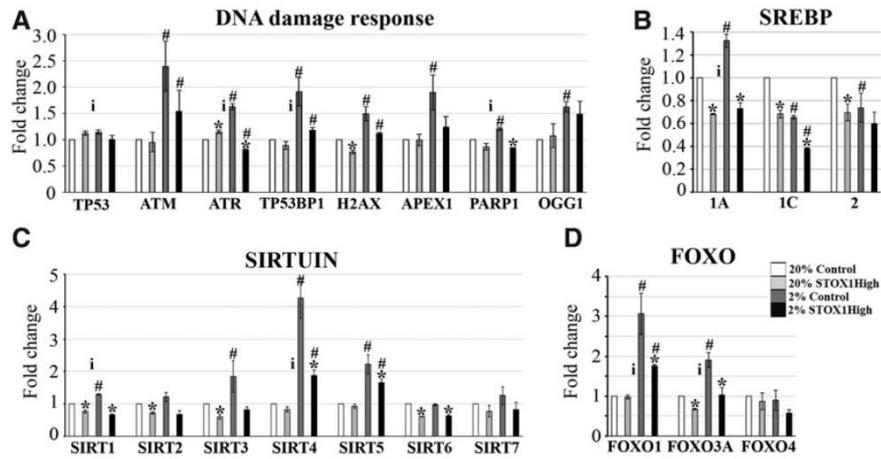
Abbreviations Used (Cont.)

FOXO3a = forkhead box protein O3a
 GABPA = GA-binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa
 GABPB1 = GA-binding protein transcription factor, beta subunit 1
 GCH1 = GTP cyclohydrolase 1
 GSEA = Gene Set Enrichment Analysis
 HIF = hypoxia-inducible factor
 iNOS = nitric oxide synthase 2, inducible
 MAP1LC3B = microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
 MMP = mitochondrial membrane potential
 mREP = mitochondrial replication marker (labeling D-loop opening)
 MTHFR = methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)
 mTRANS = a mixture of probes that target several mitochondrial RNAs
 mTRIP = mitochondrial transcription and replication imaging protocol
 NAC = *N*-acetyl cysteine
 NO = nitric oxide
 NOS = nitric oxide synthase
 NOX = NADPH oxidase
 NOXA1 = NOX activator 1
 NOXO1 = NADPH oxidase organizer 1
 NRF1 = nuclear respiratory factor 1
 NRF2A = GABPA, GA-binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa
 OPA1 = optic atrophy 1 (autosomal dominant)
 PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis
 PARK2 = Parkinson protein 2, E3 ubiquitin protein ligase (Parkin)
 PBS = phosphate-buffered saline
 PFA = paraformaldehyde

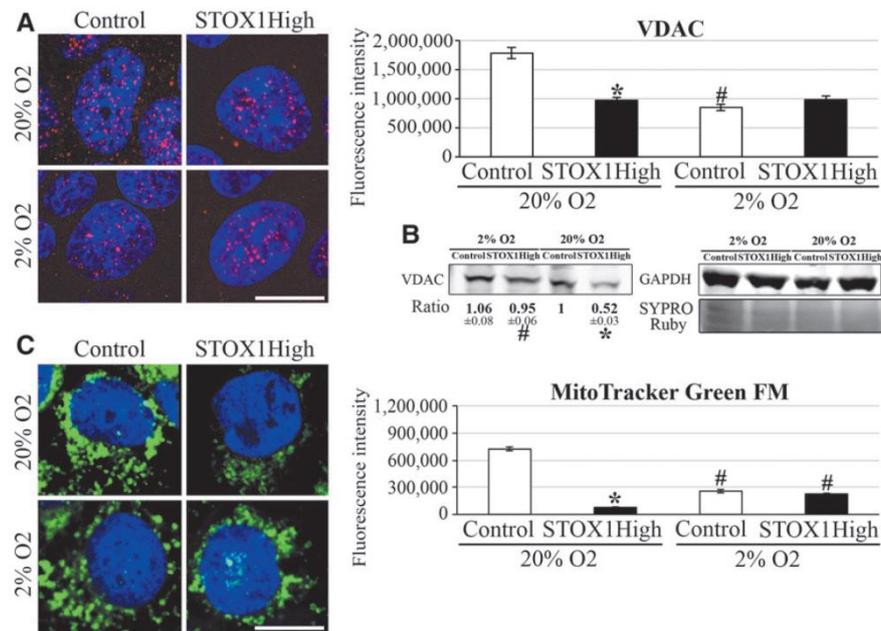
PGC1 α = peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
 PGC1 β = peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta
 PINK1 = PTEN-induced putative kinase 1
 POLG = polymerase (DNA directed), gamma
 PRDX2 = peroxiredoxin 2
 PRDX5 = peroxiredoxin 5
 PTPS = 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase
 RNS = reactive nitrogen species
 ROS = reactive oxygen species
 RT = room temperature
 RT-PCR = reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
 SD = standard deviation
 SDS = sodium dodecyl sulfate
 sENG = soluble endoglin
 sFLT-1 = soluble fms-related tyrosine kinase 1
 SOD2 = superoxide dismutase 2, mitochondrial
 SPR = sepiapterin reductase (7,8-dihydrobiopterin:NADP⁺ oxidoreductase)
 SREBP1A = sterol regulatory element binding transcription factor 1, isoform A
 SREBP1C = sterol regulatory element binding transcription factor 1, isoform C
 SSD = saline-sodium citrate
 STOX1 = storkhead box 1
 TFAM = transcription factor A, mitochondrial
 TMRE = tetramethylrhodamine ethyl ester
 TOM22 = translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)
 TRX1 = thioredoxin 1
 TRX2 = thioredoxin 2
 VDAC = voltage-dependent anion channel
 WT = wild-type



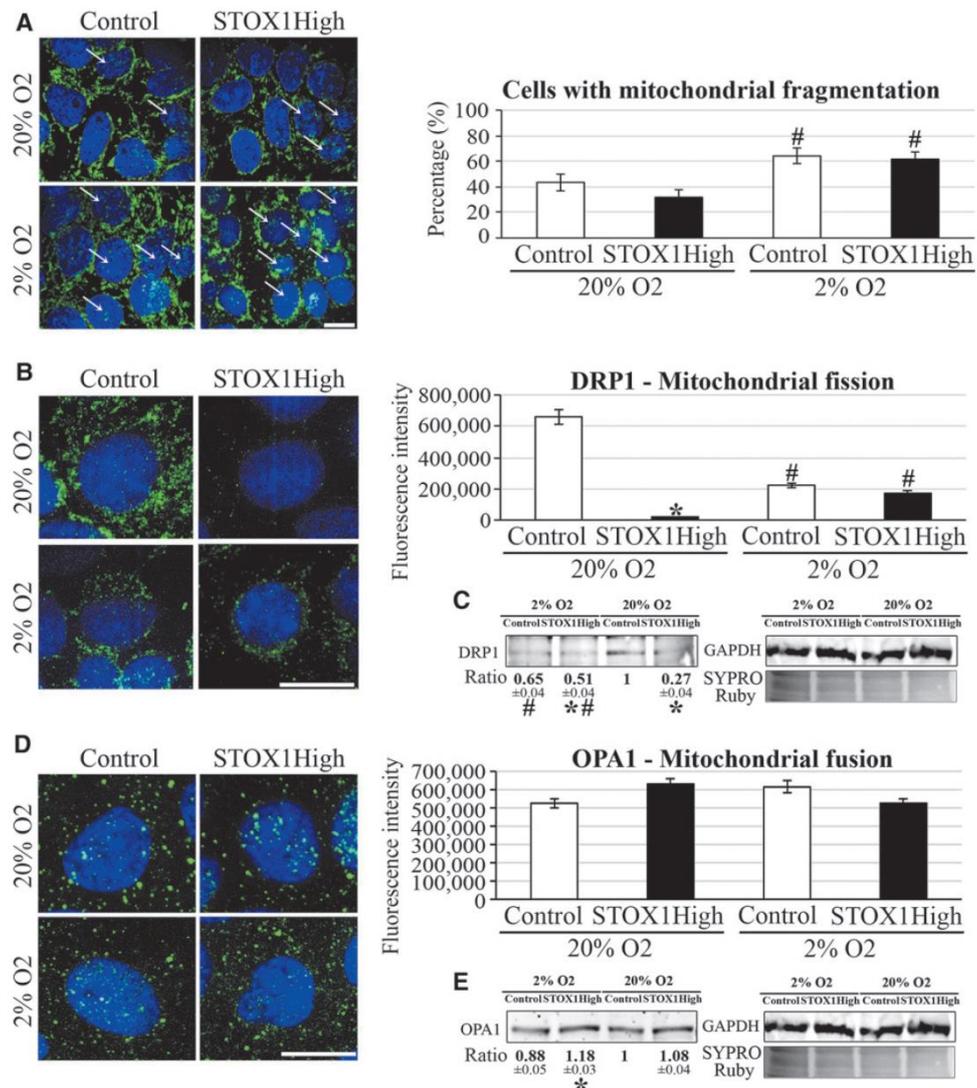
SUPPLEMENTARY FIG. S1. The “mitochondrial part” group of genes identified by GSEA is over-represented in STOX1-overexpressing placentas. The plot in the upper left part represents the enrichment of STOX1-induced genes in the subset of genes involved in mitochondrial structure and function. The genes involved are sorted on the right part of the figure starting from the most induced ones by STOX1 in the placentas. Each small square corresponds to one placental sample, and the color varies from dark red to dark blue as a function of the level of induction. For the pathway shown in this example, the false discovery rate was 0.017. GSEA, Gene Set Enrichment Analysis; STOX1, storkhead box 1.



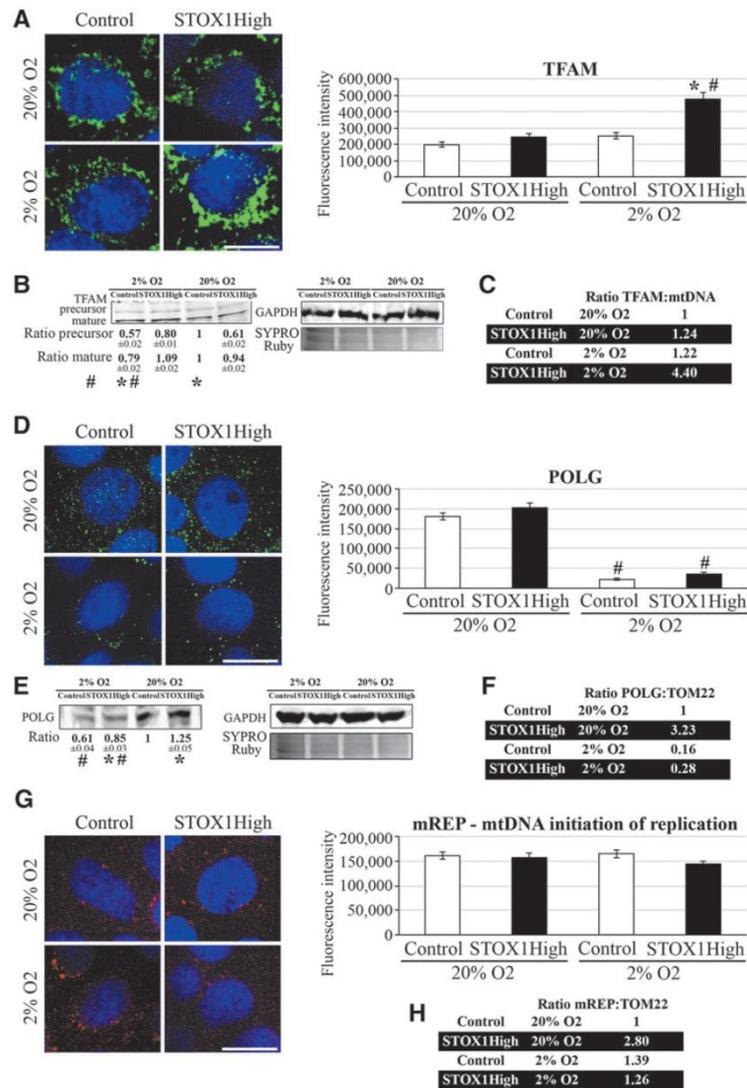
SUPPLEMENTARY FIG. S2. Altered expression of genes in STOX1 overexpressing cells recapitulates reported pre-eclampsia alterations. Quantitative RT-qPCR of (A) key genes involved in DNA damage response, (B) cholesterol homeostasis *SREBP* genes (*SREBP1A* and *1C* are generated from a single gene through the use of alternate promoters), (C) sirtuins, and (D) *FOXO* genes, in control and STOX1High cells at 20% O₂ (white and light gray bars, respectively) and at 2% (dark gray and black bars, respectively). Results are expressed as mean ± SD. * Significant effect of STOX1, # Significant effect of O₂, i significant interaction effect between the two factors. RT-qPCR, reverse transcription quantitative PCR; SD, standard deviation.



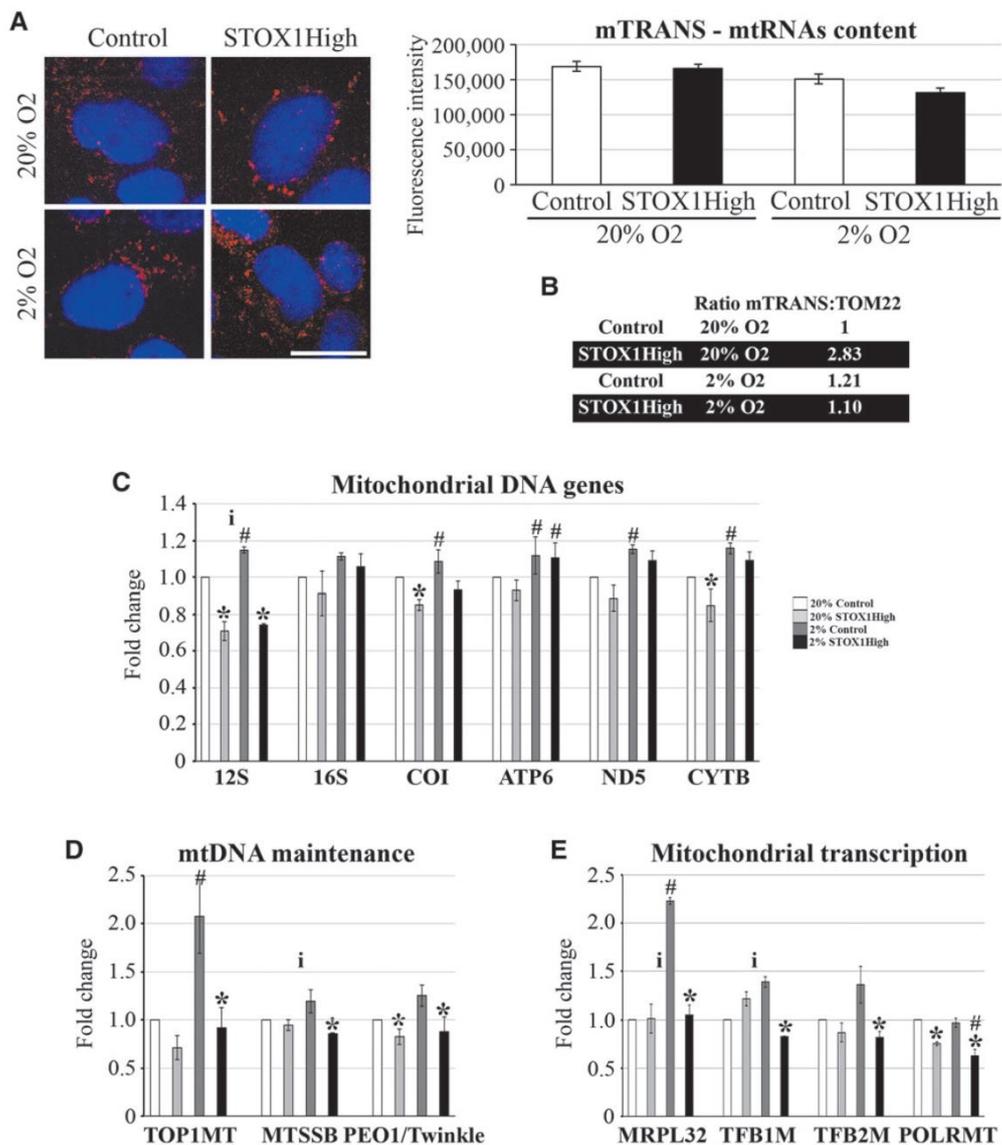
SUPPLEMENTARY FIG. S3. Further analysis of the mitochondrial mass in STOX1 overexpressing cells. (A) Three-dimensional-reconstructed cells of immunofluorescent staining with anti-VDAC (red) and counterstained for Hoechst (blue); *right panel*, fluorescence intensity quantification of VDAC per cell, $n = 30$ cells from three independent experiments, per condition. (B) Western blot of VDAC, internal reference GAPDH, and loading control SYPRO Ruby. The ratio of VDAC signal normalized first to GAPDH and then to control cells at 2% O₂ is indicated; $n = 3$ independent experiments. (C) Three-dimensional-reconstructed cells stained with MitoTracker Green FM, and counterstained with Hoechst, *right panel*, fluorescence intensity quantification of MitoTracker Green FM per cell. $n = 30$ cells from three independent experiments, per condition. Results are expressed as mean \pm SD. * Significant effect of STOX1, # significant effect of O₂. VDAC, voltage-dependent anion channel.



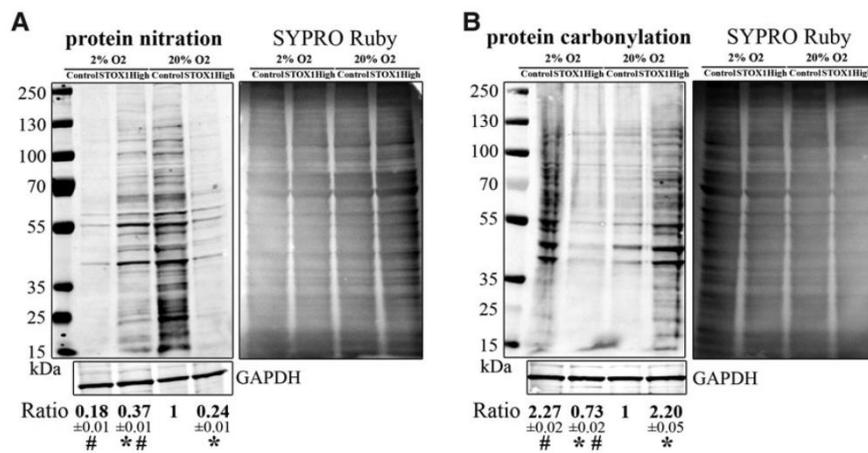
SUPPLEMENTARY FIG. S4. Impaired markers of mitochondrial fission in STOX1 overexpressing cells at 20% O₂. (A) Three-dimensional-reconstructed cells immunostained with anti-TOM22 (and counterstained with Hoechst); arrows indicate cells with detectable mitochondrial fragmentation, whereas unlabeled cells prevalently display unfragmented mitochondrial network. Right panel, percentage of cells with detectable mitochondrial fragmentation. (B) Three-dimensional-reconstructed cells immunostained stained for DRP1 (green) and counterstained for Hoechst; right panel, fluorescence intensity quantification of DRP1 per cell. (C) Western blot of DRP1 and internal reference GAPDH and loading control SYPRO Ruby. Below is indicated the ratio of DRP1 signal normalized first to GAPDH then to control cells at 2% O₂; $n = 3$ independent experiments. (D) Three-dimensional-reconstructed cells immunostained stained for OPA1 (green), an essential regulator of mitochondrial fusion, and counterstained for Hoechst; right panel, fluorescence intensity quantification of OPA1 per cell. (E) Western blot of OPA1, internal reference GAPDH, and loading control SYPRO Ruby. The ratio of OPA1 signal normalized first to GAPDH and then to control cells at 2% O₂ is indicated; $n = 3$ independent experiments. For immunofluorescence, the quantifications were carried out from $n = 30$ cells from three independent experiments for each condition. Scale bar = 10 μm . Results are expressed as mean \pm SD. * Significant effect of STOX1, # significant effect of O₂. DRP1, dynamin-related protein 1; OPA1, optic atrophy 1.



SUPPLEMENTARY FIG. S5. Altered mtDNA content and protecting factor TFAM in STOX1 overexpressing cells in hypoxia. (A) Three-dimensional-reconstructed cells immunostained for TFAM (green) and counterstained for Hoechst. Scale bar = 10 μ m; *right panel*, fluorescence intensity quantification of TFAM per cell. (B) Western blot of TFAM (precursor and mature form), internal reference GAPDH, and loading control SYPRO Ruby. The ratio of TFAM signal (either precursor or mature) normalized first to GAPDH and then to control cells at 20% O₂ is indicated; $n=3$ independent experiments. (C) Ratio of TFAM (immunofluorescence)/mtDNA normalized to control cells at 20% O₂. (D) Three-dimensional-reconstructed cells stained with anti-POLG (green), and counterstained with Hoechst; *right panel*, fluorescence intensity quantification of POLG per cell. (E) Western blot of POLG, internal reference GAPDH, and loading control SYPRO Ruby. The ratio of POLG signal normalized first to GAPDH and then to control cells at 20% O₂ is indicated; $n=3$ experiments. (F) Ratio of POLG (immunofluorescence)/TOM22 (immunofluorescence, from Fig. 3A) normalized to control cells at 2% O₂. (G) Three-dimensional-reconstructed cells labeled with the mTRIP probe mREP (red) to detect mtDNA initiation of replication, and counterstained with Hoechst; *right panel*, fluorescence intensity quantification of mREP per cell. (H) Ratio of mREP/TOM22 (immunofluorescence, from Fig. 3A) normalized to control cells at 20% O₂. Immunofluorescence, $n=30$ cells from three independent experiments, per condition. Results are expressed as mean \pm SD. * Significant effect of STOX1, # significant effect of O₂. mREP, mitochondrial replication marker; mTRIP, mitochondrial transcription and replication imaging protocol; POLG, polymerase (DNA directed), gamma; TFAM, transcription factor A, mitochondrial.



SUPPLEMENTARY FIG. S6. Analysis of mitochondrial transcripts and expression of mtDNA processing factors in STOX1 overexpressing cells. (A) Three-dimensional-reconstructed cells labeled with the mTRIP probe mTRANS (red) to detect global mtRNAs content, and counterstained with Hoechst; *right panel*, fluorescence intensity quantification of mTRANS *per cell*. $n=30$ cells from three independent experiments, per condition. (B) Ratio of mTRANS:TOM22 (immunofluorescence, from Fig. 3A) normalized to control cells at 2% O₂. $n=30$. Scale bar = 10 μ m. Quantitative RT-PCR of (C) mitochondrial genes, and key genes involved in (D) mtDNA maintenance [topoisomerase I *TOP1MT*, the mtDNA binding protein *MTSSB*, and helicase *PEO1/Twinkle*], and (E) mtDNA transcription and translation (mitochondrial ribosomal protein *MRPL32*, the mitochondrial transcription factors *TFB1M* and *TFB2M*, and the mitochondrial RNA polymerase *POLRMT*). Results are expressed as mean \pm SD. * Significant effect of STOX1, # significant effect of O₂, i significant interaction effect between the two factors, as described in the “Material and Methods” section. mTRANS, a mixture of probes that target several mitochondrial RNAs.



SUPPLEMENTARY FIG. S7. Detection of protein nitration and carbonylation by Western blot. Western blots of total protein extracts stained with (A) 3-nitrotyrosine antibody for detection of protein nitration, and (B) anti-DNP, after DNPH treatment, to detect protein carbonylation. Immunostaining of GAPDH was used as a control as well as a loading control (SYPRO Ruby). The ratio of protein nitration or carbonylation normalized first to GAPDH and then to control cells at 20% O₂ is indicated. * Significant effect of STOX1, # significant effect of O₂. DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine.

ARTICLE 2. ENDOTHELIAL CELL DYSFUNCTION AND CARDIAC HYPERTROPHY IN THE STOX1 MODEL OF PREECLAMPSIA

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia

Received: 22 June 2015
Accepted: 01 December 2015
Published: 13 January 2016

Aurélien Ducat^{1,2,3,4,*}, Ludivine Doridot^{1,2,3,4,*}, Rosamaria Calicchio^{1,2,3,4,*}, Celine Méhats^{1,2,3,4}, Jean-Luc Vilotte⁵, Johann Castille⁵, Sandrine Barbaux^{1,2,3,4}, Betty Couderc^{1,2,3,4}, Sébastien Jacques^{1,2,3,4}, Franck Letourneur^{1,2,3,4}, Christophe Buffat⁶, Fabien Le Grand^{1,2,3,4}, Paul Laissue⁷, Francisco Miralles^{1,2,3,4,†} & Daniel Vaiman^{1,2,3,4,†}

Preeclampsia is a disease of pregnancy involving systemic endothelial dysfunction. However, cardiovascular consequences of preeclampsia are difficult to analyze in humans. The objective of the present study is to evaluate the cardiovascular dysfunction induced by preeclampsia by examining the endothelium of mice suffering of severe preeclampsia induced by STOX1 overexpression. Using Next Generation Sequencing on endothelial cells of mice carrying either transgenic or control embryos, we discovered significant alterations of gene networks involved in inflammation, cell cycle, and cardiac hypertrophy. In addition, the heart of the preeclamptic mice revealed cardiac hypertrophy associated with histological anomalies. Bioinformatics comparison of the networks of modified genes in the endothelial cells of the preeclamptic mice and HUVECs exposed to plasma from preeclamptic women identified striking similarities. The cardiovascular alterations in the pregnant mice are comparable to those endured by the cardiovascular system of preeclamptic women. The STOX1 mice could help to better understand the endothelial dysfunction in the context of preeclampsia, and guide the search for efficient therapies able to protect the maternal endothelium during the disease and its aftermath.

Preeclampsia is a complication of pregnancy characterized by gestational hypertension and proteinuria¹. Preeclampsia affects ~5% of pregnant women leading to maternal and fetal morbidity and mortality^{2,3}.

Endothelial dysfunction is a characteristic of preeclampsia⁴. Women affected by preeclampsia have also cardiac dysfunction, and cardiac hypertrophy⁵. Epidemiological data report an increased risk of cardiovascular diseases later in life in women who have had a preeclamptic pregnancy⁶.

We recently developed a mouse model of preeclampsia by transgenic overexpression of the transcription factor STOX1⁷. STOX1 was identified in Dutch families by a positional cloning approach, and its involvement in the pathophysiology of preeclampsia was inferred⁸. Crossing transgenic males with WT females induces a severe preeclamptic phenotype, with gestational hypertension, proteinuria, increased plasma levels of soluble Endoglin (sENG) and soluble FMS-like tyrosine kinase 1 (sFLT1), as well as kidney histological anomalies in line with the proteinuria. In the transgenic placentas, STOX1 overexpression induces alterations of mitochondrial function and nitroso-redox imbalance, that could trigger the disease⁹.

A classical vision of the origin of the maternal symptoms in preeclampsia is through the release of toxic substances by the placenta that may be used for diagnostic and prognostic¹⁰, some of them such as sENG or sFLT1 being increased in the plasma of preeclamptic women even before the onset of the symptoms¹¹. Preeclampsia remains, first and foremost a disease of the endothelium¹², targeted by various placental-derived factors (antiangiogenic molecules as well as nucleic acids including miRNAs and microparticles).

¹Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France. ²Cnrs, UMR8104, Paris, France. ³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁴DHU Risques et Grossesse, PRES Sorbonne Paris Cité, 53 avenue de l'observatoire, 75014 Paris. ⁵Unité Mixtes de Recherche 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Institut National de la Recherche Agronomique Jouy-en-Josas, France. ⁶Genetics and Endocrine Oncology, Hôpital de la Conception Assistance Publique-Hopitaux de Marseille, Marseille, France. ⁷Unidad de Genética. Grupo GENIUIROS. Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia. ⁸These authors contributed equally to this work. ⁹These authors jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.V. (email: daniel.vaiman@inserm.fr)

Since endothelial alterations are difficult to study in human patients, we decided to evaluate thoroughly the expressional effect of a preeclamptic state on the endothelium and the heart in the STOX1 model. We used RNA-seq to examine the transcriptome of purified endothelial cells (EC) from pregnant mice bearing either WT (normal pregnancy) or STOX1 transgenic embryos (preeclamptic pregnancies). Bioinformatics analysis revealed down-regulation of genes involved in cell division, and up-regulation of genes involved in fibrosis, inflammation and cardiac hypertrophy, associated with increased heart mass, abnormal heart histology, and expression of markers of cardiac hypertrophy, consistently with the increasing number of reports describing links between preeclampsia and cardiovascular disease¹³. Overall, the alterations found in the heart and in the endothelium of wild-type females carrying transgenic embryos substantiate a model of 'dangerous placentas', able to induce systemic alterations in the mother. Then, we exposed an immortalized Human Umbilical Vein Endothelial Cell line (HUVEC) to plasma from human normotensive or preeclamptic pregnancies. Bioinformatics analysis revealed significant similarities between the *in vivo* alterations of the endothelium in the preeclamptic mice and the gene expression profile of HUVEC cells exposed to preeclamptic plasma. This suggests that our observations in mice could be extrapolated to women and paves the way to understand the molecular effects of preeclampsia in the cardiovascular system.

Methods

Animals experiments. *Breedings and Ethics.* The animals used in this study belonged to the FVB/N strain. WT ♀ mice were crossed with either WT or transgenic ♂ mice expressing the human *STOX1* under the control of the cytomegalovirus promoter, as previously described⁷. Animal experiments were carried out in strict accordance with the recommendations in the guidelines of the Code for Methods and Welfare Considerations in Behavioural Research with Animals (Directive 86/609/EC). And all efforts were made to minimize suffering. All experimental protocols were approved by the Local ethics committee of Jouy-en-Josas on the Ethics of Animal Experiments of the author's institution, INRA (Permit Number 12/035 (06.29.2012)). All animal manipulations were done according to the recommendations of the French Haut Conseil aux Biotechnologies (Permit Number N°6460 (06.25.2013)). Most of the work presented here, especially the RNA-seq analysis is focused on the TgSTOX13 mice, the only strain where homozygous transgenics could be obtained. Some of the heart expression data and heart histology were carried out conjointly on females crossed with males from the other strain available (TgSTOX42). Further details are given in the Supplementary Methods.

Endothelial cells purification. Six pregnant mice carrying either WT (3) or transgenic embryos (3) were sacrificed at E16.5. Then, muscles (from forelegs, hind legs and back) were rapidly dissected, removing fat and connective tissue. EC purification procedure is detailed in the Supplementary data. In addition to validate the gene expression modifications, three additional WT mice were sacrificed and the purified endothelium was exposed during three days either to plasma of preeclamptic mice (Carrying STOX1 overexpressing embryos) or to plasma of normal pregnant mice. The plasmas were collected at day 16.5 to 17.5 of pregnancy (normal pregnancy duration is 18.5 days in the FVB/N strain). The conditions used for treatment are the same as for the human experiment described below.

RNA-seq analysis of RNA from endothelial cells. RNA-seq was performed by the society Genotypic Technology at Bangalore (India). The data were deposited as Fastq files as project STOX1ENDO, referred to as PRJNA275924.

Immunohistochemistry. Hearts were harvested, fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. IHC was performed as described¹⁴. The immunoreactivity was detected using the Novolink polymer detection system according to manufacturer's recommendations (Leica, Nanterre, France). Immunostaining was done using DAB, and tissue sections were counterstained with Mayer's hematoxylin solution (Merck Millipore, Guyancourt, France). Anti-CTGF antibody, rabbit polyclonal HPA031074 (Sigma Prestige antibodies, Sigma, St Louis, MO) was diluted 1:100 in PBS/ 1% BSA/0.1% Triton. IHC signals were analysed using NIH ImageJ software to quantify the staining within the heart in a 20x field of view under a microscope equipped with a DC 300F camera (digital module R, IM 1000, Leica).

qRT-PCR. Standard conditions were utilized as described previously⁹, using a LightCycler Roche 480 thermocycler.

Human cell experiments. *Preeclamptic plasmas.* The plasmas from patients were obtained at the Federative Research Institute 48 (Marseille, France) which approved the use of samples for the project (agreement 08-012); all the patients were duly informed of the use of their samples and gave an informed consent and the experiments (blood sampling) were carried out in accordance with the approved guidelines. Blood samples were collected in 4.5 ml, centrifuged for 10 min at 2000 g and 20 °C (Room Temperature). Plasma was aliquoted and kept at -80 °C. Details on the patients' characteristics are given in the Supplementary Methods.

HUVEC and SVEC culture. HUVEC cells were grown until forming 90% confluent monolayers, washed twice in PBS and serum-starved for 12 hours. The cells were then grown in culture medium supplemented with 10% (vol/vol) plasma from either preeclamptic patients (8) or controls (11), in 19 independent cultures. The medium was renewed every 24 hours until reaching 72 hours exposure. To note, during the experiment 5 cultures died, but no significant difference could be observed between control and preeclamptic plasmas (two from controls and three from preeclamptic plasmas, $p = 0.34$ by χ^2 , 1 df). The conditions for SVEC cultures were identical.

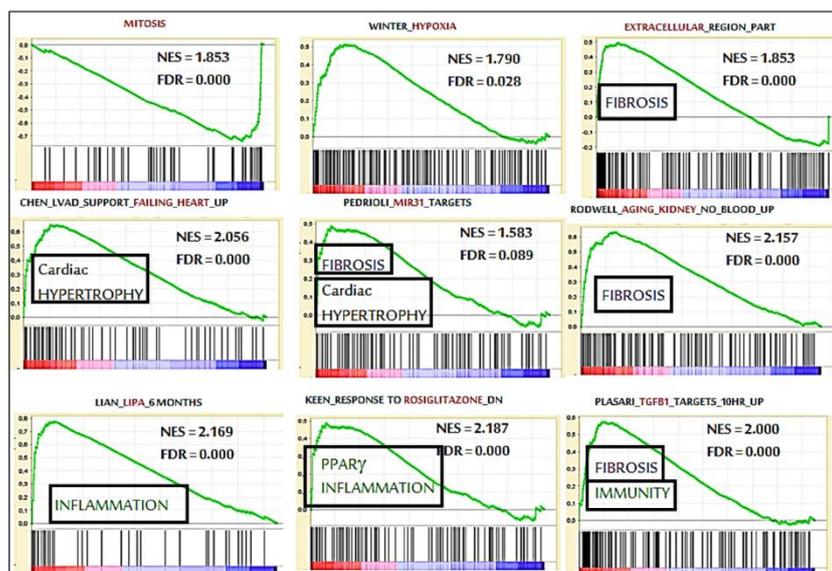


Figure 1. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). The gene expression data generated by RNA-seq was analyzed using GSEA to extract biological knowledge. Highly significant enriched gene-sets are shown here. In every thumbnail, the green curve represents the evolution of the density of the genes identified in the RNA-seq. The False Discovery Rate (FDR) is calculated by comparing the actual data with 1000 Monte-Carlo simulations. The NES (Normalized Enrichment Score) computes the density of modified genes in the dataset with the random expectancies, normalized by the number of genes found in a given gene cluster, to take into account the size of the cluster.

RNA extraction and quantitative RT-PCR conditions. Total RNA from tissues or HUVEC cells was extracted using Trizol Reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions, treated with RNase-free DNase, and quantified by spectrophotometry as described previously⁷. Reverse Transcription, and Quantitative RT-qPCR are described in Supplementary Methods, qPCR primers are listed in Table S2.

Microarray analysis of RNA from HUVEC exposed to control or preeclamptic plasmas. RNA quality was verified by Agilent bioanalyser 2100 and checked to have a RNA Integrity Number (RIN) systematically higher than 8. Two pools were hybridized on Agilent 8-plex 60 K microarrays at the Genomics Platform of the Cochin Institute according to standard validated protocols. The data were deposited at EMBL under the number E-MTAB-3348. Bioinformatics procedures are detailed in the Supplementary material.

Statistical analyses. ANOVA and post-hoc Student-Neumann-Keuls t-Tests were performed for relative expression analysis in the mouse hearts using the ΔCt values method. Differences in weight in the heart were performed using ANOVA followed by Dunnett t-test. The statistics for assessing the enrichment of group of genes or TF Binding sites in gene promoter is always based on Chi2 contingency tests that are directly performed online by DAVID, STRING or Cytoscape iRegulon tool. For basic statistics, the StatistXL add-in of ExcelTM was systematically used. $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Transcriptome of endothelial cells (EC) from preeclamptic mice. EC were isolated from the limbs of pregnant females and their purity was evaluated measuring the expression of endothelial markers (*Vwf*¹⁵, *Cd31*¹⁶, *Vcam1*¹⁷ and *Cdh5*¹⁸). The enrichment of mRNA for these markers was comprised between 6.1 fold for *Cdh5* and 24 fold for *Vwf* (Supplemental Figure S1A) indicating efficient purification. The RNA extracted from the cells was subjected to Next Generation Sequencing analysis (RNA-seq), and the resulting reads were aligned along 94,818 transcripts of the mouse genome. Of these, 33,011 were validated, corresponding to 14,220 different genes (most significantly modified listed in Table S1). RT-qPCR was performed on independent EC samples to confirm the RNA-seq results (Figure S1B).

The complete gene expression dataset was submitted to Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)¹⁹ to extract biological knowledge. We found 212 significantly enriched gene-sets (FDR < 0.25, $p < 0.01$, Table S3). Critical keywords for the gene-sets were: Mitosis, Cardiac Hypertrophy, Kidney Ageing, Fibrosis and Inflammation (Fig. 1).

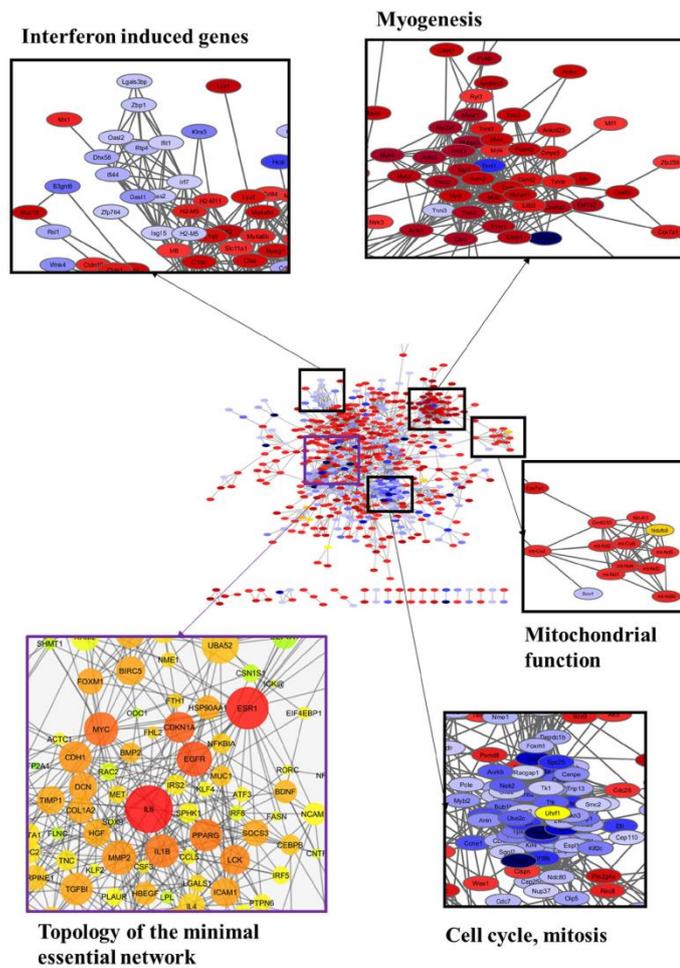


Figure 2. Protein-protein interaction network analysis. The DEGs identified from the RNAseq analysis, with a fold change ≥ 1.5 were used as seeds to construct a network of interacting proteins. The interactions between the DEGs were extracted from the STRING data base and visualized using Cytoscape software (center). The network nodes represent genes and edges interactions. The gene expression levels were mapped on the network. Red indicates up-regulation and blue down-regulation. A zoom is presented on some clusters including: Interferon-induced genes, Myogenic genes, Mitochondrial modulators and genes involved in cell cycle regulation (which are in this case drastically reduced). The left-down frame presents a topological analysis of the network. The size of the nodes is proportional to the number of connections established with other genes. The color, from green to red, is a centrality measure (betweenness centrality, BC). The BC quantifies how drastically a gene influences the structure of the whole network. IL6 is the most central gene in the network and its expression is induced in the EC by placental STOX1 overexpression.

Another method to analyse datasets of differentially expressed genes (DEGs) is to investigate if they coalesce into clusters of interacting genes/proteins. This analysis was performed with the 967 DEGs displaying a fold change (FC) ≥ 1.5 . Cluster analysis by DAVID of these DEGs identified KEGG pathways such as Dilated Cardiomyopathy and Cell Cycle, consistently with the GSEA analysis (Figure S3). Then, using the STRING database and a high interaction confidence level (0.7), we detected 893 interactions among these DEGs while 413 were expected by chance ($p < 10^{-100}$). These interactions were used to build a protein-protein interacting (PPI) network which was submitted to clustering analysis with Cytoscape to find functional modules (Fig. 2). Discrete modules were found, such as down-regulation of cell-cycle genes, and up-regulation of myogenic genes. Clusters

of mitochondrial genes were also identified, consistently with data obtained from the analysis of the placenta in preeclamptic pregnancies^{9,20}. We also detected a cluster of down-regulated genes composed of interferon targets.

Hub genes in the network were identified by topological analysis using the Cytoscape Network Analyzer. Among these, IL6, and to a lesser extent ESR1 presented the highest centrality scores. To identify transcriptional mechanisms controlling the DEGs, the top 10 % hub genes were used to build a Minimal Essential Network, MEN (Fig. 2). Promoter analysis of the MEN genes was done with the Cytoscape iRegulon apps (Figure S4, Table S4). A significant enrichment in binding sites was detected for transcription factors involved in muscle development (SOX9), inflammation (NFKB, IRF8), unfolded protein response (ATF4), cell proliferation (P53) and cell cycle (FOXM1).

Heart weight is increased in preeclamptic mice. Cardiac Hypertrophy appeared systematically in the bioinformatics analyses of our dataset. Therefore, 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. An increased weight was detected in the preeclamptic mice (Figure S3). The comparative microscopic examination revealed abnormalities in heart histology, in particular fiber disorganization, fibrosis and dilated nuclei (Fig. 3A). To assess the involvement of either hypertrophy or hyperplasia leading to this increased heart weight, we evaluated the expression of three hyperplasia markers (ki67, Topo2A and Tpx2) on heart cDNA from mice that carried either WT or transgenic embryos (6 and 10, respectively). While the expression was slightly increased for ki67 and Tpx2 (+20.7 and +21.2%, respectively) these differences were not significant (data not shown). This suggests that hypertrophy (rather than hyperplasia) is the principal mechanism responsible for the observed increase of heart weight in the preeclamptic mice.

Altered gene expression profiles in the hearts from preeclamptic mice. We measured the expression of markers of the Renin/Angiotensin system (RAS), known as locally activated in case of heart hypertrophy²¹. We observed 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 WT ♀ mice previously crossed with STOX1 transgenic ♂ compared to those crossed with WT ♂ (Fig. 3B). We also measured Endothelin-1 expression in the heart from these pregnant mice (Fig. 3B), since this factor is increased in cardiac hypertrophy²², and is known to be induced by Angiotensin II²³. All these genes were induced in the heart of mice carrying transgenic embryos. This was correlated with the expression levels of the transgene (about 15 times more in TgSTOX42 than in TgSTOX13).

Since the EC of pregnant mice carrying transgenic embryos revealed deregulation of genes involved in cardiac hypertrophy, we analyzed their expression in the heart. Eleven of these genes were investigated (*Ctgf*, *Dcn*, *Col1a1*, *Il6*, *Itgav*, *Dmd*, *Adcy7*, *Tnnc1*, *Myl2*, *Myl3*, *Tpm1*). We observed a significant up-regulation of *Myl3* and *Tpm1* (Fig. 3C). However the up-regulation was mild compared to that observed in EC (more than 4 fold for *Myl3*, and more than 3 fold for *Tpm1*). *Ctgf* that was induced 2.9 fold in the endothelium was on the contrary down-regulated 2.4 fold in the hearts (Fig. 3C). *Ctgf* immunostaining of heart sections revealed strong labeling at the edges of heart muscular fibers in the mice carrying a WT litter, whereas fainter labeling is found in the heart of the mice carrying a transgenic litter. Digitalized images quantified with ImageJ, confirmed a near 3 fold down-regulation of *Ctgf* protein, (Fig. 3D,E).

Comparative analysis of ECs dysfunction in the STOX1 mouse model and in HUVECs exposed to preeclamptic plasma. To investigate the effects of preeclamptic plasma on EC, we exposed HUVECs to plasma from mild preeclampsia, severe preeclampsia or controls for 72 hours and analyzed the gene-expression profiles using human Agilent 60 K microarrays. This allowed identifying 3,863 DEGs (186 were modified more than twice, 96 up and 90 down). Non-supervised clustering analysis of the 100 genes that present the lowest p-value (computed by ANOVA) clearly discriminates between the cells treated with the control versus the preeclamptic plasmas (Supplementary Figure S5). The DEGs with a FC ≥ 1.5 were used as seeds to build two PPI networks describing the HUVECs response to mild or severe PE plasmas. We compared both networks with the preeclamptic-mice EC network using NeAT, a software which computes the union between two networks and assesses the statistical significance of their intersection²⁴. The hypergeometric P-values of the intersections between the networks appeared highly significant (Table 1). However, the significance between the preeclamptic mice EC network is higher for the severe preeclampsia network than for the mild. Figure 4 shows the nodes and interactions at the intersection of these two networks. The topological analysis indicates that IL6, IL1B, TGFB1, and ITGB2 are the principal hub genes (Fig. 4). Biological Processes associated with this network were « blood coagulation », « chronic inflammatory response », « leukocyte migration », and « extracellular matrix » (Table S5). Finally, to evaluate *in vitro* the effect of the plasma of mice that had had either a preeclamptic or normal pregnancy on murine endothelial cells, we prepared primary endothelial cells from three control mice, divided them into two wells from 96-well plated and applied the two types of plasma onto the two wells. Then we prepared mRNA and cDNA and analyzed the expression of a sample of genes by qRT-PCR. We also performed the same experiment on three replicates of the SVEC mouse endothelial cell line. Overall, genes induced in the RNA-seq (*in vivo experiment*) were also induced in the *in vitro* conditions, but the correlation was much stronger with primary cells (Supplementary Figure S6).

Discussion

In this study, RNA-seq analysis revealed endothelial transcriptome alterations in the STOX1 mouse model of preeclampsia. In addition, cardiac hypertrophy and alterations of cardiac tissue were observed. However, our experimental design does not allow determining if the cardiac alterations are specifically due to the preeclamptic state induced by STOX1 or a consequence of the sustained increased in blood pressure.

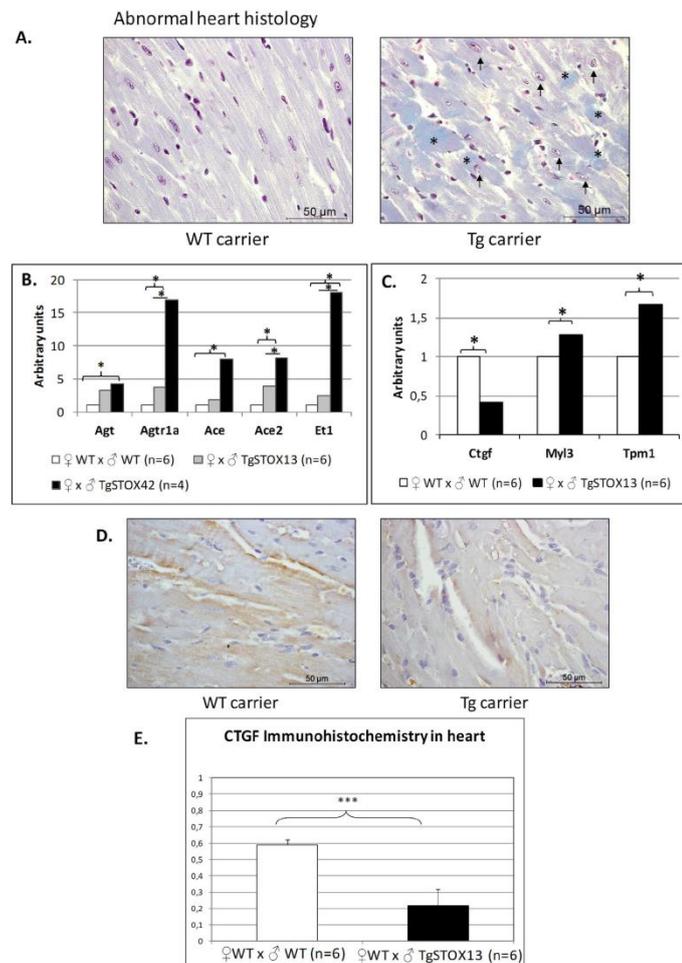


Figure 3. Heart histology and gene expression. Pregnant mice crossed with WT males ($n = 5$), transgenic TgSTOX13 ($n = 5$) or TgSTOX42 ($n = 7$) males were sacrificed at the end of gestation (E16.5-E17.5) and their hearts analyzed. (A) Heart light-field photomicrographs of Masson's trichrome-stained sections of heart collected from dams carrying WT litters (left panel) and from dams carrying transgenic litters (right panel). Arrows indicate dilated nucleus and asterisks indicate collagen deposits. (B) Relative expression of the Renin/Angiotensin System and (C) Endothelin-1 in the heart from control versus preeclamptic pregnant mice. Hearts were retrieved at the end of gestation (E16.5-E17.5) from mice crossed with wild type males (control, white bars, $n = 6$) or crossed with transgenic males (preeclamptic gestation, grey and black bars). The Ct were normalized by those obtained for two reference genes, *Sdha* and *CyclophilinA*, and the expressions for the control gestations were then arbitrarily set to one. $*p < 0,05$. The third panel (C) represents the expression analysis of markers that were modified in the endothelial cells in the heart context. The genes are grouped according to their overall expression level. (D) IHC analysis of heart sections collected from dams carrying WT litters (left panel) and from dams carrying transgenic litters (right panel) for Ctgf staining. Representative data are from six animals in each group. Scale bar is on the right lower corner. The labeling of the protein confirmed the specific mRNA decrease of mice carrying transgenic embryos, a mark of cardiac hypertrophy. (E) Quantification of the IHC labeling after ImageJ treatment, transforming the image in a Black and White and measuring the labeled surfaces.

The WT female mice cardiovascular/endothelial function and structure was systematically affected following foeto-placental expression of *STOX1*. The EC harbor a gene expression signature centered on IL-6 associated to inflammatory activation, a systematic down-regulation of genes involved in cell cycle and cell proliferation, and an

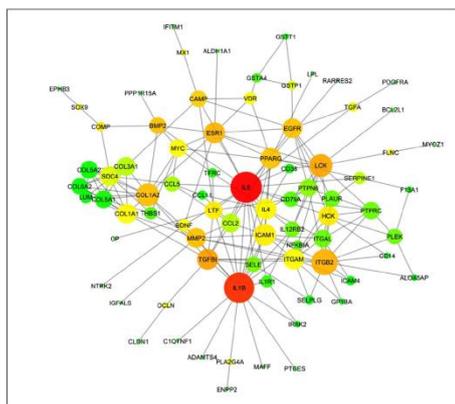


Figure 4. Comparison between the transcriptomic alterations of the endothelium in the STOX1 model and HUVECs exposed to preeclamptic plasma. HUVECs were exposed for 72 hours to mild or severe PE plasma and their transcriptome analyzed using human expression microarrays. DEGs identified in HUVECs exposed to mild or severe preeclampsia plasma were used to build networks (mild-PE-Ntw and severe-PE-Ntw) which were compared to the preeclamptic mice EC network, using the bioinformatics tool NeAT²⁴. The figure shows the common genes and interactions resulting from the intersection between the severe-PE-Ntw and the preeclamptic mice EC network. Enrichment analysis detects sets of genes involved in inflammation, extracellular matrix, TGF β cascades and coagulation processes. IL6, IL1B and ITGB1 figure among the principal hub genes in the network.

enrichment of up-regulated genes involved in fibrosis, cardiac hypertrophy and dilated cardiomyopathy. A group of down-regulated genes composed of interferon targets was also found in line with findings showing a deregulation of circulating IFN- α in lupus-affected patients²⁵ (which have a ~4 fold increase of developing a preeclampsia relative to control patients²⁶). In this recent study, Andrade and co-workers showed that lupus-affected pregnant patients have a higher concentration of circulating IFN α when they develop preeclampsia than when they do not. Interestingly the authors showed that sFLT1 expression is synergistically activated by co-treatment with IFN α and sFLT1, while IFN α treatment reduces the number of endometrial tubes development. Overall the results suggest that the antiangiogenic effects of sFLT1 are sensitized by IFN α . This is consistent with several studies showing that the type I IFN system antagonizes VEGF-stimulated angiogenesis²⁷.

The IL-6 signature of inflammation in the STOX1 mouse model is clearly reminiscent of an important amount of data obtained in humans. For instance, recently, preeclampsia was associated to gene variants present in the upstream regulator of TNF α in European Americans²⁸. Similarly, exposition of monocytes cultures to preeclamptic plasma induced the expression of IL-6, TNF α , and NFkB²⁹, suggesting that as in humans, the pathogenesis in STOX1 mice involves aggravated inflammatory responses.

Also, comparative analysis showed that the transcriptome alterations observed in the mice endothelium are similar to that found in HUVECs exposed to preeclamptic plasma.

Down-regulation of cell-cycle genes suggests a less efficient renewal of EC, which may trigger long term alterations and ageing of the cardiovascular system. This issue may be of extreme importance to understand the reasons why women after preeclampsia are at increased risk of vascular disease as well as kidney end-stage disease, multiplied ~five-fold in women who suffered preeclampsia³⁰. To note, one of the enriched GSEA gene-sets is linked to ageing kidney and fibrosis (Fig. 1). Our results are in line with a study showing that endothelial progenitor cells from PE are about twice as less numerous, with an increased differentiation time³¹.

In preeclamptic mice, heart weight was increased by ~10% and abnormal heart structure and histological features were found as well as strong alterations of the renin-angiotensin system (RAS) that may participate to cardiac hypertrophy, as observed in chronic kidney disease patients³². Resistance training-induced cardiac hypertrophy is characterized by up-regulation of the *AT1R* gene²¹. In return, RAS inhibition can reverse advanced cardiac remodeling by inducing aging in spontaneously hypertensive rats³³. Endothelin-1 (ET-1) is also involved in cardiac hypertrophy induced by aging²². It is induced by Angiotensin II²³. Here we have shown that several genes from the RAS system and ET-1 are increased in the hearts of mice carrying STOX1 transgenic embryos.

Cardiac hypertrophy has been described in PE women, even 6 years after the disease³⁴. Pregnancy involves remodeling of heart tissue and increased heart blood flow, with molecular modifications of extracellular matrix (integrins, collagen, MMPs...) ³⁵. However, this remodeling is assumed to be abnormal in preeclampsia. A link between cardiac dysfunction and preeclampsia has been substantiated by the study of Corin, a serine protease converting the pro-atrial natriuretic peptide to the active form (ANP) regulating blood pressure³⁶. Mice lacking Corin have preeclampsia-like symptoms, and mutations of the gene are found in patients with preeclampsia^{37,38}.

Interestingly, we correlated abnormal expression of Connective Tissue Growth factor (Ctgf) with endothelial dysfunction and cardiac alterations. Ctgf (also known as IGFBP-8) is a mitogen associated with renal fibrosis³⁹.

NeAT analysis	ECs STOX1 vs mild PE	Random 1	Random 2	Random 3	ECs STOX1 vs Severe PE	Random 1	Random 2	Random 3
Expected Edges in the union	33.73	33.73	33.73	33.73	46.82	46.82	46.82	46.82
Observed edges in the union	96	4	2	3	227	10	8	4
Jacquard similarity	0.0087	0.0004	0.0002	0.0003	0.0167	0.0007	0.0006	0.0003
P Value (Hypergeometric)	$8.40 \cdot 10^{-19}$	1	1	1	$1.1 \cdot 10^{-81}$	1	1	1

Table 1. Comparison of the gene networks between Mouse endothelial cells and Human HUVEC cells exposed to preeclamptic plasmas.

Induction of blood pressure overload in mice that overexpress Ctgf in the heart, demonstrated that compensatory hypertrophy was limited compared to normal littermates showing that overexpression of Ctgf tends to prevent cardiac hypertrophy⁴⁰. Contrastingly, inhibition of Ctgf with a monoclonal antibody has also been shown to limit the remodeling of the left ventricle following increased blood pressure⁴¹. Herein, we show that Ctgf was induced in the endothelium but repressed in the heart. In the light of the two studies described above, we conclude that down-regulation of Ctgf in the heart co-exist with cardiac hypertrophy, consistently with the results of Graving and co-workers (2013).

A limit of our work is that we did not have the opportunity to analyze in detail heart function in the pregnant mice (cardiac rate, ejection fraction). This could be the focus on another work less centered on global analysis of gene expression. Another limit is that we did not study the long term effects of the preeclamptic pregnancy long after the gestation, which is a major issue of the health of mothers that experienced a preeclamptic pregnancy. Clearly in a further set of experiment, the STOX1 model could be used for thoroughly assessing this question.

It has been debated whether abnormal cardiovascular function was a consequence or a predisposing cause of preeclampsia⁴². In our model, where all the female mice are WT of the same genotype, the effects that we observed are clearly a consequence of pregnancy, and not a consequence of a genetic difference between controls and affected mothers. We show that without further manipulation, STOX1 overexpression by the fetoplacental unit induces cardiovascular dysfunction, suggesting that this model is a handy tool for understanding the systemic endothelial dysfunction in preeclampsia and testing therapies, to improve maternal health.

References

- Sibai, B. M. Thrombophilia and severe preeclampsia: time to screen and treat in future pregnancies? *Hypertension* **46**, 1252–3 (2005).
- Firoz, T., Sanghvi, H., Merialdi, M. & von Dadelszen, P. Pre-eclampsia in low and middle income countries. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **25**, 537–48 (2011).
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D. & Romero, R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* **371**, 75–84 (2008).
- Sanchez-Aranguren, L. C., Prada, C. E., Riano-Medina, C. E. & Lopez, M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front Physiol* **5**, 372 (2014).
- Melchiorre, K., Sutherland, G. R., Liberati, M. & Thilaganathan, B. Maternal cardiovascular impairment in pregnancies complicated by severe fetal growth restriction. *Hypertension* **60**, 437–43 (2012).
- Lykke, J. A. *et al.* Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. *Hypertension* **53**, 944–51 (2009).
- Doridot, L. *et al.* Preeclampsia-Like Symptoms Induced in Mice by Fetoplacental Expression of STOX1 Are Reversed by Aspirin Treatment. *Hypertension* **61**, 662–668 (2013).
- van Dijk, M. *et al.* Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet* **37**, 514–9 (2005).
- Doridot, L. *et al.* Nitroso-Redox Balance and Mitochondrial Homeostasis Are Regulated by STOX1, a Pre-Eclampsia-Associated Gene. *Antioxid Redox Signal* **21**, 819–34 (2014).
- Sircar, M., Thadhani, R. & Karumanchi, S. A. Pathogenesis of preeclampsia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **24**, 131–8 (2015).
- Venkatesha, S. *et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* **12**, 642–9 (2006).
- Goulopoulou, S. & Davidge, S. T. Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia. *Trends Mol Med* **21**, 88–97 (2015).
- Chen, C. W., Jaffe, I. Z. & Karumanchi, S. A. Pre-eclampsia and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* **101**, 579–86 (2014).
- Marcellin, L. *et al.* Endometriosis also affects the decidua in contact with the fetal membranes during pregnancy. *Hum Reprod* **30**, 392–405 (2015).
- Aird, W. C., Jahroudi, N., Weiler-Guettler, H., Rayburn, H. B. & Rosenberg, R. D. Human von Willebrand factor gene sequences target expression to a subpopulation of endothelial cells in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4567–71 (1995).
- DeLisser, H. M., Newman, P. J. & Albelda, S. M. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* **15**, 490–5 (1994).
- Hahne, M., Lenter, M., Jager, U., Isenmann, S. & Vestweber, D. VCAM-1 is not involved in LPAM-1 (alpha 4 beta 1/alpha 4 beta 7) mediated binding of lymphoma cells to high endothelial venules of mucosa-associated lymph nodes. *Eur J Cell Biol* **61**, 290–8 (1993).
- Dejana, E. & Orsenigo, F. Endothelial adherens junctions at a glance. *J Cell Sci* **126**, 2545–9 (2013).
- Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 15545–50 (2005).
- Myatt, L., Muralimohanar, S. & Maloyan, A. Effect of preeclampsia on placental function: influence of sexual dimorphism, microRNA's and mitochondria. *Adv Exp Med Biol* **814**, 133–46 (2014).
- Barauna, V. G., Magalhaes, F. C., Krieger, J. E. & Oliveira, E. M. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R381–7 (2008).
- Ceylan-Isik, A. F. *et al.* Cardiomyocyte-specific deletion of endothelin receptor A rescues aging-associated cardiac hypertrophy and contractile dysfunction: role of autophagy. *Basic Res Cardiol* **108**, 335 (2013).
- Fujita, H. *et al.* DPP-4 inhibition with alogliptin on top of angiotensin II type 1 receptor blockade ameliorates albuminuria via up-regulation of SDF-1alpha in type 2 diabetic patients with incipient nephropathy. *Endocr J* **61**, 159–66 (2014).
- Brohee, S. *et al.* NeAT: a toolbox for the analysis of biological networks, clusters, classes and pathways. *Nucleic Acids Res* **36**, W444–51 (2008).

25. Andrade, D. *et al.* Interferon-alpha and angiogenic dysregulation in pregnant lupus patients destined for preeclampsia. *Arthritis Rheumatol* **67**, 977–87 (2015).
26. Clowse, M. E., Jamison, M., Myers, E. & James, A. H. A national study of the complications of lupus in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **199**, 127 e1–6 (2008).
27. Licastro, F. *et al.* Sharing pathogenetic mechanisms between acute myocardial infarction and Alzheimer's disease as shown by partially overlapping of gene variant profiles. *J Alzheimers Dis* **23**, 421–31 (2011).
28. Harmon, Q. E. *et al.* Polymorphisms in inflammatory genes are associated with term small for gestational age and preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* **71**, 472–84 (2014).
29. Rahardjo, B., Widjajanto, E., Sujuti, H. & Keman, K. Different levels of IL-1alpha, IL-6, TNF-alpha, NF-kappaB and PPAR-gamma in monocyte cultures exposed by plasma preeclampsia and normotensive pregnancy. *Pregnancy Hypertens* **4**, 187–93 (2014).
30. Vikse, B. E., Irgens, L. M., Leivestad, T., Skjaerven, R. & Iversen, B. M. Preeclampsia and the risk of end-stage renal disease. *N Engl J Med* **359**, 800–9 (2008).
31. Hwang, H. S. *et al.* Increased senescence and reduced functional ability of fetal endothelial progenitor cells in pregnancies complicated by preeclampsia without intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* **199**, 259 e1–7 (2008).
32. Raizada, V., Hillerson, D., Amaram, J. S. & Skipper, B. Angiotensin II-mediated left ventricular abnormalities in chronic kidney disease. *J Invest Med* **60**, 785–91 (2012).
33. Milingos, D. *et al.* Insulin-like growth factor-1 isoform mRNA expression in women with endometriosis: eutopic endometrium versus endometriotic cyst. *Ann N Y Acad Sci* **1092**, 434–9 (2006).
34. Ghossein-Doha, C. *et al.* Hypertension after preeclampsia is preceded by changes in cardiac structure and function. *Hypertension* **62**, 382–90 (2013).
35. Li, J. *et al.* New frontiers in heart hypertrophy during pregnancy. *Am J Cardiovasc Dis* **2**, 192–207 (2012).
36. Cui, Y. *et al.* Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. *Nature* **484**, 246–50 (2012).
37. Dong, N. *et al.* Corin mutations K317E and S472G from preeclamptic patients alter zymogen activation and cell surface targeting. [Corrected]. *J Biol Chem* **289**, 17909–16 (2014).
38. Stepanian, A. *et al.* Highly significant association between two common single nucleotide polymorphisms in CORIN gene and preeclampsia in Caucasian women. *PLoS One* **9**, e113176 (2014).
39. Chen, X. M., Qi, W. & Pollock, C. A. CTGF and chronic kidney fibrosis. *Front Biosci (Schol Ed)* **1**, 132–41 (2009).
40. Graving, J., Ahmed, M. S., von Lueder, T. G., Edvardsen, T. & Attramadal, H. CCN2/CTGF attenuates myocardial hypertrophy and cardiac dysfunction upon chronic pressure-overload. *Int J Cardiol* **168**, 2049–56 (2013).
41. Szabo, Z. *et al.* Connective tissue growth factor inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in pressure overload-induced heart failure. *Hypertension* **63**, 1235–40 (2014).
42. Osol, G. & Bernstein, I. Preeclampsia and maternal cardiovascular disease: consequence or predisposition? *J Vasc Res* **51**, 290–304 (2014).

Acknowledgements

Part of this work was supported by a 'Who am I' Labex grant, and part by an Institut Cochin 'Proof of Concept grant'. A.D., L.D. and R.C., are or were PhD students from the René-Descartes University under contracts by the University for the duration of their thesis.

Author Contributions

A.D., L.D. and R.C. carried out most of the experimental work and analyzed the results, C.M. carried out the heart histology experiments, J.L.V. and J.C. were in charge of the mouse work, S.B. drafted the manuscript and contributed to the q-RT, PCR experiments, as well as B.C., S.J. and F.L. carried out the transcriptome analysis of the HUVEC cells, FLG carried out with R.C. and A.D. the purification of endothelial cells from the mice, PL contributed to the RNAseq analysis, E.M. and D.V. coordinated the work, drafted the paper, carried out the bioinformatics analyses. All the authors contributed to improve the draft.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Ducat, A. *et al.* Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Sci. Rep.* **6**, 19196; doi: 10.1038/srep19196 (2016).

 This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary material to
Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model
of preeclampsia

Running title: Gene profiling in endothelium and heart in preeclampsia

Aurélien Ducat^{1,2,3,4#}, Ludivine Doridot^{1,2,3,4#}, Rosamaria Calicchio^{1,2,3,4#}, Celine Méhats^{1,2,3,4}, Jean-Luc Vilotte⁵, Johann Castille⁵, Sandrine Barbaux^{1,2,3,4}, Betty Couderc^{1,2,3,4}, Sébastien Jacques^{1,2,3,4}, Franck Letourneur^{1,2,3,4}, Christophe Buffat⁶, Fabien Le Grand^{1,2,3,4}, Paul Laissue⁷, Francisco Miralles^{1,2,3,4*}, Daniel Vaiman^{1,2,3,4*}.

These authors contributed equally to the experimental part of the present study.

* These authors contributed equally to the organization of the present study

There is no any conflict of interest declared.

This work is not submitted elsewhere.

1: Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

2: Cnrs, UMR8104, Paris, France

3: Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

4 : DHU Risques et Grossesse, PRES Sorbonne Paris Cité, 53 avenue de l'observatoire, 75014 Paris.

5 : Unité Mixtes de Recherche1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Institut National de la Recherche Agronomique Jouy-en-Josas, France.

6 : Genetics and Endocrine Oncology, Hôpital de la Conception Assistance PubliqueHopitaux de Marseille, Marseille, France

7 :Unidad de Genética. Grupo GENUIROS. Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad del Rosario. Bogotá, Colombia

Corresponding author: Daniel Vaiman

Address: U1016 INSERM, 24, rue du Faubourg St Jacques, 75014, Paris, France.

Telephone: 00 33 1 44412301

FAX: 00 33 1 44412302

Email: daniel.vaiman@inserm.fr

Words: 3800

Table: 1

Figures: 4

Supplementary Figures: 6

Supplementary Tables: 5

Legends to supplementary Tables and Figures

Figure S1: A. Validation by qPCR of the enrichment in endothelial cells (CD31+). Four endothelial cell markers were assessed by qRT-PCR after purification and compared with total cells and CD31 negative cells. Total RNA was prepared from a fraction of the non purified lysates of the muscle cells after collagenase/dispase treatment, from CD31- (flowthrough from the CD31 column not retained by the CD31-coated beads) and retained cells. The quantity of RNA was homogenized between the three subsets of cells before performing Reverse Transcription using MMLV (Invitrogen) according to standardized protocols. B. Validation of the NGS data on a subset of 9 differentially regulated genes relevant for the paper. Six additional endothelial cells samples were purified from independent mice carrying either WT (3) or Transgenic (3) embryos. The correlation was significant ($p < 0.028$ in a two directional test carried out using Vassarstat (<http://vassarstats.net/rsig.html>)).

Figure S2: Two examples of KEGG pathways significantly enriched in the RNA-seq dataset of DEG observed between endothelial cells from mice carrying either WT or STOX1-transgenic embryos. Each star corresponds to a gene that was modified in the dataset. The upper part shows genes modified in Dilated cardiomyopathy. In this case they were all up-regulated. On the contrary for the Cell-cycle pathway, illustrated in the lower part of the figure, the genes were down-regulated. The p values for the enrichment in genes involved in these pathways were evaluated by DAVID and were < 0.0001 .

Figure S3: Hearts have an increased weight in female mice carrying transgenic embryos. While we had a trend with the TgSTOX13 embryos (4.5 mg more) it was significant with the TgSTOX42 embryos (12mg more, corresponding to a ~10% increase).

Figure S4: iRegulon analysis of promoters of genes modified in the RNA seq experiment. iRegulon, an add-in to the Cytoscape program, was parametered to find Transcription Factor Binding Sites (TFBS) in the 20 kb centered around the Transcription Start Site (TSS) of the genes belonging to the Minimal Essential network of genes identified in the RNA-seq experiment. Genes in red are induced while genes in blue are repressed. FOXM1 was found to be mildly down-regulated (40% less expression). It is a major regulator of cell-cycle and its down-regulation could contribute to explain the deregulation of cell cycle genes that we observed in the endothelial cells. IRF8, by contrast is up-regulated and can contribute to the regulation of genes involved in inflammation and in the Interferon cascade. SOX9, which is also up-regulated (in the lower part of the figure) could play a role in the up-regulation of genes involved in myogenic function, and thus contribute to explain the cardiac hypertrophy that was observed in the mice and in the expressional network.

Figure S5: Non-supervised clustering analysis on the 100 most significant genes clearly discriminates cells exposed to control from those exposed to preeclamptic plasma. Similar heatmaps were also obtained when the number of genes was increased to 200, 1000 and 2000 genes.

Figure S6: The expression of 7 genes was analyzed by q-RT PCR on SVEC (three replicates) or primary EC (three independent mice), cultivated during three days with 10% of plasma from pregnant control or pregnant preeclamptic mice. After RNA extraction and q-RT PCR and normalization using two reporter genes (SDHA and Cyclophilin-PPIA), the expression levels were plotted. There was an excellent correlation between the RNA seq data and the effect of the treatment on primary EC cells. The correlation was less strong with the SVEC cell line. For the HUVEC experiment, we do not have the information for SERPINE1 in the array; nevertheless the correlation was relatively high ($R^2 = 0.29$, $R = 0.53$, not shown in the figure).

Table S1: List of the 100 top genes modified in the endothelium following the RNAseq experiment. In this case, compared to the other analyses each gene is significant by itself. Despite their small number, clustering by STRING revealed strongly enriched Protein interaction networks (314 interactions observed, 69 expected, $p < 10^{-100}$). The KEGG enrichment revealed the following GO:

GO_id	Term	NumberOfGenes	p-value	p-value_fdr
4510	Focal adhesion	11	1.14E-9	3.24E-7
4610	Complement and coagulation cascades	7	3.37E-8	4.79E-6
4512	ECM-receptor interaction	6	2.02E-6	1.91E-4
4260	Cardiac muscle contraction	4	2.92E-4	1.67E-2
4810	Regulation of actin cytoskeleton	6	2.94E-4	1.67E-2
4921	Oxytocin signaling pathway	5	5.04E-4	1.95E-2
4974	Protein digestion and absorption	4	5.6E-4	1.95E-2
5322	Systemic lupus erythematosus	4	6.09E-4	1.95E-2
4145	Phagosome	5	6.17E-4	1.95E-2
5144	Malaria	3	8.6E-4	2.44E-2
5150	Staphylococcus aureus infection	3	1.25E-3	3.22E-2
5146	Amoebiasis	4	1.6E-3	3.79E-2
4670	Leukocyte transendothelial migration	4	1.76E-3	3.84E-2
4611	Platelet activation	4	2.22E-3	4.5E-2
5205	Proteoglycans in cancer	5	2.41E-3	4.52E-2
4530	Tight junction	4	2.55E-3	4.52E-2
4151	PI3K-Akt signaling pathway	6	3.35E-3	5.39E-2
5133	Pertussis	3	3.42E-3	5.39E-2
5412	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	3	3.84E-3	5.74E-2
5410	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	3	5.29E-3	7.52E-2
5414	Dilated cardiomyopathy	3	6.23E-3	8.42E-2

This shows that this small subset of genes is overall enriched similarly in pathways than the more complete dataset analyzed without threshold by GSEA.

Table S2: RT-q PCR primers used throughout the study.

Table S3: Gene pathways identified as enriched by GSEA using the genes modified in the endothelial cells of mice carrying STOX1 embryos. The pathways are grouped by colors according to the most relevant keywords identified. To note, there are 6 gene-sets involved in heart function and disease, 64 associated to immunological signatures, 12 associated to inflammation, 16 to muscle function, development and disease, 27 to cell proliferation, 12 to oxidative stress and 10 to vascular function. The interpretation of the non-explicit heads of the column are the following: SIZE correspond to the number of genes of the dataset that are also in the reference dataset. ES and NES are Enrichment Score and Normalized Enrichment Score. A NES of 2 means that there are twice as many genes in the dataset study that expected by mere chance. This allows to calculate a p-value (NOMinal p-value) a FDR q-value and a FWER q-value which is more stringently used to limit the rate of type 1 in multiple testing and aiming at reducing the probability of even one false discovery, rather than the expected number of false discoveries (given by the FDR q-value). The “RANK at MAX” column refer to the ranking of the last gene contributing to the enrichment in the GSEA procedure. Since 14000 genes were identified it means that for instance the gene set LIAN_LIPA-Targets (line 78), 41 genes belonged to the gene set, and the last to contribute to the NES is the 905th. Finally, tags, lists and signal are indication of the presence and distribution of the positive genes in the dataset is the percentage of gene hits in the reference dataset. Details are available at <http://www.broadinstitute.org/gsea/doc/GSEAUUserGuideTEXT.htm>

Table S4: Listing of the iregulon output for the analysis of the minima network of genes described as Supplemental Figure 4. NES is defined in table S3 legend (for instance, HP1B3

binding site is found 6.699 fold more frequently than expected by random in the promoters of genes belonging to the MEN. AUC represents the Area under the curve, similar to the contribution of each transcription factor motif to the complete dataset.

Table S5: NeAT output for gene sets belonging to the transcriptome of HUVEC exposed to preeclamptic plasma as well as to the endothelium of mice carrying STOX1 transgenic embryos. In blue are all the significant genesets at a FDR < 0.05.

**Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model
of preeclampsia**

By Ducat et al.

Supplementary Methods

Patient characteristics

	Control group (n =10)	preeclampsia group (n=10)	p value
Maternal age (years)	30	28	ns
weight in early pregnancy (kg)	63	60	ns
Liveborn infants	10	10	
Fetal gender			ns
Male	5	6	
Female	5	4	
Gestational age group			P=0.001
2nd trimester	0	5	
3rd trimester	10	5	
arterial pressure mm Hg (systolic - diastolic)	115/85	168/93	P=5.10 ⁻¹⁵
Proteinuria (g/l / 24h)	<0.5	2.8 g/l/24h	P=1.9 10 ⁻⁵

Value presented as median (or number)

Animals

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), according to standard procedures for manipulating animals by experimented staff under authorization of the Police Prefecture (“Service de la Protection et Santé Animale et de la Protection de l’environnement” authorization RL-0801432-30801038, during all the experiments all the efforts were made to set animal suffering to the minimum). The 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. A total of 20 mice (of different crosses) were sacrificed at the end of gestation using standard accepted procedures after anaesthesia (Xylazine/Ketamine) (E16.5-E17.5) and their hearts were weighted and collected (half was kept in PFA for histological analysis, half was placed in Trizol for RNA extraction, see below). Muscles from the limbs were also collected for endothelial cells purification.

RNA extraction and quantitative RT-PCR conditions

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.

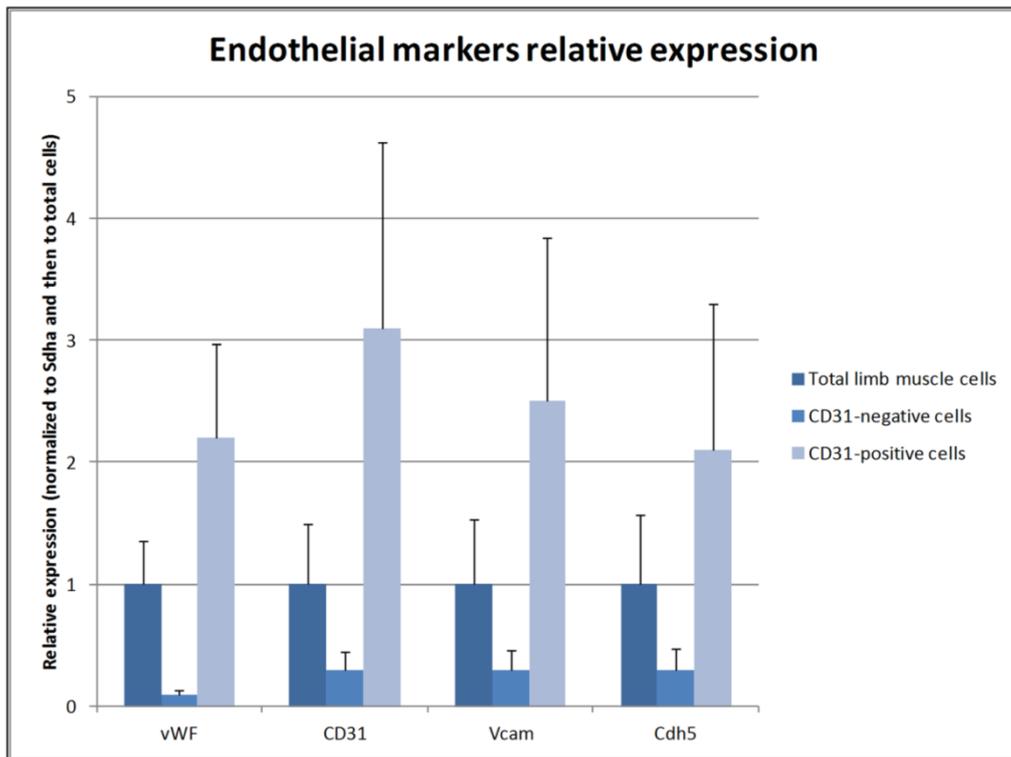
Quantitative RT-PCR was carried out using the LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Applied Science) in accordance with the manufacturer's instructions. The reaction was performed in a Light-Cycler 480 Thermocycler (Roche Applied Science). Primers were designed for the coding sequences of 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. All primers are presented as Supplemental Table 2.

Bioinformatics

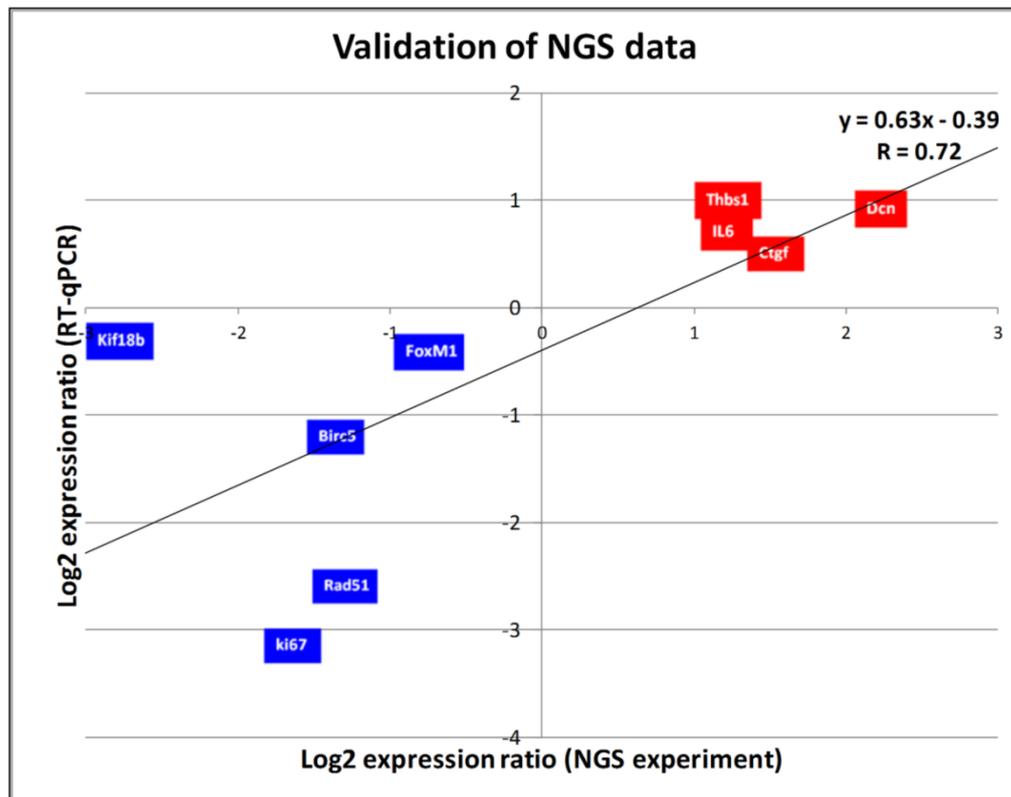
Bioinformatics analysis was used combining ArrayMining software (<http://www.arraymining.net/>¹⁴) and the Cytoscape package. The comparative analysis of networks to

examine the links between these experiments and the RNA-seq of endothelial cells was carried out using NeAT¹⁵. Basically, the software computes the edges (interactions) that are common to both networks or found in only one of the two networks. Then it calculates a Jaccard coefficient (% of edges at the intersection), the number of edges expected by chance at the intersection, and a hypergeometric P-value (corresponding to the probability of finding x edges at the intersection when y are expected by chance). In a second step, one of the two networks is randomized and a new comparison is done to calculate the random expectation. Analysis of the transcriptome for RNA-seq and microarrays was carried out using three complementary approaches: DAVID analysis of the most deregulated genes, GSEA analysis of enriched pathways and Cytoscape analysis following the identification of networks of modified genes defined by STRING http://string-db.org/newstring.cgi/show_network_section.pl. The analysis was carried out by pooling the different transcripts FPKM values to take into account the global values per gene (all transcripts) or by using the differential transcripts only. Overall network analysis gave very similar results, and thus only the first analysis, considered to represent the most complete transcript information is presented here.

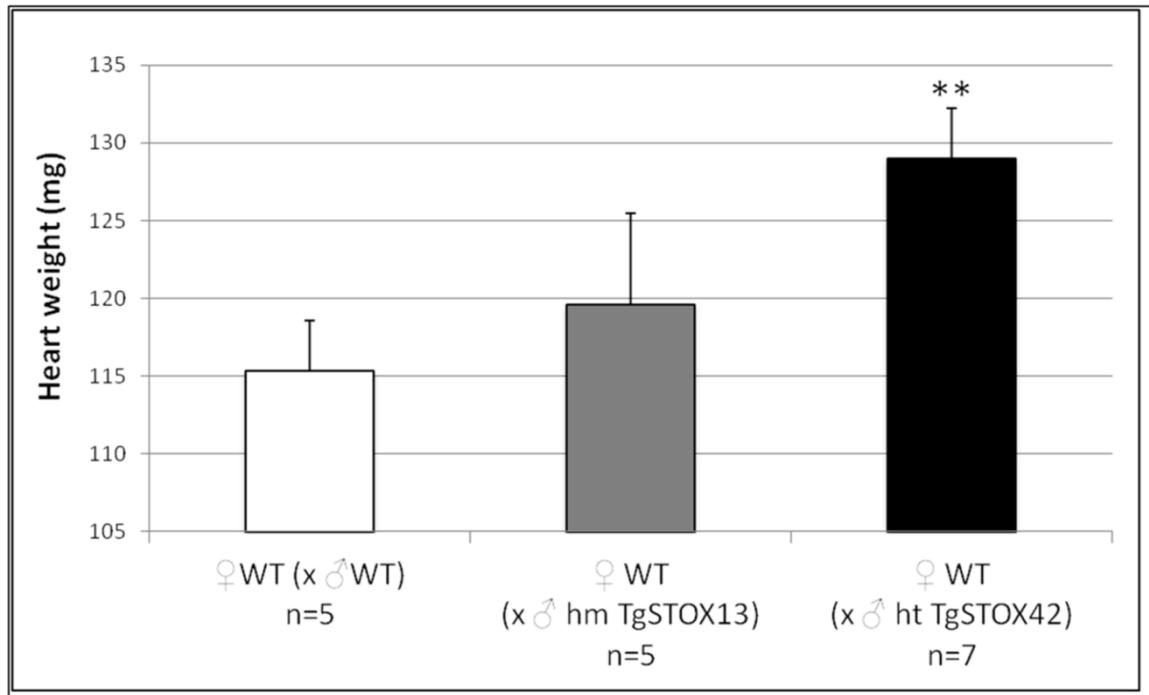
A.



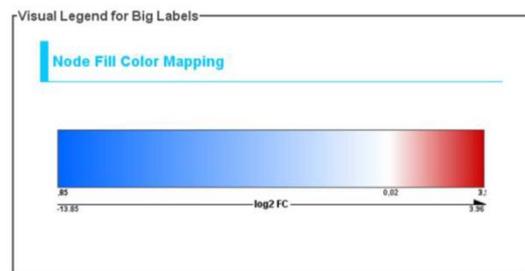
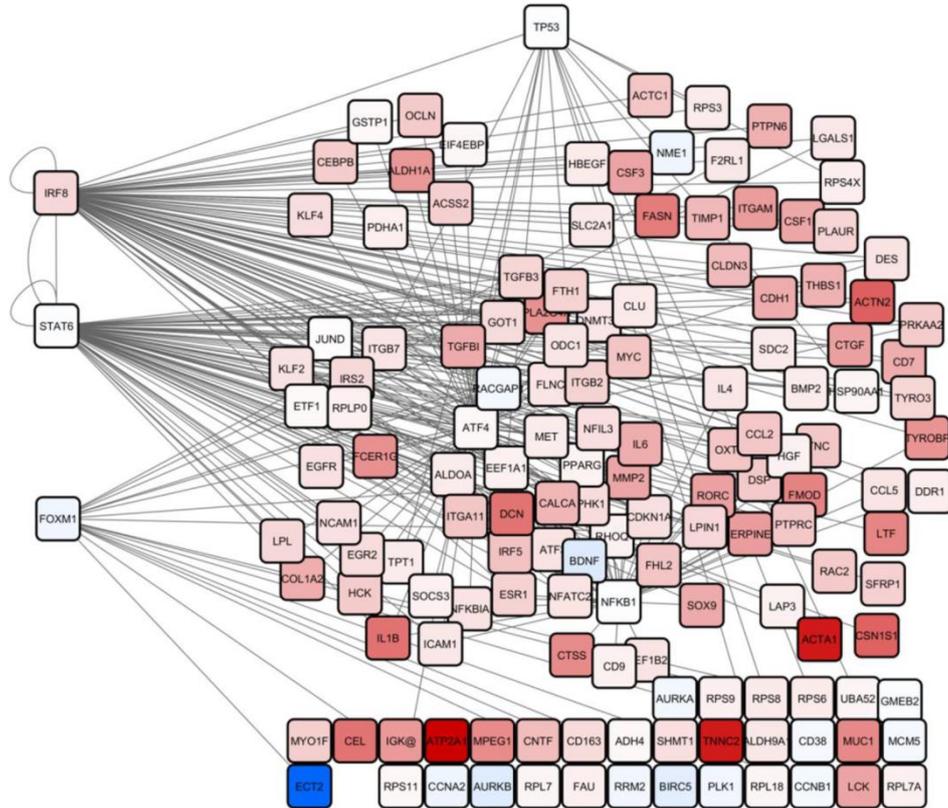
B.



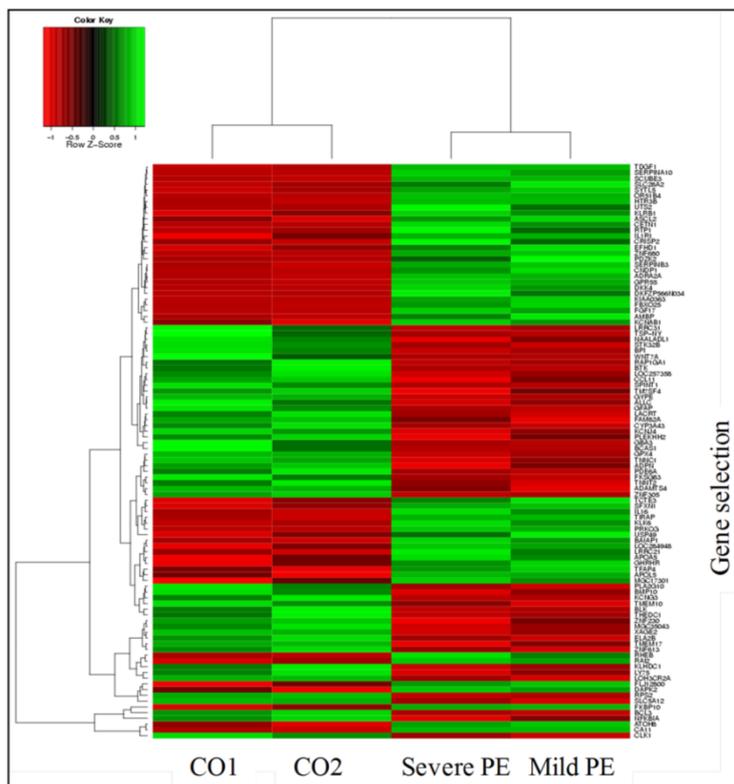
Ducat et al, Supplemental Figure 1



Ducat et al, Supplemental Figure 3



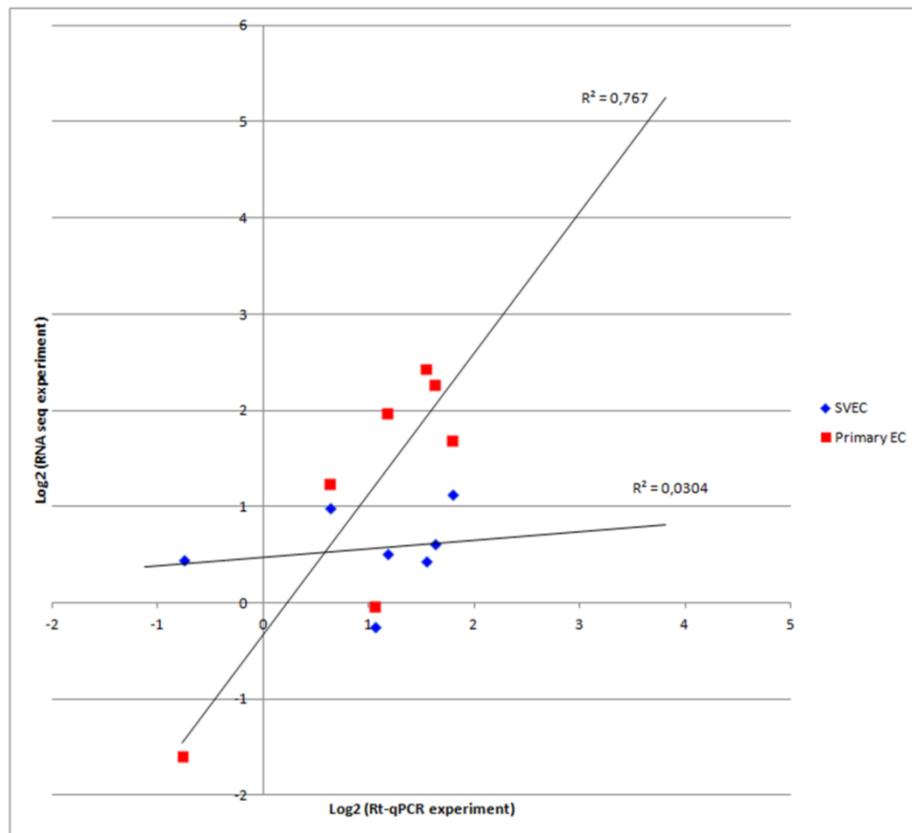
Ducat et al, Supplemental Figure 4



Ducat et al, Supplemental Figure 5

Correlation between the RNA seq experiment and the effects of Plasma exposure (from WT or transgenic pregnancies on endothelial cells)

RNA-seq	SVEC	Primary EC	Gene name
1,62	0,63	2,27	Aldh1a1
1,79	1,14	1,69	Htra3
1,17	0,52	1,97	Ifitm1
-0,77	0,46	-1,60	Cdkn1c
1,05	-0,24	-0,04	Cpxm2
0,63	0,99	1,23	Efh1
1,54	0,44	2,43	Serpine1



Ducat et al, Supplemental Figure 6

ARTICLE 3 (EN PRÉPARATION). LOW-DOSE PROTECTIVE ASPIRIN EFFECTS ARE CORRELATED WITH DEREGULATION OF HNF EXPRESSION IN THE PLACENTAS OF STOX1 PREECLAMPTIC MICE

Aurélien Ducat, Alexandra Vargas, Ludivine Doridot, Alessia Bagattin, Jonathan Lerner, Betty Couderc, Francisco Miralles, Marco Pontoglio, Daniel Vaiman.

Abstract

Aspirin (salicylic acid) is one of the most ancient drugs of the human pharmacopeia. Nonetheless, its action at low doses is not well understood at the molecular level. One of the applications of low dose aspirin treatment is in the prevention of preeclampsia in patients at risk. Using a mouse model of preeclampsia, induced by overexpression of the STOX1 transcription factor, we showed by transcriptomics that aspirin massively down-regulates genes of the coagulation cascade. Bioinformatics suggest that this may be due to an action on HNF transcription factors, two of them, Hnf1beta and Hnf4alpha being strongly down-regulated by the aspirin treatment. In this study, we investigated the regulations of Hnf1beta by STOX1 and aspirin, and the molecular consequences of the deregulation on one of its target genes, KIF12. Our data suggest that some targets of Hnf1beta (such as genes important for coagulation) are mostly regulated by aspirin, while some others are not.

Introduction

Preeclampsia is a major disease of pregnancy characterized by the occurrence of a *de novo* hypertension and proteinuria in pregnant women from the 20th week of gestation ¹. This disease, when diagnosed can only progress towards a worsening of the symptoms, leading sometimes to the necessity of extracting the foeto-placental unit to preserve the mother health. Preeclampsia is therefore a major contributor for prematurity ². Recently, it has become clear that preterm birth is an important risk factor for programming diseases in adult life ³. Medical interventions against preeclampsia are considerably limited, although meta-analyses of Randomized Control Trials show that Low Dose Aspirin (75-150 µg/day) appears to reduce the incidence of preeclampsia by ~10-30% ^{4,5}. This modest effect could be due to the fact that most studies apply aspirin relatively late in pregnancy, while the improvement could be much higher if aspirin is given before 16 weeks ⁶⁻⁸. Overall, most researchers admit that aspirin has at least a modest effect, while the understanding of the function of aspirin at low-doses is unclear. This question can be approached using animal models of preeclampsia. Recently we developed such a model of severe preeclampsia in mice induced by the placental overexpression of the transcription factor STOX1, that triggers all the hallmarks symptoms of preeclampsia in the pregnant WT female, hypertension, proteinuria and an increased plasma level of sFLT1 and sENG ⁹. In this model, we observed that the complete set of symptoms could be corrected by the administration of aspirin in the drinking water of the mice at a dose corresponding to the equivalent of 150-200 mg/day in humans, taking into account the quantity of water absorbed every day by the mice. In the present study, using this model and control mice, we compared the placental gene expression with or without aspirin treatment. Bioinformatics revealed that amongst major changes in gene expression, aspirin specifically and dramatically down-regulates genes of the coagulation cascade, without targeting directly genes that are modified in the placenta by STOX1 overexpression. Among these modified genes, promoter analysis

revealed a preeminence of binding sites for members of the HNF family of transcription factors. In the mouse placentas we show that STOX1 overexpression decreases the protein level of HNF1beta. We also show in cellular models that HNF1 targets are significantly down-regulated in STOX1 overexpressing cells, in a methylation-dependent way.

Material and Methods

Animal experiments were not specifically performed for the present study. They are all described in detail in 9 and 10. The microarray that was performed on the placentas was presented in 10.

Cell culture

JEG-3 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium Glutamax (DMEM, Life TechnologiesTM) with 10% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Life Technologies) and 1% penicillin/streptomycin (S/P) at 37° in the presence of 5% CO₂ and 20% O₂. Cells were seeded in 24-well plates the evening before the transfection at 50% confluency in order to reach approximately 75 % the day after. They were transfected conjointly with three plasmid constructions: either by pCMX STOX1A (400ng) + Renilla (pRL-RSV, 10ng) + pGL3-KIF12 (390 ng), or by pCMX STOX1A (400ng) + Renilla (pRL-RSV, 10ng) + pGL3-HNF1b multi KIF12 (390 ng), using LipofectamineR2000 (Life TechnologiesTM). The controls were identical except that the pCMX STOX1A vector was substituted by a pCMX-Empty vector. When aspirin was used, the cells were treated at a concentration of 10µg/ml in the medium, changed every 24 hours. The day after transfection, the medium was replaced with DMEM with FCS, antibiotics and aspirin in the treated wells. Cell lysis was performed 4 days after transfection: after removal of medium and washing with DPBS (Life Technologies^R), 100µL of Passive Lysis Buffer 1X (Promega) was added in each well and the plates were rocked during one hour. Then the lysate was transferred into a fresh tube. In vitro methylation was performed using SssI methylase (New England Biolabs), following the manufacturer's recommendation, and previous experiments¹¹. Briefly, 5µL of NE buffer, 1µL of SAM, 5µL of SssI (4U/µL), volume corresponding to 5µG of pGL3-KIF12, qsp H₂O 50 µL, were incubated overnight at 37°C, then the enzyme was inactivated 20 minutes at 65°C, the DNA purified with NucleoSpin Extract II kit from MACHEREY-NAGEL followed with a phenol extraction and by ethanol precipitation. Transcriptional activity was assessed by the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) in 96-well plates according to the manufacturer's instruction (50µL instead of 100 of each reagent was added). Luminescence was measured using a Berthold Centro XS3 LB960 luminometer. The observed firefly's activity was divided by the Renilla's activity and the mean values of the replicates were calculated.

Microarrays and Bioinformatics

The microarray was made available with the EMBL-EBI accession number E-MTAB-1970. Twelve samples were hybridized on a Nimblegen Mouse Expression Array MM8_60mer. Each of them was from a RNA mix of three placentas from three different pregnancies with a RIN >8. Previously¹⁰, the effect of aspirin was not analyzed, and it is the focus of the present study. The complete dataset was first analyzed using Arraymining¹², in order to produce a Heatmap (Figure 1). The heatmap was drawn from the 500 most significant genes (Feature Selection Method: eBayes). DAVID was used to identify cascades that were massively deregulated in this gene list that allowed identifying significant KEGG pathways. The network analysis was carried out by submitting the list of 500 genes to String (<http://string-db.org/>), with the option 'multiple names'¹³. Then the structure of the network obtained was saved and exported to Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) a platform originally developed in 2003¹⁴. The sub network composed of the down-regulated genes (Figure 2A) was then analyzed using iRegulon¹⁵, a tool enabling to identify common binding sites for transcription factors in a series of promoters.

Western blot analysis and quantification

Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA, and protease inhibitor cocktail. Thirty micrograms of protein, estimated by Bradford reactions (Sigma-Aldrich), were loaded for SDS-PAGE. After blotting, Hybond ECL nitrocellulose filters were probed with primary antibodies, then with secondary antibodies. Detection and detection was performed using the ImageJ software.

Statistical analysis

Significance was generally evaluated using one or two-ways ANOVA followed by post-hoc tests (Student-Neumann test) between the different groups if there were more than two groups. StatistXL add-in Excel was used. A value of $p < 0.05$ was considered significant. For the specific case of ImageJ quantification of Western Blots, the analysis was performed on the four groups by a Kruskal-Wallis non-parametric test, then between the control group and each other using a Mann-Whitney non-parametric test.

Results

Low-dose aspirin treatment down-regulates coagulation genes in STOX1-overexpressing placentas

RNA from mouse placental samples were used to generate cDNA and hybridized to Nimblegen mouse expression arrays (with the EMBL-EBI reference E-MTAB-1970). On this array, 12 samples corresponding to 12 pools of 3 placentas were hybridized. The pools correspond to WT placentas or transgenic placentas obtained by crossing WT females either with transgenic male mice from two strains (HM13 and Ht42), strains that have been described previously^{9, 10, 16} or with WT male mice. The genes were sorted using Arraymining (<http://www.arraymining.net/R-php-1/ASAP/microarrayinfobiotic.php>) by increasing ANOVA p-values. In Figure 1, the 500 first genes are shown, and allowed a non-supervised clustering for the genes as well as for the samples. This heatmap revealed a clear separation between transgenic placentas and non-transgenic placentas (the six rows at the right part of the figure in Figure 1). In addition, when the transgenic placentas were collected from aspirin-treated mice, they segregated clearly apart from the non-treated transgenic placentas (see WTxHT42asp and WTxHM13asp, compared with WTxHT42 and WTxHM13, for the four rows on the left part of Figure 1). In contrast with the transgenic placentas, the controls placentas were not very different when treated or non-treated by aspirin, and did not clusterize separately (see the tree above Figure 1 for the rows WTxWT and WTxWTasp). Overall, the strong labeling of the placental genes in the heatmap in the context “transgenic + treated” drives the largest part of the variance, suggesting a strong effect of aspirin treatment, exclusively when the placentas over-express STOX1. This was further substantiated by a DAVID analysis (<https://david.ncifcrf.gov/>) of the gene clusters modified by Aspirin (Table 1). The most significantly differentially expressed pathways were observed between transgenic aspirin-treated versus transgenic non-aspirin treated placentas, and among those, the most significant one was “Complement and Coagulation Cascades” with a Bonferroni corrected p-value estimated at $2.97 \cdot 10^{-13}$. When all the placentas (transgenic and non-transgenic) are taken together, the Bonferroni-corrected p-value is 0.012. When the WT placentas are considered alone, this KEGG pathway achieves a non-significant Bonferroni-corrected p-value of 0.15; in this case, only the “ribosome” mouse pathway was marginally significant ($p = 0.02$, after correction for multiple testing). In the context of transgenic placentas, the modified genes in the ‘Complement and Coagulation Cascade’ are presented in a KEGG pathway as Supplementary Figure 1. Overall, our data shows clearly that the aspirin effects are dependent on the genetic context. Therefore the next question that we wished to address was whether aspirin treatment was compensating the action of STOX1 by deregulating oppositely the same genes, thus bringing the balance back to normal, or whether this treatment was

acting on different genes, compensating indirectly the deleterious effects of STOX1 overexpression in the placenta.

Genes modified by aspirin are not superposed to genes modified by STOX1 overexpression in the transgenic placentas

We performed a network analysis of the genes altered in the experiment using String and then Cytoscape (Figure 2). In Figure 2A, are presented the deregulation of genes by aspirin treatment; it is possible to notice a block of connected genes deregulated negatively by aspirin treatment (in red or pink), while in Figure 2B, are highlighted on the same network the genes altered by STOX1 overexpression in the absence of aspirin. It appears that the colors cannot be superposed, clearly meaning that STOX1 overexpression does not alter the expression of the same factors. This suggests that STOX1 deregulates genes in the placenta leading to a preeclamptic phenotype, while the compensation by aspirin is through the deregulation of a different set of genes. Next, we wished to analyze the specific block of genes down-regulated by aspirin visible in the network.

Zooming on this cluster of down-regulated genes (Figure 2C) revealed that most of them are involved in regulating coagulation, which is very consistent with the DAVID/KEGG analysis presented in Supplementary Figure 1. Then, we analyzed the promoter content of these down-regulated genes in Transcription Factor Binding Sites (TFBS) using the iRegulon add-in of Cytoscape. Very interestingly, this revealed that a very large part of the genes encompass the binding site for transcription factors HNF1alpha and HNF1beta (Supplementary Table 1). To note, HNF4alpha is also a target of these genes. At the mRNA level, HNF factors were not themselves strongly altered by STOX1 overexpression, except for HNF4alpha, whose mRNA abundance was decreased by 3.15 fold in the transgenic placentas of aspirin-treated mice. HNF1alpha was reduced by only 13%, and HNF1beta by decreased by 23% in the transgenic placentas of aspirin-treated mice (Table 2). From a statistical point of view the NES (Normalized Enrichment Score) for HNF binding sites in the down-regulated genes was estimated at 6.69 by iRegulon (up to 13.3 when the swissregulon database was used as a reference, Supplementary Table1), showing that these sites are highly overrepresented in the promoters of the genes down-regulated by aspirin treatment of the pregnant mice ($p < 0.0001$). This prompted us to test whether Aspirin action could be mediated, at least partially by the regulation of HNF factors at the protein level.

HNF1beta expression is reduced in transgenic placentas treated by Aspirin.

We examined the expression of HNF factors in the placentas. The information available from the microarray analysis is summarized in Table 2. Overall the expression of the members of the HNF family in the placentas was low for Hnf1alpha, taken as reference (arbitrary fixed to 1), very low for Hnf4gamma, high for Hnf1beta, and very high for Hnf4alpha. Statistically the data were analyzed by two-ways ANOVA (Figure 3A and Supplemental Document 1). We could observe a significant deregulation by aspirin for Hnf1beta and Hnf4alpha ($p = 0.007$ and 0.0002 , respectively). While STOX1 overexpression tended to down-regulate both genes, Hnf4alpha only was significantly reduced at the expression level ($p = 0.013$). In this case there was a significant interaction effect ($p = 0.009$), this interaction indicated a synergistic effect of STOX1 and aspirin in decreasing the level of Hnf4alpha mRNA. Overall therefore, for these two factors, STOX1 tends to down-regulate gene expression, and aspirin to potentiate this effect. We wished to analyze further this regulation.

We prepared protein extracts from WT and Transgenic placentas in mice that received either aspirin in the drinking water or were untreated during their pregnancies. HNF1beta antibody gave a clear signal in Western Blot (Figure 3B), and beta-tubulin was used as an internal control. A systematic quantification of the signal was performed using ImageJ (Figure 3C). Our data indicate that without aspirin, STOX1 was able to decrease about five-fold the level of HNF1beta as well as aspirin treatment on WT placentas. Interestingly we could show that the combination of aspirin treatment and STOX1 overexpression tends to decrease even more strongly this level of HNF1beta (~12 fold). In sum, STOX1 as well as aspirin tend to down-regulate HNF1beta, and these

modifications appear stronger at the protein level than at the mRNA level. Those results led us to hypothesize that the transcriptome profile in the mouse placentas are due, at least partially, to an alteration of the expression of HNF factors, leading to the deregulation of many genes of the coagulation cascade. Next we wished to investigate in a cell model the impact of STOX1 and aspirin on a known target of HNF1beta, KIF12.

The expression of HNF1 targets is modified by STOX1 in a trophoblast cell model.

We used two reporter constructions: one is a plasmid encompassing a ~1000 bp fragment of the human KIF12 promoter controlling the expression of Luciferase (KIF12 promoter in Figure 4, from ¹⁷). This sequence encompasses a CG dinucleotide that can be methylated. The other one, (HNF Reporter in Figure 4) encompasses 10 repeats of the basic HNF1beta binding site in addition to the KIF12 basal promoter of 143 bp. Transfections were performed in JEG-3 trophoblast cell line, on four replicates in six independent experiments, and resulted in very reproducible data. ANOVA analysis indicated that there was a significant effect (down-regulation) on the KIF12 promoter when STOX1 was overexpressed. Since there was a methylatable CG dinucleotide in the sequence, we tested the effects of in vitro methylation of the plasmid using the SssI methylase. In this case, the reduction of KIF12 expression by STOX1 was not significant. We could also identify a significant interaction effect between methylation and STOX1 overexpression, while no statistically significant effect of Aspirin could be observed. This result seems to indicate that the transcriptional effects of STOX1 expression are possible only when the KIF12 promoter is not methylated.

Since the KIF12 promoter may contain regulatory elements for STOX1-modified transcription factors outside HNFs, we investigated the second construction, where the HNF binding site is polymerized ten times. In this case, we confirmed a strong down-regulation of the expression by STOX1A overexpression (2.5 fold, $p=5.1 \cdot 10^{-17}$), while aspirin tends to increase significantly the HNF Reporter expression level (+ 15-20%, $p=0.036$). Overall these experiments show that STOX1 overexpression tend to reduce the expression of genes that are HNF targets, when their promoter is not methylated. Aspirin effect tends to marginally compensate this down-regulation.

Discussion

Aspirin is one of the most widely used drugs throughout the world. Women at risk for preeclampsia are often treated with low doses of aspirin (~100 mg/day), which confers a certain degree of protection ⁴, albeit very few studies attempted to understand the underlying molecular basis of this protection. In the present study, we identified metabolic pathways that are modified by aspirin treatment in the placenta, using a mouse model of preeclampsia where we have shown that low-dose aspirin in the drinking water efficiently rescues the preeclampsia symptoms ⁹. We previously showed that in this model, there was a strong alteration of the expression of genes involved in mitochondrial physiology and oxidative/nitrosative stress ¹⁰. Therefore, it was interesting to see whether the aspirin modulated the expression of the same genes in the opposite direction to explain its effects. From the present study, we conclude that it is probably not the case but rather that low-dose aspirin essentially down-regulates genes implicated in coagulation, and is strongly doing so exclusively in the transgenic placentas. By promoter analysis of the modified genes we identified by bioinformatics an enrichment of binding sites for the HNF1 transcription factors (also known as TCF1 and TCF2). Amongst the four known Hnf genes, two, Hnf1beta and Hnf4alpha were significantly modified in the microarray. It is interesting to notice that Hnf4alpha is a validated target of Hnf1alpha/beta, suggesting that the down regulation of this factor in the placenta (Figure 4a), could be due to the down regulation of Hnf1beta. Stox1 down-regulated them moderately at the RNA level more strongly at the protein level, and aspirin enhanced this down-regulation to a higher extent (Figure 4C and Figure 5). We further analyzed the regulation by Hnf1beta in a cell model by

luciferase assays. We showed that STOX1 overexpression leads to a methylation-dependent decreased expression from the KIF12 promoter. Then, using a simplified promoter (a polymer of the HNF consensus binding site from the KIF12 promoter, we confirmed down-regulation by STOX1 overexpression. In this case there was a moderate compensation of this effect by aspirin treatment.

Overall, our study suggests for the first time to the best of our knowledge, that the anti-coagulant effects of aspirin treatment at low doses could be mediated by a down-regulation of the expression of HNF factors. At the transcriptome level, the effects of STOX1 overexpression are not predominantly on genes involved in coagulation. Nevertheless, in cell models and in the placentas, HNF factors are down-regulated by STOX1 and HNF factors have indeed been reported to impact coagulation cascades. HNF1alpha present variants associated to cardiovascular risk¹⁸, HNF4alpha acts directly on various genes involved in amine synthesis, serotonin metabolism that in turn may influence coagulation in the brain context¹⁹. HNF4alpha KO mice or siRNA injected mice see a dramatic down-regulation of many genes of the coagulation cascade in the liver²⁰. HNF1beta expression level has also been associated to coagulation via a 3 fold increased risk of thrombosis in tumors²¹. In the context of coagulation, HNF1 binding sites have as well been found in the promoter of the C-reactive protein (CRP), an anticoagulant molecule synthesized in the liver²². More recently, exome sequencing revealed associations between the level of CRP and HNF1alpha genetic polymorphisms²³. In our experiments there is a mild down-regulation of several HNF factors by STOX1 overexpression in cells (GEO dataset GSE13475²⁴) and in the placentas (EMBL accession number E-MTAB-1970), but clearly these modifications are not strong enough to compensate for the noxious effects (maybe the impact on oxidative/nitrosative stresses in the context of preeclamptic placentas).

The promoter of KIF12 was used as a reference target of HNF1beta despite no known role of this factor in coagulation¹⁷. We found that the KIF12 promoter itself is down-regulated by STOX1 overexpression in an epigenetic-dependent fashion while aspirin tends to mildly counteract this effect. In previous cell experiments²⁴ HNF1beta was reduced by ~40% by STOX1 overexpression. Our present results tend to suggest that the KIF12 promoter could be down-regulated by the decrease of HNF1beta expression caused by STOX1. The absence of strong aspirin effect could be due either to the fact that adding this molecule on culture cells is quite dissimilar than to have it given in the drinking water in vivo, or to the fact that trophoblast cells could be less sensitive to aspirin than the placenta in vivo, albeit several publications report effects of aspirin in trophoblast cells in culture^{25,26}.

There seems to be a consensus today that aspirin at low doses, has at least a moderate protective effect against preeclampsia, and some strategies of therapeutic usages are already applied in clinical tests^{27,28}. Administered early in gestation (before 16 weeks) aspirin could even be much more potent to protect against preeclampsia, especially in at risk pregnancies^{6,7}. The molecular comprehension of the mode of function of aspirin in the context of preeclampsia is still elusive. Our present work seems to indicate that aspirin in the context of preeclampsia might be able to decrease Hnf1beta and Hnf4alpha expression in the placenta; this would allow hypothesizing that the beneficial effect of aspirin would mainly be caused by a systemic decrease of the coagulation capacities of the patient. Interestingly, transcriptome analysis of human preeclamptic placenta (GEO profiles, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles>) did not reveal strong modifications of HNF expression, quite similarly to what we have found in the STOX1 mouse model. In both situations, aspirin would play a protective role far downstream the actual causes of the preeclamptic phenotype, be them STOX1 overexpression, or other causes. In MODY patients, our data suggest that precautions should be taken if they have to be treated by aspirin. A recent study on aspirin responsiveness in type I diabetes emphasizes the need for further evaluation of the safety of aspirin treatment in T1DM patients²⁹.

References

1. Sibai BM. Thrombophilia and severe preeclampsia: time to screen and treat in future pregnancies? *Hypertension*. 2005;46(6):1252-1253.
2. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84.
3. Lewandowski AJ, Leeson P. Preeclampsia, prematurity and cardiovascular health in adult life. *Early Hum Dev*. 2014;90(11):725-729.
4. Askie LM, Duley L, Henderson-Smart DJ, Stewart LA. Antiplatelet agents for prevention of preeclampsia: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet*. 2007;369(9575):1791-1798.
5. Xu TT, Zhou F, Deng CY, Huang GQ, Li JK, Wang XD. Low-Dose Aspirin for Preventing Preeclampsia and Its Complications: A Meta-Analysis. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2015;17(7):567-573.
6. Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, Forest JC, Giguere 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.
7. Bakhti A, Vaiman D. Prevention of gravidic endothelial hypertension by aspirin treatment administered from the 8th week of gestation. *Hypertens Res*. 2011;34(10):1116-1120.
8. Roberge S, Giguere Y, Villa P, Nicolaides 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(7):551-556.
9. Doridot L, Passet B, Mehats C, Rigourd V, Barboux 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.
10. Doridot L, Chatre L, Ducat A, Vilotte JL, Lombes A, Mehats C, Barboux S, Calicchio R, Ricchetti M, Vaiman D. Nitroso-Redox Balance and Mitochondrial Homeostasis Are Regulated by STOX1, a Pre-Eclampsia-Associated Gene. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(6):819-834.
11. Chelbi ST, Doridot L, Mondon F, Dussour C, Rebouret R, Busato F, Gascoin-Lachambre G, Barboux S, Rigourd V, Mignot TM, Tost J, Vaiman D. Combination of promoter hypomethylation and PDX1 overexpression leads to TBX15 decrease in vascular IUGR placentas. *Epigenetics*. 2011;6(2):247-255.
12. Glaab E, Garibaldi JM, Krasnogor N. ArrayMining: a modular web-application for microarray analysis combining ensemble and consensus methods with cross-study normalization. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:358.
13. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D447-452.
14. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498-2504.
15. Janky R, Verfaillie A, Imrichova H, Van de Sande B, Standaert L, Christiaens V, Hulselmans G, Herten K, Naval Sanchez M, Potier D, Svetlichnyy D, Kalender Atak Z, Fiers M, Marine JC, Aerts

- S. iRegulon: from a gene list to a gene regulatory network using large motif and track collections. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(7):e1003731.
16. Ducat A, Doridot L, Calicchio R, Mehats C, Vilotte JL, Castille J, Barbaux S, Couderc B, Jacques S, Letourneur F, Buffat C, Le Grand F, Laissue P, Miralles F, Vaiman D. Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Sci Rep.* 2016;6:19196.
17. Reiner AP, Gross MD, Carlson CS, Bielinski SJ, Lange LA, Fornage M, Jenny NS, Walston J, Tracy RP, Williams OD, Jacobs DR, Jr., Nickerson DA. Common coding variants of the HNF1A gene are associated with multiple cardiovascular risk phenotypes in community-based samples of younger and older European-American adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study and The Cardiovascular Health Study. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(3):244-254.
18. Yamanishi K, Doe N, Sumida M, Watanabe Y, Yoshida M, Yamamoto H, Xu Y, Li W, Yamanishi H, Okamura H, Matsunaga H. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha is a key factor related to depression and physiological homeostasis in the mouse brain. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119021.
19. Safdar H, Cheung KL, Vos HL, Gonzalez FJ, Reitsma PH, Inoue Y, van Vlijmen BJ. Modulation of mouse coagulation gene transcription following acute in vivo delivery of synthetic small interfering RNAs targeting HNF4alpha and C/EBPalpha. *PLoS One.* 2012;7(6):e38104.
20. Cuff J, Salari K, Clarke N, Esheba GE, Forster AD, Huang S, West RB, Higgins JP, Longacre TA, Pollack JR. Integrative bioinformatics links HNF1B with clear cell carcinoma and tumor-associated thrombosis. *PLoS One.* 2013;8(9):e74562.
21. Tsay W, Lee YM, Lee SC, Shen MC, Chen PJ. Characterization of human protein C gene promoter: insights from natural human mutants. *DNA Cell Biol.* 1996;15(11):907-919.
22. Schick UM, Auer PL, Bis JC, Lin H, Wei P, Pankratz N, Lange LA, Brody J, Stitzel NO, Kim DS, Carlson CS, Fornage M, Haessler J, Hsu L, Jackson RD, Kooperberg C, Leal SM, Psaty BM, Boerwinkle E, Tracy R, Ardissino D, Shah S, Willer C, Loos R, Melander O, McPherson R, Hovingh K, Reilly M, Watkins H, Girelli D, Fontanillas P, Chasman DI, Gabriel SB, Gibbs R, Nickerson DA, Kathiresan S, Peters U, Dupuis J, Wilson JG, Rich SS, Morrison AC, Benjamin EJ, Gross MD, Reiner AP. Association of exome sequences with plasma C-reactive protein levels in >9000 participants. *Hum Mol Genet.* 2015;24(2):559-571.
23. 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.
24. Gong Y, Ma Z, Patel V, Fischer E, Hiesberger T, Pontoglio M, Igarashi P. HNF-1beta regulates transcription of the PKD modifier gene Kif12. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(1):41-47.
25. Li C, Raikwar NS, Santillan MK, Santillan DA, Thomas CP. Aspirin inhibits expression of sFLT1 from human cytotrophoblasts induced by hypoxia, via cyclo-oxygenase 1. *Placenta.* 2015;36(4):446-453.
26. Orendi K, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Gonen R, Meiri H, Lubzens E, Huppertz B. Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta.* 2011;32 Suppl:S49-54.
27. Park F, Russo K, Williams P, Pelosi M, Puddephatt R, Walter M, Leung C, Saaid R, Rawashdeh H, Ogle R, Hyett J. Prediction and prevention of early-onset pre-eclampsia: impact of aspirin after first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;46(4):419-423.
28. Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2015.

29. Zaccardi F, Rizzi A, Petrucci G, Ciaffardini F, Tanese L, Pagliaccia F, Cavalca V, Ciminello A, Habib A, Squellerio I, Rizzo P, Tremoli E, Rocca B, Pitocco D, Patrono C. In Vivo Platelet Activation and Aspirin Responsiveness in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(2):503-509.

Figures

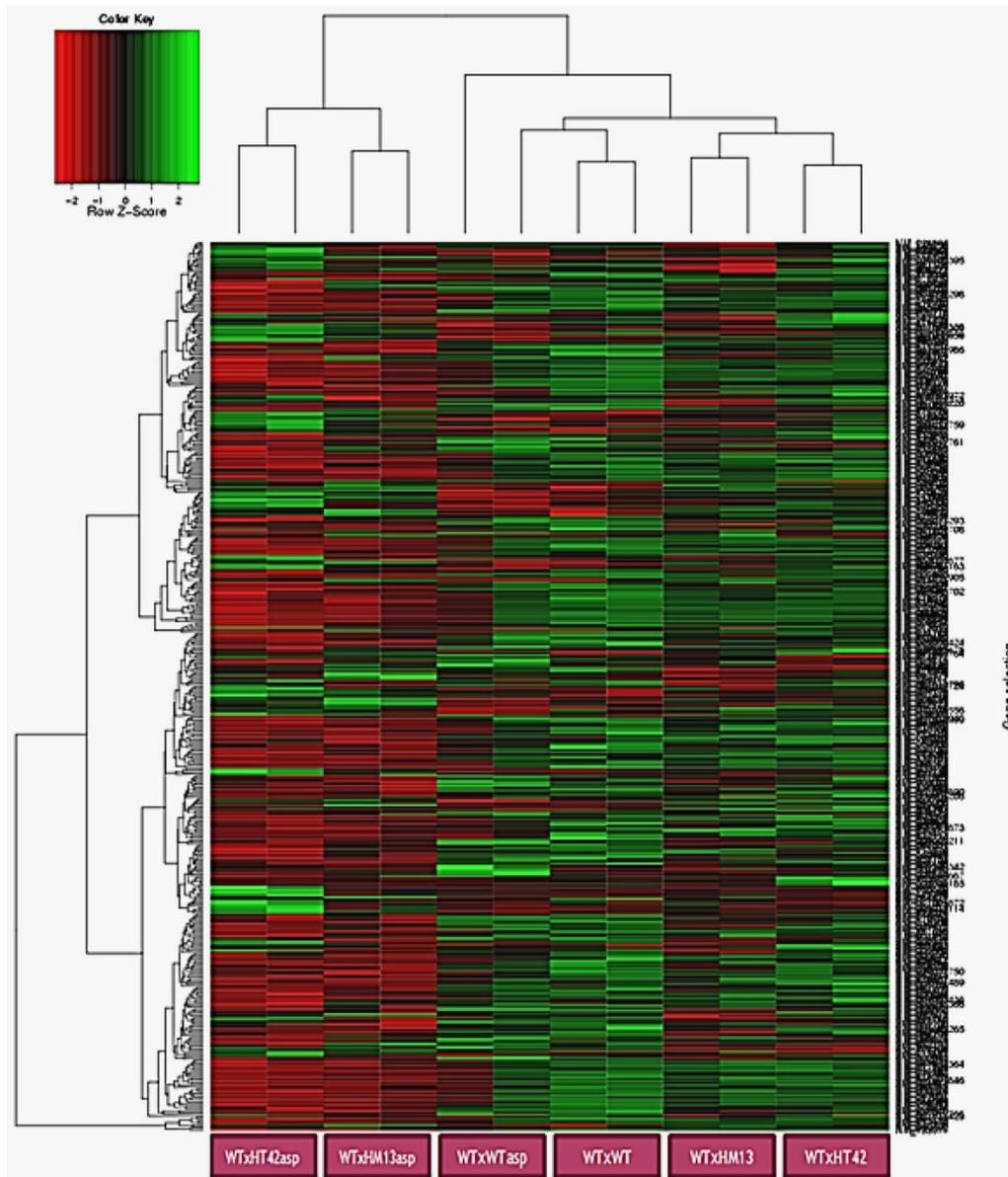


Figure 1. Non-supervised clustering presented as a heatmap representation of the 500 most significantly modified genes ranked by increasing P value using the online tool arraymining (see material and methods). Each lane is the result of hybridization of a pool of three placentas. The induction ratios are analyzed by ANOVA. HM13 and HT42 refer to two strains of transgenic mice overexpressing STOX1 (from Doridot and coworkers, 2013).

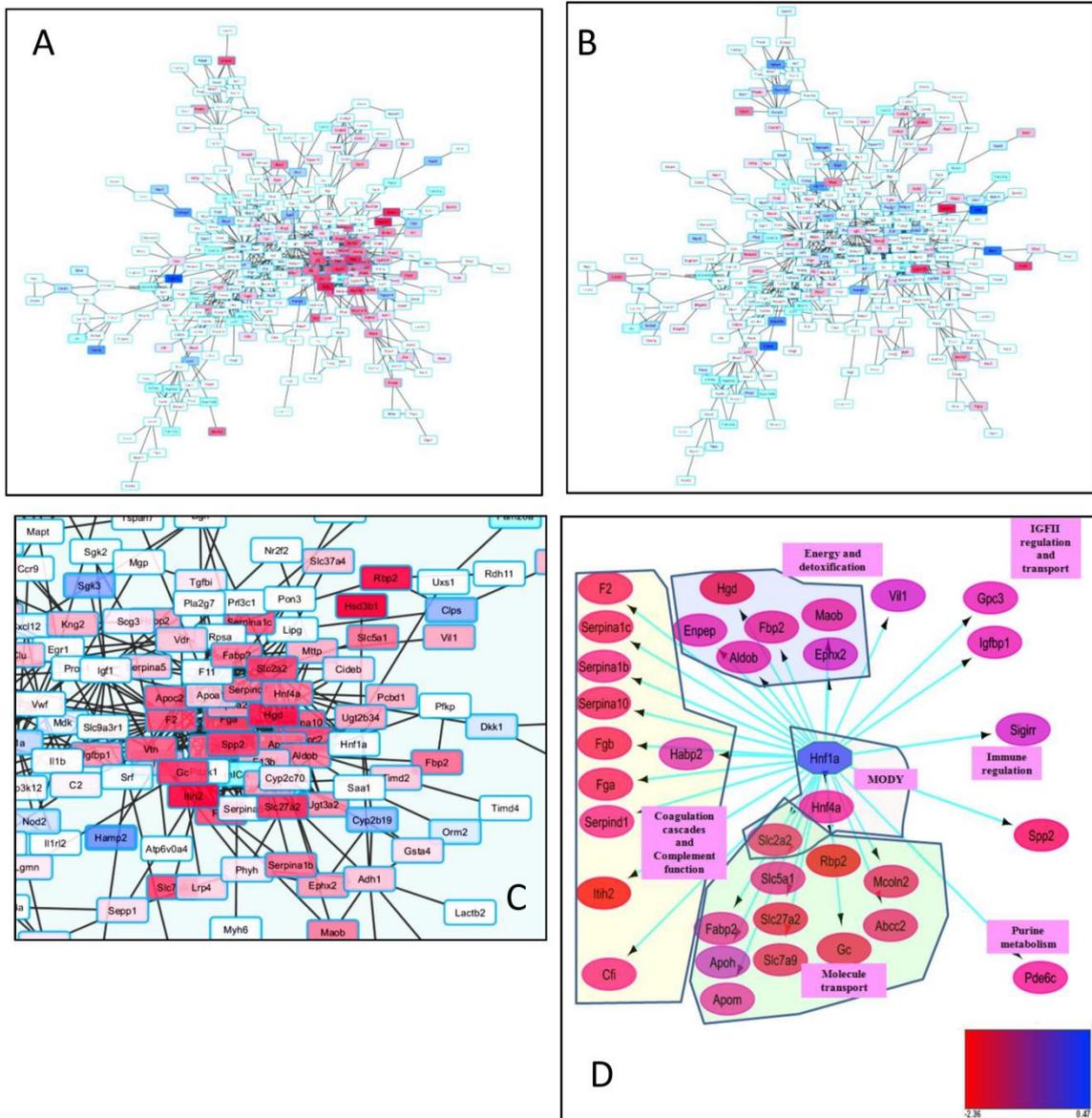


Figure 2. The 500 genes modified in the placenta are connected in a functional network of genes modified in the placenta. The colors mark genes that are deregulated (red for down-regulated and blue for up regulated in this graph). A) The network is associated with the deregulation induced by aspirin treatment. A dense sub-network of down-regulated genes appears in red/pink/purple. The same network is presented in B) and this time, the colors correspond to the genes that are deregulated by STOX1 overexpression in the placenta, the subnetwork present in A) is not visible anymore. C) Zooming on the genes labeled in red in the subnetwork A, enabling to read their names (note in particular the down-regulation of the thrombin gene, the F2 coagulation factor). D) A summary of the promoter analysis by the Cytoscape add-in iRegulon, grouped in gene functions (see also Supplementary Table 1). At the center, Hnf transcription factor binding sites appear as present in many of these promoters. To note, Hnf4alpha, appears also strongly down-regulated by aspirin treatment (see also Table 2).

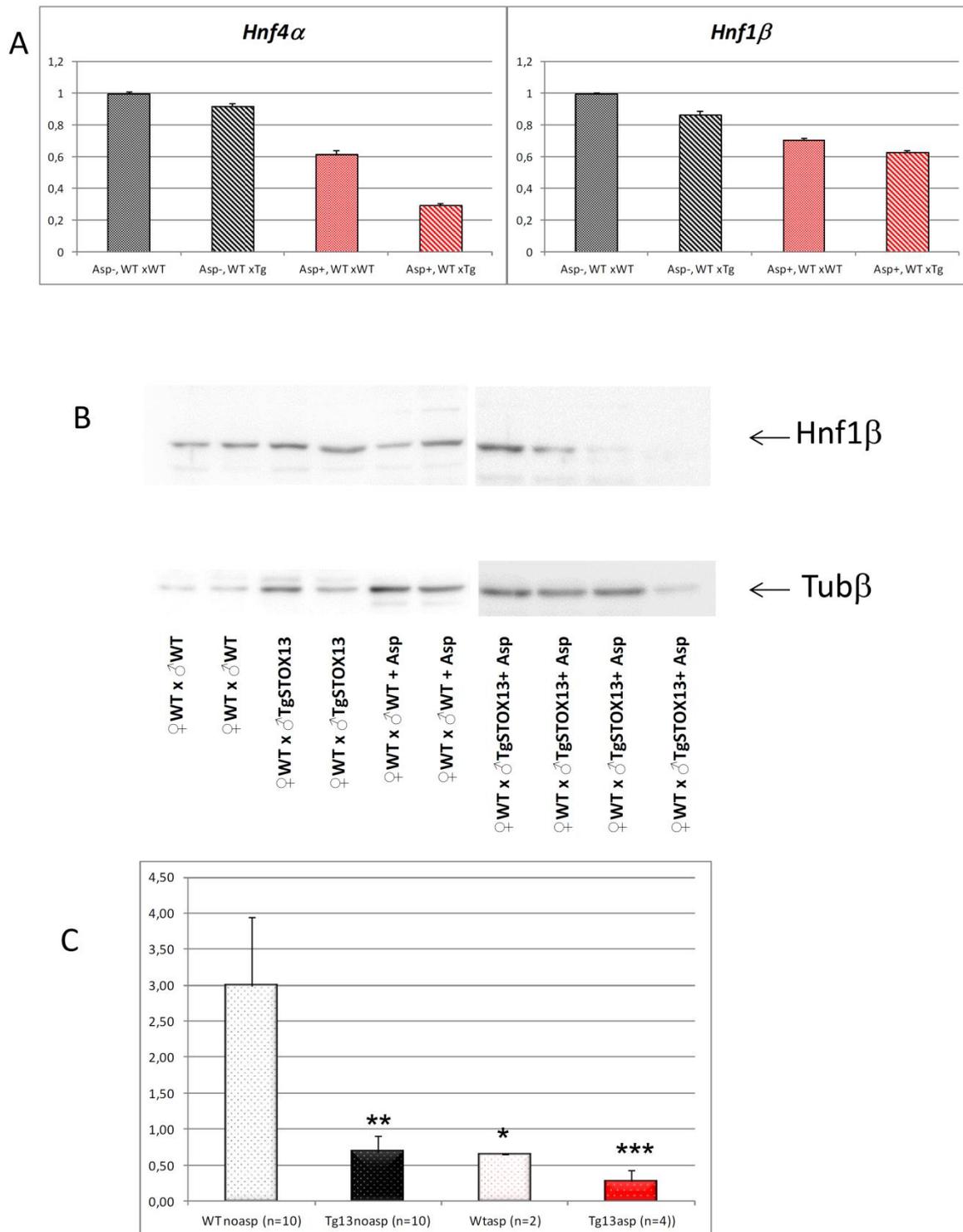


Figure 3. A) *Hnf4alpha* and *Hnf1beta* expressions are modified in the placentas by Aspirin (in red) and by STOX1 overexpression (in large oblique hatches). B) *Hnf1beta* is also deregulated at the protein level, as quantified in C). The statistical analysis in A was by two-ways ANOVA, while the Western Blot statistical analysis was based on non-parametric tests (Kruskal-Wallis, $p=0.0013$, followed by Mann-Whitneys: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$).

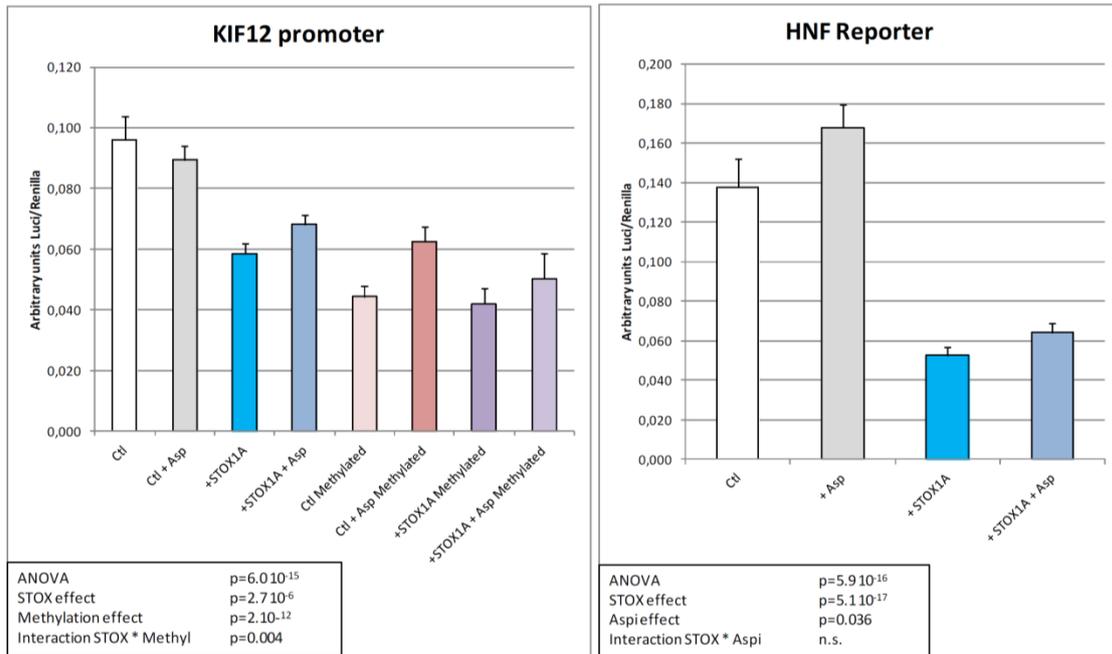
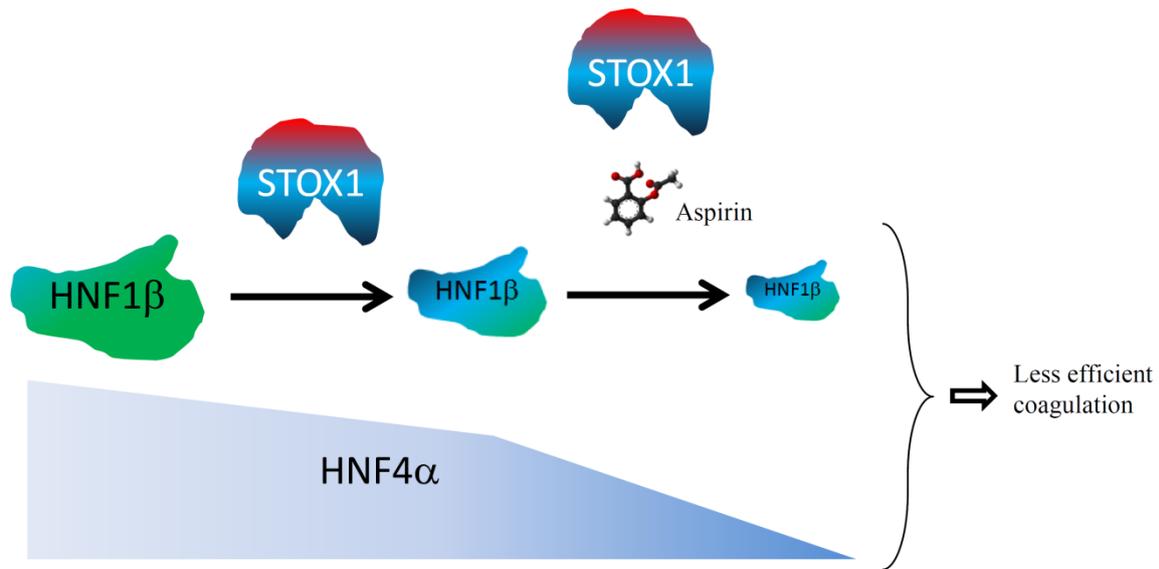


Figure 4. Luciferase assays in JEG-3 cells for the two reporter plasmids encompassing the luciferase expression under the control of the KIF12 promoter and of a sub-region of the promoter encompassing a 10 x polymer of the HNF1 binding site. The KIF12 promoter contains in addition a CpG that was methylated in vitro using the SssI methylase. In this case, the down-regulation effect triggered by STOX1 was not apparent anymore, meaning that this decrease is methylation dependent. Each panel presents the statistical values calculated by two-ways ANOVA (HNF reporter) or three-ways ANOVA (KIF12 promoter).



HNF1β Target genes

Involved in coagulation

Not strongly modified by STOX1 (microarrays data)

Down-regulated by aspirin in a context of STOX1 overexpression (microarrays data)

Not involved in coagulation (KIF12)

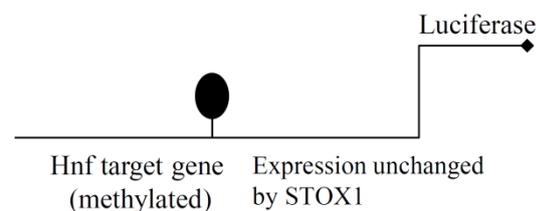
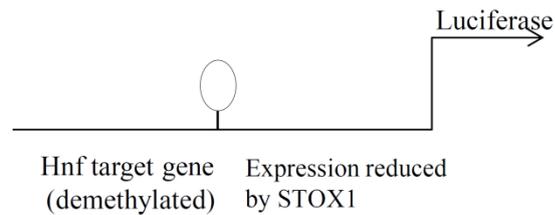
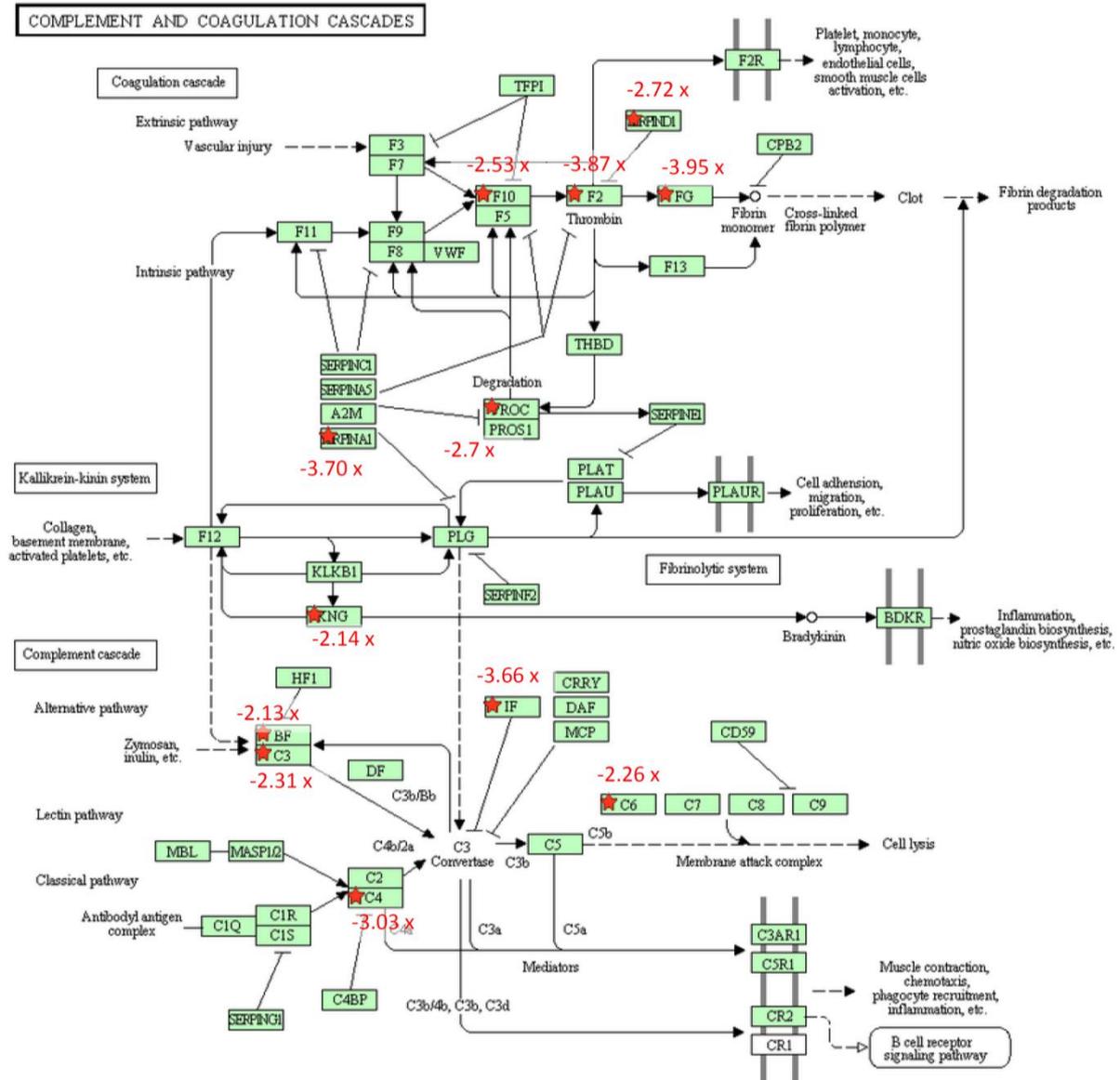


Figure 5. A summary of the results reported here. In placental cells, STOX1 is able to down-regulate the expression of HNF1beta, at the mRNA and protein levels. In the placental context, the effect is synergized by aspirin treatment. Since HNF4alpha is a direct target of HNF1beta, this can lead to an ever stronger effect on this gene, both being strongly involved in coagulation processes. The impact on HNF1beta target genes may depend according to the type of genes: for genes involved in the coagulation cascade, there is a moderate decrease of expression by STOX1, but a strong decrease when aspirin is given especially in the high STOX1 expression (preeclamptic) context. For a gene not involved in coagulation, KIF12, that has been studied here, the expression is significantly reduced by STOX1 overexpression, but only when the promoter is demethylated. For this gene, the aspirin effect, if any, is mild.



Supplementary Figure 1

Table 1: KEGG pathways of down-regulated genes under aspirin treatment (<2 fold)

Category	Term	Count	%	PValue	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
All placentas												
KEGG_PATHWAY	mmu04610:Complement and coagulation cascades	4	11.11	0.00056	NM_008934. NM_181849. NM_009780. NM_010168	14	75	5738	21.86	0.012	0.012	0.430
Transgenic placentas only												
KEGG_PATHWAY	mmu04610:Complement and coagulation cascades	15	10.42	4.49 10^{-15}	NM_008934. NM_010196. NM_007686. NM_016704. NM_181849. NM_009243. NM_009244. NM_009780. NM_008223. NM_201375. NM_023125. NM_009778. NM_008198. NM_010168. NM_007972	57	75	5738	20.13	2.97 10^{-13}	2.97 10^{-13}	4.55 10^{-12}
KEGG_PATHWAY	mmu00982:Drug metabolism	5	3.47	0.0059	NM_010358. NM_010232. NM_172778. NM_001001446. NM_153598	57	75	5738	6.71	0.33	0.18	5.90
KEGG_PATHWAY	mmu00500:Starch and sucrose metabolism	3	2.08	0.048	NM_134005. NM_145572. NM_153598	57	36	5738	8.39	0.96	0.66	39.42
KEGG_PATHWAY	mmu00350:Tyrosine metabolism	3	2.08	0.055	NM_013547. NM_016	57	39	5738	7.74	0.98	0.61	44.07

					672. NM_172 778							
KEGG_PATH WAY	mmu00380:Tryptophan metabolism	3	2.0 8	0.05 8	NM_009 414. NM_016 672. NM_172 778	57	40	5738	7.55	0.98	0.55	45.6 0
KEGG_PATH WAY	mmu05322:Systemic lupus erythematosus	4	2.7 8	0.07 9	NM_016 704. NM_009 778. NM_010 188. NM_009 780	57	103	5738	3.91	1.00	0.60	56.8 5
WT placentas only												
KEGG_PATH WAY	mmu03010:Ribosome	5	6.6 7	0.00 062	XM_984 165. XM_887 027. XM_357 236. XM_486 761. XM_001 001572	27	89	5738	11.94	0.02	0.02	0.55 0
KEGG_PATH WAY	mmu04610:Complement and coagulation cascades	4	5.3 3	0.00 449	NM_008 934. NM_181 849. NM_009 780. NM_010 168	27	75	5738	11.33	0.15	0.08	3.91

Table 2: Aspirin effect on HNF genes in transgenic and non-transgenic placentas

	Expression level	Aspirin effect in WT placentas	Aspirin effect in STOX1 transgenic placentas	STOX1 effects	Overall aspirin effect	Interaction effect
<i>Hnf1alpha</i>	Low (1)	1.444	0.870	0.997	ns	ns
<i>Hnf1beta</i>	Medium (3.9)	0.705	0.728	0.757	p=0.007	ns
<i>Hnf4alpha</i>	High (14.2)	0.614	0.317	0.488 (p=0.013)	p=0.0002	p=0.0088
<i>Hnf4gamma</i>	Low (0.31)	1.444	0.977	1.025	ns	ns

RÉSULTATS NON PUBLIÉS

1. RECHERCHE DU SITE DE FIXATION À L'ADN DE STOX1A ET STOX1B

Matériel et méthodes

Construction d'un vecteur d'expression pour Flag-STOX1A et Flag-STOX1B

Pour produire notre protéine chimérique Flag-STOX1 (isoforme A ou B), nous avons utilisé un vecteur déjà disponible au laboratoire, où la séquence d'ADNc de *STOX1* (isoforme A ou B) humain avait été intégrée dans le vecteur pCMX entre les sites des enzymes de restriction EcoRI et HindIII. Le Flag en lui-même correspond à la séquence protéique DYKDDDDK (Acide aspartique – Tyrosine – Lysine – Acide aspartique – Acide aspartique – Acide aspartique – Lysine). Pour construire l'insert, j'ai commandé des oligonucléotides contenant deux séquences de Flag encadrées par les séquences reconnues par l'enzyme de restriction EcoRI (GAATTC) : GAA TTC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GGA TCC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GGA TCC GAA TTC (75 pb). Le vecteur ainsi que des inserts Flag ont été digérés avec l'enzyme de restriction EcoRI de chez Life TechnologiesTM (Carlsbad, États-Unis). Le vecteur a ensuite été déphosphorylé avec de la SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) de chez Affymetrix® (Santa Clara, États-Unis) : cette étape est essentielle pour éviter la recircularisation du plasmide. Le vecteur déphosphorylé a ensuite été purifié sur colonne avec le kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » de chez Macherey-Nagel (Düren, Allemagne) avant ligation. La ligation a été réalisée avec de la ligase T4 de chez Thermo Scientific (Waltham, États-Unis) toute une nuit en présence du vecteur digéré purifié et des inserts digérés purifiés présents en excès molaire (5 à 10 fois). Des bactéries chimiocompétentes (« One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli », Life TechnologiesTM) ont ensuite été transformées avec le mélange de ligation et étalées sur milieu sélectif (LB-Ampicilline). Après une nuit à 37°C, une PCR a été réalisée sur les clones obtenus avec des amorces situées de part et d'autre des inserts attendus (T7P et 360R). Cela permet de voir, grâce à une migration sur gel d'agarose à 2 %, lesquelles ont intégré un insert ou éventuellement des concatémères d'inserts. Les colonies ayant intégré un ou plusieurs inserts ont alors été mises en culture (milieu LB + ampicilline 100 µg/mL) toute une nuit. Le lendemain, l'ADN plasmidique de ces colonies a été extrait par la technique « miniprep » grâce au kit « GeneJETTM Plasmid miniprep Kit » de chez Thermo Scientific et séquencé à la plate-forme de séquençage de l'Institut Cochin afin de vérifier le nombre d'inserts correctement intégrés et leur sens.

Transfection dans des cellules COS et extraction protéique

Les cellules COS-7 ont été cultivées dans un milieu complet DMEM(1X)+GlutaMAXTM-1 (Life TechnologiesTM) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 % de pénicilline-streptomycine. L'ensemencement a été effectué entre 35 et 45 % de confluence la veille de la transfection (de façon à être en phase exponentielle le lendemain au moment de la transfection). Les cellules ont été transfectées avec la lipofectamine®2 000 de chez Life TechnologiesTM qui contient des liposomes pouvant piéger les molécules d'ADN (les liposomes, en traversant la bicouche lipidique des membranes des cellules eucaryotes, peuvent ainsi faire rentrer des molécules d'ADN dans les cellules). Pour chaque transfection dans un puits d'une plaque 6 puits de chez TPP® (Trasadingen, Suisse), 2 µg d'ADN ont été mélangé dans 200 µL de DMEM simple (sans SVF ni

antibiotique) contenant 6 µL de lipofectamine. Après 6 heures d'incubation, du SVF a été rajouté afin d'en avoir 10 % dans le milieu. Pour certaines transfections, du MG132 réf. C2211 de chez Sigma-Aldrich® (Saint-Louis, États-Unis) a été rajouté : il s'agit d'un inhibiteur du protéasome devant être utilisé à 20 µM dans le milieu de culture pendant 4 heures avant l'extraction protéique. L'extraction protéique en elle-même a eu lieu 48 heures après la transfection : les cellules ont été décollées des puits par grattage puis récupérées dans un tampon d'extraction RIPA contenant des anti-protéases (25 mM NaCl + 10 mM Tris-HCl pH7,5 + 5 mM EDTA + 0,1% NP-40 + 1X Protease Inhibitor Cocktail de chez Sigma). Les cellules ont ensuite été soniquées 5 fois 5 secondes dans le sonificateur Bioruptor® Standard de chez Diagenode (Liège, Belgique), puis laissées 1 heure sous agitation à 4 °C. Après centrifugation pour sédimenter les débris cellulaires (5 minutes à 13 000 g), le surnageant contenant les extraits protéiques a été prélevé. Une partie de ce surnageant a été conservée pour doser les protéines (par la méthode de Bradford), une autre partie pour le Western blot (WB) de contrôle. Une fois le WB de contrôle réalisé, une transfection à plus grande échelle a été réalisée, en vue de l'expérience de PCR-sélection, dans des boîtes rondes de culture cellulaire de 60,1 cm² (TPP®). Les quantités de milieu, de plasmide et de lipofectamine dans ces boîtes ont été calculées au *pro rata* de la surface cellulaire (un puits d'une plaque 6 puits faisant 8,960 cm²).

Western blot : vérification de l'expression de la protéine

Une partie de l'extrait protéique obtenu a été mélangée à un tampon de dénaturation Laemmli contenant du bêta-mercapto-éthanol (50 mM Tris pH6,8 + 2 % SDS + 10 % glycérol + 0,004 % bleu de bromophénol + 5 % bêta-mercapto-éthanol) de façon à déposer 10 à 30 µg de protéine. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 100 °C pendant 5 minutes afin de les dénaturer, puis déposés sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE). Le gel de concentration (qui permet de concentrer les échantillons protéiques sur la même ligne de départ avant séparation) et le gel de séparation 10 % (qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire apparent) ont été coulés. Après migration des protéines dans un tampon adéquat (Tris 25 mM + Glycine 190 mM + SDS 2 %) puis transfert sur une membrane de PolyVinylidene Fluoride (PVDF) Amersham HybonTM-P de chez GE Healthcare (Pittsburgh, États-Unis) dans un autre tampon adéquat (glycine 192 mM + Tris base 25 mM pH8,3), les sites aspécifiques de la membrane ont été bloqués par les protéines de lait dans un tampon de blocage de PBS contenant 5 % de lait en poudre. Puis les membranes ont été incubées une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire anti-Flag M2 (Sigma F3165) dilué au 2 500^{ème} dans un tampon de PBS contenant 0,1 % de tween et 1 % de lait. Le lendemain, après trois lavages des membranes dans du PBS contenant 0,1 % de tween, l'anticorps secondaire anti-souris (DAKO P0260 de chez Sigma) dilué au 2 500^{ème} dans de la gélatine a été ajouté pendant environ une heure à température ambiante. Cet anticorps est couplé à la peroxydase de raifort (*Horseradish peroxydase*, HRP). Cette peroxydase catalyse la production d'H₂O et O⁻ à partir de H₂O₂ et l'oxydation successive du luminol qui se retrouve alors dans un état excité et émet de la lumière autour de 430 nm (indélectable à l'œil nu). La détection a été réalisée grâce au kit de chimioluminescence « ECL SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate » de chez Thermo Scientific, et la révélation sur un film photographique.

PCR-sélection

Le mélange suivant a été incubés pendant 40 minutes : 50 µg de protéines issues des extraits protéiques des transfections (qui étaient donc conservées dans du tampon RIPA : 25 mM NaCl + 10 mM Tris-HCl pH7,5 + 5 mM EDTA + 0,1% NP-40 + 1X Protease Inhibitor Cocktail de chez Sigma), en présence de 5,5 µg de poly(dI-dC) (ou acide Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic), un copolymère double brin aléatoire ne contenant que des bases Cytidine ou Inosine, qui, en entrant en compétition avec l'ADN, diminue les fixation non-spécifiques entre l'ADN et les protéines), avec

3 ng d'une solution d'oligonucléotides aléatoires double brin de 76 pb. Ces oligonucléotides ont été construits avec deux séquences fixes de 25 pb, qui ont été utilisées pour les amorces de PCR, encadrant une séquence aléatoire de 26 pb (Figure 1), dans un volume total de 50 µL d'eau exempte de DNase et RNase. En parallèle, 1,5 mg de billes Dynabeads® Protein G de chez Life Technologies™ ont été lavées deux fois avec 400 µL de PBS. Ces billes ont été incubées pendant 20 minutes sous agitation avec 1 µg de l'anticorps anti-Flag M2 dans 200 µL de PBS-0,5 % NP40. Les billes couplées aux anticorps ont ensuite été incubées sous agitation pendant 20 minutes avec le mélange contenant les extraits protéiques et les oligonucléotides aléatoires. Après trois lavages avec 400 µL de PBS, les complexes billes-anticorps-protéines-ADN ont été resuspendus dans 30 µL d'eau puis dénaturés 10 minutes à 100 °C. Le surnageant a ensuite été récupéré et on a réalisé des PCR (grâce aux amorces des oligonucléotides) avec différents nombres de cycle (Tableau 1) dont 4 µL du produit a été déposé sur un gel d'agarose 3 %, ce qui a permis de vérifier la taille et choisir le produit de PCR le plus riche en ADN spécifique en fonction du nombre de cycle. Le produit de PCR le plus adéquat a été choisi pour réaliser un autre tour de PCR-sélection, qui consiste à réaliser à nouveau la suite d'étapes purification-immunoprécipitation-élution-PCR décrit plus haut, en remplaçant les oligonucléotides aléatoires par 3 µL de produit de PCR du tour précédent. En tout, 5 étapes consécutives ont été réalisées. À la fin du cinquième tour, les produits de PCR ont été purifiés sur gel à l'aide du kit « GeneJet Gel Extraction kit » de chez Thermo Scientific. Ces extraits purifiés ont ensuite été clonés.

Clonage dans le vecteur TOPO-TA et séquençage

Le clonage dans le vecteur TOPO®TA cloning® de chez Life Technologies™ est une méthode rapide et facile pour cloner des produits de PCR et faire du séquençage. En effet, le vecteur pCR™2.1®-TOPO® de 3,9 kb ouvert est construit de telle façon à se lier facilement avec les produits de PCR qui ont eu souvent une base Adénine de rajoutée en 3' par la Taq polymérase au cours de l'élongation. Dans un premier temps, le produit de PCR a été incubé avec le vecteur TOPO-TA pendant 10 à 15 minutes à température ambiante (temps nécessaire pour que la topoisomérase I crée une liaison covalente entre le produit de PCR et le vecteur). Les produits de cette incubation ont été transformés dans des bactéries chimiocompétentes « One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli » de chez Life Technologies™, cultivées sur des boîtes de Petri Ampicilline de 10 cm de diamètre sur lesquelles on a ajouté 40 µL d'IPTG/X-gal de chez Sigma. Le lendemain, une PCR a été réalisée sur les clones obtenus dans le but de voir la taille des fragments intégrés dans le vecteur. Les colonies d'intérêt ont alors été mises en culture (milieu LB + ampicilline 100 µg/mL) toute une nuit. Le lendemain, l'ADN de ces colonies a été extrait par la technique « miniprep » grâce au kit « GeneJET™ Plasmid miniprep Kit » de chez Thermo Scientific, et séquençé à la plate-forme de séquençage de l'Institut Cochin (avec l'amorce M13F) en vue de futures analyses.

Analyse bio-informatique : logiciel MEME

L'analyse des séquences a été effectuée à l'aide du logiciel MEME (*Multiple Em for Motif Elicitation*) version 4.9.0, qui est un logiciel accessible en ligne (<http://meme.nbcr.net/>), décrit pour la première fois dans un article en 1994 (Bailey et Elkan, 1994), et qui permet de trouver un motif commun au sein d'un groupe de séquences d'ADN ou de séquences de protéines. Un motif est une suite de bases azotées ou d'acides aminés dans un ordre précis qui est retrouvée plusieurs fois dans un groupe de séquences (d'ADN ou protéiques). Les motifs MEME sont établis à partir de matrices de probabilité de position qui indiquent la probabilité de chaque lettre d'apparaître à une position du motif (les motifs MEME ne contiennent pas de lacunes). MEME prend en entrée un groupe de séquences d'ADN ou de séquences protéiques, et en sortie autant de motifs que demandé. Pour choisir automatiquement les meilleurs motifs, MEME utilise des techniques de modélisation statistique en comparant chaque motif à un modèle aléatoire : MEME construit tout d'abord une banque de séquences aléatoires où chaque position est indépendante, et où les bases sont choisies en fonction de leur fréquence dans la banque qu'on lui a soumise. MEME compare ensuite ces séquences aléatoires aux séquences fournies par l'utilisateur, et calcule la probabilité que chaque motif trouvé apparaisse par hasard, en donnant les valeurs suivantes :

- le rapport de vraisemblance logarithmique (« log likelihood ratio ») : le rapport de vraisemblance logarithmique du motif est le logarithme du rapport de la probabilité des occurrences du motif au sein de l'ensemble des séquences données sur la probabilité des occurrences du motif au sein de l'ensemble des séquences aléatoires. Plus il est élevé, plus le motif trouvé est spécifique ;
- la E-value : il s'agit de la signification statistique du motif (plus la E-value est faible, plus le motif est statistiquement significatif). La E-value d'un motif est basé sur son rapport de vraisemblance logarithmique (« log likelihood ratio »), le nombre de bases constituant le motif, le nombre de séquences dans lesquelles il apparaît, les fréquences des bases dans l'ensemble des séquences données, et la taille de l'ensemble des séquences. La E-value est une estimation du nombre prévu de motifs ayant le même rapport de vraisemblance donnée (ou supérieur), la même largeur et le même nombre d'occurrences, que l'on pourrait trouver dans un modèle aléatoire. Il s'agit donc de la probabilité de trouver ce motif à cette fréquence dans un modèle aléatoire.

À partir de ces données, MEME représente les motifs trouvés sous forme d'un « LOGO » qui contient des piles de lettres à chaque position dans le motif. La hauteur totale de la pile est proportionnelle à la signification statistique de chaque lettre dans l'identification du motif (dans le détail, la hauteur de la pile est calculée à partir de l'entropie relative de cette position dans le motif en bits, autre valeur statistique dont je ne détaillerai pas le calcul ici). La hauteur des lettres individuelles d'une pile est la probabilité de la lettre à cette position multipliée par la hauteur totale de l'empilement.

Par ailleurs, MEME présente les occurrences (sites) du motif dans l'ensemble des séquences données, alignés les uns avec les autres. MEME présente également ces occurrences sous forme de diagramme. Chaque site est identifié par le nom de la séquence où il se produit, le volet (si les deux brins de séquences d'ADN sont utilisés), et la position dans la séquence où le site commence. Enfin, un schéma fonctionnel montrant un combiné de tous les motifs (non chevauchants) sur chacune des séquences contribuant aux motifs est présenté en fin d'analyse.

Gel retard

Des sondes simple-brin biotinylées et non-biotinylées contenant les motifs consensus identifiées au cours de la PCR-sélection ainsi que leur séquence complémentaire respective (biotinylées et non biotinylées) ont été commandées sur le site d'Eurogentec (<http://www.eurogentec.com/eu-home.html>) et sont représentées dans la Figure 2. Des sondes mutées non-biotinylées et leur séquence complémentaire ont également été commandées. Toutes ces sondes ont été hybridées avec

Essai luciférase

Pour valider l'effet fonctionnel des séquences consensus trouvées (censées être de possibles sites de fixation de STOX1), j'ai intégré ces séquences dans un vecteur contenant l'ADNc de la luciférase firefly déjà disponible au laboratoire, dérivé du pGL3-Basic de Promega (Madison, États-Unis), dans lequel un CMV minimal a été intégré entre les sites des enzymes de restrictions XhoI et HindIII. Les séquences intégrées correspondent aux sondes hybridées qui ont été utilisées pour le retard sur gel. Pour une intégration en bouts francs, ces séquences double-brin doivent être phosphorylées : cette phosphorylation a été réalisée avec l'enzyme T4 Polynucléotide kinase de chez Thermo Scientific. Le vecteur a ensuite été digéré avec l'enzyme de restriction SmaI de chez Life TechnologiesTM, puis déphosphorylé avec de la SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) de chez Affymetrix® et enfin purifié sur colonne avec le kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel). La ligation a été réalisée avec de la ligase T4 de chez Thermo Scientific pendant toute une nuit en présence du vecteur digéré purifié et des inserts phosphorylés purifiés présents en excès molaire (5 à 10 fois). La transformation de bactéries, la sélection de colonies intéressantes, l'extraction d'ADN plasmidique et le séquençage ont eu lieu dans les mêmes conditions que pour la construction des vecteurs d'expression Flag-STOX1. La PCR sur clones a été réalisée avec des amorces universelles situées de part et d'autre des inserts attendus (GL2 et RV3). Le principe de l'essai luciférase a ensuite été de faire plusieurs transfections de plusieurs vecteurs dans des cellules COS avec de la lipofectamine, comme décrit précédemment. Plusieurs transfections ont été réalisées dans des plaques 24 puits avec différentes combinaisons de vecteurs : le vecteur renilla (5 ng, qui a servi à normaliser les résultats sur l'efficacité relative de la transfection), le vecteur pGL3 avec nos inserts (270 ng), le vecteur inducteur pCMX-STOX1A (200 ng). Chaque transfection a été réalisée en « sixplicat ». Les quantités de milieu, de plasmide et de lipofectamine dans ces boîtes ont été calculées au *pro rata* de la surface cellulaire (un puits d'une plaque 24 puits faisant 1,862 cm²). La révélation a été réalisée en utilisant le kit « Dual-Luciferase® Reporter Assay System » de chez Promega. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Excel®2010. Le test Mann-Whitney a été utilisé avec un seuil de signification statistique à 0,05.

Résultats

Logiciel MEME : deux séquences consensus ont été identifiées

Résultats pour 4Flag-STOX1B

L'analyse des résultats a été faite sur les 58 séquences obtenues (Tableau 2), avec les réglages suivants :

- distribution des occurrences de motifs : n'importe quel nombre de répétitions.
- nombre de différents motifs : 3
- largeur minimale de motif : 6
- largeur maximale de motif : 8

Tableau 2 : séquences obtenues à l'issue de la PCR-sélection

Légende :

- STRE1 (ou son complémentaire)
- STRE2 (ou son complémentaire)
- Chevauchement des deux séquences

Séquences obtenues avec la protéine 4Flag-STOX1B	Séquences obtenues avec la protéine STOX1B
>seq1 GT GGTGC GGGAA CAT GCTTCCACGG T	>seq1 GTTCCCTGTGATATTGTGGGATCGGT
>seq2 GACGCCATAAGTCTGTGTGCCCGTT	>seq2 AAGGTTGAGCCTATGTGTGTGCCATT
>seq3 CCACATGGCCCTAAGAGCAAGCATT	>seq3 GGGGCGTTAGTCCAATTCAGCCTTGG
>seq4 C GGTGC GAAA TAAT CATTTCACGG	>seq4 GGCCTTCCGTTCCAGCCAGATAGGTAG
>seq5 TCGACTACGACATGGATTACATCTGAGCAACTGCAGCAAGGGCG	>seq5 ACTGTAAGCGCATTCCGGATTATTTG
>seq6 GGTGTNCTGGAGGGAGGTGGTCATG	>seq6 GAGAGTCGCTGTTTATGAAGAGTGAT
>seq7 ACGCCGAAGGTTATGTTTAGTACTCA	>seq7 GTGACGTTTCAATTTGGGTATTGGTC
>seq8 TGCGCAGCGTTCTCGTCGGAAATTGC	>seq8 TGCCCTGGACTTAGAGTCGTTAGTTG
>seq9 GGTCTGGAATGGGTG CAAATTGCAGT (deux fois le motif 1)	>seq9 ATCGGTATTGTAATATGCTGTGAGAC
>seq10 C GGTGTGGAGA GC CATCTCACGG CAC	>seq10 GCGGTCGGGATCGTGTAGATTGATCC
>seq11 GT GGTGC GGGAA CAT GCTTCCACGG T	>seq11 GAAGTGCATGAGTATGCTGGATGGTA
>seq12 ATTTCGGACTTGCCGAGTTCAGAGT	>seq12 TGAGGGTGGCGGTAGACTTGA
>seq13 C GGTGTGGAGA GC CATCTCACGG CAC	>seq13 TGTGGTAGAACTGCGGATGCGGGTTC
>seq14 GTCCGCTCTCTGTCTGTTGCCGTAGG	>seq14 GCGGGATGAGCGATGGTCTGCTCTG
>seq15 CTTTGTAGCATGTATGTATGAGGGG	>seq15 CGTGTGGGCGGGTTTGGCATAGC
>seq16 CTTTGGGTCCTGGACGTCGTTGTCA	>seq16 AGCTTGCTGATTTGTGCTGATCAATT
>seq17 CTTTGGGTCCTGGACGTCGTTGTCA	>seq17 TCAGAGGTCATCAGCTCGAGCGAGC
>seq18 GCTTGA CATTTCACGG GTTACCCTGG	>seq18 TCAACAGCCACCCCCAAAACTTAAC
>seq19 ATGCAAAATCTGCCAAGATCCACCAA	>seq19 CACCTTAACCCACCCTTGATGTAACA
>seq20 ATGCAAAATCTGCCAAGATCCACCAA	>seq20 GGAGCGTGATACCTCAACCGCCATC
>seq21 ACAAAAAACAATACCGCCTACACC	>seq21 AAACACATTTAATACCACTGTAAAAT
>seq22 CAGTTCGGAACCCAACGATAACATAC	>seq22 TATAGGAAAGCACAGGTGATCCAACA
>seq23 A CCGTGGAAGC ATG TCCCGCGCC AC (les 2 motifs sur le brin complémentaire)	>seq23 GGTAGCGTTTCTGTTCAAGTCGCCAG
>seq24 ATA GGTGC GGGAGA GTT CATCACACGG	>seq24 CTCTGATTATGCTTGTATGTCGGGG
>seq25 C GGTGTGGAGA GC CATCTCACGG CAC	>seq25 GTACTGGTTGAAGAGTATAAGTGGTC
>seq26 TGCCGTTCCGGATTAGGGCAATCGNG	>seq26 CGCTAGTGTAGAGGAGCGGTACGCCA
>seq27 CGCGTTGGCAGGTTTGTGCCACCAT	>seq27 TGTGGGTTTCGTGCGGGTGGGTGTGCT
>seq28 CGGTGGGCGCGCTTGACTTATCCTGT	>seq28 GAGCATCGAGGGGGCTATTTGTTCT
>seq29 C GGTGTGGAGA GC CATCTCACGG NAC	>seq29 GACGTCTTTTGTCTTATGTTTTCTAC
>seq30	>seq30 TAAGCGGGGTATAAATTAGGCTGAGG
	>seq31

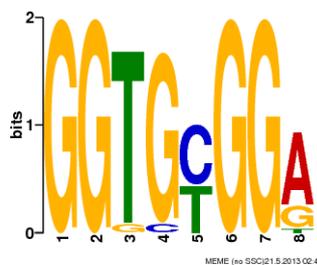
<p>ATAGTANTGGCGCANGTATGCGGGTG >seq31 GAATAGTTAGTGTTTCGTTTGCNTCNN >seq32 CGGTGTGGAGAGCCATCTCACGGCAC >seq33 TGAACCTACAGGGTGCGGTGCATGAT >seq34 GGTGCGGATTGGTCAACTCACGGACT (deux fois le motif 1 et une fois le motif 2) >seq35 CTACCCCACACGGGTCAATACAGATC >seq36 CTCCCCGCNACACACCAGTCCACCGA (motif 1 sur le complémentaire, motif 2 sur ce brin) >seq37 GCGCTCTCNGGNGCATTGGAGGTGCA >seq38 GTGGTGCGGAACATGCTTCCACGGA >seq39 AGATTGGTGGCACATGCCAGGTGAA >seq40 ATTTTGGATTTTGTAGTATACTCTGCC >seq41 ACGAGAGCCATGCCTTGGGCGTCCAG (sur le brin complémentaire) >seq42 AATTGGGCATCTTAATGGTTTTAACT >seq43 TGGGAACCTGTTAGCGCTGGCCAAGT >seq44 ATGTCAATGGTCCCCTGTGTTATGGT >seq45 GTTAGCAGTGTACGTTGACATCTAT >seq46 GAAGAGATCAAATGTTGGATTTTTGT >seq47 GTCTGCTATGTTCCGTTTGTAGAAAT >seq48 GTTGCCAAGAATTTTAATGTGGCTCT >seq49 AACCGTGAATTCGACAATTCGCACC (les 2 motifs sur le brin complémentaire) >seq50 GTGCCGTGAGATGGCTCTCCACACCG (les 2 motifs sur le brin complémentaire) >seq51 AGTAGACACACAACAGCCATTATATA >seq52 TCTGACTGCGAAGAACTTTCTCGTTT >seq53 ATGGTGGCGACAAACCTGCCAACGCG >seq54 CGTGAAAAGTAAATTTCCGCCCCCA (les 2 motifs sur le brin complémentaire, motif 2 tronqué) >seq55 ACCGTGGAAGCATGTCCCGCACCAC (les 2 motifs sur le brin complémentaire) >seq56 GTGCCGTGAGATGGCTCTCCACACCG (les 2 motifs sur le brin complémentaire) >seq57 AGGCCGTTTCCGCCGGGGGCGCAG (motif 2 tronqué) >seq58 TTTGGTCGCGTTGGGTTTCCAAGATG</p>	<p>GTAGCCTTGTGATGGCGAGGATCGTA >seq32 GCCTCTGCCCATTGGGCTGGTTTTGG >seq33 CGCAGGTGAGTACAATCGTCGTTTCGT >seq34 GTCAAAGCGTCAGATATGACATTTTT >seq35 CGGTTTCGTTAATCTCTTGTGGCATCT >seq36 TGCGTGGNCTAGTCATTTAGGCCTTG >seq37 AGTGTGGGCAATATATTTATTTAAGG >seq38 TCAATAGCAACGCGAACGAGTGGCCC >seq39 TTGTGAAGATAGCTTACCCGATTCTN >seq40 GGTTTTATTGGAGATAATTATCCGGGA >seq41 CTGGTACTCCCATTCTACCCTAGAA >seq42 TATCGGGATTTGGTTTTGGGTGCGGT >seq43 GGGGGTTACAACGAAAGGGGCGTTC >seq44 ATGTAGGCTTGTCAATCTACGAATTT</p>
--	---

Pour déterminer la taille du motif attendu, je me suis basé sur les données déjà publiées sur les motifs obtenus des facteurs de transcription FOX (Benayoun *et al.*, 2008), qui décrivaient un motif de 8 bases. Les résultats de la soumission de ces séquences sur MEME sont présentés en Figure 3 : le logiciel a mis en évidence deux séquences consensus significatives avec des E-value de $1,5 \cdot 10^{-11}$ pour le motif 1 et de $4,1 \cdot 10^{-9}$ pour le motif 2. La suite de l'analyse a consisté à aligner manuellement toutes nos séquences sur Excel en repérant les bases du/des motif(s) (autour des lettres les plus fréquentes), et à construire un tableau d'occurrences pour chaque motif consensus trouvé, qui donnait le pourcentage de chaque base pour chaque position. Par rapport à l'analyse par MEME, cette analyse permet d'inclure les séquences tronquées, les motifs qui se répètent plusieurs fois dans une séquence, les motifs un peu plus longs, ce qui a permis de trouver le motif 1 dans 23 séquences (alors que MEME ne le trouvait que dans 18). Une donnée tout à fait intéressante à analyser a été le diagramme combiné : il montrait de plus que les deux séquences se retrouvaient souvent (pour 13 séquences sur 16) sur les mêmes séquences (Figure 4). Au final, ces tableaux m'ont donc permis de trouver 23 fois le motif n° 1 dans 21 séquences et de trouver 21 fois le motif n° 2 dans 21 séquences sur 58. Cette analyse m'a permis enfin de faire ressortir deux séquences consensus de 10 bases (Tableau 3).

Figure 3 : séquences obtenues avec le logiciel MEME à partir des séquences issues de la PCR-sélection réalisée sur la protéine 4Flag-STOX1B

Motif 1 :

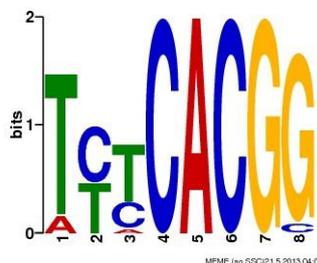
- E-value : $1,5 \cdot 10^{-11}$
- nombre de sites : 18



→ a été appelé par la suite séquence consensus n° 2

Motif 2 :

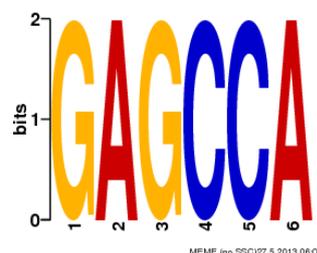
- E-value : $4,1 \cdot 10^{-9}$
- nombre de sites : 17



→ a été appelé par la suite séquence consensus n° 1

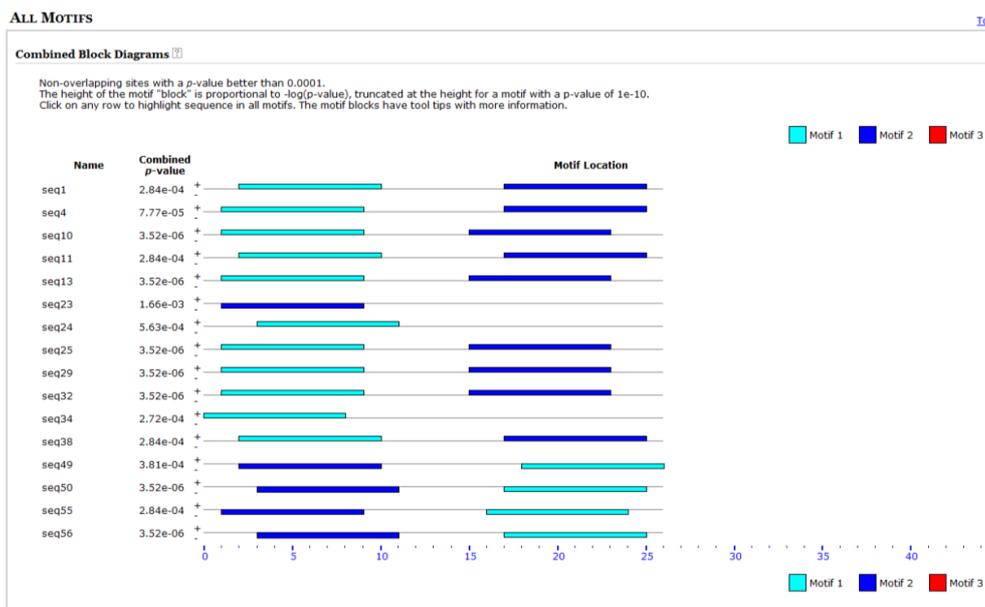
Motif 3 :

- E-value : $1,8 \cdot 10^{-2}$
- nombre de sites : 9



Pour chaque motif trouvé, MEME donne la E-value. Les lettres dans les logos sont toujours colorées de la même façon (Adénine en rouge, Cytosine en bleu, Guanine en orange, Thymines en vert).

Figure 4 : diagramme combiné des séquences consensus n° 1 et 2



Lorsque le brin d'ADN est spécifié, « + » désigne la séquence soumise, et « - » signifie le brin complémentaire de cette séquence.

Tableau 3 : tableaux des occurrences après alignement des séquences

Motif 1 (aligné sur GGNNNGG)										
A	0	0	3	3	0	0	0	13	9	16
T	0	0	17	1	12	0	0	3	3	4
C	0	0	2	1	11	0	0	1	1	2
G	23	23	1	18	0	23	23	6	10	1
Total	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Consensus	G	G	T	G	T/C	G	G	A	A/C	A
Pourcentage du plus occurent	100	100	74	78	52	100	100	57	43	70
Consensus n° 2 : GGTG[T/C]GGA[A/C]A ou GGTGYGGAMA										
Motif 2 (aligné sur CACG)										
A	0	13	2	0	2	0	21	0	0	0
T	0	1	16	10	12	0	0	0	0	0
C	14	6	1	11	6	21	0	21	0	2
G	7	1	2	0	1	0	0	0	21	17
Total	21	21	21	21	21	21	21	21	21	19
Consensus	C	A	T	T/C	T	C	A	C	G	G
Pourcentage du plus occurent	66,7	61,9	76	52,4	57,1	100	100	100	100	89
Consensus n° 1 : CAT[T/C]TCACGG ou CATYTCACGG										

Un tableau d'occurrences a été construit pour chaque motif consensus trouvé : il donne le pourcentage de chaque base pour chaque position.

Résultats pour STOX1B (contrôle négatif)

L'analyse des résultats a été faite sur les 44 séquences obtenues, en utilisant les mêmes réglages que pour Flag-STOX1B :

- distribution des occurrences de motifs : n'importe quel nombre de répétitions.
- nombre de différents motifs : 3
- largeur minimale de motif : 6
- largeur maximale de motif : 8

Aucune séquence significative n'a été trouvée par MEME (Figure 5). Cela confirmait qu'en l'absence de protéine « flaguée », les oligonucléotides n'étaient pas sélectionnés sur un motif particulier.

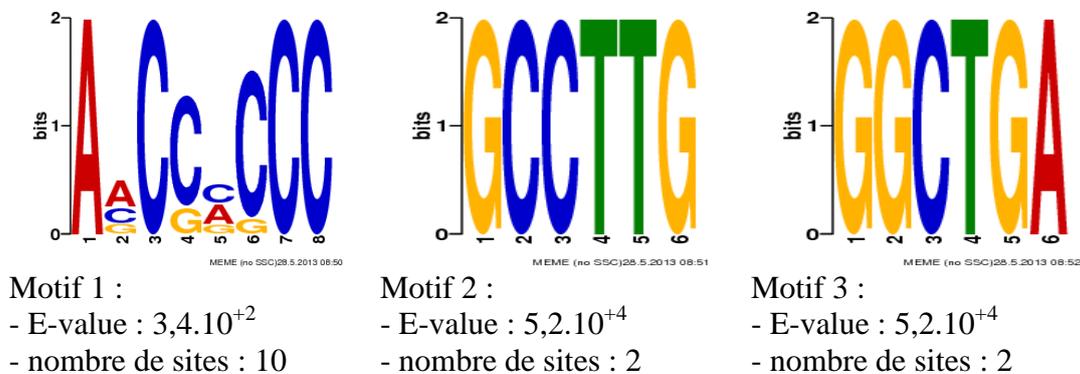
Bilan

La PCR-sélection réalisée avec la protéine 4Flag-STOX1B a fait ressortir 2 séquences consensus possibles de 10 paires de bases. Ces séquences ont été appelées STRE1 et STRE2 (pour *STOX1 Responsive Element*).

STRE1 : CATYTCACGG

STRE2 : GGTGYGGAMA

Figure 5 : séquences obtenues avec le logiciel MEME à partir des séquences issues de la PCR-sélection réalisée sur la protéine STOX1B.



Noter l'absence de E-value faible (pas de motifs significativement enrichis).

Validation en retard sur gel

L'expérience de retard sur gel a permis de valider l'interaction physique entre la protéine et les séquences consensus trouvées. J'ai donc commandé des sondes biotinylées et non-biotinylées contenant soit 3 sites STRE1 (sonde 3xSTRE1), soit 3 sites STRE2 (sonde 3xSTRE2). Pour la mise au point des conditions, j'ai commencé par préparer 3 mélanges pour chaque sonde : sonde biotinylée seule ; sonde biotinylée + extraits protéiques ; sonde biotinylée + extraits protéiques + la même sonde non biotinylées en excès molaire (200 fois).

Dans cette première expérience, les sondes utilisées étaient : la sonde fournies dans le kit servant de témoin (appartenant au système EBNA : *Epstein-Barr Nuclear Antigen*), la sonde 3xSTRE1 et la sonde 3xSTRE2. J'ai ensuite déposé sur gel ces différents mélanges. Cette expérience a été réalisée deux fois indépendamment et a donné le même résultat (Figure 6). On a observé dans un premier temps que la séquence consensus n° 2 ne semblait pas créer de retard. Nous nous sommes donc concentrés sur la séquence n° 1, qui nous donnait déjà des résultats préliminaires intéressants. En effet, il y avait apparition d'un retard lorsque l'on incubait la sonde biotinylée avec des extraits protéiques, retard qui disparaissait lorsqu'on rajoutait cette même sonde non-biotinylée en excès molaire (expérience de compétition).

J'ai ensuite réalisé une autre expérience afin de tester si la bande retard était bien spécifique de notre protéine d'intérêt. Ainsi, j'ai préparé plusieurs mélanges utilisant la séquence consensus n° 1 : un mélange contenant uniquement de la sonde biotinylée, un mélange contenant la sonde biotinylée et des extraits protéiques, un mélange contenant la sonde biotinylée avec des extraits protéiques et la même sonde non-biotinylée en excès molaire (200 fois), un mélange contenant la sonde biotinylée avec des extraits protéiques et une sonde mutée non-biotinylée en excès molaire (200 fois), et un mélange contenant la sonde biotinylée avec des extraits protéiques et l'anticorps anti-Flag (Figure 7). Pour ce dernier puits, si la séquence que nous avons trouvé était spécifique de notre protéine, nous aurions dû obtenir un « supershift » (c'est-à-dire une bande plus haute que celle apparue avec la sonde biotinylée et les extraits protéiques seuls, en raison de la formation de complexes ADN-facteur transcriptionnel-anticorps). L'absence de « supershift » a suggéré que ce n'était pas STOX1 qui se liait directement à la séquence d'ADN ; en revanche, la bande retard qui apparaissait sur tous nos gels semblait être spécifique de la séquence STRE1, car elle disparaissait lorsqu'on ajoutait la sonde non-biotinylée en excès molaire et elle réapparaissait lorsqu'on ajoutait la sonde mutée non-biotinylée en excès molaire.

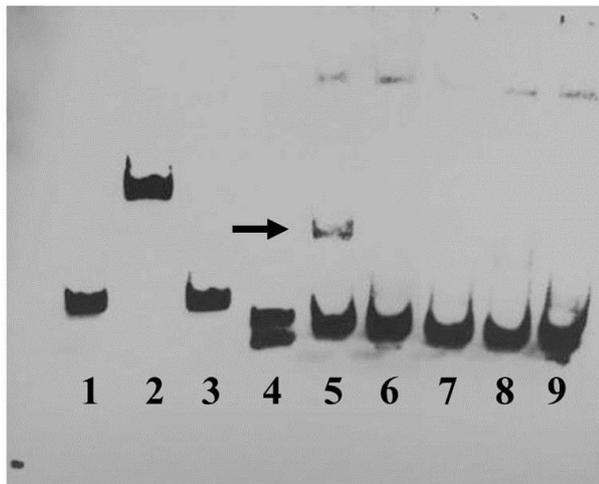
Ces premières expériences de validation en gel retard nous ont permis de dire que :

- la séquence consensus n° 2 n'était pas fixée par une protéine contenue dans ces extraits nucléaires dans les conditions utilisées pour ce retard sur gel.
- La séquence consensus n° 1 liait spécifiquement un facteur contenu dans les extraits protéiques. A priori, ce facteur n'était pas STOX1.

D'autres expériences de retard sur gel sont en cours avec la protéine FLAG-STOX1A.

Plusieurs essais luciférase sont en cours d'analyse statistique.

Figure 6 : première expérience de retard sur gel



Description des puits :

1 : ADN biotinylé contrôle EBNA

2 : ADN biotinylé contrôle EBNA + extraits protéiques EBNA

3 : ADN biotinylé contrôle EBNA + extraits protéiques EBNA + ADN non-biotinylé contrôle EBNA en excès molaire (200 fois)

4 : STRE1biot

5 : STRE1biot + extraits protéiques (contenant 4Flag-STOX1B)

6 : STRE1biot + extraits protéiques (contenant 4Flag-STOX1B) + STRE1

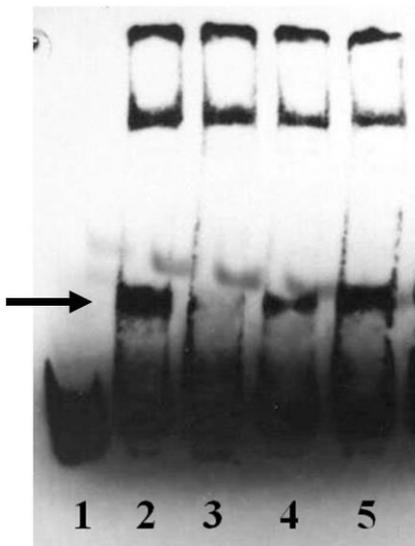
7 : STRE2biot

8 : STRE2biot + extraits protéiques (contenant 4Flag-STOX1B)

9 : STRE2biot + extraits protéiques (contenant 4Flag-STOX1B) + STRE2

La flèche indique le retard observé avec la protéine 4Flag-STOX1B.

Figure 7 : retard sur gel sur la séquence consensus n° 1



Description des puits :

1 : STRE1biot

2 : STRE1biot + 4Flag-STOX1B

3 : STRE1biot + 4Flag-STOX1B + STRE1

4 : STRE1biot + 4Flag-STOX1B + mSTRE1

5 : STRE1biot + 4Flag-STOX1B + Anticorps anti-Flag M2 (Sigma F3165)

La flèche indique le retard observé avec la protéine 4Flag-STOX1B.

2. TEST DE L'ALPHA-1-MICROGLOBULINE SUR LE MODÈLE DE SOURIS STOX1

Material and Methods

First experiment: TgSTOX42 mice and A1M

The experiment will be performed at the INRA animal facility in Jouy-en-Josas, France (lab of Jean-Luc Vilotte). Female FVBN mice will be ordered by Dr Vaiman, the invoice payed by Dr Hansson.

Groups:

6 wt ♀ crossed with TgSTOX42 ♂ - 12 μ M A1M (6 injections at days 6, 8, 10, 12, 14 and 16)

6 wt ♀ crossed with TgSTOX42 ♂ - buffer (6 injections at days 6, 8, 10, 12, 14 and 16)

A1M dose

The current A1M prep has a concentration of 2,25 mg/ml: 12 μ M = 270 μ g = 0,12 ml

Buffer: 15mM Tris-HCl pH8.0 injected at 0,12 ml

During experiment:

- Measure blood pressure (BP) every second day throughout the experiment
- Collect urine for proteinuria measures every second day (by dipstick)
- Take blood samples (200 μ l) at early, mid and late gestation. Blood is collected in Heparin tubes, centrifugation to separate plasma, RBC and WBC. WBC cell pellet re-suspended in Trizol, as described below.

Termination d17:

At time of termination organs and fluids are collected from each female:

- placenta: 1 frozen on dry ice, 1 preserved in formalin
- kidneys: 1 frozen on dry ice, 1 preserved in formalin
- liver: frozen on dry ice
- brain: frozen on dry ice
- spleen: frozen on dry ice
- lungs: frozen on dry ice
- skin from the abdomen (belly shaved before incision): frozen on dry ice
- blood: collected in heparin, centrifugation, plasma frozen and WBC in Trizol as described below
- urine: frozen
- pups counted and weighed

From the blood collected at time points during gestation and at termination, we want plasma and WBC. WBC from the interphase are recovered and washed once with 1xPBS. The cell pellet is re-suspended in a suitable volume of RNA-preserving agent e.g. Trizol, to enable gene expression analysis.

Second experiment: WT mice and A1M

Groups

- 10 wt ♀ crossed with TgSTOX42 ♂ - 12µM A1M
- 10 wt ♀ crossed with TgSTOX42 ♂ - buffer
- 10 wt ♀ crossed with wt ♂ - 12µM A1M
- 10 wt ♀ crossed with wt ♂ - buffer

6 injections at days 6, 8, 10, 12, 14 and 16, termination at day 17

A1M dose

A1M (batch ASY1211) 2.25 mg/ml: 12µM = 270µg = 0.27 mg = 0.12 ml

Buffer: 15mM Tris-HCl pH8.0 injected at 0.12 ml

During experiment:

- Measure blood pressure (BP) with non-invasive method every second day throughout the experiment and starting before confirmed mating to acquire a base line.
- Collect urine every second day
- Take blood samples (100µl) at early, mid and late gestation. Blood is collected in Heparin tubes, spin to separate the plasma.

Termination d17:

At time of termination organs and fluids are collected from each female:

- placenta: 1 frozen on dry ice, 1 preserved in EM-fixation, 1 preserved in formalin
- kidneys: 1 frozen on dry ice, 1 preserved in EM-fixation, 1 preserved in formalin
- liver: frozen on dry ice
- blood: collected in heparin, centrifugation, plasma frozen and WBC in e.g. Trizol
- urine: frozen
- pups: counted

From the blood collected at time of termination we want plasma and WBC. After centrifugation, WBC from the interphase are recovered and cell pellet is re-suspended in a suitable volume of RNA-preserving agent e.g. Trizol, to enable gene expression analysis.

Sum-up

Group A: wildtype females mated to STOX1Tg42 males (hetero) – PE – treatment buffer

Group B: wildtype females mated to STOX1Tg42 males (hetero) – PE – treatment A1M

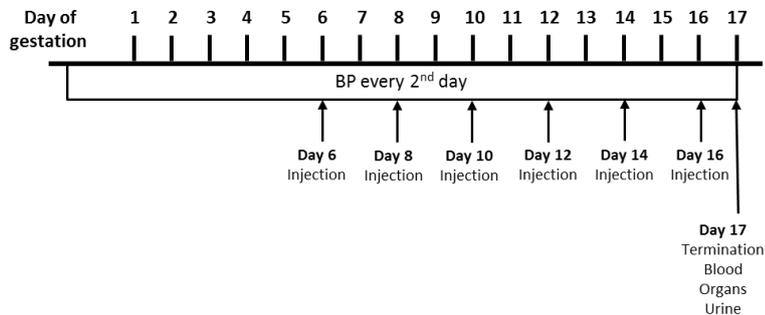
Group C: wildtype females mated to wildtype males – controls – treatment buffer

Group D: wildtype females mated to wildtype males – controls – treatment A1M

Treatment was given as injection i.p. at days 6, 8, 10, 12, 14 and 16 during pregnancy. Termination was at day 17.

During the pregnancy, blood was collected at an early- and a mid-gestation time point for the majority of females, in addition to the time of termination. Same thing was done for the collection of urine. Blood pressure was measured every 2nd day.

All samples from summer 2015 were thawed upon arrival to Lund, all plasma + urine + organs.



Results

Litter size

There was a difference observed between the groups, but it was not significant.

Litter size shown as mean (Table 1) and median (Table 2):

Table 1.

Group	# pups	\pm SD	n
Control – buffer	7,3	2,2	4
Control – A1M	7,0	1,2	4
PE - buffer	5,2	2,7	5
PE – A1M	6,2	3,7	5

Table 2.

Group	# pups	\pm SD	n
Control – buffer	8	2,2	4
Control – A1M	7	1,2	4
PE - buffer	5	2,7	5
PE – A1M	5	3,7	5

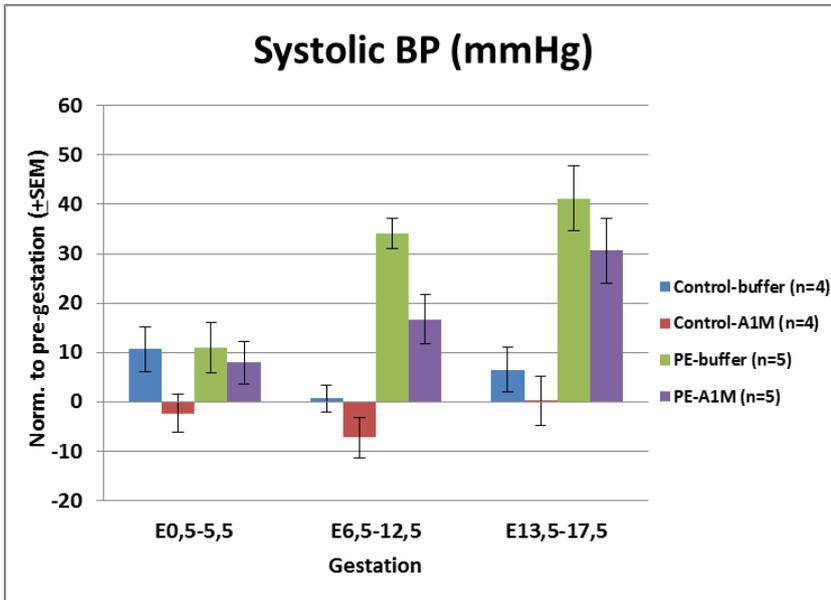
Blood pressure

Blood pressure was measured using different devices during Experiment 1-2013 and Experiment 2-2015, if I remember correctly.

There are a number of different ways to present the BP data, all of which has pros and cons. I have chosen a few ways here, guided by what Daniel did in the first analysis 2013. Please give me input on what you prefer.

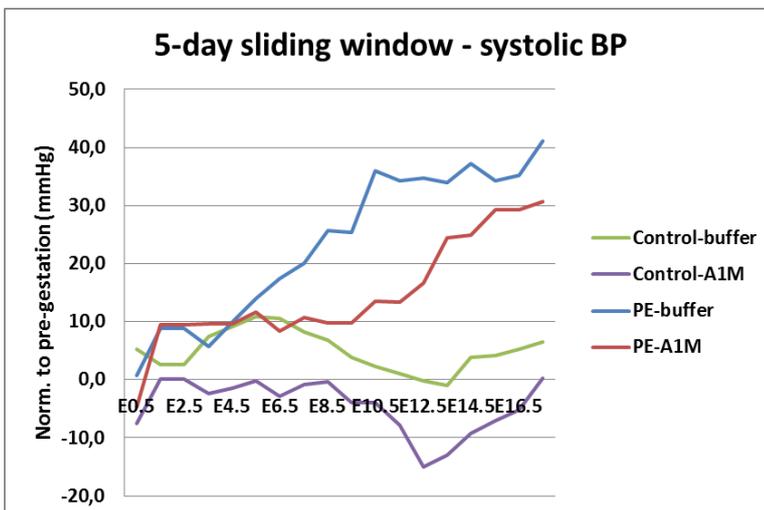
In figure 1: significant difference between PE-buffer and PE-A1M mid-gestation (E6,5-E12,5) with $p < 0,003$. Significant difference between Control-buffer/Control-A1M and PE-buffer/PE-A1M both mid- and late-gestation, $p < 0,004$.

Figure 1.



In figure 2: increase in BP during pregnancy observed in both PE groups, but not in the control groups.

Figure 2.



In figure 3 and 4: the BP measured during summer 2015 (Control-buffer and Control-A1M) starts out at a higher level already pre-gestation, compared to the 2 groups done summer 2013 (PE-buffer and PE-A1M).

But the groups Control-buffer and Control-A1M do not increase in BP over the pregnancy, while an increase is seen in both of the groups PE-buffer and PE-A1M. Control-A1M is dropping more in BP over the duration of the pregnancy, already before any treatment but especially around day 11-12, while Control-buffer is more at an even level.

Figure 3:

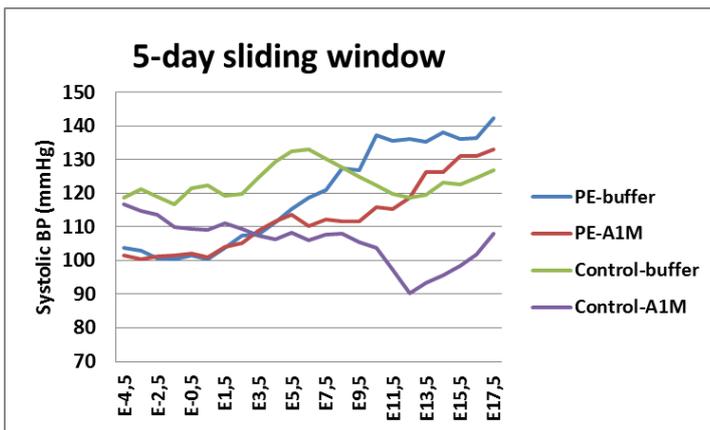
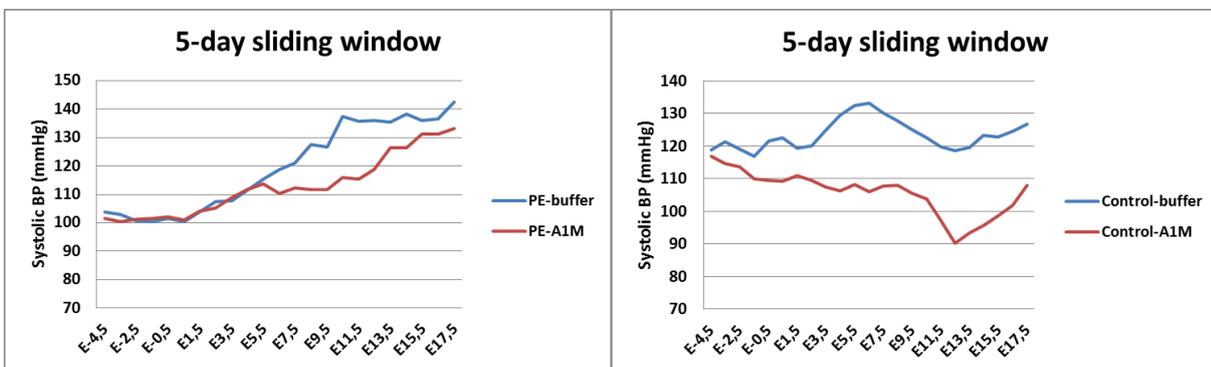


Figure 4.



In figure 5-6-7-8: shown is the individual BP during the gestation for each mouse in each of the 4 groups (as 5-day sliding window).

Figure 5 and 6.

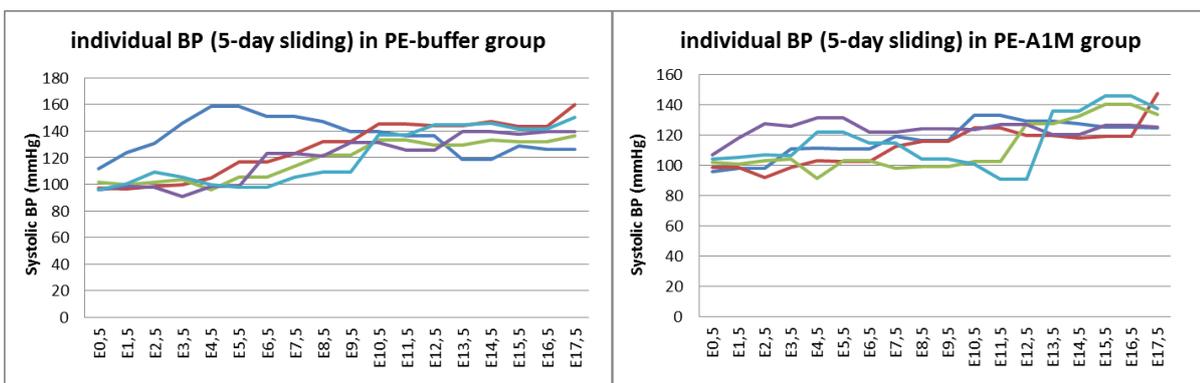
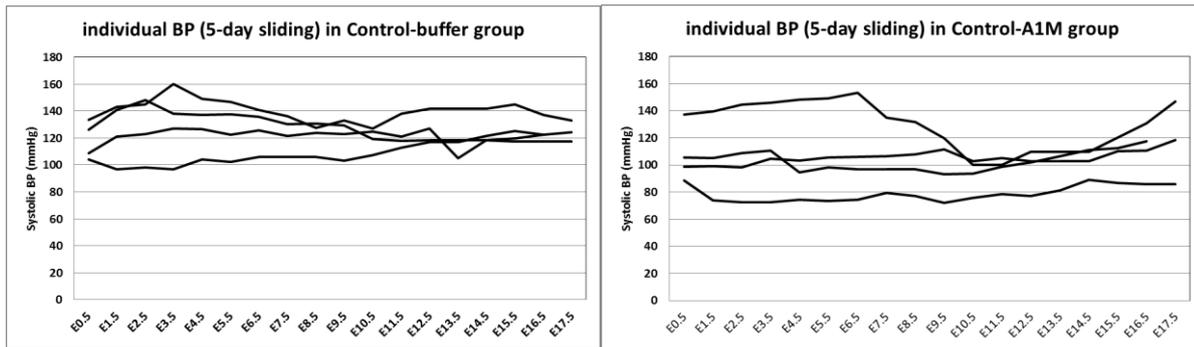


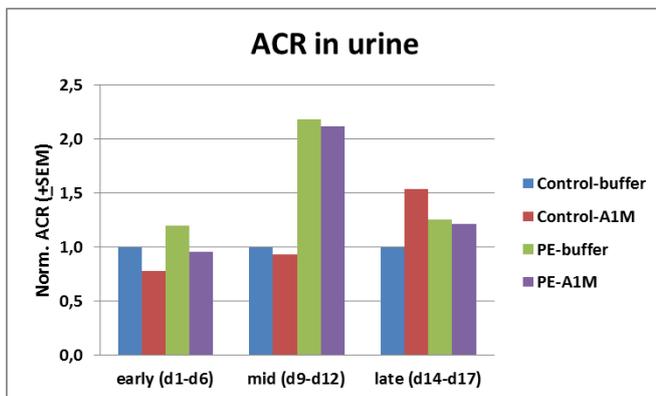
Figure 7 and 8.



Proteinuria

Only clear proteinuria at mid-gestation, and A1M has no effect. Previous analysis of the samples from 2013 had a calculation error that resulted in that A1M seemed to have a positive effect on this parameter...

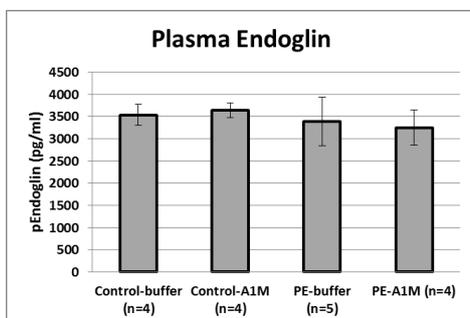
Figure 9.



Plasma endoglin

No difference in plasma endoglin levels between the groups.

Figure 10.



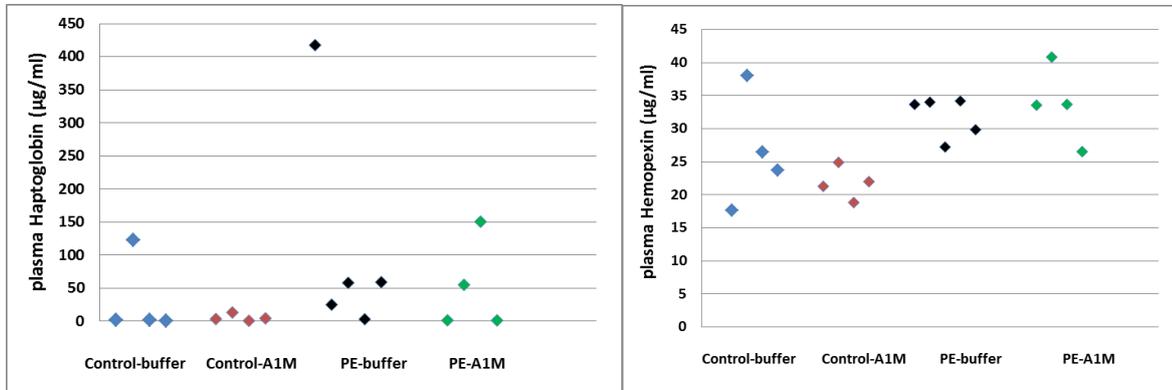
Plasma haptoglobin and hemopexin

In figure 11: no significant differences in Hp between the groups, only a weak trend of increased levels in the PE groups.

In figure 12: no significant difference in Hx between Control-buffer and the other 3 groups, only a weak trend of increased levels in the PE groups.

Significant difference between Control-A1M and PE-buffer (p 0,001) and PE-A1M (p 0,01)

Figure 11 and 12.

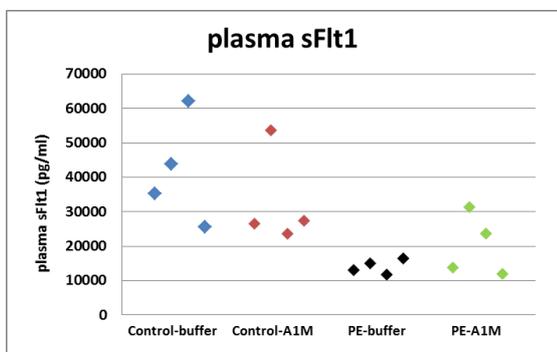


Plasma sFlt1

Plasma sFlt1 levels lower in the PE-groups. (Used ELISA: R&D system cat.nr. MVR100)

No significant differences between the groups, but a tendency of the controls to have higher levels (?).

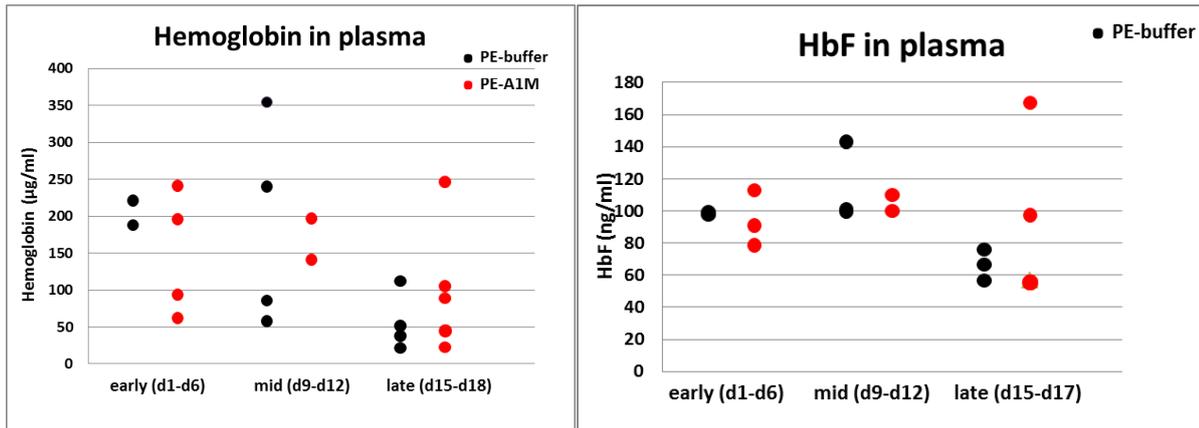
Figure 13.



Hemoglobin and HbF in plasma

In figure 14 and 15: plasma levels of total haemoglobin and HbF was measured (using ELISA's "mouse haemoglobin, GenWay GWB-7B19E2" and "mouse HbF Elisa, My Bio Source"). No differences in either during gestation. Do not know about the specificities of these ELISA kits.

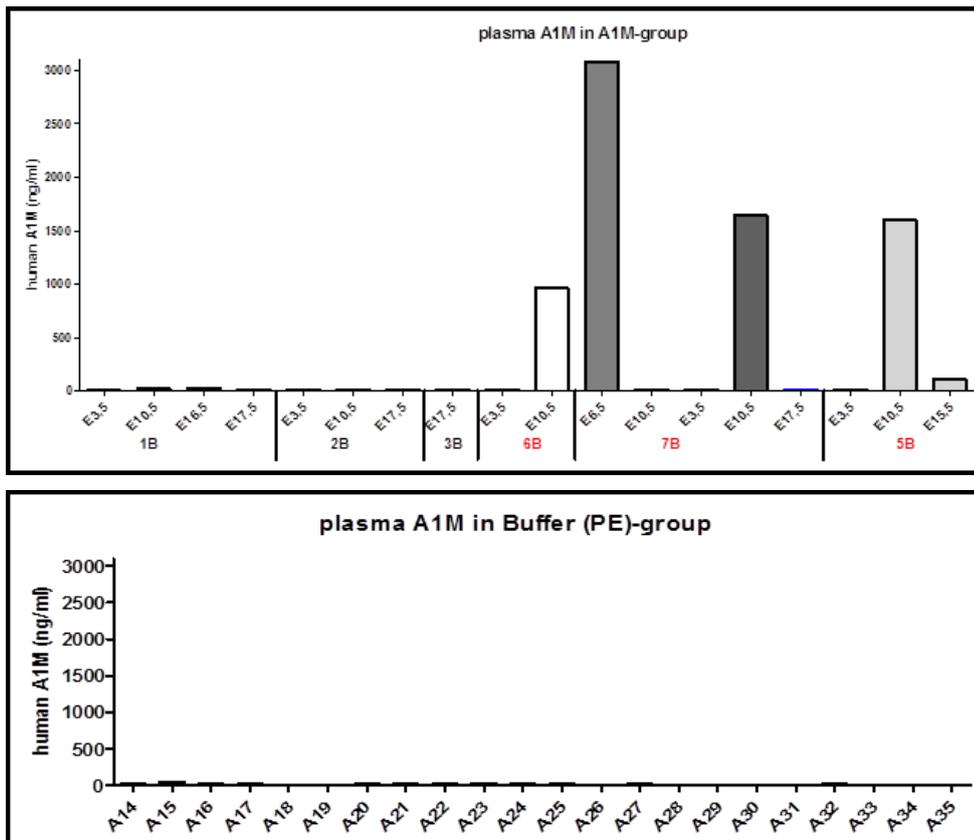
Figure 14 and 15.



Plasma levels of human rA1M

In figure 16: A1M-RIA specific for human A1M was performed on all plasma samples from groups PE-buffer and PE-A1M. rA1M was found in some of the plasma samples in the PE-A1M group only, demonstrating that rA1M injected i.p. find its way to the circulation.

Figure 16.



Real-time PCR

Since the organs from experiment 2 (2015) were all thawed upon arrival in Lund, the RNA prepared from placenta, liver and kidney was degraded (data not shown).

Total RNA was prepared from kidney, liver, placenta and white blood cells (WBC) from experiment 1 (2013), and qPCR was performed for the following genes: Ambp, HMOX1, CAT, SOD2 and sFlt1. We used HPRT as endogenous control for kidney, liver and WBC. For placenta, we used Sdha.

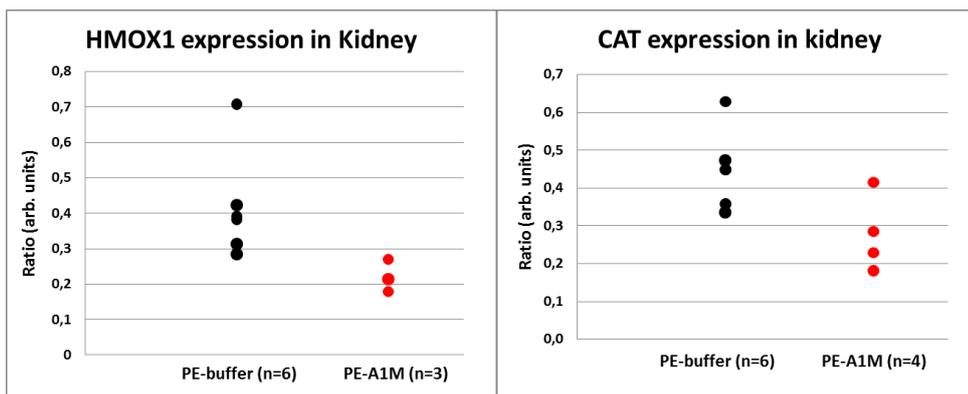
Also, we genotyped all the placentas that were sent to us from experiment 1. Since the STOX1Tg42 males used in that experiment were heterozygote for the transgene, ~50% of the pups/placentas were transgenic and the rest were wildtype. We only used transgenic placentas for the gene expression analysis.

No difference in gene expression between PE-buffer and PE-A1M for any of the genes in WBC.

No difference in gene expression between PE-buffer and PE-A1M for any of the genes in liver.

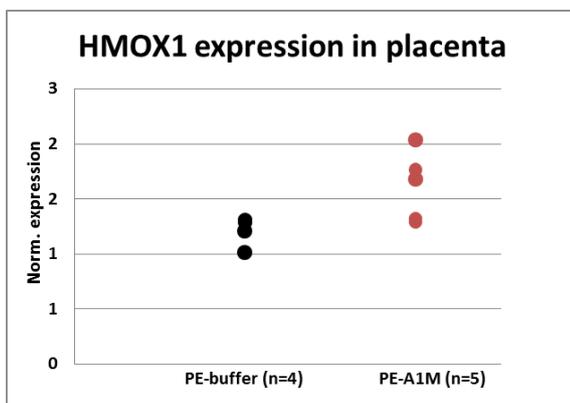
In figure 17 and 18: there was a tendency to lower expression of HMOX1 (p 0,024) and CAT (p 0,036) in kidney from the PE-A1M group. No differences were seen for the other genes.

Figure 17 and 18.



In figure 19: there was a tendency to higher expression of HMOX1 (p 0,04) in placenta from the PE-A1M group. No differences were seen for the other genes.

Figure 19.



Protein nitration and carbonyl in placenta

Protein was prepared from transgenic placentas from both PE-groups.

We also prepared protein from the two control groups from experiment 2.

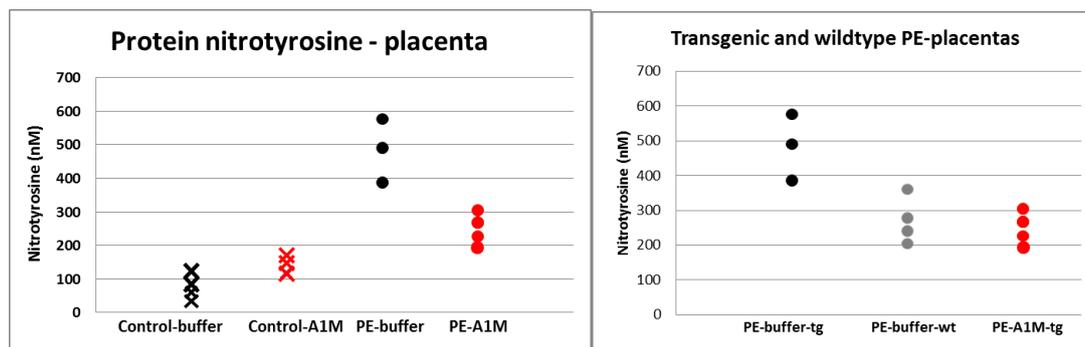
In addition, we included some wildtype placentas from the PE-buffer group, to see if there was any difference between wildtype and transgenic placentas developed together in the same uterus.

To detect nitrotyrosine residues we used “OxiSelect Nitrotyrosine ELISA kit, STA-305, Cell Biolabs” and to detect carbonyl residues we used “OxiSelect Protein Carbonyl ELISA kit, STA-310, Cell Biolabs”.

In figure 20: Significantly elevated level of nitrotyrosine residues in proteins from transgenic placentas in the PE-buffer group compared to Control-buffer (p 0,01). The A1M treatment reduced the level of nitrotyrosine in the PE-A1M group in comparison to the PE-buffer group (p 0,04).

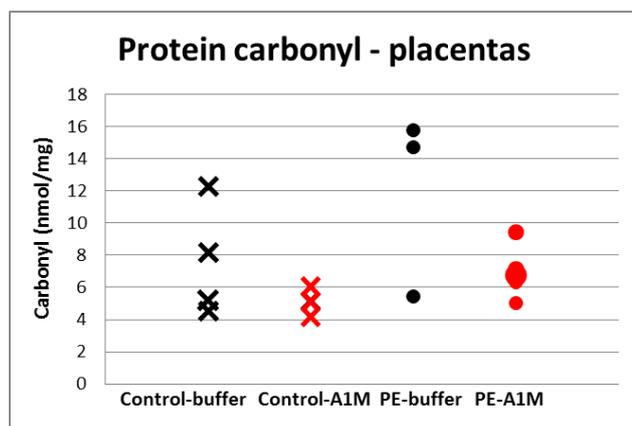
In figure 21: The wildtype placentas in the PE-buffer group had lower levels of nitrotyrosine compared to the transgenic placentas in the same group (p 0,04), and down to the same levels as seen in the PE-A1M group.

Figure 20 and 21.



In figure 22: No significant difference in protein carbonyl levels between any of the groups.

Figure 22.

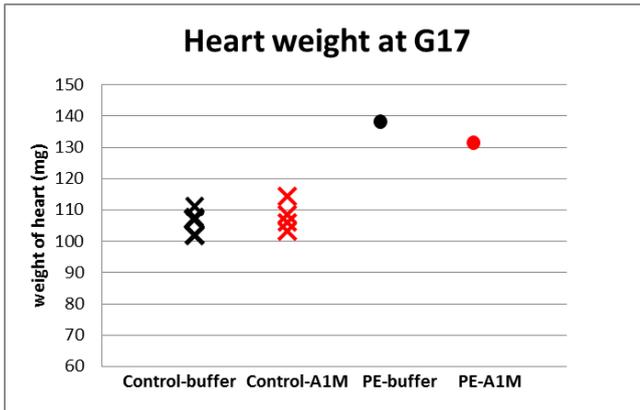


Weight of the heart at time of termination (G17)

We weighed the thawed hearts from both the control groups. From the two PE groups there was only 1 heart from each group that we could measure, we have 3 more hearts from each group but they were in Trizol, so could not be used for this.

In figure 23: There was clearly a difference in the weight of the heart between the 2 control groups and the 2 PE groups, but no statistics due to only 1 heart in each of the PE groups.

Figure 23.



QUATRIÈME PARTIE : DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION

DISCUSSION

1. LE STRESS NITROSATIF DANS LA PATHOLOGIE VASCULAIRE

Un de nos résultats les plus marquants concernant le lien entre *STOX1* et les radicaux libres est le fait d'avoir retrouvé dans les placentas murins surexprimant *STOX1* une plus grande quantité de protéines nitratées que dans les placentas de génotype sauvage (Doridot *et al.*, 2014). Il paraît alors légitime de se demander si ce changement de pattern oxydatif peut expliquer le phénotype prééclampsique, notamment l'hypertension.

Tout d'abord, nos résultats sont cohérents avec les articles qui établissent un lien entre stress nitrosatif et prééclampsie. Il a notamment été montré la présence d'ions peroxy-nitrites et de nitrotyrosines dans les placentas prééclampsiques (Myatt *et al.*, 1996). Cela a été associé à une réactivité vasculaire diminuée dans ces placentas (Kossenjans *et al.*, 2000). Les modifications covalentes par ajout de radical peroxy-nitrite peuvent toucher tous les types de protéines – transporteurs, enzymes, protéines de structures, etc. – et affecter fortement leur fonctionnalité (Martínez et Andriantsitohaina, 2009) ou conduire à leur dégradation par le protéasome (Souza *et al.*, 2000). Ces données suggèrent que ces altérations peuvent réellement avoir un effet sur la fonction placentaire globale (Myatt, 2010).

D'un autre côté, le lien entre stress nitrosatif et hypertension vasculaire systémique existe lui aussi bel et bien. On sait notamment que l'administration chronique chez le rat d'un analogue de la L-arginine, le L-NAME (*N-nitro-l-arginine methyl ester*), bloque les trois isoformes de la NO synthase et provoque une hypertension par déficience de NO (Ribeiro *et al.*, 1992 ; Seth *et al.*, 2016). Or le stress nitrosatif provoque la formation d'ions peroxy-nitrites, ce qui diminue la biodisponibilité du NO et peut donc, de la même manière que dans le modèle rat, induire une hypertension. Il a également été montré que le stress nitrosatif pouvait causer une dysfonction endothéliale avec notamment une nitration des protéines du cytosquelette (Girouard *et al.*, 2007 ; Knepler *et al.*, 2001).

Il y a donc une cohérence entre le stress nitrosatif et la dysfonction placentaire, ainsi qu'entre le stress nitrosatif et l'hypertension vasculaire systémique. Pour relier ces deux phénomènes, plusieurs auteurs proposent l'hypothèse de vésicules relarguées par le placenta (Cockell *et al.*, 1997 ; Lau *et al.*, 2013) qui peuvent contenir des protéines (Baig *et al.*, 2014). Une hypothèse serait que la dysfonction placentaire observée au cours d'une prééclampsie pourrait provoquer le relargage de vésicules contenant des protéines nitratées qui, une fois arrivées dans l'endothélium maternel, provoquerait une dysfonction endothéliale par oxydation des composants cellulaires. Cependant, cette hypothèse n'ayant jamais été proposée, il est peut-être plus probable que la dysfonction placentaire causée par un stress nitrosatif provoque le relargage de facteurs, comme sFlt1 ou sEng, capables d'induire l'hypertension systémique. D'ailleurs, nos données transcriptomiques des cellules endothéliales mettent en évidence une activation des voies de l'inflammation mais pas du stress oxydatif ou nitrosatif (Ducat *et al.*, 2016).

2. L'ASPIRINE ET LA PRÉÉCLAMPSIE

Les résultats murins autour de l'aspirine sont finalement assez surprenants puisque, lorsqu'on regarde la littérature, l'effet de l'aspirine dans la prééclampsie est très controversé. En effet, alors que la première étude était très prometteuse (Beaufils *et al.*, 1985), des méta-analyses n'ont pas montré d'effet significatif de l'aspirine sur la prévention de la prééclampsie (Villa *et al.*, 2013). La controverse réside aussi dans le moment de l'administration de l'aspirine. Une méta-analyse a montré, par exemple, que l'aspirine donnée avant 16 semaines de grossesse réduisait les complications de la prééclampsie (Bakhti et Vaiman, 2011 ; Bujold *et al.*, 2010). Il semble néanmoins y avoir un consensus aujourd'hui pour affirmer que l'aspirine à faible dose a au moins un effet protecteur contre la prééclampsie modérée. À ce titre, des stratégies d'usages thérapeutiques sont déjà appliquées dans les essais cliniques (Mol *et al.*, 2016 ; Park *et al.*, 2015).

Si le rôle de l'aspirine dans la prévention de la prééclampsie fait débat, très peu d'études ont tenté de comprendre la base moléculaire sous-jacente de cette protection. L'aspirine est essentiellement connue pour inhiber l'agrégation plaquettaire (Weiss, 2003). Un de ses mécanismes d'action bien documenté est l'acétylation de l'enzyme cyclo-oxygénase 1, ce qui entraîne une inhibition de la synthèse de thromboxane A₂ (Undas *et al.*, 2007). Est-ce un mécanisme suffisant pour expliquer la résolution de l'hypertension gestationnelle lors de prééclampsie ? À notre connaissance, aucune publication ne répond à cette question.

Dans notre modèle, les souris ont reçu de l'aspirine dans l'eau de boisson avant même d'être gestantes. On peut se demander, tout d'abord, si effectivement le moment de l'administration est un facteur important dans notre modèle, comme il semble l'être chez la femme. Il serait intéressant de faire la même expérience en changeant ce paramètre et de déceler éventuellement un seuil critique d'administration : y a-t-il un seuil de temps de gestation ? Ou y a-t-il un seuil de tension artérielle ?

De plus, les transcriptomes placentaires révèlent de grandes différences d'expressions géniques entre les souris prééclamptiques non traitées et les souris prééclamptiques traitées, ce qui est en faveur d'un effet transcriptionnel de l'aspirine sur le placenta. Cet effet transcriptionnel n'avait, à notre connaissance, jamais été montré *in vivo*. Quelques expériences ont été menées *ex vivo* sur des explants de placentas humains (Johnson *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2015) ou sur des cellules trophoblastiques immortalisées (Orendi *et al.*, 2010).

Se pose alors la question de l'effet transcriptionnel de l'aspirine, peu documenté dans la littérature. Est-ce un effet direct ou indirect ? Quels autres facteurs fait-il intervenir ? Quelles cellules du placenta sont les cibles de cet effet ? Nos expériences tentent de répondre à ces questions.

Nous avons déjà montré que, dans le modèle de souris surexprimant *STOX1*, il existe une forte altération de l'expression de gènes placentaires impliqués dans la physiologie mitochondriale et le stress nitrosatif. Par conséquent, il était intéressant de voir si l'aspirine modulait l'expression des mêmes gènes dans le sens inverse pour expliquer ses effets. Nous avons conclu que ce n'était probablement pas le cas, et que l'aspirine à faible dose réprimait essentiellement des gènes impliqués dans la coagulation. Ceci est cohérent avec l'effet documenté de l'aspirine sur les plaquettes, mais qui était inconnu sur le placenta.

L'analyse bioinformatique des promoteurs des gènes modifiés a identifié un enrichissement des sites de liaison pour les facteurs de transcription HNF. De manière intéressante, une récente publication a révélé que l'aspirine pourrait interagir avec les facteurs HNF1-alpha (Sridhar *et al.*, 2012). Par des études mécanistiques de biologie moléculaires et cellulaire, notre étude suggère dans l'ensemble, pour la première fois, que les effets anticoagulants du traitement à l'aspirine à faibles doses pourraient être médiés par une régulation de l'expression des facteurs HNF. En effet, le rôle des facteurs HNF dans la coagulation a été publié dans des contextes cardiovasculaire (Reiner *et al.*, 2009) et cérébral (Safdar *et al.*, 2012).

De nombreux mécanismes et questions subsistent : est-ce que cet effet de l'aspirine sur la coagulation explique complètement le phénotype *in vivo* ? Quel est le lien moléculaire entre STOX1 et les facteurs HNF – compétition sur un même promoteur, interaction protéique ?

Notre travail actuel semble indiquer que l'aspirine dans le contexte de la prééclampsie pourrait être en mesure de diminuer l'expression de Hnf1bêta et Hnf4alpha dans le placenta. Cela suggérerait l'hypothèse que l'effet bénéfique de l'aspirine serait principalement dû à une diminution systémique des capacités de coagulation du patient. L'aspirine jouerait donc un rôle protecteur en aval des causes réelles du phénotype prééclamptique.

1. *STOX1*, LA MITOCHONDRIE ET LES RADICAUX LIBRES

Nos résultats publiés en 2014 concernant le lien entre *STOX1*, la mitochondrie et les radicaux libres sont complètement novateurs et ouvrent la voie à de nouvelles pistes pour mieux comprendre la fonction cellulaire de *STOX1* et son implication dans les mécanismes précoces de la prééclampsie.

- Le transcriptome placentaire des souris prééclampsiques à E16.5 révèle massivement des altérations de voies métaboliques reliées à la mitochondrie. Ces résultats confirment les données transcriptomiques obtenues à partir des cellules JEG-3 surexprimant *STOX1*. Nous avons également observé dans les placentas transgéniques une augmentation de la masse mitochondriale ainsi qu'une augmentation de la nitration des protéines, par rapport aux placentas WT. Ces données mettent en évidence un déséquilibre de la balance nitroso-redox *in vivo*, récemment confirmé par nos collaborateurs en Suède par un kit ELISA (« OxiSelect Nitrotyrosine, STA-305, Cell Biolabs ») alors que nous avons détecté initialement ces protéines par immunofluorescence (Doridot *et al.*, 2014).
- Dans les cellules JEG-3 surexprimant *STOX1*, nous avons observé, à 20 % d'oxygène, une plus grande activité mitochondriale ainsi qu'une plus importante production de ROS (comparé à des cellules contrôles). À 2 % d'oxygène, nous avons observé un switch de production des radicaux libres. Les cellules surexprimant *STOX1* produisent moins de ROS que les cellules contrôles mais produisent plus de RNS. Nous avons retrouvé des modifications protéiques correspondant à ces altérations. À 20 % d'oxygène, les cellules surexprimant *STOX1* présentent plus de protéines carbonylées – marqueurs d'un stress dû aux ROS – que les cellules contrôles, tandis qu'à 2 % d'oxygène les cellules surexprimant *STOX1* présentent plus de protéines nitratées – marquant un stress dû aux RNS – que les cellules contrôles.
- Nous avons observé que l'expression du micro-ARN mir-210 est complètement éteinte dans les cellules surexprimant *STOX1* à 2 % d'oxygène. Or, dans les cellules contrôles, une baisse du taux d'oxygène active la voie de l'hypoxie, notamment les facteurs HIF qui activent eux-mêmes l'expression de mir-210, qui va lui-même réprimer un certain nombre de gènes dont le rôle est de permettre une meilleure adaptation de la cellule à l'hypoxie (Huang *et al.*, 2010). L'extinction de mir-210 dans les cellules surexprimant *STOX1* suggère que ces cellules vont difficilement s'adapter à des niveaux bas d'oxygène.

En conclusion, ces résultats montrent que *STOX1* est capable, *in vitro* et *in vivo*, de moduler le stress oxydatif, la fonction mitochondriale et la balance des radicaux libres ROS/RNS. De plus, le taux d'oxygène semble être un facteur important de la régulation du rôle de *STOX1*.

Ces résultats s'intègrent complètement dans le contexte de la prééclampsie. En effet, une abondante littérature existe concernant le rôle de l'hypoxie, du stress oxydatif et du stress nitrosatif dans la prééclampsie. Une des premières étapes dans la physiopathologie de la prééclampsie serait une hypoxie placentaire pouvant conduire à un stress oxydatif. Le stress nitrosatif a également été incriminé dans la prééclampsie et serait par ailleurs plus agressif que le stress oxydatif (Radi, 2013). Néanmoins, il n'a pas été établi si le stress oxydatif et nitrosatif était une réelle cause ou plutôt une conséquence de lésions plus précoces dans ce syndrome.

Cependant, l'idée que la fonction du gène *STOX1* dans l'équilibre des radicaux libres pourrait avoir un rôle précoce dans l'apparition de la prééclampsie est appuyée par d'autres données concernant le modèle souris. Dans notre modèle, nous n'avons pas observé de différence de structure au niveau du placenta (Doridot *et al.*, 2013), ce qui nous a conforté dans l'idée que l'induction du phénotype prééclampsique serait due à la sécrétion de facteurs circulants provenant de cet organe. Parmi ces

facteurs, les protéines carbonylées et nitratées sont des candidates envisagées. Cependant nous n'avons pas montré *stricto sensu* la relation de cause à effet entre la présence de protéines nitratées dans les placentas et l'hypertension, quoique de nombreux articles mentionnent ce lien dans l'espèce humaine. Par ailleurs, l'utilisation de L-NAME (inhibiteur des NOS), de même que la génération de souris eNOS^{-/-} induit un phénotype prééclamptique (Li *et al.*, 2012)

Malgré tout, des résultats non publiés (sauf un abstract) concernant l'effet de l'alpha-1-microglobuline nous indiquent que le stress oxydatif pourrait être un mécanisme participant à l'établissement de l'hypertension. En effet, l'hémoglobine fœtale a été montrée comme ayant un caractère pro-oxydant et pourrait être un des facteurs relargués par le placenta et induisant l'hypertension (Hansson *et al.*, 2014). Les premiers résultats de souris traitées à l'alpha-1-microglobuline, molécule à caractère antioxydant capable notamment de se lier à l'hémoglobine circulante, montrent une baisse significative de la tension par le traitement. Ceci laisse à penser que la modulation de molécules prooxydantes pourrait être une voie de traitement de la prééclampsie.

Enfin, de récents articles ont montré par l'approche double-hybride que la protéine STOX1 interagit physiquement avec la protéine GCLM (*glutamate-cysteine ligase, modifier subunit*), une des deux sous-unités de la ligase glutamate-cystéine, enzyme limitante dans la synthèse du glutathion (Wang *et al.*, 2011), molécule antioxydante majeure (comme décrit dans la première partie). STOX1 pourrait donc avoir une action directe sur des molécules antioxydantes et donc sur la production de radicaux libres.

Nous avons récemment exploré l'action de STOX1 sur le stress oxydatif à l'aide de drogues pro- ou anti-oxydantes ciblant des voies particulières, comme le Mn-TBAP – analogue de la MnSOD – ou la roténone – inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les analyses statistiques de ces expériences sont en cours et devraient nous permettre de connaître les enzymes ou protéines cibles de STOX1 dans la régulation du stress oxydatif cellulaire.

2. EFFETS CARDIOVASCULAIRES DE LA PRÉÉCLAMPSIE

Nos résultats publiés en 2016 ont renforcé la pertinence de notre modèle souris. En effet, nous avons montré qu'une souris femelle portant des fœtus transgéniques subissait des altérations cardiovasculaires comparables à celles observées chez les femmes prééclamptiques. Ces résultats ont plusieurs répercussions :

- Notre modèle souris est un bon modèle pour étudier les mécanismes biologiques sous-tendant l'apparition de l'hypertension. L'endothélium vasculaire est à l'interface du sang et des cellules musculaires lisses des vaisseaux et contrôle la vasoconstriction. Ainsi, toute dysfonction de ces cellules altère les signaux vers les cellules musculaires et altère donc l'état contractile du système cardiovasculaire. L'étude de l'origine moléculaire de cette dysfonction nous renseignerait sans doute beaucoup sur les mécanismes princeps de la prééclampsie. Cette dysfonction est-elle due à un facteur circulant ? À un relargage de microparticules ? À des cellules fœtales ? À des protéines carbonylées/nitratées ? À des acides nucléiques ? À une altération de la coagulation ? Ou à tous ces éléments à la fois ? La limite de notre étude est que nous avons étudié l'état transcriptionnel des cellules endothéliales en fin de gestation. Il serait donc intéressant d'envisager la même étude plus précocement. En effet, les altérations observées – voies inflammatoires et mitotiques – pourraient être secondaires à des lésions initiales. Une telle étude permettrait peut-être également d'envisager de nouveaux types de marqueurs précoces pour dépister la prééclampsie.
- Notre modèle souris serait un bon modèle d'étude à long terme des effets cardiovasculaires d'une prééclampsie. La souris étant en effet un animal de laboratoire simple d'élevage, il est tout à fait envisageable de garder des souris gestantes plusieurs mois après la gestation et d'étudier au niveau du cœur, du rein ou de l'endothélium d'une part les altérations histologiques telles que la fibrose, les dépôts de fibrine, les altérations structurales, et d'autre part les altérations moléculaires

telles que les altérations transcriptomiques ou épigénétiques. Ce modèle permettrait des études mécanistiques de ces effets à long terme, ce qui n'est pas envisageable chez la femme pour qui nous n'avons que des études statistiques rétrospectives sur les dominantes pathologiques post-gestationnelles, notamment les maladies cardiovasculaires et rénales.

3. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE *STOX1* DANS LES TROPHOBLASTES

Plusieurs études en cours ont pour but d'élucider les mécanismes moléculaires princeps de *STOX1*. En effet, depuis sa découverte en 2005, aucun élément de réponse sur l'ADN n'a été démontré pour ce facteur de transcription. De plus, cette protéine a été localisée à la fois dans le noyau et à la fois dans le cytoplasme des cellules trophoblastiques (van Dijk *et al.*, 2005). Aucune donnée n'existe à ce jour sur ses rôles potentiels dans le cytoplasme.

Les études transcriptomiques de cellules surexprimant *STOX1* nous ont renseignés sur les voies biologiques contrôlées par *STOX1*, mais il se mélange les actions directes des actions indirectes. Les expériences récentes de transfections de siARN dirigés contre *STOX1* pourraient nous faire avancer sur ce point, par recoupement des données de répression et de surexpression.

Le travail sur les facteurs HNF nous a fait progresser sur les aspects mécanistiques. En effet, nous avons montré que la surexpression de *STOX1* dans les placentas murins était liée à une diminution de HNF1-bêta, et que la surexpression de *STOX1* dans un modèle cellulaire de trophoblastes entraînait une répression des cibles de HNF1-bêta. Ces résultats nous font supposer que les protéines *STOX1* et HNF peuvent interagir directement ou indirectement par le biais d'un partenaire, ou entrer en compétition pour se lier à la une même séquence d'ADN.

Plus directement, les travaux de PCR-sélection ont mis en évidence que les protéines *STOX1B* et *STOX1A* (même si non montré ici) étaient capables de se lier à une séquence d'ADN, confortant ainsi le rôle présumé de facteur de transcription de *STOX1*. Cependant, nous n'avons à ce jour pas pu mettre en évidence la fonction d'induction de la transcription par *STOX1* en utilisant des plasmides rapporteurs. Ainsi, ces résultats posent de nombreuses questions sur le rôle de *STOX1* dans le noyau. Est-il capable d'activer directement la transcription ? A-t-il besoin d'un partenaire ? A-t-il plutôt un rôle épigénétique en tant que modificateur des marques d'histones ou en remodelant la chromatine ? Ces différentes hypothèses sont en train d'être testées une à une au laboratoire.

Le projet à moyen terme, qui peut-être sera le plus prometteur, est la recherche de partenaires protéiques de *STOX1*. En effet, si nous arrivons à valider l'interaction de *STOX1* avec des protéines dont le mode d'action est connu, la fonction de *STOX1* et ses cibles moléculaires apparaîtront plus clairement. Ce qu'il est important de faire, c'est aussi de distinguer ses partenaires cytoplasmiques de ses partenaires nucléaires. Nous pourrions éventuellement découvrir de multiples rôles cellulaires pour *STOX1*, déjà envisagés ou non, complémentaires ou distincts, spécifiques du placenta ou des cellules nerveuses, qui pourraient expliquer les phénomènes observés au cours de la prééclampsie ou de la maladie d'Alzheimer.

De plus nous avons jusqu'à présent principalement étudié l'effet de la surexpression de *STOX1* (*in vivo* ou *in vitro*). Une collaboration récente avec l'équipe de Marie-Noëlle Dieudonné vise à étudier l'impact transcriptomique de la sous-expression de *STOX1* par transfection de siARN, dirigés contre *STOX1* et *STOX2*, dans des cultures primaires de trophoblastes issus de placentas humains du premier trimestre de la grossesse. Des analyses bioinformatiques sont en cours. Ces analyses, recoupées avec les analyses de surexpression, devraient nous orienter sur les voies biologiques activées par *STOX1*.

L'ensemble de ces projets est résumé dans le **Tableau 13**.

4. CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de cette thèse sont encourageants pour la découverte des rôles de STOX1. L'effet important de STOX1 sur la production de radicaux libres pourrait expliquer de nombreux mécanismes de la prééclampsie et de la maladie d'Alzheimer. Cependant, nous manquons encore beaucoup d'informations mécanistiques sur la protéine STOX1. Au fur et à mesure des recherches, nous découvrons de plus en plus de voies régulées par STOX1 mais nous n'avons pas encore déchiffré le mécanisme d'action précis de cette protéine qui expliquerait toutes les observations référencées dans la littérature. Les expériences futures, notamment la recherche de partenaires protéiques, devrait nous aider dans ce sens.

Dans l'ensemble, nos résultats contribuent à mieux comprendre la physiopathologie de la prééclampsie. De plus, le développement d'un modèle de souris est une condition intéressante pour évaluer des approches thérapeutiques qui ne peuvent évidemment pas être testés chez les femmes enceintes.

Tableau 13 : projets à court, moyen et long terme

	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i> (modèle souris)	Projets collaboratifs
Court terme	Évaluation des effets de STOX1 sur les marques chromatiniennes (méthylation et acétylation d'histones notamment)	Génération d'un nouveau modèle de souris par transgénèse additive d'un BAC humain contenant le gène STOX1 et phénotypage de ces souris (hypertension, protéinurie).	Imagerie fonctionnelle du placenta et du cœur de souris gestantes : IRM, produit de contraste, modèle d'hypoperfusion, élasticité du placenta.
	Recherche du site de fixation <i>in vitro</i> par ChIP-seq		
	Génération de nouvelles lignées cellulaires BeWo surexprimant STOX1 (isoforme A ou B) et caractérisation de ces cellules (transcriptome, fusion cellulaire, stress oxydatif, réparation membranaire)		
Moyen terme	Recherche de partenaires spécifiquement cytoplasmiques et nucléaires par une approche protéomique sans a priori.	Évaluation des effets à long terme d'une gestation prééclampsique sur l'endothélium (marques épigénétiques, expression génique)	
Long terme	Localisation cellulaire de STOX1 : shift cytoplasme-noyau ? interaction avec la voie AKT ? Co-localisation avec la mitochondrie ? Shift en relation avec un stress (radicaux libres/hypoxie) ou en relation avec le cycle cellulaire ?	Étude des mécanismes précoces du phénotype prééclampsique : transcriptome de cellules endothéliales précoces, transcriptome du placenta précoce, étude de la production de radicaux libres précoce.	Accouplement de souris STOX1 avec des souris PrP0 (collaboration INRA) : étude du rôle de STOX1 dans le système nerveux
		Recherche de marqueurs précoces de prééclampsie chez les souris : marqueurs protéiques ? ADN, ARN circulant, exosomes ?	Étude de l'effet du sperme sur la réponse utérine par accouplement de souris femelles avec des mâles transgéniques vasectomisés (collaboration INRA)
		Transcriptome et/ou sécrétome des blastocystes +/- associé à transcriptome des cornes utérines	

LISTES ET RÉFÉRENCES

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : structure des membranes fœtales chez les amniotes.....	12
Figure 2 : les différentes conformations extérieures de placentas	12
Figure 3 : les différentes organisations tissulaires des interactions entre les tissus maternels et fœtaux.....	14
Figure 4 : les différentes structures histologiques des membranes interhémales placentaires	15
Figure 5 : arbre phylogénétique des mammifères euthériens	17
Figure 6 : interactions et transport du glucose entre la structure trilaminaire trophoblastique et l'espace sanguin au sein du labyrinthe murin	17
Figure 7 : photos d'un placenta humain normal à terme.....	19
Figure 8 : anatomie générale du placenta humain.....	20
Figure 9 : structure du placenta humain et de la circulation sanguine placentaire à terme	20
Figure 10 : représentation schématique des différentes étapes du développement du placenta humain.....	22
Figure 11 : coupe transversale d'une villosité flottante au premier trimestre de la grossesse et à terme.....	22
Figure 12 : remodelage des artères spiralées utérines au cours de la placentation humaine	23
Figure 13 : représentation des voies de différenciation du blastocyste humain.....	23
Figure 14 : les différents types de débris trophoblastiques relargués par le placenta dans la circulation maternelle au cours de la grossesse	24
Figure 15 : circulation intervillieuse au premier trimestre de grossesse.....	25
Figure 16 : environnement en oxygène et maladies.....	26
Figure 17 : pression partielle d'oxygène et expression des gènes dans le trophoblaste	26
Figure 18 : mécanismes sous-tendant la tolérance maternelle du fœtus	27
Figure 19 : photos d'un utérus et d'un placenta murins normaux	28
Figure 20 : anatomie comparée des placentas humain et murin	29
Figure 21 : circulations maternelle et fœtale au sein du placenta murin à terme.....	30
Figure 22 : développement du placenta murin.....	31
Figure 23 : décidualisation et placentation murine	31
Figure 24 : remodelage des artères spiralées utérines au cours de la placentation murine.....	32
Figure 25 : vue d'ensemble des lignées trophoblastiques murines et de leurs gènes spécifiques	32
Figure 26 : populations cellulaires présentes à l'interface foeto-maternel du placenta murin	33
Figure 27 : mécanismes de régulation des gènes codant des chimiokines inflammatoires au cours de la placentation.....	34
Figure 28 : taux de prééclampsie selon l'origine ethnique de la mère.....	39
Figure 29 : positions chromosomiques de quelques régions de susceptibilité et de quelques gènes candidats pour la prééclampsie	42

Figure 30 : lésions d'endothéliose glomérulaire	44
Figure 31 : œdème cérébral chez des patientes prééclamptiques et des modèles animaux de prééclampsie/éclampsie	46
Figure 32 : cascades physiologiques de la coagulation et de la fibrinolyse.....	46
Figure 33 : algorithme de prescription du traitement antihypertenseur en cas de prééclampsie sévère	51
Figure 34 : arbre décisionnel pour l'arrêt de grossesse en cas de prééclampsie.....	52
Figure 35 : facteurs de risque pour les maladies cardiovasculaires induits par la grossesse	55
Figure 36 : placentation anormale au cours de la prééclampsie	58
Figure 37 : comparaison d'artères spiralées utérines remodelées ou non-remodelées	58
Figure 38 : les molécules sFlt1 et sEng provoquent une dysfonction endothéliale en antagonisant la signalisation du VEGF, du PlGF et du TGF-β.....	60
Figure 39 : modifications vasculaires au cours d'une grossesse normale et prééclamptiques	61
Figure 40 : stades du développement de la prééclampsie	61
Figure 41 : modèle intégré de la physiopathologie complexe de la prééclampsie.....	62
Figure 42 : pression artérielle systolique au cours de la gestation dans différents modèles de souris prééclamptiques.....	66
Figure 43 : concentrations de dioxygène approximatives dans le corps humain.....	73
Figure 44 : structure de la mitochondrie et rôle dans le métabolisme énergétique de la cellule eucaryote	75
Figure 45 : sites de production de ROS par la mitochondrie	77
Figure 46 : modèle de la production de ROS dans les phagosomes des neutrophiles activés	77
Figure 47 : vue d'ensemble des sources de productions intracellulaires de ROS.....	78
Figure 48 : réactions intracellulaires menant à la génération du NO• et des RNS	79
Figure 49 : réactions entre l'ion superoxyde et le monoxyde d'azote	79
Figure 50 : modifications post-traductionnelles induites par les RNS.....	82
Figure 51 : interaction des RNS avec les lipides	82
Figure 52 : effets délétères des RNS sur l'ADN et l'ARNm.....	83
Figure 53 : vue d'ensemble des principales enzymes antioxydantes.....	85
Figure 54 : structure chimique des antioxydants dérivés de l'alimentation les plus communs	85
Figure 55 : structure du glutathion.....	85
Figure 56 : respiration aérobie et autorégulation de la production mitochondriale de ROS	86
Figure 57 : principaux produits oxydatifs des bases d'ADN et ADN glycosylases (DG, DNA glycosylases) premièrement responsables de leur excision dans les cellules de mammifères.....	88
Figure 58 : distances de diffusion estimées du monoxyde d'azote, de l'ion peroxyde, du radical hydroxyle et de l'ion superoxyde dans un contexte vasculaire.....	89
Figure 59 : production de H ₂ O ₂ et rôles dans la protection et la signalisation intracellulaire	89
Figure 60 : RONS produits durant l'inflammation	91
Figure 61 : effets des RNS sur la cyclooxygénase COX-2	91

Figure 62 : effets du NO• sur les cellules vasculaires.....	91
Figure 63 : les microparticules comme de nouveaux médiateurs du stress nitrosatif.....	96
Figure 64 : NO• et angiogenèse	96
Figure 65 : apports potentiels de biomarqueurs liés au stress oxydatif ou nitrosatif dans la prévention de maladies.....	96
Figure 66 : représentation des transcrits de <i>STOX1</i> au moment de la découverte du gène.....	100
Figure 67 : captures d'écran des pages <i>Ensembl</i> actuelles des gènes <i>STOX1</i> humain et <i>Stox1</i> murin et caractéristiques des transcrits	101
Figure 68 : alignement des séquences protéiques FOX avec la protéine <i>STOX1</i>	102
Figure 69 : structure du domaine de liaison à l'ADN des facteurs de transcription à « hélice ailée »	103
Figure 70 : localisation cellulaire des différentes isoformes de <i>STOX1</i> humain dans des cellules SGHPL5	103
Figure 71 : localisation cellulaire de la protéine <i>STOX1A</i> dans des cellules U-373.....	103
Figure 72 : localisation cellulaire de la protéine <i>STOX1A</i> dans des cellules SH-SY5Y au cours d'une mitose.....	104
Figure 73 : expression protéique de <i>STOX1</i> dans le placenta humain	105
Figure 74 : expression tissulaire des isoformes de <i>STOX1</i> chez l'homme	106
Figure 75 : capture d'écran de la page <i>Ensembl</i> actuelle du gène <i>STOX2</i> humain et caractéristiques des transcrits.....	108
Figure 76 : arbre phylogénétique des gènes <i>Stox1</i> et <i>Stox2</i> d'après la base de données <i>Ensembl</i> ...	110
Figure 77 : effets de la méthylation de <i>STOX1</i> dans les types cellulaires d'une villosité chorale.	115

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : facteurs de risque de la prééclampsie.....	39
Tableau 2 : tests de dépistage proposés pour la prééclampsie	48
Tableau 3 : bilan de première intention après une prééclampsie	52
Tableau 4 : quelques lignées de cellules endothéliales humaines.....	64
Tableau 5 : présentation de modèles animaux pour la prééclampsie	65
Tableau 6 : exemples d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	71
Tableau 7 : comparaison des sources intracellulaires et extracellulaires des RONS.....	80
Tableau 8 : exemples de dommages liés aux ROS <i>in vivo</i>	80
Tableau 9 : exemples de molécules antioxydantes	83
Tableau 10 : homologues entre quelques séquences de <i>STOX1</i> et <i>STOX2</i>	108
Tableau 11 : caractéristiques génomiques de quelques gènes paralogues et orthologues de <i>STOX1</i> humain	109
Tableau 12 : comparaison des caractéristiques biochimiques des acides aminés histidine et tyrosine.....	114
Tableau 13 : projets à court, moyen et long terme.....	223

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A

ADAM-12 : *a disintegrin and metalloprotease 12*
ADN : acide désoxyribonucléique
ALAT : alanine aminotransférase
ALS : *amyotrophic lateral sclerosis*
AMM : autorisation de mise sur le marché
AngII : angiotensine II
ANT : *adenine nucleotide translocator*, transporteur ADP/ATP mitochondrial
ARDS : *acute respiratory distress syndrome*, syndrome de détresse respiratoire aiguë
ARN : acide ribonucléique
ASAT : aspartate aminotransférase
AT1AA : agonistic autoantibodies against type-1 angiotensin-II receptor, anticorps agonistes du récepteur à l'angiotensine II de type 1

B

BH4 : tétrahydrobioptérine
 β - : bêtabloquant

C

CCNB1 : cycline B1
ChIP : *chromatin immunoprecipitation*
ChIP-seq : *chromatin immunoprecipitation followed by sequencing*
CI : contre-indication
CIVD : coagulation intravasculaire disséminée
cM : centi Morgan
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CNTNAP2 : *contactin-associated protein-like 2*
COMT : catéchol-O-méthyltransférase
COX : cyclooxygénase
CRH : *corticotrophin-releasing hormone*, corticolibérine
CTNNA3 : *cadherin-associated protein alpha 3*
CYP : cytochrome P450

D

DBD : *DNA binding domain*, domaine de liaison à l'ADN
DG : *DNA glycosylases*, ADN glycosylases
DRO : dérivés réactifs de l'oxygène
DRA : dérivés réactifs de l'azote
DUOX : dual oxydases

E

EC : *endothelial cells*, cellules endothéliales
EDHF : *endothelium-derived hyperpolarizing factor*
EDRF : *endothelium-derived relaxing factor*
eNOS : *endothelial nitric oxide synthase*
ER : *endoplasmic reticulum*, réticulum endoplasmique
ERA : espèces réactives de l'azote
ERK : *extracellular signal-regulated kinases*
ERO : espèces réactives de l'oxygène
ESB : encéphalopathie spongiforme bovine
ET-1 : endothéline 1

F

FAD : flavine adénine dinucléotide
FADH₂ : forme réduite de la FAD
FIH-1 : *factor inhibiting HIF-1*
FLJ : *full-length long Japan project* (full-length sequenced cDNAs project)
FMN : flavine mononucléotide
FMNH₂ : forme réduite de la FMN
fms : *feline McDonough sarcoma*, gène dérivé de la lignée de McDonough du virus du sarcome félin
FQR ou ETFDH : *electron-transferring-flavoprotein-ubiquinone oxydoreductase*

G

γ GT : gamma glutamyl-transférase
GC : guanylyl cyclase
GCLM : *glutamate-cysteine ligase, modifier subunit*
ChIP : chromatin immunoprecipitation
GMPc : guanosine 3',5'-monophosphate cyclique

Listes et références

GPD2 : glycérol 3-phosphate déshydrogénase 2, mitochondriale

GPx : glutathion peroxydase

GSNO : S-nitrosoglutathione

H

ham-1 : hermaphrodite specific motoneurons abnormal migration 1

hCG : hormone chorionique gonadotrope ou gonadotropine

HELLP : hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets count, syndrome associant hémolyse, taux élevé d'enzymes hépatiques et comptage plaquettaire bas

HIF : hypoxia inducible factor

HLA : human leucocyte antigen, protéine du complexe majeur d'histocompatibilité

HO : hème oxygénase

HRG : histidine-rich glycoprotein

HSN : hermaphrodite specific motoneurons

HtrA3 : high temperature requirement A3

I

ICAM-1 : intercellular adhesion molecule-1

ICH, intracerebral haemorrhage, hémorragie intracérébrale

IFN γ : interféron gamma

IGFs : insulin-like growth factors

IGFBP-1 : insulin-like growth factor binding protein-1

IMS : intermembrane space, espace intermembranaire

INHBA : activine-A

iNOS : inducible nitric oxide synthase

IRM : imagerie par résonnance magnétique

IUGR : intrauterine growth retardation, retard de croissance intra-utérin

IV : voie intraveineuse

J, K

ko : knockout

L

LCFA : long-chain fatty acids, acides gras à longue chaîne

L-DOPA : forme stéréo-isomérique lévogyre de la 3,4-dihydroxyphénylalanine

LOAD : late-onset Alzheimer disease, maladie d'Alzheimer tardive

LRRTM3 : Leucine Rich Repeat Transmembrane Neuronal 3

M

MAPK : mitogen-activated protein kinases

MPO : myéloperoxydase

2ME : 2-méthoxyestradiol

N

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : forme réduite de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NES : nuclear export signal, signal d'export nucléaire

NLS : nuclear localization sequence, séquence de localisation nucléaire

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

nNOS : neuronal nitric oxide synthase

NOS : nitric oxide synthase

NOX : NADPH oxydase

O

OGDH : 2-oxoglutarate déshydrogénase

orf : open reading frame

P

PAD : pression artérielle diastolique

PAM : pression artérielle moyenne = [PAS+2PAD]/3

PAPP-A : pregnancy-associated plasma protein A

PARP : poly-ADP-ribose polymérase

PAS : pression artérielle systolique

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

PCR : polymerase chain reaction

PDH : pyruvate déshydrogénase

PEE : preeclampsia/eclampsia

PGE2 : prostaglandine E2

PGI2 : prostacycline

pH : potentiel hydrogène

PKG : protéine kinase G

PIGF : *placental growth factor*

PMF : *proton motive force*, force proton-motrice

PTGS2 : *prostaglandin-endoperoxide synthase 2*

PP-13 : *placental protein 13*

PPAR γ : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma

pVHL : *von Hippel-Lindau protein*

Q

Q : coenzyme Q10

qRT-PCR : *quantitative real time PCR* (PCR quantitative en temps réel)

R

RCIU : retard de croissance intra-utérin

RNI : *reactive nitrogen intermediates*

RNS : *reactive nitrogen species*

ROI : *reactive oxygen intermediates*

RONs : *reactive oxygen and nitrogen species*

ROS : *reactive oxygen species*

RT-PCR : *reverse transcription PCR*

S

SA : semaine d'aménorrhée

sEng : *soluble endoglin*, endogline soluble

sFlt1 : *soluble fms-like tyrosine kinase 1*, forme soluble du récepteur du VEGF

SFRS7 : *serine/arginine-rich splicing factor 7*

sGC : *soluble guanylyl cyclase*, guanylyl cyclase soluble

SNP : *single nucleotide polymorphism*, polymorphisme d'une paire de nucleotide

SP1 : *pregnancy-specific β 1-glycoprotein*

SR : *sarcoplasmic reticulum*, réticulum sarcoplasmique

SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone

STOX1 : Storkhead box 1

T

TA : *transactivator domain*, domaine transactivateur

TGF- β : *transforming growth factor beta*

TNF α : *tumour necrosis factor alpha*

TXA2 : thromboxane A2

U

UCP : *uncoupling protein*, protéine découplante

UTR : *untranslated region*

UV : ultra-violet

V, W, X, Y, Z

VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule-1*

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

LISTE DES SITES WEB

- Ensembl : <http://www.ensembl.org/index.html>
- Orphanet : <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>
- *Expression Atlas* : <http://www.ebi.ac.uk/gxa/home>
- *GeneHub-Gepis* : <http://research-public.gene.com/Research/genentech/genehub-gepis/genehub-gepis-search.html>
- *BioGPS* : <http://biogps.org/#goto=searchresult>
- *NCBI* : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/nucest/>
- Site de l'Institut Cochin : <http://cochin.inserm.fr/>
- Site de l'INRA : <http://www6.jouy.inra.fr/gabi/les-Recherches/Equipes-de-recherche/MoDiT>
- dbSNP de NCBI :
http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1341667

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acar N, Ustunel I, Demir R (2011). Uterine natural killer (uNK) cells and their missions during pregnancy: a review. *Acta Histochem.*, **113**, 82–91.
- Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, *et al.* (2002). Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Dev. Biol.*, **250**, 358–373.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J (2011). *Biologie moléculaire de la cellule*, cinquième. ed. Médecine Sciences Publications, Paris.
- Alsat E, Malassiné A, Tarrade A, Merviel P, Évain-Brion D (1999). Le cytotrophoblaste humain, un casse-tête pour le biologiste.
- Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, *et al.* (2002). Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.*, **359**, 1877–1890.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 7915–7922.
- Anson RM, Bohr VA (2000). Mitochondria, oxidative DNA damage, and aging. *J. Am. Aging Assoc.*, **23**, 199–218.
- Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, Nagahiro Y, Shimizu K, Umegae N, *et al.* (2000). Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.*, **47**, 524–527.
- Arngrimsson R, Björnsson S, Geirsson RT, Björnsson H, Walker JJ, Snaedal G (1990). Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **97**, 762–769.
- Askelund KJ, Chamley LW (2011). Trophoblast deportation part I: review of the evidence demonstrating trophoblast shedding and deportation during human pregnancy. *Placenta*, **32**, 716–723.
- Askie LM, Duley L, Henderson-Smart DJ, Stewart LA, PARIS Collaborative Group (2007). Antiplatelet agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Lond. Engl.*, **369**, 1791–1798.
- Baggio MRF, Martins WP, Calderon ACS, Berezowski AT, Marcolin AC, Duarte G, *et al.* (2011). Changes in fetal and maternal Doppler parameters observed during acute severe hypertension treatment with hydralazine or labetalol: a randomized controlled trial. *Ultrasound Med. Biol.*, **37**, 53–58.
- Baig S, Kothandaraman N, Manikandan J, Rong L, Ee KH, Hill J, *et al.* (2014). Proteomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in preeclampsia. *Clin. Proteomics*, **11**, 40.
- Bailey TL, Elkan C (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. ISMB Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*, **2**, 28–36.
- Bakhti A, Vaiman D (2011). Prevention of gravidic endothelial hypertension by aspirin treatment administered from the 8th week of gestation. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.*, **34**, 1116–1120.
- Banerjee S, Randeve H, Chambers AE (2009). Mouse models for preeclampsia: disruption of redox-regulated signaling. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE*, **7**, 4.

- Barone R (2001). Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4, Splanchnologie II. Vigot, Paris.
- Bartels PA, Hanff LM, Mathot R a. A, Steegers E a. P, Vulto AG, Visser W (2007). Nicardipine in pre-eclamptic patients: placental transfer and disposition in breast milk. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.*, **114**, 230–233.
- Barton JR, O'brien JM, Bergauer NK, Jacques DL, Sibai BM (2001). Mild gestational hypertension remote from term: progression and outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **184**, 979–983.
- Baxter JK, Weinstein L (2004). HELLP syndrome: the state of the art. *Obstet. Gynecol. Surv.*, **59**, 838–845.
- Beaufils M, Uzan S, Donsimoni R, Colau JC (1985). Prevention of pre-eclampsia by early antiplatelet therapy. *Lancet Lond. Engl.*, **1**.
- Bell MJ (2010). A historical overview of preeclampsia-eclampsia. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs. JOGNN NAACOG*, **39**, 510–518.
- Bellamy L, Casas J-P, Hingorani AD, Williams DJ (2007). Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, **335**, 974.
- Benayoun BA, Caburet S, Dipietromaria A, Bailly-Bechet M, Batista F, Fellous M, *et al.* (2008). The identification and characterization of a FOXL2 response element provides insights into the pathogenesis of mutant alleles. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 3118–3127.
- Berends AL, Bertoli-Avella AM, de Groot CJM, van Duijn CM, Oostra BA, Steegers EAP (2007). STOX1 gene in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.*, **114**, 1163–1167.
- Beucher G, Simonet T, Dreyfus M (2008). [Management of the HELLP syndrome]. *Gynécologie Obstétrique Fertil.*, **36**, 1175–1190.
- Bodnar LM, Catov JM, Klebanoff MA, Ness RB, Roberts JM (2007). Prepregnancy body mass index and the occurrence of severe hypertensive disorders of pregnancy. *Epidemiol. Camb. Mass*, **18**, 234–239.
- Boucoiran I, Suarathana E, Rey E, Delvin E, Fraser WB, 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.*, **30**, 681–688.
- Breathett K, Muhlestein D, Foraker R, Gulati M (2014). Differences in preeclampsia rates between African American and Caucasian women: trends from the National Hospital Discharge Survey. *J. Womens Health 2002*, **23**, 886–893.
- Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, *et al.* (2010). Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstet. Gynecol.*, **116**, 402–414.
- Bunderson M, Coffin JD, Beall HD (2002). Arsenic induces peroxynitrite generation and cyclooxygenase-2 protein expression in aortic endothelial cells: possible role in atherosclerosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **184**, 11–18.
- Burton GJ (2009). Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J. Anat.*, **215**, 27–35.
- Burton GJ, Jauniaux E (2001). Maternal vascularisation of the human placenta: does the embryo develop in a hypoxic environment?. *Gynécologie Obstétrique Fertil.*, **29**, 503–508.
- Burton GJ, Kaufmann P, Huppertz B (2006). CHAPTER 5 - Anatomy and Genesis of the Placenta A2 - Neill, Jimmy D., *in: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*, Academic Press, St Louis, pp. 189–243.

- Busse R, Fleming I (2006). Vascular endothelium and blood flow. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 43–78.
- Buurma AJ, Turner RJ, Driessen JHM, Mooyaart AL, Schoones JW, Bruijn JA, *et al.* (2013). Genetic variants in pre-eclampsia: a meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*, **19**, 289–303.
- Calicchio R, Buffat C, Mathieu JR, Ben Salem N, Mehats C, Jacques S, *et al.* (2013). Preeclamptic plasma induces transcription modifications involving the AP-1 transcriptional regulator JDP2 in endothelial cells. *Am. J. Pathol.*, **183**, 1993–2006.
- Carter AM (2008). What fossils can tell us about the evolution of viviparity and placentation. *Placenta*, **29**, 930–931.
- Carter AM, Mess AM (2014). Mammalian Placentation: Implications for Animal Models, *in: Pathobiology of Human Disease*, Elsevier, pp. 2423–2442.
- Chaiworapongsa T, Chaemsaihong P, Yeo L, Romero R (2014). Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat. Rev. Nephrol.*, **10**, 466–480.
- Challier J-C, Uzan S (2003). [The human placenta and its pathologies: focus on oxygen]. *Médecine Sci. MS*, **19**, 1111–1120.
- Chesley LC (1980). Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor, and remote prognosis. *Kidney Int.*, **18**, 234–240.
- Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, **364**, 412–420.
- Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, 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.
- Cockell AP, Learmont JG, Smárason AK, Redman CW, Sargent IL, Poston L (1997). Human placental syncytiotrophoblast microvillous membranes impair maternal vascular endothelial function. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **104**, 235–240.
- Cohen J, Vaiman D, Sibai BM, Haddad B (2015). Blood pressure changes during the first stage of labor and for the prediction of early postpartum preeclampsia: a prospective study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **184**, 103–107.
- Collange O, Launoy A, Kopf-Pottecher A, Dietemann J-L, Pottecher T, Collège national des gynécologues et obstétriciens, *et al.* (2010). [Eclampsia]. *Ann. Fr. Anesthésie Rèanimation*, **29**, e75-82.
- Colucci F, Moffett A, Trowsdale J (2014). Medawar and the immunological paradox of pregnancy: 60 years on. *Eur. J. Immunol.*, **44**, 1883–1885.
- Conde-Agudelo A, Romero R, Roberts JM (2015). Tests to Predict Preeclampsia, *in: Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*, Elsevier, pp. 221–251.
- Constância M, Kelsey G, Reik W (2004). Resourceful imprinting. *Nature*, **432**, 53–57.
- Davisson RL, Hoffmann DS, Butz GM, Aldape G, Schlager G, Merrill DC, *et al.* (2002). Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension*, **39**, 337–342.
- de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, *et al.* (1998). Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22528–22536.
- Dedon PC, Tannenbaum SR (2004). Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **423**, 12–22.

- Dekker G, Sibai B (2001). Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia. *Lancet Lond. Engl.*, **357**, 209–215.
- Desai C, Garriga G, McIntire SL, Horvitz HR (1988). A genetic pathway for the development of the *Caenorhabditis elegans* HSN motor neurons. *Nature*, **336**, 638–646.
- Diemunsch P, Langer B, Noll E (2010). Principes généraux de la prise en charge hospitalière de la prééclampsie. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation*, **29**, e51–e58.
- Ding D, Scott NM, Thompson EE, Chaiworapongsa T, Torres R, Billstrand C, *et al.* (2012). Increased protein-coding mutations in the mitochondrial genome of African American women with preeclampsia. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif*, **19**, 1343–1351.
- Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K (1996). The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **175**, 902–905.
- Doridot L, Châtre L, Ducat A, Vilotte J-L, Lombès A, Méhats C, *et al.* (2014). Nitroso-Redox Balance and Mitochondrial Homeostasis Are Regulated by STOX1, a Pre-Eclampsia-Associated Gene. *Antioxid. Redox Signal.*,.
- Doridot L, Méhats C, Vaiman D (2012). [Comparative analysis of mice models for preeclampsia]. *Ann. Cardiol. Angéiologie*, **61**, 234–238.
- Doridot L, Passet B, Méhats C, Rigourd V, Barbaux S, Ducat A, *et al.* (2013). Preeclampsia-Like Symptoms Induced in Mice by Fetoplacental Expression of STOX1 Are Reversed by Aspirin Treatment. *Hypertension*, **61**, 662–668.
- Dubar G, Rackelboom T, Tsatsaris V, Mignon A (2012). Prééclampsie. Eclampsie. *EMC - Anest.-Rianim.*, **17**, 1–17.
- Ducat A, Doridot L, Calicchio R, Méhats C, Vilotte J-L, Castille J, *et al.* (2016). Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Sci. Rep.*, **6**, 19196.
- Duckitt K, Harrington D (2005). Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*, **330**, 565.
- Ducloy-Bouthors A-S (2010). [Clotting disorders and preeclampsia]. *Ann. Fr. Anesthésie Réanimation*, **29**, e121-134.
- Duley L, Gülmezoglu AM, Henderson-Smart DJ, Chou D (2010a). Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD000025.
- Duley L, Henderson-Smart DJ, Walker GJ, Chou D (2010b). Magnesium sulphate versus diazepam for eclampsia. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD000127.
- Enquobahrie DA, Meller M, Rice K, Psaty BM, Siscovick DS, Williams MA (2008). Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **199**, 566.e1-11.
- Erlandsson L, Nääv Å, Hennessy A, Vaiman D, Gram M, Åkerström B, *et al.* (2016). Inventory of Novel Animal Models Addressing Etiology of Preeclampsia in the Development of New Therapeutic/Intervention Opportunities. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989*, **75**, 402–410.
- Erlebacher A (2013). Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat. Rev. Immunol.*, **13**, 23–33.
- Espinoza J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, *et al.* (2006). Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J. Perinat. Med.*, **34**, 447–458.
- Evain-Brion D, Malassiné A (2010). Le placenta humain. Tec & Doc Lavoisier, Cachan; Paris.
- Falcao S, Stoyanova E, Cloutier G, Maurice RL, Gutkowska J, Lavoie JL (2009). Mice overexpressing both human angiotensinogen and human renin as a model of superimposed preeclampsia on chronic hypertension. *Hypertension*, **54**, 1401–1407.

- Feng G, Yi P, Yang Y, Chai Y, Tian D, Zhu Z, *et al.* (2013). Developmental stage-dependent transcriptional regulatory pathways control neuroblast lineage progression. *Dev. Camb. Engl.*, **140**, 3838–3847.
- Fenstad MH, Johnson MP, Løset M, Mundal SB, Roten LT, Eide IP, *et al.* (2010). 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.
- Floyd RA, Towner RA, He T, Hensley K, Maples KR (2011). Translational research involving oxidative stress and diseases of aging. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, 931–941.
- Forman HJ, Maorino M, Ursini F (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc.)*, **49**, 835–842.
- Founds SA, Conley YP, Lyons-Weiler JF, Jeyabalan A, Hogge WA, Conrad KP (2009). Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. *Placenta*, **30**, 15–24.
- Founds SA, Conley YP, Lyons-Weiler JF, Jeyabalan A, Hogge WA, Conrad KP (2009). Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. *Placenta*, **30**, 15–24.
- Frank CA, Hawkins NC, Guenther C, Horvitz HR, Garriga G (2005). *C. elegans* HAM-1 positions the cleavage plane and regulates apoptosis in asymmetric neuroblast divisions. *Dev. Biol.*, **284**, 301–310.
- Frein D, Schildknecht S, Bachschmid M, Ullrich V (2005). Redox regulation: a new challenge for pharmacology. *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 811–823.
- Frishman WH, Veresh M, Schlocker SJ, Tejani N (2006). Pathophysiology and medical management of systemic hypertension in preeclampsia. *Curr. Hypertens. Rep.*, **8**, 502–511.
- Fuchs R, Ellinger I (2004). Endocytic and transcytotic processes in villous syncytiotrophoblast: role in nutrient transport to the human fetus. *Traffic Cph. Den.*, **5**, 725–738.
- Furukawa S, Kuroda Y, Sugiyama A (2014). A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J. Toxicol. Pathol.*, **27**, 11–18.
- Gajiwala KS, Burley SK (2000). Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 110–116.
- Gaugler-Senden IPM, Huijssoon AG, Visser W, Steegers EAP, de Groot CJM (2006). Maternal and perinatal outcome of preeclampsia with an onset before 24 weeks' gestation. Audit in a tertiary referral center. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **128**, 216–221.
- Georg Schmorl (1893). Pathologisch-anatomische Untersuchungen über Puerperal-Eklampsie [Pathological and anatomical examinations of puerperal-eclampsia]. Vogel, Leipzig.
- Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*, **23**, 3–19.
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, **119**, 623–626.
- Ghanem FA, Movahed A (2008). Use of antihypertensive drugs during pregnancy and lactation. *Cardiovasc. Ther.*, **26**, 38–49.
- Giguère Y, Charland M, Bujold E, Bernard N, Grenier S, Rousseau F, *et al.* (2010). Combining biochemical and ultrasonographic markers in predicting preeclampsia: a systematic review. *Clin. Chem.*, **56**, 361–375.

- Gilbert JS, Gilbert SAB, Arany M, Granger JP (2009). Hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats is associated with increased soluble endoglin expression. *Hypertension*, **53**, 399–403.
- Gille JH, Moore DG, Sedgwick CJ (1977). Placental infarction: a sign of pre-eclampsia in a patas monkey (*Erythrocebus patas*). *Lab. Anim. Sci.*, **27**, 119–121.
- Girouard H, Park L, Anrather J, Zhou P, Iadecola C (2007). Cerebrovascular nitrosative stress mediates neurovascular and endothelial dysfunction induced by angiotensin II. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**, 303–309.
- Golfier F (2011). Orphanet: Môle hydatiforme *In*: [en ligne]. [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=99927] (Consultation le 18/3/16).
- Graves DB (2012). The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *J. Phys. Appl. Phys.*, **45**, 263001.
- Gutteridge JM, Halliwell B (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **899**, 136–147.
- Haddad B, Masson C, Deis S, Touboul C, Kayem G, Collège national des gynécologues et obstétriciens, *et al.* (2010). [Criteria of pregnancy termination in women with preeclampsia]. *Ann. Fr. Anesthésie Rèanimation*, **29**, e59-68.
- Halliwell B (2015). Free Radicals and Other Reactive Species in Disease, *in: John Wiley & Sons Ltd (Ed.), eLS.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–9.
- Halliwell B, Gutteridge J (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. OUP Oxford, Oxford ; New York.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, **92**, 3007–3017.
- Hansson SR, Nääv Å, Erlandsson L (2014). Oxidative stress in preeclampsia and the role of free fetal hemoglobin. *Front. Physiol.*, **5**, 516.
- Hare JM, Stamler JS (2005). NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J. Clin. Invest.*, **115**, 509–517.
- Harrison GA, Humphrey KE, Jones N, Badenhop R, Guo G, Elakis G, *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.
- Harskamp RE, Zeeman GG (2007). Preeclampsia: at risk for remote cardiovascular disease. *Am. J. Med. Sci.*, **334**, 291–295.
- Hartell NA, Archer HE, Bailey CJ (2005). Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B. *Biochem. Pharmacol.*, **69**, 781–790.
- Hartmann C, Landgraf M, Bate M, Jäckle H (1997). Krüppel target gene knockout participates in the proper innervation of a specific set of *Drosophila* larval muscles. *EMBO J.*, **16**, 5299–5309.
- Hegde ML, Hegde PM, Rao KS, Mitra S (2011). Oxidative genome damage and its repair in neurodegenerative diseases: function of transition metals as a double-edged sword. *J. Alzheimers Dis. JAD*, **24 Suppl 2**, 183–198.
- Herse F, LaMarca B (2013). Angiotensin II type 1 receptor autoantibody (AT1-AA)-mediated pregnancy hypertension. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989*, **69**, 413–418.

- Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CWG, Carrington M, Trowsdale J, *et al.* (2004). Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med.*, **200**, 957–965.
- Hofmeyr GJ, Lawrie TA, Atallah AN, Duley L (2010). Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD001059.
- Hogg K, Blair JD, McFadden DE, von Dadelszen P, Robinson WP (2013). Early onset preeclampsia is associated with altered DNA methylation of cortisol-signalling and steroidogenic genes in the placenta. *PLoS One*, **8**, e62969.
- Holmström KM, Finkel T (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 411–421.
- Hu R, Jin H, Zhou S, Yang P, Li X (2007). Proteomic analysis of hypoxia-induced responses in the syncytialization of human placental cell line BeWo. *Placenta*, **28**, 399–407.
- Huang X, Le Q-T, Giaccia AJ (2010). MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway. *Trends Mol. Med.*, **16**, 230–237.
- Hubel CA (1999). Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.*, **222**, 222–235.
- Hung T-H, Skepper JN, Charnock-Jones DS, Burton GJ (2002). Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ. Res.*, **90**, 1274–1281.
- Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C (2005). HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **19**, 681–693.
- Iglesias-Platas I, Monk D, Jebbink J, Buimer M, Boer K, van der Post J, *et al.* (2007). STOX1 is not imprinted and is not likely to be involved in preeclampsia. *Nat. Genet.*, **39**, 279-280-281.
- Jahoor F, Badaloo A, Reid M, Forrester T (2008). Protein metabolism in severe childhood malnutrition. *Ann. Trop. Paediatr.*, **28**, 87–101.
- James J (2014). Overview of Human Implantation, *in: Pathobiology of Human Disease.*, Elsevier, pp. 2293–2307.
- Jarzemowski JA (2014). Normal Structure and Function of the Placenta, *in: Pathobiology of Human Disease.*, Elsevier, pp. 2308–2321.
- Jenkins SM, Head BB, Hauth JC (2002). Severe preeclampsia at <25 weeks of gestation: maternal and neonatal outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **186**, 790–795.
- Jeyabalan A, Conrad KP (2007). Renal function during normal pregnancy and preeclampsia. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, **12**, 2425–2437.
- Johnson F, Giulivi C (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol. Aspects Med.*, **26**, 340–352.
- Johnson RD, Polakoski K, Everson WV, Nelson DM (1997). Aspirin induces increased expression of both prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 in cultured human placental trophoblast. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **177**, 78–85.
- Kahn CM (2010). The Merck Veterinary Manual, 10th ed. Wiley.
- Kamei T, Jones SR, Chapman BM, MCGonigle KL, Dai G, Soares MJ (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway modulates the endocrine differentiation of trophoblast cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.*, **16**, 1469–1481.

- Kanayama N, Takahashi K, Matsuura T, Sugimura M, Kobayashi T, Moniwa N, *et al.* (2002). Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol. Hum. Reprod.*, **8**, 1129–1135.
- Karp G (2009). *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. John Wiley & Sons.
- Karumanchi SA, Epstein FH (2007). Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: cause or consequence of preeclampsia?. *Kidney Int.*, **71**, 959–961.
- Karumanchi SA, Maynard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP (2005). Preeclampsia: a renal perspective. *Kidney Int.*, **67**, 2101–2113.
- Kaufmann P (1981). Entwicklung der Plazenta, *in: Die Plazenta des Menschen.*, Thieme Georg Verlag, Stuttgart.
- Kaufmann P (1992). Oto Grosser's monographs. *Placenta*, **13**, 191–193.
- Kee Y, Hwang BJ, Sternberg PW, Bronner-Fraser M (2007). Evolutionary conservation of cell migration genes: from nematode neurons to vertebrate neural crest. *Genes Dev.*, **21**, 391–396.
- Kenny LC, McCrae KR, Cunningham FG (2015). Platelets, Coagulation, and the Liver, *in: Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy.*, Elsevier, pp. 379–396.
- Khalil RA, Granger JP (2002). Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **283**, R29-45.
- Kim SY, Park SY, Lim JH, Yang JH, Kim MY, Park HY, *et al.* (2009). The Y153H Variant of the STOX1 Gene in Korean Patients with Preeclampsia. *J. Genet. Med.*, **6**, 56–61.
- Kivinen K, Peterson H, Hiltunen L, Laivuori H, Heino S, Tiala I, *et al.* (2007). Evaluation of STOX1 as a preeclampsia candidate gene in a population-wide sample. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, **15**, 494–497.
- Klandorf H, Van K (2012). Oxidative and Nitrosative Stresses: Their Role in Health and Disease in Man and Birds, *in: Lushchak, V. (Ed.), Oxidative Stress - Molecular Mechanisms and Biological Effects.*, InTech.
- Knepler JL, Taher LN, Gupta MP, Patterson C, Pavalko F, Ober MD, *et al.* (2001). Peroxynitrite causes endothelial cell monolayer barrier dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **281**, C1064-1075.
- Knight M, UKOSS (2007). Eclampsia in the United Kingdom 2005. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.*, **114**, 1072–1078.
- Kossenjans W, Eis A, Sahay R, Brockman D, Myatt L (2000). Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **278**, H1311-1319.
- Kudo Y, Boyd CAR, Kimura H, Cook PR, Redman CWG, Sargent IL (2003). Quantifying the syncytialisation of human placental trophoblast BeWo cells grown in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **1640**, 25–31.
- Lachmeijer AMA, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrímsson R (2002). Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **105**, 94–113.
- Lachmeijer AM, Arngrímsson R, Bastiaans EJ, Frigge ML, Pals G, Sigurdardóttir S, *et al.* (2001). A genome-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, **9**, 758–764.
- Laivuori H (2007). Genetic aspects of preeclampsia. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, **12**, 2372–2382.
- Lam C, Lim K-H, Karumanchi SA (2005). Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*, **46**, 1077–1085.

- Lambeth JD, Neish AS (2014). Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu. Rev. Pathol.*, **9**, 119–145.
- Lapaire O, Holzgreve W, Oosterwijk JC, Brinkhaus R, Bianchi DW (2007). Georg Schmorl on trophoblasts in the maternal circulation. *Placenta*, **28**, 1–5.
- Lau SY, Barrett CJ, Guild S-J, Chamley LW (2013). Necrotic trophoblast debris increases blood pressure during pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, **97**, 175–182.
- Le Bouteiller P, Blaschitz A (1999). The functionality of HLA-G is emerging. *Immunol. Rev.*, **167**, 233–244.
- Le Bouteiller P, Tabiasco J (2006). Killers become builders during pregnancy. *Nat. Med.*, **12**, 991–992.
- Leno-Durán E, Hatta K, Bianco J, Yamada AT, Ruiz-Ruiz C, Olivares EG, *et al.* (2010). Fetal-placental hypoxia does not result from failure of spiral arterial modification in mice. *Placenta*, **31**, 731–737.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim K-H, England LJ, Yu KF, *et al.* (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.*, **350**, 672–683.
- Li C, Raikwar NS, Santillan MK, Santillan DA, Thomas CP (2015). Aspirin inhibits expression of sFLT1 from human cytotrophoblasts induced by hypoxia, via cyclo-oxygenase 1. *Placenta*, **36**, 446–453.
- Li F, Hagaman JR, Kim H-S, Maeda N, Jennette JC, Faber JE, *et al.* (2012). eNOS deficiency acts through endothelin to aggravate sFlt-1-induced pre-eclampsia-like phenotype. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, **23**, 652–660.
- Li J, Liu W, Ding S, Xu W, Guan Y, Zhang JH, *et al.* (2008). Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats. *Brain Res.*, **1210**, 223–229.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, **473**, 317–325.
- Lim HJ, Wang H (2010). Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J. Clin. Invest.*, **120**, 1004–1015.
- Lindheimer MD, Taylor RN, Roberts JM, Cunningham FG, Chesley L (2015). Introduction, History, Controversies, and Definitions, *in: Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*, Elsevier, pp. 1–24.
- Liu VWT, Huang PL (2008). Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc. Res.*, **77**, 19–29.
- Lodish H (2008). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
- Ma XL, Gao F, Nelson AH, Lopez BL, Christopher TA, Yue TL, *et al.* (2001). Oxidative inactivation of nitric oxide and endothelial dysfunction in stroke-prone spontaneous hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 879–885.
- Madeja Z, Yadi H, Apps R, Boulouvar S, Roper SJ, Gardner L, *et al.* (2011). Paternal MHC expression on mouse trophoblast affects uterine vascularization and fetal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 4012–4017.
- Magee LA, Yong PJ, Espinosa V, Côté AM, Chen I, von Dadelszen P (2009). Expectant management of severe preeclampsia remote from term: a structured systematic review. *Hypertens. Pregnancy*, **28**, 312–347.

- Maharaj ASR, Walshe TE, Saint-Geniez M, Venkatesha S, Maldonado AE, Himes NC, *et al.* (2008). VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *J. Exp. Med.*, **205**, 491–501.
- Mailloux RJ, Harper M-E (2012). Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends Endocrinol. Metab. TEM*, **23**, 451–458.
- Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ (2010). The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J. Clin. Invest.*, **120**, 1016–1025.
- Martínez MC, Andriantsitohaina R (2009). Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid. Redox Signal.*, **11**, 669–702.
- Martínez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R (2005). Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288**, H1004-1009.
- Matzuk MM, Dionne L, Guo Q, Kumar TR, Lebovitz RM (1998). Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice. *Endocrinology*, **139**, 4008–4011.
- Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim K-H, Li J, Mondal S, *et al.* (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.*, **111**, 649–658.
- McCarthy FP, Kingdom JC, Kenny LC, Walsh SK (2011). Animal models of preeclampsia; uses and limitations. *Placenta*, **32**, 413–419.
- McDonald SD, Best C, Lam K (2009). The recurrence risk of severe de novo pre-eclampsia in singleton pregnancies: a population-based cohort. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.*, **116**, 1578–1584.
- McDonald SD, Han Z, Walsh MW, Gerstein HC, Devereaux PJ (2010). Kidney disease after preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.*, **55**, 1026–1039.
- McDonald SD, Malinowski A, Zhou Q, Yusuf S, Devereaux PJ (2008). Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analyses. *Am. Heart J.*, **156**, 918–930.
- McNaught AD, Wilkinson A (1997). Compendium of Chemical Terminology: IUPAC Recommendations, 2nd ed. (the “Gold Book”). ed, *IUPAC Chemical Data Series*,. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Medawar PB (1953). Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **7**, 320–338.
- Meziani F, Tesse A, David E, Martinez MC, Wangesteen R, Schneider F, *et al.* (2006). Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility. *Am. J. Pathol.*, **169**, 1473–1483.
- Millar TM, Stevens CR, Benjamin N, Eisenthal R, Harrison R, Blake DR (1998). Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.*, **427**, 225–228.
- Miller RK, Genbacev O, Turner MA, Aplin JD, Caniggia I, Huppertz B (2005). Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta*, **26**, 439–448.
- Moffett-King A (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 656–663.
- Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratnam S, Magee LA, de Groot CJM, Hofmeyr GJ (2016). Preeclampsia. *Lancet Lond. Engl.*, **387**, 999–1011.

- Moses EK, Fitzpatrick E, Freed KA, Dyer TD, Forrest S, Elliott K, *et al.* (2006). Objective prioritization of positional candidate genes at a quantitative trait locus for pre-eclampsia on 2q22. *Mol. Hum. Reprod.*, **12**, 505–512.
- Mossman HW (1937). Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures, *in: Contributions to Embryology Carnegie Institution N° 158.*, pp. 133–248.
- Mossman HW (1987). Vertebrate Fetal Membranes: Comparative Ontogeny and Morphology; Evolution; Phylogenetic Significance; Basic Functions; Research Opportunities. Rutgers University Press, New Brunswick, N.J.
- Mozumdar A, Liguori G (2011). Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U.S. adults: NHANES III to NHANES 1999-2006. *Diabetes Care*, **34**, 216–219.
- Murad F (2006). Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N. Engl. J. Med.*, **355**, 2003–2011.
- Murphy MP, Holmgren A, Larsson N-G, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, *et al.* (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.*, **13**, 361–366.
- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryder OA, O'Brien SJ (2001). Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature*, **409**, 614–618.
- Murray SA, Morgan JL, Kane C, Sharma Y, Heffner CS, Lake J, *et al.* (2010). Mouse gestation length is genetically determined. *PLoS One*, **5**, e12418.
- Mütze S, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Rath W (2008). Genes and the preeclampsia syndrome. *J. Perinat. Med.*, **36**, 38–58.
- Myatt L (2010). Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*, **31 Suppl**, S66-69.
- Myatt L, Rosenfield RB, Eis AL, Brockman DE, Greer I, Lyall F (1996). Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension*, **28**, 488–493.
- Nadeem L, Munir S, Fu G, Dunk C, Baczyk D, Caniggia I, *et al.* (2011). Nodal signals through activin receptor-like kinase 7 to inhibit trophoblast migration and invasion: implication in the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Pathol.*, **178**, 1177–1189.
- Nicolis S, Pennati A, Perani E, Monzani E, Sanangelantoni AM, Casella L (2006). Easy oxidation and nitration of human myoglobin by nitrite and hydrogen peroxide. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, **12**, 749–757.
- Nie X, Zhang K, Wang L, Ou G, Zhu H, Gao W-Q (2015). Transcription factor STOX1 regulates proliferation of inner ear epithelial cells via the AKT pathway. *Cell Prolif.*,.
- Novo E, Parola M (2008). Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, **1**, 5.
- Nowotny K, Jung T, Grune T, Höhn A (2014). Accumulation of modified proteins and aggregate formation in aging. *Exp. Gerontol.*, **57**, 122–131.
- O'Brien M, McCarthy T, Jenkins D, Paul P, Dausset J, Carosella ED, *et al.* (2001). Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, **58**, 1943–1949.
- Ogden CL, Carroll MD (2010). Prevalence of overweight, obesity, and extreme obesity among adults: United States, trends 1960–1962 through 2007–2008. *Natl. Cent. Health Stat.*, **6**, 1–6.
- Ogino K, Wang D-H (2007). Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med. Okayama*, **61**, 181–189.

- Olsson MG, Centlow M, Rutardóttir S, Stenfors I, Larsson J, Hosseini-Maaf B, *et al.* (2010). Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger $\alpha 1$ -microglobulin in preeclampsia. *Free Radic. Biol. Med.*, **48**, 284–291.
- Orendi K, Gauster M, Moser G, Meiri H, Huppertz B (2010). Effects of vitamins C and E, acetylsalicylic acid and heparin on fusion, beta-hCG and PP13 expression in BeWo cells. *Placenta*, **31**, 431–438.
- Orendi K, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Gonen R, Meiri H, *et al.* (2011). Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta*, **32 Suppl**, S49-54.
- Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B (2011). Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.*, **119**, 3–19.
- Oudejans CBM, Mulders J, Lachmeijer AMA, van Dijk M, Könst AAM, Westerman BA, *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.
- Oudejans CBM, van Dijk M (2008). Placental gene expression and pre-eclampsia. *Placenta*, **29 Suppl A**, S78-82.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, **87**, 315–424.
- Palmer AE, London WT, Sly DL, Rice JM (1979). Spontaneous preeclamptic toxemia of pregnancy in the patas monkey (*Erythrocebus patas*). *Lab. Anim. Sci.*, **29**, 102–106.
- Paravicini TM, Touyz RM (2006). Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc. Res.*, **71**, 247–258.
- Park F, Russo K, Williams P, Pelosi M, Puddephatt R, Walter M, *et al.* (2015). Prediction and prevention of early-onset pre-eclampsia: impact of aspirin after first-trimester screening. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.*, **46**, 419–423.
- Pickles CJ, Symonds EM, Broughton Pipkin F (1989). The fetal outcome in a randomized double-blind controlled trial of labetalol versus placebo in pregnancy-induced hypertension. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **96**, 38–43.
- Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M (2006). The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta*, **27**, 939–958.
- Pinzar E, Wang T, Garrido MR, Xu W, Levy P, Bottari SP (2005). Angiotensin II induces tyrosine nitration and activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **579**, 5100–5104.
- Polin RA, Fox WW, Abman SH (Eds.) (2004). Fetal and neonatal physiology, 3rd ed. ed. W.B. Saunders Co, Philadelphia, Pa.
- Poon LCY, Kametas NA, Valencia C, Chelemen T, Nicolaides KH (2011). Hypertensive disorders in pregnancy: screening by systolic diastolic and mean arterial pressure at 11-13 weeks. *Hypertens. Pregnancy Off. J. Int. Soc. Study Hypertens. Pregnancy*, **30**, 93–107.
- Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA (2011). Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*, **123**, 2856–2869.
- Powers RW, Roberts JM, Plymire DA, Pucci D, Datwyler SA, Laird DM, *et al.* (2012). Low placental growth factor across pregnancy identifies a subset of women with preterm preeclampsia: type 1 versus type 2 preeclampsia?. *Hypertension*, **60**, 239–246.
- Radi R (2013). Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc. Chem. Res.*, **46**, 550–559.

- Rafikova O, Rafikov R, Nudler E (2002). Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 5913–5918.
- R. Hughes T (Ed.) (2011). A Handbook of Transcription Factors, *Springer*,. Timothy R. Hughes, Dordrecht Heidelberg London New-York.
- Rai A, Cross JC (2014). Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Dev. Biol.*, **387**, 131–141.
- Ramsey EM, Harris JWS (1966). Comparison of uteroplacental vasculature and circulation in the rhesus monkey and man. [Carnegie Institution of Washington], [Washington].
- Rana S, Karumanchi SA, Lindheimer MD (2014). Angiogenic factors in diagnosis, management, and research in preeclampsia. *Hypertension*, **63**, 198–202.
- Rayman MP (2012). Selenium and human health. *Lancet Lond. Engl.*, **379**, 1256–1268.
- Redman CWG (2011). Preeclampsia: a multi-stress disorder. *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl. Française Médecine Interne*, **32 Suppl 1**, S41-44.
- Redman CWG, Sargent IL (2010). Immunology of pre-eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989*, **63**, 534–543.
- Redman CWG, Sargent IL, Taylor RN (2015). Immunology of Normal Pregnancy and Preeclampsia, in: *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*,. Elsevier, pp. 161–179.
- Reiner AP, Gross MD, Carlson CS, Bielinski SJ, Lange LA, Fornage M, *et al.* (2009). Common coding variants of the HNF1A gene are associated with multiple cardiovascular risk phenotypes in community-based samples of younger and older European-American adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study and The Cardiovascular Health Study. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **2**, 244–254.
- Rhee SG (2006). Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*, **312**, 1882–1883.
- Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R (1992). Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*, **20**, 298–303.
- Rice-Evans CA, Diplock AT (1993). Current status of antioxidant therapy. *Free Radic. Biol. Med.*, **15**, 77–96.
- Rigourd V, Chauvet C, Chelbi ST, Rebourcet R, Mondon F, Letourneur F, *et al.* (2008). STOX1 overexpression in choriocarcinoma cells mimics transcriptional alterations observed in preeclamptic placentas. *PLoS One*, **3**, e3905.
- Riley PA (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**, 27–33.
- Robbins JR, Skrzypczynska KM, Zeldovich VB, Kapidzic M, Bakardjiev AI (2010). Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.*, **6**, e1000732.
- Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK (1989). Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **161**, 1200–1204.
- Rossant J, Cross JC (2001). Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 538–548.
- Safdar H, Cheung KL, Vos HL, Gonzalez FJ, Reitsma PH, Inoue Y, *et al.* (2012). Modulation of mouse coagulation gene transcription following acute in vivo delivery of synthetic small interfering RNAs targeting HNF4 α and C/EBP α . *PLoS One*, **7**, e38104.
- Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S (2014). La reproduction animale et humaine. Editions Quae.

- Sánchez-Aranguren LC, Prada CE, Riaño-Medina CE, Lopez M (2014). Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front. Physiol.*, **5**, 372.
- Sattar N, Greer IA (2002). Pregnancy complications and maternal cardiovascular risk: opportunities for intervention and screening?. *BMJ*, **325**, 157–160.
- Sawa T, Ohshima H (2006). Nitrate DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.*, **14**, 91–100.
- Schwartz RB, Feske SK, Polak JF, DeGirolami U, Iaia A, Beckner KM, *et al.* (2000). Preeclampsia-eclampsia: clinical and neuroradiographic correlates and insights into the pathogenesis of hypertensive encephalopathy. *Radiology*, **217**, 371–376.
- Seth MK, Hussain ME, Pasha S, Fahim M (2016). Effects of a novel ACE inhibitor, 3-(3-thienyl)-l-alanyl-ornithyl-proline, on endothelial vasodilation and hepatotoxicity in l-NAME-induced hypertensive rats. *Drug Des. Devel. Ther.*, **10**, 1533–1542.
- Sharma L, Kaur J, Shukla G (2012). Role of oxidative stress and apoptosis in the placental pathology of Plasmodium berghei infected mice. *PloS One*, **7**, e32694.
- Sibai BM (1990). The HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets): much ado about nothing?. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **162**, 311–316.
- Sibai BM (2006). Preeclampsia as a cause of preterm and late preterm (near-term) births. *Semin. Perinatol.*, **30**, 16–19.
- Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, **82**, 291–295.
- Simmons DG, Cross JC (2005). Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Dev. Biol.*, **284**, 12–24.
- Singh RP, Agarwal R (2007). Inducible nitric oxide synthase-vascular endothelial growth factor axis: a potential target to inhibit tumor angiogenesis by dietary agents. *Curr. Cancer Drug Targets*, **7**, 475–483.
- Söber S, Reiman M, Kikas T, Rull K, Inno R, Vaas P, *et al.* (2015). Extensive shift in placental transcriptome profile in preeclampsia and placental origin of adverse pregnancy outcomes. *Sci. Rep.*, **5**, 13336.
- Société française d'anesthésie et de réanimation, Collège national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF), Société française de médecine périnatale (SFMP), Société française de néonatalogie (SFNN) (2009). [Multidisciplinary management of severe pre-eclampsia (PE). Experts' guidelines 2008. Société française d'anesthésie et de réanimation. Collège national des gynécologues et obstétriciens français. Société française de médecine périnatale. Société française de néonatalogie]. *Ann. Fr. Anesthésie Réanimation*, **28**, 275–281.
- Souza JM, Choi I, Chen Q, Weisse M, Daikhin E, Yudkoff M, *et al.* (2000). Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**, 360–366.
- Sridhar GR, Nageswara Rao PV, Kaladhar DS, Devi TU, Kumar SV, Sridhar GR, *et al.* (2012). In Silico Docking of HNF-1a Receptor Ligands, In Silico Docking of HNF-1a Receptor Ligands. *Adv. Bioinforma. Adv. Bioinforma.*, **2012**, **2012**, e705435.
- Staines-Urias E, Paez MC, Doyle P, Dudbridge F, Serrano NC, Ioannidis JPA, *et al.* (2012). Genetic association studies in pre-eclampsia: systematic meta-analyses and field synopsis. *Int. J. Epidemiol.*, **41**, 1764–1775.
- Stegers EAP, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R (2010). Pre-eclampsia. *Lancet Lond. Engl.*, **376**, 631–644.

- Subtil D, Goeusse P, Puech F, Lequien P, Biaisque S, Breart G, *et al.* (2003). Aspirin (100 mg) used for prevention of pre-eclampsia in nulliparous women: the Essai Régional Aspirine Mère-Enfant study (Part 1). *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.*, **110**, 475–484.
- Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, *et al.* (2003). Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J. Biol. Chem.*, **278**, 12605–12608.
- Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB, *et al.* (2006). Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol. Dis.*, **22**, 76–87.
- Tarachand U (1986). Decidualisation: origin and role of associated cells. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.*, **57**, 9–16.
- Teles A, Zenclussen AC, Schumacher A (2013). Regulatory T Cells are Baby's Best Friends. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989.*
- Thatcher GRJ (2005). An introduction to NO-related therapeutic agents. *Curr. Top. Med. Chem.*, **5**, 597–601.
- Thulluru HK, Park C, Dufort D, Kleiverda G, Oudejans C, van Dijk M (2013). Maternal Nodal inversely affects NODAL and STOX1 expression in the fetal placenta. *Front. Genet.*, **4**, 170.
- Traber MG, Stevens JF (2011). Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, 1000–1013.
- Tyberghein K, Goossens S, Haigh JJ, van Roy F, van Hengel J (2012). Tissue-wide overexpression of alpha-T-catenin results in aberrant trophoblast invasion but does not cause embryonic mortality in mice. *Placenta*, **33**, 554–560.
- Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG (2007). Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood*, **109**, 2285–2292.
- van Abel D, Abdul-Hamid O, Dijk M van, Oudejans CBM (2012a). Transcription factor STOX1A promotes mitotic entry by binding to the CCNB1 promotor. *PloS One*, **7**, e29769.
- van Abel D, Abdulhamid O, Scheper W, van Dijk M, Oudejans CBM (2012b). STOX1A induces phosphorylation of tau proteins at epitopes hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, **528**, 104–109.
- van Abel D, Hölzel DR, Jain S, Lun FMF, Zheng YWL, Chen EZ, *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, Michel O, Veerhuis R, Jacobs M, van Dijk M, Oudejans CBM (2012c). Direct downregulation of CNTNAP2 by STOX1A is associated with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD*, **31**, 793–800.
- Van Den Brenk HA, Jamieson D (1962). Pulmonary damage due to high pressure oxygen breathing in rats. I. Lung weight, histological and radiological studies. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **40**, 37–49.
- van Dijk M, Drewlo S, Oudejans CBM (2010a). Differential methylation of STOX1 in human placenta. *Epigenetics*, **5**, 736–742.
- van Dijk M, Mulders J, Poutsma A, Könst AAM, Lachmeijer AMA, Dekker GA, *et al.* (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, Oudejans CBM (2011). STOX1: Key player in trophoblast dysfunction underlying early onset preeclampsia with growth retardation. *J. Pregnancy*, **2011**, 521826.

- van Dijk M, van Bezu J, Poutsma A, Veerhuis R, Rozemuller AJ, Scheper W, *et al.* (2010b). The pre-eclampsia gene STOX1 controls a conserved pathway in placenta and brain upregulated in late-onset Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD*, **19**, 673–679.
- van Dijk M, van Bezu J, van Abel D, Dunk C, Blankenstein MA, Oudejans CBM, *et al.* (2010c). 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, van Abel D, Dunk C, Blankenstein MA, Oudejans CBM, *et al.* (2010d). 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, van Abel D, Dunk C, Blankenstein MA, Oudejans CBM, *et al.* (2010e). 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.
- Vasdev S, Gill V, Singal P (2007). Role of advanced glycation end products in hypertension and atherosclerosis: therapeutic implications. *Cell Biochem. Biophys.*, **49**, 48–63.
- Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martísek P (2003). The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic. Res.*, **37**, 121–127.
- Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J (2012). Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging*, **4**, 3–12.
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, *et al.* (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.*, **12**, 642–649.
- Vikse BE, Irgens LM, Leivestad T, Skjaerven R, Iversen BM (2008). Preeclampsia and the risk of end-stage renal disease. *N. Engl. J. Med.*, **359**, 800–809.
- Villa PM, Kajantie E, Räikkönen K, Pesonen A-K, Hämäläinen E, Vainio M, *et al.* (2013). Aspirin in the prevention of pre-eclampsia in high-risk women: a randomised placebo-controlled PREDO Trial and a meta-analysis of randomised trials. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.*, **120**, 64–74.
- Villacorta L, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Chen X, Freeman BA, Chen YE, *et al.* (2007). Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, H770-776.
- Vishal-Tandon MD, Gupta BM, Tandon R (2005). Free radicals/reactive oxygen species. *JK Pract.*, **12**, 143–148.
- Vogel P (2005). The current molecular phylogeny of Eutherian mammals challenges previous interpretations of placental evolution. *Placenta*, **26**, 591–596.
- Wacker JR, Wagner BK, Briese V, Schauf B, Heilmann L, Bartz C, *et al.* (2006). Antihypertensive therapy in patients with pre-eclampsia: A prospective randomised multicentre study comparing dihydralazine with urapidil. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **127**, 160–165.
- Wang J, Huo K, Ma L, Tang L, Li D, Huang X, *et al.* (2011). Toward an understanding of the protein interaction network of the human liver. *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 536.
- Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, *et al.* (1993). A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nat. Genet.*, **4**, 59–61.
- Ward K, Taylor RN (2015). Genetic Factors in the Etiology of Preeclampsia/Eclampsia, *in: Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*, Elsevier, pp. 57–80.
- Watson ED, Cross JC (2005). Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiol. Bethesda Md*, **20**, 180–193.

- Webster RP, Brockman D, Myatt L (2006). Nitration of p38 MAPK in the placenta: association of nitration with reduced catalytic activity of p38 MAPK in pre-eclampsia. *Mol. Hum. Reprod.*, **12**, 677–685.
- Weiss HJ (2003). The discovery of the antiplatelet effect of aspirin: a personal reminiscence. *J. Thromb. Haemost. JTH*, **1**, 1869–1875.
- Winer N, Branger B, Collège national des gynécologues et obstétriciens, Société française de médecine périnatale, Société française de néonatalogie, Société française de anesthésie et de réanimation (2010). [Management of preeclampsia in a perinatal network]. *Ann. Fr. Anesthésie Réanimation*, **29**, e47-50.
- Winn VD, Gormley M, Paquet AC, Kjaer-Sorensen K, Kramer A, Rumer KK, *et al.* (2009). Severe preeclampsia-related changes in gene expression at the maternal-fetal interface include sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-6 and pappalysin-2. *Endocrinology*, **150**, 452–462.
- Wooding FBP, Flint APF (1994). Placentation, *in: Lamming, G.E. (Ed.), Marshall's Physiology of Reproduction.*, Springer Netherlands, pp. 233–460.
- Wooding P, Burton G (2008). Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution. Springer Science & Business Media.
- World Health Organization (1988). Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **158**, 80–83.
- Xia Y, Roman LJ, Masters BS, Zweier JL (1998). Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J. Biol. Chem.*, **273**, 22635–22639.
- Yermilov V, Rubio J, Ohshima H (1995). Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxy-nitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett.*, **376**, 207–210.
- Zenclussen AC, Fest S, Joachim R, Klapp BF, Arck PC (2004). Introducing a mouse model for pre-eclampsia: adoptive transfer of activated Th1 cells leads to pre-eclampsia-like symptoms exclusively in pregnant mice. *Eur. J. Immunol.*, **34**, 377–387.
- Zhang J, Zeisler J, Hatch MC, Berkowitz G (1997). Epidemiology of pregnancy-induced hypertension. *Epidemiol. Rev.*, **19**, 218–232.
- Zhao G, Meng T, Chen H (2013). STOX1 Expression and Its Significance in Human Placentas from Preeclamptic Pregnancies. *J. China Med. Univ.*, **42**, 481–484.
- Zhao L, Bracken MB, DeWan AT (2013). Genome-wide association study of pre-eclampsia detects novel maternal single nucleotide polymorphisms and copy-number variants in subsets of the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study cohort. *Ann. Hum. Genet.*, **77**, 277–287.
- Zhao X, Gan L, Pan H, Kan D, Majeski M, Adam SA, *et al.* (2004). Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochem. J.*, **378**, 839–849.
- Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, *et al.* (2008). Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat. Med.*, **14**, 855–862.
- Zhou Y, Gormley MJ, Hunkapiller NM, Kapidzic M, Stolyarov Y, Feng V, *et al.* (2013). Reversal of gene dysregulation in cultured cytotrophoblasts reveals possible causes of preeclampsia. *J. Clin. Invest.*, **123**, 2862–2872.
- Zusterzeel PL, Peters WH, Visser W, Hermsen KJ, Roelofs HM, Steegers EA (2001). A polymorphism in the gene for microsomal epoxide hydrolase is associated with pre-eclampsia. *J. Med. Genet.*, **38**, 234–237.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
RÉSUMÉ	5
SOMMAIRE	7
PREMIÈRE PARTIE : ÉTAT DES CONNAISSANCES	9
CHAPITRE I. LA PLACENTATION HUMAINE ET MURINE	11
1. GÉNÉRALITÉS	11
1.1. Définition.....	11
1.2. Classification des placentas.....	13
1.2.1. Classification morphologique	13
1.2.2. Classification organisationnelle.....	13
1.2.3. Classification des structures histologiques interhémales	14
1.3. Phylogénie.....	16
1.4. Fonctions	18
2. LA PLACENTATION HUMAINE.....	19
2.1. Description du placenta humain à terme	19
2.1.1. Présentation anatomique.....	19
2.1.2. Circulation fœto-placentaire	19
2.2. Mécanismes de la placentation humaine	21
2.2.1. Implantation et développement des villosités choriales.....	21
2.2.2. Le remodelage des artères spiralées utérines	21
2.2.3. Différenciations et spécialisations cellulaires au cours de la placentation.....	24
2.2.4. Oxygène et placentation	25
2.2.5. Immunité et placentation.....	27
3. LA PLACENTATION MURINE	28
3.1. Description du placenta murin à terme.....	28
3.1.1. Présentation anatomique.....	28
3.1.2. Circulation fœto-placentaire	28
3.2. Mécanismes de la placentation murine	30
3.2.1. Implantation et développement du labyrinthe	30
3.2.2. Le remodelage des artères spiralées utérines	30
3.2.3. Différenciations et spécialisations cellulaires au cours de la placentation.....	33
3.2.4. Immunité et placentation.....	33
4. CONCLUSION DE CE PREMIER CHAPITRE : LE PLACENTA, UN ORGANE PLURIFONCTIONNEL ENCORE MÉCONNU	35
CHAPITRE II. LA PRÉÉCLAMPSIE.....	37
1. DÉFINITIONS.....	37
2. HISTORIQUE	37
3. ÉPIDÉMIOLOGIE.....	38

3.1. Incidence de la prééclampsie.....	38
3.1. Incidence de l'éclampsie	40
4. ÉTIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUES	40
4.1. Facteurs de risques de la prééclampsie.....	40
4.2. Génétique de la prééclampsie.....	40
4.3. Facteurs de risque de l'éclampsie.....	41
5. SYMPTÔMES, COMPLICATIONS ET LÉSIONS	43
5.1. Symptômes maternels.....	43
5.2. Complications fœtales	43
5.3. Le syndrome HELLP.....	43
5.4. Complications et lésions rénales	44
5.5. Complications et lésions cardiorespiratoires	44
5.6. L'éclampsie	45
5.7. Autres complications.....	45
6. DIAGNOSTIC ET DÉPISTAGE	47
6.1. Diagnostic usuel	47
6.2. Dépistage de la prééclampsie	47
7. PRISE EN CHARGE ET TRAITEMENTS.....	49
7.1. Prise en charge générale	49
7.2. Traitements antihypertenseurs.....	49
7.3. Prise en charge de l'éclampsie	50
7.4. Traitements curatifs.....	51
7.5. Prise en charge du post-partum	53
7.6. Bilan après une prééclampsie	54
8. PRONOSTIC À MOYEN ET LONG TERME.....	54
8.1. Risque de récurrence de la prééclampsie	54
8.2. Pronostic cardiovasculaire et rénal à long terme.....	54
9. PRÉVENTION.....	56
10. PHYSIOPATHOLOGIE	57
10.1. Défaut de placentation.....	57
10.2. Ischémie-reperfusion placentaire et dysfonction endothéliale maternelle	59
10.3. Autres concepts	60
11. LES OUTILS D'ÉTUDES DE LA PRÉÉCLAMPSIE	63
11.1. Lignées cellulaires.....	63
11.1.1. Lignées cellulaires trophoblastiques.....	63
11.1.2. Lignées de cellules endothéliales	64
11.2. Modèles animaux	64
12. CONCLUSION DE CE DEUXIÈME CHAPITRE : LA PRÉÉCLAMPSIE, UN SYNDROME DE LA GROSSESSE ENCORE MÉCONNU.....	67
CHAPITRE III. LE STRESS OXYDATIF ET NITROSATIF	69

1. CONCEPTS CHIMIQUES.....	69
1.1. Les radicaux libres.....	69
1.1.1. Définitions.....	69
1.1.2. Génération.....	69
1.1.3. Réactivité chimique.....	70
1.2. Les espèces réactives de l’oxygène et de l’azote.....	70
2. BIOLOGIE DES RONS DANS LE RÈGNE ANIMAL.....	72
2.1. Histoire évolutive : utilisation de l’oxygène par les organismes aérobies et production de RONS.....	72
2.2. Sources de production des ROS <i>in vivo</i>	74
2.2.1. La mitochondrie : source principale des ROS dans la cellule eucaryote.....	74
2.2.2. NADPH oxydases.....	76
2.2.3. Autres enzymes.....	76
2.3. Sources de production des RNS <i>in vivo</i>	78
2.4. Sources extracellulaires de RONS.....	79
2.5. Cibles moléculaires des ROS.....	79
2.6. Cibles moléculaires des RNS.....	81
2.6.1. Modifications post-traductionnelles des protéines.....	81
2.6.2. Lipides.....	81
2.6.3. ADN/ARN.....	81
2.7. L’homéostasie des RONS grâce aux antioxydants.....	84
2.8. Processus biologiques faisant intervenir les RONS.....	87
2.8.1. Rôle dans la signalisation cellulaire.....	87
2.8.2. Rôle dans l’inflammation.....	90
2.8.3. Rôle dans la défense immunitaire.....	90
2.8.4. Monoxyde d’azote et vasodilatation.....	90
2.8.5. Rôles divers.....	92
3. PATHOLOGIE DES RONS.....	92
3.1. Concept du stress oxydatif et nitrosatif.....	92
3.2. Maladies humaines liées aux ROS.....	93
3.3. Maladies humaines liées aux RNS.....	94
4. THÉRAPEUTIQUE AUTOUR DES RONS : OXYDANTS <i>VERSUS</i> ANTIOXYDANTS.....	95
5. CONCLUSION DE CE TROISIÈME CHAPITRE : LA DUALITÉ DES RONS, ENTRE EFFETS BÉNÉFIQUES ET EFFETS DÉLÉTÈRES.....	97
CHAPITRE IV. LES PROTÉINES STOX1.....	99
1. DÉCOUVERTE.....	99
2. DESCRIPTION DU GÈNE HUMAIN.....	100
2.1. Transcrits et isoformes protéiques.....	100
2.2. Localisation cellulaire.....	104
2.3. Expression tissulaire.....	105
3. PARALOGUES ET ORTHOLOGUES.....	107
3.1. Le gène paralogue <i>STOX2</i>	107
3.2. Orthologues de <i>STOX1</i> et <i>STOX2</i> humains.....	107

4. CONNAISSANCES SCIENTIFIQUES SUR STOX1	112
4.1. STOX1A facteur de transcription.....	112
4.2. STOX1 et la prééclampsie.....	112
4.3. Le polymorphisme Y153H.....	113
4.4. STOX1 comme gène soumis à empreinte	114
4.5. STOX1, le système nerveux et la maladie d'Alzheimer	115
4.6. STOX1 et le cycle cellulaire	116
5. CONCLUSION DE CE DERNIER CHAPITRE : STOX1, UN GÈNE PLURIFONCTION ?.....	116
DEUXIÈME PARTIE : DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	117
1. PRÉSENTATION DE L'ÉQUIPE.....	119
2. PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE RECHERCHE	119
2.1. Intégration de mon travail dans la thématique de l'équipe	119
2.2. Objectifs de l'étude	119
2.3. Approches retenues	120
2.4. Collaborations	120
3. DONNÉES PRÉLIMINAIRES ET MODÈLES D'ÉTUDE	121
4. PLAN DU TRAVAIL EXPÉRIMENTAL	122
4.1. Étude du stress oxydatif <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	122
4.2. Étude du phénotype des cellules endothéliales de souris gestantes	122
4.3. Étude du lien entre STOX1, les facteurs HNF et l'aspirine	122
4.4. Autres travaux menés en parallèles	122
TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS.....	123
ARTICLE 1. NITROSO-REDOX BALANCE AND MITOCHONDRIAL HOMEOSTASIS ARE REGULATED BY STOX1, A PRE-ECLAMPSIA-ASSOCIATED GENE	125
ARTICLE 2. ENDOTHELIAL CELL DYSFUNCTION AND CARDIAC HYPERTROPHY IN THE STOX1 MODEL OF PREECLAMPSIA	149
ARTICLE 3 (EN PRÉPARATION). LOW-DOSE PROTECTIVE ASPIRIN EFFECTS ARE CORRELATED WITH DEREGULATION OF HNF EXPRESSION IN THE PLACENTAS OF STOX1 PREECLAMPTIC MICE	171
RÉSULTATS NON PUBLIÉS	187
1. RECHERCHE DU SITE DE FIXATION À L'ADN DE STOX1A ET STOX1B	187
2. TEST DE L'ALPHA-1-MICROGLOBULINE SUR LE MODÈLE DE SOURIS STOX1	201
QUATRIÈME PARTIE : DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	213
DISCUSSION	215
1. LE STRESS NITROSATIF DANS LA PATHOLOGIE VASCULAIRE	215
2. L'ASPIRINE ET LA PRÉÉCLAMPSIE	216
PERSPECTIVES	219

1. <i>STOX1</i> , LA MITOCHONDRIE ET LES RADICAUX LIBRES	219
2. EFFETS CARDIOVASCULAIRES DE LA PRÉÉCLAMPSIE	220
3. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE <i>STOX1</i> DANS LES TROPHOBLASTES	221
4. CONCLUSION	222
LISTES ET RÉFÉRENCES.....	225
LISTE DES FIGURES.....	227
LISTE DES TABLEAUX.....	230
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	231
LISTE DES SITES WEB.....	235
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	237
TABLE DES MATIÈRES	255