



**HAL**  
open science

# Stéroidogénèse anormale et statut anti-angiogénique au cours de la prééclampsie, utilisation potentielle comme biomarqueurs

Nadia Berkane

► **To cite this version:**

Nadia Berkane. Stéroidogénèse anormale et statut anti-angiogénique au cours de la prééclampsie, utilisation potentielle comme biomarqueurs. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT: 2019SACLS069 . tel-02909697

**HAL Id: tel-02909697**

**<https://theses.hal.science/tel-02909697>**

Submitted on 31 Jul 2020

**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.

# Stéroïdogénèse anormale et statut anti-angiogénique au cours de la prééclampsie : Utilisation potentielle comme biomarqueurs

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à Université Paris Sud

École doctorale n°568

**signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)**

Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Kremlin Bicêtre, le 11 mars 2019, par

**Nadia Berkane**

Composition du Jury :

**Jacques Young**

PUPH, Université Paris Saclay (– UMR S 1185)

Président

**Jean Guibourdenche**

PUPH, Université René Descartes (– UMR S 1139)

Rapporteur

**Vassilis Tsatsaris**

PUPH, Université René Descartes (– UMR S 1139)

Rapporteur

**Ingrid Plotton**

MCUPH, Université Lyon 1

Examineur

**Celia Ravel**

PUPH, Université Rennes 1 (– UMR 1085)

Examineur

**Michael Schumacher**

Directeur de Recherche, Université Paris Saclay (– UMR 1195)

Directeur de thèse

**Nathalie Chabbert-Buffer**

PUPH, Sorbonne Université (– UMR S 938)

Co-Directeur de thèse



Stéroïdogénèse anormale et statut  
anti-angiogénique au cours de la  
prééclampsie :  
Utilisation potentielle comme  
biomarqueurs

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à Université Paris Sud

École doctorale n°568

**signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)**

Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Kremlin Bicêtre, le 11 mars 2019, par

**Nadia Berkane**

Composition du Jury :

**Jacques Young**

PUPH, Université Paris Saclay (– UMR S 1185)

Président

**Jean Guibourdenche**

PUPH, Université René Descartes (– UMR S 1139)

Rapporteur

**Vassilis Tsatsaris**

PUPH, Université René Descartes (– UMR S 1139)

Rapporteur

**Ingrid Plotton**

MCUPH, Université Lyon 1

Examineur

**Celia Ravel**

PUPH, Université Rennes 1 (– UMR 1085)

Examineur

**Michael Schumacher**

Directeur de Recherche, Université Paris Saclay (– UMR 1195)

Directeur de thèse

**Nathalie Chabbert-Buffer**

PUPH, Sorbonne Université (– UMR S 938)

Co-Directeur de thèse









*Ne tenez pour certain que ce qui est démontré.*

**Isaac Newton 1642- 1727.**

## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement le Professeur Nathalie Chabbert-Buffet initiatrice du choix du sujet de cette thèse, de la mise en contact avec le laboratoire de recherche, et surtout soutien indéfectible, stimulant et conseillant avec efficacité et bienveillance. Je te remercie de tout le temps passé à peaufiner cette recherche. Cette étape était importante pour moi, elle n'aurait pu être franchie sans ton aide. Reçois ici toute ma reconnaissance sincère.

Je souhaite aussi remercier Monsieur Michael Schumacher d'avoir bien voulu m'accepter comme doctorante, atypique par le parcours puis le départ à l'étranger. Merci de m'avoir donné cette chance et d'avoir cru en ma persévérance.

Je veux aussi dire un grand merci à Philippe Lière qui m'a permis de bénéficier de ses connaissances et m'a aidé par ses relectures multiples des articles. Merci Philippe de ton accueil, de ta disponibilité et de m'avoir communiqué ton enthousiasme pour les stéroïdes et la GC/MS.

Merci au Docteur Guillaume Lefèvre, vingt ans à « chercher » ensemble sur la prééclampsie, du protocole oxygène jusqu'à MOMA et d'autres à venir. Ta rigueur et tes connaissances nous ont permis de « monter » des protocoles ambitieux. Ta disponibilité m'a beaucoup aidé et ta connaissance des statistiques m'a sauvé plus d'une fois. Sans toi pas de MOMA. Reçois ma sincère reconnaissance pour tout cela et ton soutien constant.

Je remercie le Professeur Alexandre Hertig qui un jour de 2003 est venu avec un article du JCI dans les mains sur le sFlt1, starter de nos travaux. Merci Alexandre pour ton

enthousiasme et ton brio tu as permis que ce travail existe. Reçois toute ma sincère reconnaissance.

Merci Jean Paul Oudinet, pour ton aide et ta disponibilité, pour ton regard de chercheur ... toutes tes remarques étaient prémonitoires, les reviewers ne disaient pas autre chose. Merci de ton accueil et de ton aide pour l'administratif, et de ton accompagnement dans ce travail.

Je remercie le Professeur Boulvain, qui m'a appris le BAba des statistiques. Merci Michel sincèrement pour ton accessibilité, tes conseils, tes relectures, et ton aide à structurer le manuscrit MOMA.

Je remercie aussi Antoine Pianos car les HPLC et GC/MS ne vont pas de soi pour un médecin clinicien et pourtant avec gentillesse et beaucoup de temps pris, tu m'as aidé pour mon immersion dans les techniques du laboratoire.

Je remercie Nadia Alfaïdy et son équipe pour son aide dans les techniques de RT-qPCR et Western Blot placentaires. Merci sincèrement pour ton accueil et les collaborations à venir.

Je remercie aussi le Professeur Charles Coutant qui au début de ce travail a pris beaucoup de son temps pour faire et refaire des statistiques au gré de mes nouvelles idées en attendant que j'arrive à les manier seule. Merci sincèrement Charles.

Je remercie Marine Cachanado, qui a toujours été disponible pour voir et revoir les statistiques de MOMA avec sérieux et gentillesse. Merci pour toute cette collaboration.

De même, MOMA n'aurait pu exister sans Jérémy, Anne, Lise, Emmanuelle, Lieve, et les autres chefs de cliniques, sage-femmes et infirmières et l'URCEST, je les en remercie infiniment.

Je remercie le Professeur Rondeau, pour son soutien au projet MOMA, et les négociations avec la DRC, et pour tout ce qu'il m'a appris sur la prééclampsie.

Je remercie sincèrement le Professeur Serge Uzan, qui m'a soutenu pour ce projet, m'a permis de le réaliser au sein du service, m'a appris beaucoup sur la prééclampsie et l'aspirine, et m'a permis d'apprendre encore par le recrutement exceptionnel de la maternité de Tenon. Recevez monsieur ma sincère reconnaissance pour tout cela et aussi pour votre confiance.

Il me paraît indispensable de remercier sincèrement le Docteur Michel Beaufils pour tout ce qu'il m'a appris sur la prééclampsie et l'aspirine.

Enfin je remercie avec respect les membres du jury qui auront à juger ce travail.





# Table des matières

Table des matières .....	1
Table des abréviations.....	9
Liste des figures.....	14
Liste des Tableaux .....	17
Introduction.....	19
<b>La prééclampsie</b> .....	24
1.1. Généralités.....	24
1.2. Epidémiologie.....	24
1.3. Définitions .....	24
1.4. Formes cliniques précoces et tardives.....	26
1.5. Tableaux cliniques et conséquences.....	29
1.5.1. Conséquences pour la mère .....	29
1.5.1.1. Symptomes généraux.....	29
1.5.1.2. L'atteinte rénale.....	30
1.5.1.3. L'atteinte cérébrale .....	32
1.5.1.4. Le HELLP syndrome.....	32
1.5.1.5. L'hématome rétroplacentaire.....	33
1.5.2. Conséquence pour l'enfant à naître: .....	33
1.5.2.1. RCIU.....	33
1.5.2.2. Risques à distance.....	34
1.6. Etiologies de la prééclampsie ou « la maladie des hypothèses ».....	34
1.7. Facteurs de risque de la prééclampsie.....	35
1.8. L'implication du placenta .....	35
1.8.1. Atteinte placentaire : inflammation, ischémie et stress oxydatif .....	36
1.8.2. Implantation placentaire.....	37
1.8.2.1. Phénomènes d'apposition et de pénétration de l'oeuf .....	37
1.8.2.2. Phénomènes de migration des cellules trophoblastiques .....	40
1.8.3. Phénomènes de remodelage des vaisseaux utérins .....	40
1.8.3.1. 1ère phase du remodelage : les plugs.....	40
1.8.3.2. 2ème phase du remodelage : des vaisseaux atones.....	41
1.8.3.3. Défaut d'invasion trophoblastique au cours de la prééclampsie.....	43
1.8.3.4. Application clinique : Le Doppler aux artères utérines .....	43

1.8.4. La prééclampsie : une maladie spécifique au placenta humain .....	44
1.8.4.1. La profondeur de l'invasion trophoblastique.....	45
1.8.4.2. Le remodelage des vaisseaux utérins.....	45
1.8.4.3. Le lieu de la stéroïdogénèse .....	46
1.9. Bases physiopathologiques de la prééclampsie .....	46
1.9.1. Généralités.....	46
1.9.2. Situations cliniques, facteurs de risque de prééclampsie .....	48
1.9.2.1. L'obésité .....	48
1.9.2.2. Diabète .....	49
1.9.2.3. Hypertension chronique.....	50
1.9.2.4. L'infection .....	50
1.9.3. Déséquilibre entre facteurs angiogéniques/anti-angiogéniques.....	51
<b>Des facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques impliqués dans la prééclampsie .....</b>	<b>52</b>
2.1. Généralités.....	52
2.2. Le VEGF .....	52
2.2.1. Généralités.....	52
2.2.2. La régulation du gène du VEGF .....	53
2.3. Le PlGF.....	54
2.4. Les récepteurs membranaires VEGFR1 et VEGFR 2.....	55
2.5. Le sFlt-1.....	57
2.5.1. Historique .....	57
2.5.2. sFlt-1 et grossesse normale ou prééclamptique .....	59
2.5.3. Facteurs pouvant modifier le sFlt-1 .....	64
2.5.4. Le sFlt-1 n'intervient pas seul dans la prééclampsie .....	65
2.6. L'endogline soluble.....	65
2.6.1. Généralités.....	66
2.6.2. Le TGF $\beta$ .....	67
2.6.3. Les récepteurs du TGF $\beta$ .....	67
2.6.4. Les actions de la sEng.....	68
2.6.5. Conclusion.....	69
2.7. L'hCG .....	69
2.7.1. Généralités.....	69
2.7.2. Les différentes formes d'hCG.....	70
2.7.3. Synthèse de l'hCG.....	72

2.7.4. Le récepteur de l'hCG .....	73
2.8. Utilisation du dosage de ces facteurs en clinique.....	74
2.8.1. Au premier trimestre : Le dépistage très précoce.....	74
2.8.2. Au 2ème trimestre : dépistage précoce et aide au diagnostic.....	75
2.8.3. Le cas particulier des suspicions de prééclampsie .....	76
<b>La stéroïdogénèse au cours de la grossesse normale et de la prééclampsie .....</b>	<b>77</b>
3.1. Généralités.....	77
3.1.1. Historique .....	77
3.1.2. Stéroïdes et grossesse.....	78
3.1.3. La synthèse des stéroïdes par le placenta et autres cellules .....	78
3.1.4. Répartition des enzymes de la stéroïdogénèse au sein de la cellule .....	79
3.1.5. L'utilisation du cholestérol .....	79
3.1.6. La problématique de l'absence de la CYP17A1 .....	80
3.2. La synthèse des oestrogènes .....	80
3.2.1. Généralités.....	80
3.2.2. L'estriol et l'estétrol : des estrogènes d'origine foetale.....	81
3.2.2.1. L'estriol .....	81
3.2.2.2. L'estétrol .....	82
3.2.3. Le cas particulier de l'aromatase .....	83
3.2.3.1. Généralités.....	83
3.2.3.2. Régulation du gène de l'aromatase .....	85
3.2.3.2.1. Les polymorphismes du gène .....	85
3.2.3.2.2. L'hypoxie.....	85
3.2.3.2.3. Les miARNs.....	86
3.2.4. La COMT.....	86
3.2.5. Autres voies de métabolisme des estrogènes.....	88
3.2.5.1. Généralités.....	88
3.2.5.2. Sulfatation.....	88
3.2.5.3. Glucuronidation.....	89
3.2.5.4. Formation de quinones .....	89
3.2.6. L'HSD17B2 : une protection foetale à l'interface materno-foetale ? .....	89
3.3. Les récepteurs aux oestrogènes .....	90
3.3.1. Généralités.....	90
3.3.2. Structure des ERs.....	90
3.3.3. Affinité des ERs à leurs ligands.....	92

<b>3.4. Voies de signalisation des oestrogènes.....</b>	<b>93</b>
3.4.1. Généralités.....	93
3.4.2. Les effets génomiques.....	94
3.4.3. Les effets non-génomiques.....	95
3.4.4. Les effets mixtes.....	97
3.4.5. Les autres effets des oestrogènes .....	97
<b>3.5. Synthèse et métabolisme de la progestérone .....</b>	<b>98</b>
3.5.1. Progestérone et métabolites .....	98
3.5.2. Métabolisme et Elimination de la Progestérone.....	99
3.5.3. Les effets de la progestérone .....	100
<b>3.6. Les récepteurs de la progestérone .....</b>	<b>100</b>
3.6.1. Les récepteurs propres de la progestérone .....	100
3.6.2. Les autres récepteurs qui fixent la progestérone.....	102
<b>3.7. Protéines de transport des oestrogènes et de la progestérone.....</b>	<b>102</b>
3.7.1. Généralités.....	102
3.7.2. La SHBG.....	103
3.7.3. La transcortine .....	103
<b>3.8. Problématiques des mesures de concentrations des stéroïdes .....</b>	<b>104</b>
<b>3.9. Stéroïdes et prééclampsie .....</b>	<b>104</b>
3.9.1. Généralités.....	104
3.9.2. Interaction entre implantation trophoblastique et stéroïdogénèse .....	105
3.9.3. Oestrogènes et prééclampsie .....	105
3.9.4. Progestatifs et prééclampsie .....	105
3.9.5. Les précurseurs des oestrogènes et des progestatifs et prééclampsie...	106
<b>Traitements de la prééclampsie .....</b>	<b>107</b>
<b>4.1. Traitements préventifs.....</b>	<b>107</b>
4.1.1. Aspirine.....	107
4.1.2. Héparine .....	107
4.1.3. Traitement par la progestérone.....	107
<b>4.2. Traitements curatifs.....</b>	<b>108</b>
4.2.1. Traitements expérimentaux en cours d'évaluation .....	108
4.2.1.1. Epuration du sang maternel en sFlt-1 .....	108
4.2.1.2. Statines .....	108
4.2.1.3. Sildénafil (Viagra) .....	109
<b>Hypothèses, Méthodes et Objectifs de l'étude.....</b>	<b>112</b>

<b>Hypothèses :</b> .....	112
5.1. Généralités.....	112
5.2. Hypothèses .....	112
<b>Méthodologie</b> .....	114
5.3. Analyse bibliographique (article 1) .....	114
5.4. Méthodologie clinique : Essai MOMA (article 2) .....	115
5.4.1. Type d'étude.....	115
5.4.2. Les critères d'inclusion et d'exclusion .....	116
5.4.3. Les définitions utilisées pour cet essai .....	116
5.4.4. Objectifs primaire et secondaires de l'étude .....	117
5.4.5. Nombre de sujets nécessaires .....	118
5.4.6. Procédure de l'essai.....	118
5.4.7. Choix du Plasma.....	120
5.4.8. Choix de la population .....	120
5.4.9. Choix de la stratification par le Doppler aux artères utérines .....	121
5.5. Méthodologie clinique : Etude Stéroïde (article 3) .....	122
5.5.1. Objectifs .....	122
5.5.2. Nombre de femmes à inclure.....	122
5.5.3. Etude du défaut d'aromatation.....	123
5.6. Méthodologie clinique : Expression de l'Aromatase (article 3).....	123
5.6.1. Objectifs .....	123
5.6.2. Femmes incluses.....	123
5.6.3. Technique de récupération des placentas .....	124
5.7. Méthodologie analytique .....	126
5.7.1. Dosage du sFlt-1.....	126
5.7.2. Evaluation du profil stéroïdien par GC/MS.....	128
5.7.2.1. Méthodologie d'analyse : Schéma récapitulatif.....	128
5.7.2.2. La technique GC/MS.....	130
5.7.2.3. Protocole analytique .....	130
5.7.2.4. Extraction.....	131
5.7.2.5. Purification par SPE.....	131
5.7.2.6. Dérivation des stéroïdes sulfates .....	132
5.7.2.7. HPLC et dérivation des stéroïdes non conjugués .....	132
5.7.2.8. L'analyse GC/MS.....	133
5.7.2.8.1. La chromatographie en phase gazeuse (GC) .....	134

5.7.2.8.2.	La spectrométrie de masse .....	136
5.7.2.9.	Mesures des concentrations de stéroïdes par GC/MS.....	137
5.7.2.9.1.	Pré-test .....	137
5.7.2.9.2.	Identification de stéroïdes.....	137
5.7.2.9.3.	Quantification des stéroïdes .....	138
5.7.2.9.4.	Evaluation du profil stéroïdien placentaire.....	138
5.7.3.	Evaluation de l'expression de l'aromatase placentaire.....	140
5.7.3.1.	Expression de l'aromatase au niveau de l'ARN messenger. ....	140
5.7.3.2.	Quantification de la protéine aromatase : Western Blot .....	141
	<b>Objectifs</b> .....	142
	<b>Introduction de l'article 1</b> .....	145
6.1.	Contexte et présentation de la publication.....	145
6.2.	En conclusion .....	148
	<b>Article 1</b> .....	149
	<b>Introduction à l'article 2</b> .....	150
7.1.	Rationnel .....	150
7.2.	Modalités administratives.....	151
7.3.	Objectif de l'essai MOMA.....	151
7.4.	Type d'essai et Modalités.....	151
7.5.	La cohorte .....	152
7.6.	Principaux résultats .....	153
7.7.	Conclusions de l'étude .....	155
7.8.	Les points forts de cette étude .....	156
7.9.	Les limites de l'étude.....	156
7.10.	Rationnel du choix du seuil et problématique .....	157
7.11.	Autres problèmes rencontrés lors de ce travail .....	159
	<b>Article 2</b> .....	161
	<b>Introduction de l'article 3</b> .....	162
8.1.	Rationnel .....	162
8.2.	Mise en place des collaborations .....	162
8.3.	Cohortes incluses.....	162
8.3.1.	Profil stéroïden .....	162
8.3.2.	Expression de l'aromatase .....	163
8.4.	Calcul d'effectif et population incluse .....	163
8.5.	Principaux résultats .....	164

8.5.1. Anomalies des oestrogènes.....	164
8.5.2. Anomalies de la progestérone et de ses métabolites .....	165
8.5.3. Anomalies des précurseurs.....	166
8.5.4. Cortisol.....	166
8.6. Relation entre stéroïdes et facteurs angio/antiangiogéniques.....	167
8.7. Forces et limites de ce travail.....	168
8.8. Conclusions de l'article.....	170
<b>Article 3</b> .....	171
<b>Discussion globale</b> .....	173
9.1. Préambule.....	173
9.2. La balance des facteurs angiogéniques/antiangiogéniques .....	173
9.3. Les anomalies de la stéroïdogénèse.....	178
9.4. Oestrogènes, progestagènes et physiopathologie de la prééclampsie....	186
9.4.1. Oestrogènes et facteurs pro et anti-angiogéniques .....	186
9.4.2. Progestatifs et facteurs pro et anti-angiogéniques.....	187
9.4.3. Intégration de la « théorie » des oestrogènes et des progestatifs dans la physiopathologie de la prééclampsie .....	187
<b>Perspectives</b> .....	191
10.1. MOMA .....	191
10.2. Stéroïdes.....	191
10.2.1. Profil stéroïdien placentaire avec ou sans prééclampsie.....	191
10.2.2. Analyse de l'expression des enzymes impliquées.....	192
10.2.3. Suivi longitudinal depuis le 1er trim. jusqu'à l'accouchement.....	192
10.2.4. Couplage profil stéroïdien placentaire et expression : ERs/PRs ....	193
10.2.5. Stéroïdes, sFlt-1 et PlGF : Synthèse in vitro en milieu hypoxique...	193
10.2.6. Essais thérapeutiques in vitro (estradiol, progestérone, 2-ME2)...	194
<b>Conclusion</b> .....	195
<b>Présentations à des congrès</b> .....	197

## **Tables des**

### **1. Abréviations**

### **2. Figures**

### **3. Tableaux**



## Table des abréviations

<b>ACOG</b>	American College of Obstetricians and Gynecologists
<b>ACVR1</b>	Activin A receptor, type I
<b>ADAM12</b>	A Disintegrin And Metalloproteinase 12
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AF1</b>	Activation fonction 1
<b>AMP</b>	Assistance médicale à la procréation
<b>AP1</b>	Activated protein 1
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ALT</b>	alanine amino transférase;
<b>AST</b>	aspartate aminotransférase
<b>AVK</b>	Anti vitamine K
<b>CIVD</b>	Coagulation intra vasculaire disséminée
<b>CNGOF</b>	Collège National des Obstétriciens et Gynécologues Français
<b>COMT</b>	Catéchol-O-méthyltransférase
<b>CTEVs</b>	Cytotrophoblastes extravilleux
<b>Cts</b>	Cytotrophoblastes
<b>CYP17A1</b>	Cytochrome P450 17A1 (17 $\alpha$ -hydroxylase,20-desmolase)
<b>CYP450scc</b>	Cytochrome P450 steroid chain cleavage
<b>Da</b>	Dalton
<b>DBD</b>	DNA-binding domain
<b>DHEA</b>	Déhydroépiandrostérone
<b>DHP</b>	Dihydroprogestérone
<b>DHT</b>	Dihydrotestostérone
<b>dNK</b>	Decidual natural killer
<b>DOC</b>	Déocorticostérone
<b>E-box</b>	Enhancer Box (séquence de consensus)
<b>E2</b>	Estradiol
<b>E3</b>	Estriol
<b>E4</b>	Estétrol
<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid

<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>eNOS</b>	Endothelial nitric oxide synthase
<b>ER</b>	Estrogen receptor
<b>ERE</b>	Estrogen response element
<b>ERE-LS</b>	Estrogen response element - like sequence
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>Ers</b>	Récepteurs aux oestrogènes
<b>FLAIR</b>	Fluid Attenuated Inversion Recovery
<b>GC/MS</b>	Gas chromatography-mass spectrometry
<b>hGCM1</b>	Human Glial cell missing 1
<b>GADPH</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>GMPc</b>	Guanosine monophosphate cyclique
<b>GPER I ou GPR30</b>	G Protein-coupled estrogen receptor I anciennement récepteur orphelin GPR30
<b>HBFA</b>	Heptafluorobutyric anhydride
<b>HELLP</b>	Hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count
<b>HHP</b>	3a/b5a/b20a-hexahydroprogestérone
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$
<b>HLA-C</b>	Human leucocyte antigen – C/ complexe majeur d'histocompatibilité classe I – C
<b>HPLC</b>	high pressure liquid chromatography
<b>HRE</b>	Hypoxia response element
<b>HRP</b>	Hématome rétroplacentaire
<b>HSD</b>	Hydroxysteroid deshydrogenase
<b>HSD17B1</b>	Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 1
<b>HSD17B3</b>	Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3
<b>HSD3B1</b>	3- $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase + $\Delta$ 5 $\Delta$ 4isomerase de type I
<b>HTA</b>	Hypertension artérielle
<b>HTA</b>	Hypertension artérielle pulmonaire
<b>HUVEC</b>	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>IU</b>	International unit
<b>IFD</b>	International Federation of Diabetes

<b>IgFbp1</b>	Insuline-like Growth Factor-binding protein 1
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IP</b>	Index de pulsatilité
<b>IRM</b>	Imagerie par résonnance magnétique
<b>ISSHP</b>	International Society for the study of Hypertension in Pregnancy
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>kD</b>	Kilodalton
<b>LBD</b>	Ligand binding domain
<b>LC/MS</b>	Liquid chromatography–mass spectrometry
<b>LIF</b>	Leukemia inhibitory factor
<b>M-CSF</b>	Macrophage colony-stimulating factor
<b>MFIU</b>	Mort fœtale in utero
<b>miARNs</b>	Micro ARNs
<b>MLN64</b>	Metastatic Lymph Node 64
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase
<b>mPR</b>	Méthyl tetrahydrofolate reductase
<b>MTHFR</b>	membrane progesterone receptor
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NO</b>	Nitric oxide (Monoxyde d'azote)
<b>OAP</b>	Œdème aigu du poumon
<b>OHP</b>	Hydroxyprogestérone
<b>OHPREG</b>	Hydroxyprégnénolone
<b>PAD</b>	Pression artérielle diastolique
<b>PAPPA</b>	Pregnancy-associated plasma protein-A
<b>PAS</b>	Pression artérielle systolique
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PE</b>	Prééclampsie
<b>PI3K/Akt</b>	Phosphoinositol/Protéine kinase B
<b>PIGF</b>	Placental Growth factor
<b>PP13</b>	Placental protein 13

<b>PRE</b>	Progesterone response element
<b>PRA</b>	Progesterone Receptor A/ Progesterone Receptor B
<b>PRB</b>	Progesterone Receptor B
<b>PREG</b>	Prégnénolone
<b>PREGS</b>	Prgnenolone sulfate
<b>PROG</b>	Progestérone
<b>RT-qPCR</b>	Quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction
<b>RCIU</b>	Retard de croissance intra utérin
<b>RPL13</b>	Ribosomal protein L13a
<b>SA</b>	Semaines d'aménorrhée
<b>SCP2</b>	Sterol Carrier Protein-2
<b>SDHEA</b>	Sulfate de déhydroépiandrostérone
<b>SERM</b>	Selective estrogen receptor modulator
<b>SGOC</b>	Société des Obstétriciens et Gynécologues Canadiens
<b>SHBG</b>	Sex hormone-binding globulin
<b>SOPK</b>	Syndrome des ovaires polykystiques
<b>SP1</b>	Specificity protein 1
<b>SPE</b>	Solid phase extraction
<b>StAR</b>	Steroidogenic acute regulatory protein
<b>STS</b>	Steroid sulfatase
<b>STs</b>	Syncytiotrophoblastes
<b>TCA</b>	Temps de céphaline activée
<b>TGFβ</b>	Transforming Growth Factor β
<b>TGβFR</b>	Transforming Growth Factor β Receptor
<b>THDOC</b>	Tétrahydrodéoxycorticostérone
<b>THP</b>	3 alpha-hydroxy-5 alpha-prégnan-20-one, alloprégnanolone
<b>TIC</b>	Total ion current
<b>Tie2</b>	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
<b>TIMP</b>	Tissue inhibitor of metalloproteinase
<b>UAD</b>	Uterine artery Doppler
<b>UI</b>	Unité internationale
<b>USF</b>	Upstream stimulatory factor

<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VEGFR</b>	Vascular endothelial growth factor receptor
<b>VPN</b>	Valeur prédictive négative
<b>VPP</b>	Valeur prédictive positive
<b>WB</b>	Western Blot

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Physiopathologie de la prééclampsie. Une maladie générale.....	29
<b>Figure 2.</b> Le glomérule rénal. ....	30
<b>Figure 3.</b> De la fécondation à la nidation.....	37
<b>Figure 4.</b> Implantation trophoblastique. ....	38
<b>Figure 5.</b> Chambres intervillieuses et villosités placentaires. ....	39
<b>Figure 6.</b> Remodelage des artères utérines. ....	42
<b>Figure 7.</b> Doppler aux artères utérines en 2 <sup>ème</sup> partie de grossesse. ....	44
<b>Figure 8.</b> Physiopathologie de la prééclampsie (hors troubles de la stéroïdogénèse).....	51
<b>Figure 9.</b> Récepteurs tyrosine kinase du VEGF.....	57
<b>Figure 10.</b> Protéines Flt1 et sFlt-1. ....	58
<b>Figure 11.</b> Moyenne des concentrations de sFlt-1 avant et après les signes cliniques en fonction de l'âge gestationnel au moment du prélèvement. ....	62
<b>Figure 12.</b> Concentrations de sFlt-1 en fonction du nombre de semaines avant la survenue d'une prééclampsie. ....	63
<b>Figure 13.</b> Concentrations sériques du sFlt-1 en fonction de l'âge gestationnel. ....	63
<b>Figure 14.</b> Répartition des enzymes et récepteurs aux estrogènes et progestagènes....	79
<b>Figure 15.</b> Stéroïdogénèse au cours de la grossesse.....	81
<b>Figure 16.</b> Molécule d'estriol. ....	82
<b>Figure 17.</b> Molécule d'estétrol. ....	83
<b>Figure 18.</b> L'aromatase.....	84
<b>Figure 19.</b> Représentation du gène de l'aromatase. ....	84
<b>Figure 20.</b> Place de la COMT dans le métabolisme des oestrogènes.....	86
<b>Figure 21.</b> Représentation de la conversion des catécholestrogènes en méthoxyestrogènes.....	87
<b>Figure 22 A.</b> Voies de signalisation génomiques des récepteurs aux oestrogènes.....	93

<b>Figure 22 B.</b> Voies de signalisation génomiques des récepteurs aux oestrogènes, phénomène de docking. ....	94
<b>Figure 22 C.</b> Voies de signalisation génomiques des récepteurs aux oestrogènes, couplage avec d'autres récepteurs.....	95
<b>Figure 23.</b> Voies de signalisation non- génomiques des récepteurs aux oestrogènes. ...	96
<b>Figure 24.</b> Métabolisme de la progestérone au cours de la grossesse.....	98
<b>Figure 25.</b> Mode d'action du Sildénafil. ....	109
<b>Figure 26.</b> Exemple de courbe de calibration du sFlt-1 : données brutes. ....	127
<b>Figure 27.</b> Exemple de courbe de calibration du sFlt-1 : après transformation logarithmique. ....	128
<b>Figure 28.</b> Protocole analytique.....	128
<b>Figure 29.</b> Schéma du couplage GC/MS. ....	134
<b>Figure 30.</b> Profil chromatographique d'un mélange de stéroïdes dérivés (A), du <sup>2</sup> H <sub>5</sub> -estradiol (B), de l'estradiol (C) et de l'estrone (D).....	135
<b>Figure 31 (A, B, C).</b> Spectres de masse de l'estradiol (A), du <sup>2</sup> H <sub>5</sub> -estradiol (B) et de l'estrone (C) dérivés.....	139
<b>Figure 32.</b> Représentation en 3 dimensions de l'analyse GC/MS d'un mélange de stéroïdes dérivés.....	140
<b>Figure 33.</b> Modifications des concentrations de stéroïdes et expression enzymatique au cours de la prééclampsie. ....	147
<b>Figure 34.</b> Diagramme de l'essai. ....	152
<b>Figure 35.</b> Courbe ROC : sFlt-1 pour prédire une grossesse avec prééclampsie.....	154
<b>Figure 36.</b> Courbe ROC : sFlt-1 pour prédire une grossesse avec complication (critère composite présent). ....	155
<b>Figure 37.</b> Population ayant servi au calcul du seuil de sFlt-1 .....	157
<b>Figure 38.</b> Courbe ROC de la mesure du sFlt-1 plasmatique dans le diagnostic de	

prééclampsie. ....	157
<b>Figure 39.</b> Résultat du suivi longitudinal des concentrations du sFlt-1 dans un groupe de population contrôle ou avec prééclampsie. ....	158
<b>Figure 40.</b> Concentrations maternelles plasmatiques des concentrations lors de grossesse avec dopplers utérins anormaux. ....	159
<b>Figure 41.</b> Concentrations plasmatiques de l'estriol. ....	164
<b>Figure 42.</b> Concentrations plasmatiques de la 20 $\alpha$ -DHP. ....	165
<b>Figure 43.</b> Concentrations plasmatiques du cortisol. ....	166
<b>Figure 44.</b> Corrélation entre les concentrations plasmatiques de l'estradiol et du PIGF. ....	167
<b>Figure 45.</b> Corrélation entre les concentrations plasmatiques de la 20 $\alpha$ -DHP et le sFlt-1. ....	168
<b>Figure 46.</b> Corrélation entre les concentrations plasmatiques de la 20 $\alpha$ -DHP et le ratio sFlt-1/PIGF. ....	168
<b>Figure 47.</b> Physiopathologie incluant l'hypothèse du défaut d'aromatation comme conséquence de l'ischémie et la nécrose placentaire. ....	188
<b>Figure 48.</b> Physiopathologie de la prééclampsie impliquant des anomalies précoces de la stéroïdogénèse. ....	189



# Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Critères diagnostiques de la prééclampsie. ....	27
<b>Tableau 2.</b> Facteurs de Risque de la prééclampsie. ....	35
<b>Tableau 3.</b> Principaux effets de l’HCG au cours de la grossesse. ....	71
<b>Tableau 4.</b> Critère composite de morbidité et mortalité maternofoetale. ....	117
<b>Tableau 5.</b> Protocole de surveillance rapprochée. ....	119
<b>Tableau 6.</b> Validation des paramètres de mesure des stéroïdes par GC/MS.....	129
<b>Tableau 7.</b> Rappel des Principaux résultats de l’essai MOMA.....	175
<b>Tableau 8.</b> Rappel des Principaux résultats de l’étude du profil stéroïdien à 24-29 SA. ....	180



# Introduction

La prééclampsie affecte 1 à 7% des femmes enceintes (Hutcheon et al., 2011; Savitz et al., 2014) et représente à travers le monde, une des premières causes de morbidité et de mortalité des femmes et de leurs enfants à naître (Khan et al., 2006; Kuklina et al., 2009). On a longtemps pensé qu'il s'agissait d'une pathologie transitoire propre à la période de la grossesse et du postpartum immédiat et, qu'une fois cette période révolue, il n'en restait pas de séquelles, hormis les conséquences des complications sévères et celles liées à la prématurité induite. Tel n'est pas le cas, les dernières données de suivi à distance de ces mères et de ces enfants montrent des conséquences négatives à long terme avec un surrisque vasculaire pour les mères (Beaufils, 2011; Williams, 2011) et des conséquences épigénétiques défavorables pour les enfants (Ma et al., 2014). A ce jour, aucun traitement curatif n'existe. La stratégie de prise en charge consiste à enlever le placenta et de ce fait à faire naître le (ou les) enfants, ce qui, dans les formes précoces de pré-éclampsie, va exposer ce (ou ces) dernier(s) aux effets néfastes d'une prématurité induite.

La réalisation de ce travail de recherche sur la prééclampsie m'a toujours paru une évidence car depuis le début de ma formation de gynécologue obstétricienne, et plus particulièrement lors de mon long passage dans le département de Gynécologie et d'Obstétrique de l'hôpital Tenon - centre recruteur de formes sévères de prééclampsie -, j'ai eu à prendre en charge et côtoyer les conséquences maternelles, fœtales et néonatales de ces grossesses compliquées. Ce travail de recherche a eu pour objectifs de participer à une meilleure compréhension de la physiopathologie de la prééclampsie mais aussi d'apporter de manière transversale de nouvelles données pour alimenter la recherche sur le cancer ainsi que le suggère un article intitulé : « *A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia* » paru en 2012 dans la revue *Oncotarget*

(Louwen et al., 2012). En effet, la prééclampsie partage « en miroir inversé » avec le cancer beaucoup de concepts (invasion, migration, ...), de molécules et de voies de signalisation.

La prééclampsie est due à un dysfonctionnement placentaire, mais singulièrement, cette pathologie sous sa forme spontanée ne touche pas tous les mammifères mais seulement les humains et quelques primates. Cette particularité constitue un frein à la compréhension des mécanismes impliqués et à la mise au point de traitements.

La mise en évidence d'une surexpression placentaire du sFlt-1, important facteur antiangiogénique a constitué dans les années 2000 un tournant dans la compréhension de la physiopathologie de la prééclampsie (Maynard et al., 2003). Le sFlt-1 a été montré comme pouvant être à l'origine de certaines manifestations cliniques de la prééclampsie : la capture des facteurs angiogéniques VEGF et PlGF par le sFlt-1 interdirait leur effets angiogéniques, vasodilatateurs et antithrombotiques par l'absence de liaison à leurs récepteurs membranaires (Maynard et al., 2003). La surexpression du sFlt-1 par le placenta semble confortée par la concordance des études réalisées. J'ai pour ma part pu y contribuer, en mettant en évidence que les concentrations plasmatiques anormales élevées de sFlt-1 précédaient les symptômes cliniques de la prééclampsie (Hertig et al., 2004). Cependant la valeur additionnelle de la mesure du sFlt-1 dans la prise en charge des patientes reste à évaluer. La concentration plasmatique du PlGF, qui est facile à mesurer est diminuée chez les patientes avec PE avant même l'augmentation des concentrations circulantes de sFlt-1 (Levine et al., 2004). Le PlGF est un facteur angiogénique synthétisé principalement par le placenta qui possède des effets angiogéniques de lymphangiogénèse et de migration cellulaire (Li et al., 2005) par lui même, mais aussi et plus principalement en déplaçant le VEGF vers son récepteur principal (le VEGFR-2) (Cudmore et al., 2012). Parallèlement à ces travaux sur le déséquilibre des facteurs angiogéniques/anti-

angiogéniques, l'évaluation des modifications de la stéroïdogénèse placentaire au cours de la prééclampsie a fait l'objet de travaux récents (Kanasaki et al., 2008).

Le placenta humain est une formidable glande endocrine prenant le relais de l'ovaire très tôt dans la grossesse pour la synthèse des stéroïdes sexuels qui sont nécessaires au maintien et à la qualité de celle-ci. D'anciennes études avaient évalué l'association entre une stéroïdogénèse anormale et la survenue d'une prééclampsie mais leurs résultats étaient contradictoires et manquaient de fiabilité en raison principalement de techniques de mesure limitées par des réactions croisées (Rahman et al., 1975; Thompson et al., 1977; Notation et al., 1977; Rosing et al., 1984; Zamudio et al., 1994; Krasowski et al., 2014). Aussi cet axe de recherche a été délaissé jusqu'à ces dernières années où, le développement de techniques de spectrométrie de masse associées à des techniques de chromatographie en phase gazeuse ou liquide, a permis l'accès à des mesures plus fiables des stéroïdes mais aussi à la réalisation de profil stéroïdien large sur un même échantillon.

La possibilité de collaborer avec différentes équipes de recherche clinique et fondamentale a fait que mon activité de recherche a porté, à la fois sur l'apport du dosage du sFlt-1 dans la prise en charge des patientes prééclamptiques mais également sur les modifications de la stéroïdogénèse au cours de la prééclampsie analysées par technique de GC/MS. Ces axes de recherche en apparence parallèles partagent en fait de nombreux liens et interactions que nous aborderons dans la discussion.

L'introduction du travail expérimental est divisée en 4 parties. La première partie contient un rappel sur la prééclampsie et l'implantation ovulaire. La deuxième partie présente les facteurs angiogéniques et antiangiogéniques et leur liens avec la prééclampsie. La troisième partie aborde la stéroïdogénèse au cours de la grossesse normale et compliquée de prééclampsie. Enfin la quatrième et dernière partie est consacrée aux hypothèses de travail, à la méthodologie employée, aux objectifs de l'étude et aux premiers résultats.



## **Revue bibliographique**

# La prééclampsie

## 1.1. Généralités

La prééclampsie est une pathologie humaine qui peut survenir chez les femmes enceintes dès la fin du 2<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse et exceptionnellement encore plus tôt (Sibai et al., 1991; Brittain and Bayliss, 1995; English et al., 2015). Elle peut aussi apparaître ou s'exacerber au cours de la période du postpartum.

## 1.2. Epidémiologie

La prévalence de cette pathologie, rapportée par les auteurs, varie selon les populations étudiées et les définitions utilisées. En population générale le risque se situe entre 1 et 7% (Hutcheon et al., 2011; Savitz et al., 2014). Cependant certains facteurs de risque de la prééclampsie tels que le syndrome métabolique ou un âge maternel avancé sont en augmentation majeure et peuvent faire craindre un accroissement important du nombre de cas de prééclampsie ces prochaines décennies. La prééclampsie figure parmi les premières causes de mortalité et de morbidité fœtale et néonatale dans les pays développés et en voie de développement (Khan et al., 2006; Kuklina et al., 2009). Elle est à l'origine de complications par elle même mais aussi par la prématurité induite qu'elle peut imposer.

Le nombre de décès annuels dans le monde en relation avec la prééclampsie est évalué à environ 70,000 décès maternels et 500,000 décès d'enfants (Sibai et al., 2005; Khan et al., 2006).

## 1.3. Définitions

Comme son nom l'indique, la prééclampsie désigne l'ensemble des signes cliniques et biologiques qui surviennent avant l'éclampsie (crise convulsive tonico-clonique de la grossesse). Le tableau le plus classique est celui de la survenue de novo d'une hypertension



artérielle gestationnelle et d'une protéinurie après 20 SA (Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, 2000; Berkane, 2010). L'hypertension correspond à des PAS supérieures ou égales à 140 mmHg et/ou des PAD supérieures ou égales à 90 mmHg. Ces mesures doivent être prises au repos en position assise ou en décubitus latéral gauche et doivent être mesurées à au moins 2 reprises avec un intervalle de 4 heures, de manière plus rapprochée si les chiffres sont très pathologiques. Si les PAS et/ou les PAD sont très élevées : supérieures ou égales à 160 et/ou les PAD à 110, on considère qu'il s'agit d'une prééclampsie sévère (tableau 1).

La protéinurie quant à elle, est considérée comme pathologique lorsqu'elle est supérieure à 0,3 g/L ou 0,3g/24h, ou lorsque le ratio protéinurie/créatininurie est supérieur à 30 (Redman, 2011a; American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013a). Cette protéinurie peut atteindre des taux très élevés constituant alors un véritable syndrome néphrotique. La protéinurie est isolée, aussi la leucocyturie et l'hématurie ne font pas partie du tableau de prééclampsie. Lorsque la prééclampsie survient chez des patientes hypertendues chroniques (HTA présente avant la grossesse ou diagnostiquée avant 20 SA), la prééclampsie est dite « surajoutée », « superimposed preeclampsia » pour les anglosaxons (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013a).

Ces définitions ont l'avantage d'être claires mais ne couvrent pas toutes les présentations cliniques et biologiques de cette pathologie polymorphe. C'est pour cela que les définitions sont variables d'une société savante à l'autre et dans le temps pour une même société (Berkane, 2010; Redman, 2011a; American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013a; Tranquilli et al., 2014; Magee et al., 2014). Pour exemple, la présence d'œdème indispensable au diagnostic il y a 25 ans ne fait plus partie de la définition et tout récemment la présence d'une protéinurie est devenue maintenant facultative si la patiente

présente une HTA gestationnelle associée à certaines anomalies cliniques ou biologiques (**tableau 1**).

Les difficultés pour définir cette maladie sont la conséquence de la multitude des tableaux présentés par les patientes mais aussi des connaissances limitées que nous avons sur la (ou les) étiologie(s) ainsi que sur le (ou les) mécanisme(s) physiopathologique(s). Le **tableau 1** reprend la définition de la SGOC (Magee et al., 2014), de l'ISSHP (Tranquilli et al., 2014), de l'ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013a) et du CNGOF (Berkane, 2010).

#### **1.4. Formes cliniques précoces et tardives**

Il paraît important de faire la distinction entre les prééclampsies en fonction de la précocité d'apparition des signes, le seuil étant 34 SA (Valensise et al., 2008), voire 32 SA pour certains (Société française d'anesthésie et de réanimation (Sfar) et al., 2009).

Les formes les plus précoces (début avant 34 SA) seraient la conséquence d'une invasion trophoblastique insuffisante (cf § implantation) (Valensise et al., 2008). A l'inverse les prééclampsies dites tardives (début après 34SA), seraient plutôt la conséquence de pathologies maternelles retrouvées dans le syndrome métabolique tel que défini par l'IFD (Alberti et al., 2006) type : HTA chronique, diabète ou obésité. L'atteinte fœtale (RCIU) y serait moins fréquente et les symptômes maternels peut être moins graves (Valensise et al., 2008).

**Tableau 1.** Critères diagnostiques de la prééclampsie.

<p><b>SGOC (2014)</b></p>	<p>Une prééclampsie peut arriver de novo, Elle est définie comme une hypertension gestationnelle (PAS &gt;140 mm Hg et/ou PAD &gt;90 mm Hg) avec un ou plusieurs des signes suivants</p> <p><b>Protéinurie nouvelle</b>, ou 1 ou plus des atteintes/complications sévères :</p> <p><b>Système nerveux central : Atteintes</b> : céphalées, troubles visuels</p> <p><b>Complications sévères</b> : éclampsie, PRES, cécité corticale, ou décollement de rétine, score de Glasgow &lt; 13, accident vasculaire cérébral, accident ischémique cérébral transitoire, déficit neurologique ischémique réversible,</p> <p><b>Cardiorespiratoire :</b></p> <p><b>Atteintes</b> : Dyspnée, douleurs thoraciques, saturation en oxygène &lt; 97%</p> <p><b>Complications sévères</b> : HTA sévère non contrôlée (après 12h malgré une trithérapie), saturation en oxygène &lt; 90%, nécessité de <math>\geq 50\%</math> d'oxygène plus d'une heure ou d'une intubation, OAP, nécessité d'inotropes cardiaques, ischémie ou infarctus cardiaque, PAS <math>\geq 160</math> mm Hg et/ou PAD <math>\geq 110</math> mm Hg.</p> <p><b>Hématologie :</b></p> <p><b>Atteintes</b> : leucocytes augmentés, TP diminué ou TCA allongé, thrombopénie</p> <p><b>Complications sévères</b> : Thrombopénie &lt; <math>50 \cdot 10^9/L</math>, transfusion de produits sanguins.</p> <p><b>Appareil rénal :</b></p> <p><b>Atteintes</b> : Augmentation de la créatinine, augmentation de l'acide urique</p> <p><b>Complications sévères</b> : créatinine &gt; <math>150 \mu\text{mol/L}</math> sans pathologie rénale antérieure, nécessité de dialyse,</p> <p><b>Foie :</b></p> <p><b>Atteintes</b> : nausées, vomissements, douleur en hypochondre droit ou barre épigastrique, augmentation des transaminases, des LDH ou de la bilirubine, albuminémie basse.</p> <p><b>Complications sévères</b> : dysfonction hépatique (INR <math>\times 2</math> en l'absence d'AVK), hématome sous capsulaire avec ou sans rupture,</p> <p><b>Atteinte foetoplacentaire :</b></p> <p><b>Atteintes</b> : Anomalies du rythme cardiaque, RCIU, oligoamnios, diastole ombilicale nulle ou reverse flow</p> <p><b>Complications sévères</b> : HRP avec détresse maternelle ou fœtale, onde a négative (Doppler canal d'Arantius), MFIU.</p> <p><b>Prééclampsie sévère</b> : une prééclampsie avec une ou des complications sévères</p>
<p><b>ISSHP (2014)</b></p>	<p><b>Prééclampsie :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hypertension</b> qui se développe après 20 SA et la coexistence de l'apparition d'un ou plusieurs des signes suivants</li> <li>• <b>Protéinurie</b></li> <li>• <b>Dysfonction d'un autre organe maternel</b></li> </ul> <p>Insuffisance rénale (créatininémie <math>\geq 90 \mu\text{mol/L}</math>)</p> <p>Atteinte hépatique (transaminases élevées et/ou douleur en hypochondre droit ou barre épigastrique)</p> <p>Complications neurologiques (exemple : éclampsie, altération mentale, cécité, accident vasculaire cérébral, ou plus souvent hyperréflexie avec clonies, céphalées sévères avec hyperréflexie, scotomes visuels persistants)</p> <p>Complications hématologiques (thrombopénie, CIVD, hémolyse)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Dysfonction utéroplacentaire</b></li> </ul> <p>RCIU</p>

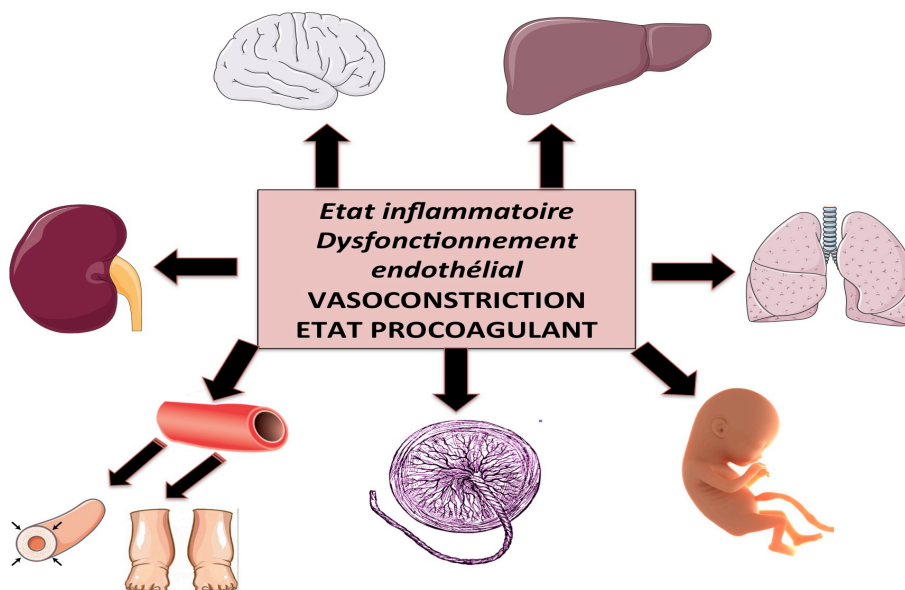
<p><b>ACOG (2013)</b></p>	<p><b>Prééclampsie :</b>  <b>HTA + Protéinurie :</b>  Pressions artérielles :  PAS <math>\geq</math> 140 mmHg et/ou PAD <math>\geq</math> 90mmHg à 2 reprises et à 4 heures d'intervalle chez une patiente &gt; 20 SA et précédemment normotensive  PAS <math>\geq</math> 160 mmHg et/ou PAD <math>\geq</math> 110mmHg mesurées au moins deux fois à quelques minutes d'intervalle  Protéinurie : un ratio protéinurie sur créatininurie <math>\geq</math> 30  <b>Ou en absence de protéinurie, une hypertension nouvelle avec un des signes suivant :</b>  Thrombopénie : &lt; 100G/L*, Insuffisance rénale : créatininémie &gt; 97 <math>\mu</math>mol/L ou une créatinémie doublée en l'absence de pathologie rénale*  Altération de la fonction hépatique : tests de fonction hépatique supérieurs à &gt; 2x la norme*, Œdème pulmonaire : *  Symptômes visuels ou neurologiques : *  <i>*Critères de prééclampsie sévère.</i>  <b>La prééclampsie surajoutée « superimposed »</b> est définie comme la survenue d'une protéinurie ou d'un des signes cités plus haut chez une patiente hypertendue.</p> <p><b>Prééclampsie sévère :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PAS <math>\geq</math> 160 mmHg et/ou PAD <math>\geq</math> 110mmHg à 2 reprises et à 4 heures d'intervalle</li> <li>• Thrombocytopenie &lt; 100G/L</li> <li>• Insuffisance rénale progressive : créatininémie &gt; 97 <math>\mu</math>mol/L ou une créatinémie doublée en l'absence de pathologie rénale</li> <li>• Tests de fonction hépatique supérieurs à &gt;2x la norme, douleur abdominale persistante dans le quadrant supéro-externe droit ou en région épigastrique ne répondant pas à l'antalgie et non-expliquée par une autre étiologie</li> <li>• Œdème pulmonaire</li> <li>• Apparition de symptômes visuels ou neurologiques</li> </ul>
<p><b>CNGOF (2010)</b></p>	<p><b>HTA gravidique (HTG) :</b> PAS &gt;140 mm Hg et/ou PAD &gt;90 mm Hg, survenant après 20 SA et disparaissant avant la fin de la 6ème semaine du postpartum</p> <p><b>Prééclampsie (PE) :</b> association d'une HTG à une protéinurie (&gt; 0,3 g/24h)</p> <p><b>Prééclampsie sévère :</b> PE avec au moins l'un des critères suivants :  HTA sévère (PAS &gt; 160 mm Hg et/ou PAD &gt; 110 mm Hg)  atteinte rénale avec : oligurie (&lt; 500 ml/24h) ou créatinine &gt; 135<math>\mu</math>mol/L, ou protéinurie &gt; 5 g/j  OAP ou barre épigastrique persistante ou HELLP syndrome  éclampsie ou troubles neurologiques rebelles (troubles visuels, ROT polycinétiques, céphalées),  thrombopénie &lt;100 G/L  Hématome Rétro Placentaire (HRP) ou retentissement fœtal.</p> <p><b>PE précoce :</b> survenant avant 32 SA  <b>HELLP syndrome :</b> association de : hémolyse, cytolysse hépatique et thrombopénie.</p>

## 1.5. Tableaux cliniques et conséquences

Il s'agit d'une maladie générale de l'organisme maternel par atteinte de son endothélium vasculaire par diverses substances issues du placenta (Redman and Sargent, 2005).

La prééclampsie se différencie d'une grossesse normale par la présence d'une vasoconstriction généralisée, d'un état inflammatoire plus marqué et d'un état proagulant de type coagulation intravasculaire disséminée (Sibai et al., 2005; Redman and Sargent, 2009). D'abord non détectables, ces anomalies vont finalement s'exprimer et le tableau présenté par la patiente va alors s'aggraver rapidement.

### 1.5.1. Conséquences pour la mère



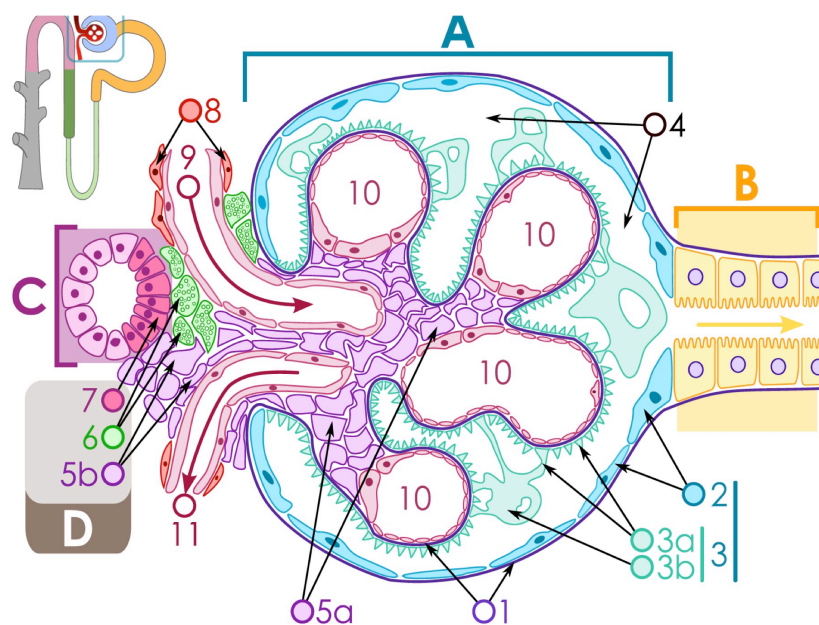
**Figure 1.** Physiopathologie de la prééclampsie. Une maladie générale.

#### 1.5.1.1. Symptômes généraux

La **figure 1** schématise les différents « organes » atteints. La vasoconstriction va conduire à l'apparition d'une hypertension artérielle avec un risque d'hypertension maligne pouvant se compliquer de rupture de vaisseaux cérébraux avec hémorragie méningée et/ou intracérébrale qui assombrit clairement le pronostic vital et fonctionnel maternel. L'association de cette vasoconstriction à une CIVD va favoriser les phénomènes d'ischémie/reperfusion dans divers organes comme le placenta et le foie pouvant conduire

à la constitution d'un hématome rétroplacentaire ou d'un hématome sous capsulaire hépatique au pronostic redoutable pour la mère et l'enfant. Ces phénomènes ischémiques expliquent une autre complication sévère de la prééclampsie : le HELLP syndrome.

### 1.5.1.2. L'atteinte rénale



**Figure 2.** Le glomérule rénal.

*Illustration réalisée par Michal Komorniczak (Pologne),*

*<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5177335>.*

*Diagramme structural d'un glomérule rénal: A – Corpuscule rénal B – Tubule proximal C – Tube contourné distal D – Appareil juxtaglomérulaire 1. Membrane basale glomérulaire 2. Capsule de Bowman – couche pariétale 3. Capsule de Bowman – couche viscérale 3a. Pédicelles du podocyte 3b. Podocyte 4. Chambre urinaire 5a. Mésangium – Cellules intraglomérulaire 5b. Mésangium – Cellules extraglomérulaire 6. Cellules granuleuses de l'appareil juxtaglomérulaire 7. Macula densa 8. Myocytes lisses 9. Artériole afférente 10. Anses capillaires 11. Artériole efférente.*

Elle s'exprime par :

1 - une insuffisance rénale fonctionnelle liée principalement à une baisse du flux plasmatique rénal et du débit de filtration glomérulaire à mettre en lien avec une augmentation des résistances au niveau des artérioles rénales. Sur le plan clinique et biologique cela conduira à une augmentation de la créatininémie et de l'uricémie.

2 - une glomérulopathie avec protéinurie (Maynard et al., 2003; Craici et al., 2013; Penning et al., 2014). Le filtre naturel qui retient les hématies maternelles et les protéines

de grande taille dont l'albumine est constitué de plusieurs éléments dont les podocytes (Pavenstädt et al., 2003) (**figure 2**). Les podocytes sont la principale source locale de VEGF (Pavenstädt et al., 2003). Ils synthétisent par ailleurs diverses protéines dont la néphrine qui installée au pied des podocytes participe au rôle de diaphragme pour empêcher le passage de protéines du sang maternel vers la chambre urinaire (Pavenstädt et al., 2003). Des lésions podocytaires avec diminution ou perte de la synthèse de néphrine, excès d'apoptose, et relargage des débris podocytaires en grande quantité dans les urines ont été décrits dans la prééclampsie (Penning et al., 2014). Ces lésions ainsi que l'endothéliose glomérulaire (cf plus bas) expliquent la présence de la protéinurie.

Un défaut de VEGF semble en être la cause comme le montre l'apparition de ce type de lésions chez l'humain lors de l'utilisation de médicaments anticancéreux de type anticorps anti VEGF (Wu et al., 2010), et comme démontré par l'équipe de Karumanchi qui a injecté à des souris un adénovirus transfecté avec le gène du sFlt-1 qui capte le VEGF circulant (Maynard et al., 2003).

Devant des formes sévères de prééclampsie des patientes ont eu une biopsie rénale généralement dans la période du post partum. L'histologie des pièces de biopsie a permis de mettre en évidence une lésion considérée comme pathognomonique : l'endothéliose glomérulaire (Stillman and Karumanchi, 2007). Celle-ci peut être décrite comme une turgescence des cellules endothéliales du capillaire glomérulaire, qui est parfois telle que la lumière en est occluse. Cette « endothéliose » est souvent associée à d'autres anomalies moins spécifiques, comme l'activation de la coagulation (dépôts de fibrine) ou la perte de la fenestration de l'endothélium. Un travail considéré après sa publication comme non éthique, a montré que l'endothéliose glomérulaire pouvait se retrouver en fin de grossesse chez des patientes présentant une grossesse strictement normale et n'était pas « pathognomonique » de PE (Strevens et al., 2003). Au cours de ces grossesses normales,

l'endothéliose glomérulaire serait due à l'augmentation physiologique du sFlt-1 en fin de grossesse et pourrait expliquer une protéinurie modérée en toute fin d'une grossesse considérée comme normale, ce qui présenterait la prééclampsie comme l'excès d'un processus normal (Strevens et al., 2003).

Les autres atteintes seront abordées plus succinctement.

### **1.5.1.3. L'atteinte cérébrale**

Elle est la conséquence des phénomènes de vasoconstriction et d'ischémie-reperfusion au niveau cérébral. Elle touche prioritairement la zone corticale postérieure et va s'exprimer par des céphalées, des acouphènes, des réflexes ostéotendineux vifs et diffusés et des troubles visuels à type de scotomes ou points scintillants dans le champ visuel – l'aire corticale postérieure est l'aire de la vision -, dans les formes plus sévères un flou visuel ou une cécité corticale. Ces signes précèdent l'éclampsie qui est une crise convulsive généralisée tonico-clonique (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013a). L'imagerie par résonance magnétique permet parfois de retrouver un syndrome de vasoconstriction cérébrale ou un PRES celui-ci correspond à un œdème cérébral vasogénique et s'exprime par des signes neurologiques divers et à l'IRM un hypersignal en T2 et FLAIR (Fischer and Schmutzhard, 2017).

### **1.5.1.4. Le HELLP syndrome**

Ce syndrome décrit en 1982 par Weinstein (Weinstein, 1982) correspond à une forme sévère de prééclampsie qui engage le pronostic vital maternel. Il est caractérisée par une hémolyse, des enzymes hépatiques (transaminases) élevées dans le sang maternel et des plaquettes basses. Ce syndrome sous sa forme complète nécessitera une naissance rapide dans les 48 heures (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013b).



### **1.5.1.5. L'hématome rétroplacentaire**

Sous l'effet de phénomènes de vasoconstriction et d'ischémie-reperfusion, un hématome peut se constituer entre la face maternelle du placenta et l'utérus.

Sous sa forme classique sévère il s'exprime par des métrorragies, une contracture utérine avec arrêt des échanges entre le fœtus et sa mère et une détresse ou un décès fœtal. Pour la mère les troubles de la coagulation généralement associés peuvent être source d'une morbidité importante (Witlin and Sibai, 2001; American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013a).

### **1.5.2. Conséquence pour l'enfant à naître:**

Le placenta dysfonctionnel avec des phénomènes exacerbés d'apoptose et de nécrose (cf § placenta) ne va pas jouer correctement son rôle de fournisseur d'oxygène et de nutriments pour le fœtus.

#### **1.5.2.1. RCIU**

Le RCIU est une cause fréquente de morbidité fœtale et postnatale (Wollmann, 1998) dont les principales étiologies sont l'insuffisance placentaire, le tabac et les causes infectieuses ou génétiques. Les définitions du RCIU sont variables (Chauhan et al., 2009).

La définition la plus simple (Peleg et al., 1998) est celle d'un fœtus de poids inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile mais une part des fœtus petits pour l'âge gestationnel sont en fait constitutionnellement petits et n'entrent pas dans un cadre pathologique (Lausman et al., 2013). A l'inverse des fœtus de poids supérieur ou égal au 10<sup>ème</sup> percentile n'ont en fait pas atteint le poids pour lequel ils étaient génétiquement déterminés, ce sont de vrais RCIU alors même qu'ils ne seront pas dépistés par le seuil > ou < au 10<sup>ème</sup> percentile. La zone de stockage des graisses chez le fœtus se trouve principalement au niveau abdominal aussi la

mesure du périmètre abdominal (PA) est parfois préférée à celle du poids ( $PA < \text{ou} \geq 10^{\text{ème}}$  percentile).

On distingue 2 types de RCIU : le RCIU dysharmonieux c'est à dire avec un conservation de la circonférence céphalique et le RCIU harmonieux où les mensurations fœtales sont diminuées dans leur ensemble y compris le pôle céphalique (Peleg et al., 1998).

Le RCIU dysharmonieux est le plus souvent lié à des apports nutritionnels insuffisant généralement du à une pathologie vasculaire placentaire, alors que le RCIU harmonieux peut être le marqueur d'un simple fœtus constitutionnellement petit ou d'une anomalie chromosomique, cependant ces définitions sont artificielles car si la grossesse se prolonge le RCIU peut devenir harmonieux et certaines anomalies chromosomiques peuvent être associées à un RCIU dysharmonieux. Certains classent les RCIU dont le poids est  $<$  au  $3^{\text{ème}}$  percentile comme sévères (Suhag and Berghella, 2013).

#### **1.5.2.2. Risques à distance**

L'hypoxie chronique est aussi accusée d'induire des modifications épigénétiques aux conséquences néfastes durables après la naissance (Ma et al., 2014; Nomura et al., 2017). Le stress oxydatif maternel semble être aussi transmis au nouveau-né et semble associé à une plus grande morbidité et mortalité (Bharadwaj et al., 2017). La prématurité induite par nécessité pour préserver la santé de la mère et/ou la vie de l'enfant peut participer aux risques de décès néonatal ou de séquelles postnatales chez l'enfant.

### **1.6. Etiologies de la prééclampsie ou « la maladie des hypothèses »**

Pourquoi les patientes peuvent développer une prééclampsie et tout particulièrement au cours de leur première grossesse reste une énigme. Cette « maladie des hypothèses » a vu diverses théories proposées tour à tour sans qu'aucune ne convienne à l'ensemble des cas

présentés. Il est probable que le tableau clinique et biologique de la prééclampsie soit plus la résultante de différentes étiologies que la conséquence d'une cause unique.

Nous aborderons dans le § 1.9. une partie des hypothèses ou situations favorisantes.

**Tableau 2.** Facteurs de Risque de la prééclampsie.

*Adapté du Bulletin Technique de l'ACOG 1996 (ACOG, 1996)*

<b>Facteurs de risque</b>	<b>Odd Ratio</b>
<i>Nulliparité</i>	(3:1)
<i>Age &gt; 40 years</i>	(3:1)
<i>Race noire</i>	(1.5:1)
<i>Antécédents familiaux de prééclampsie</i>	(5:1)
<i>Néphropathie</i>	(20:1)
<i>Hypertension chronique</i>	(10:1)
<i>Syndrome des antiphospholipides</i>	(10:1)
<i>Diabète</i>	(2:1)
<i>Grossesses multiples</i>	(4:1)
<i>Obésité/Surpoids</i>	(3:1)

### 1.7. Facteurs de risque de la prééclampsie

Les facteurs de risque connus de prééclampsie sont listés dans le **tableau 2**. Parmi eux, les principaux facteurs de risque sont la primiparité qui inclut la nulliparité, les antécédents personnels de complications obstétricales de type « vasculaire » comme les antécédents de prééclampsie, et les pathologies maternelles à risque vasculaire.

### 1.8. L'implication du placenta

Il est maintenant admis qu'un dysfonctionnement placentaire est l'élément fondateur de la prééclampsie (Redman and Sargent, 2005; Redman and Sargent, 2009). C'est bien le placenta et non le fœtus qui est le pivot de cette pathologie, comme souligné par le surrisque de prééclampsie en cas de môle hydatiforme partielle ou complète c'est à dire sans embryon présent (Acosta-Sison, 1956).

### **1.8.1. Atteinte placentaire : inflammation, ischémie et stress oxydatif**

Dans la forme classique de la prééclampsie tout particulièrement dans sa forme précoce, le placenta présente des lésions d'ischémie liées à une hypoperfusion placentaire en raison de :

- i) la persistance d'un réseau vasculaire utérin à haute résistance par défaut de colonisation des artères utérines par les cellules trophoblastiques (cf. § implantation),
- ii) un état procoagulant local engendré par l'ischémie (Tannetta and Sargent, 2013)
- iii) un excès de stress oxydatif local (Redman and Sargent, 2009)
- iv) une inflammation locale (Salafia et al., 1995) avec entre autre un excès au niveau placentaire de TNF- $\alpha$ , IL6 et IL17 (Cornelius, 2018).

L'inflammation et l'excès de stress oxydatif peuvent être la conséquence de phénomènes ischémiques et d'ischémie/revascularisation (Redman and Sargent, 2009) mais peuvent aussi être la conséquence de situations extérieures au placenta comme le syndrome métabolique qui induit une présence et/ou une synthèse locale placentaire de TNF- $\alpha$  et d'interleukines proinflammatoires (Chen et al., 1996; Lau et al., 2013; Palei et al., 2015; Kim et al., 2010).

L'ischémie, le stress oxydatif et l'inflammation vont conduire au niveau placentaire, à une nécrose et une apoptose augmentées (Haider and Knöfler, 2009; Garcia-Lloret et al., 2000). Des débris membranaires trophoblastiques et des composants cellulaires sont alors libérés en excès dans la circulation maternelle (Knight et al., 1998; Tse et al., 2004; Redman and Sargent, 2005; Redman and Sargent, 2009; Sibai et al., 2005) et ont un effet délétère sur l'endothélium vasculaire maternel générant une vasoconstriction, un état procoagulant et une perméabilité capillaire anormale (Sibai et al., 2005). L'ischémie placentaire va aussi induire la surexpression placentaire de sFlt-1 (Nagamatsu et al., 2004;

Li et al., 2005a) qui favorisera la survenue des signes cliniques de prééclampsie (cf § 2.5).

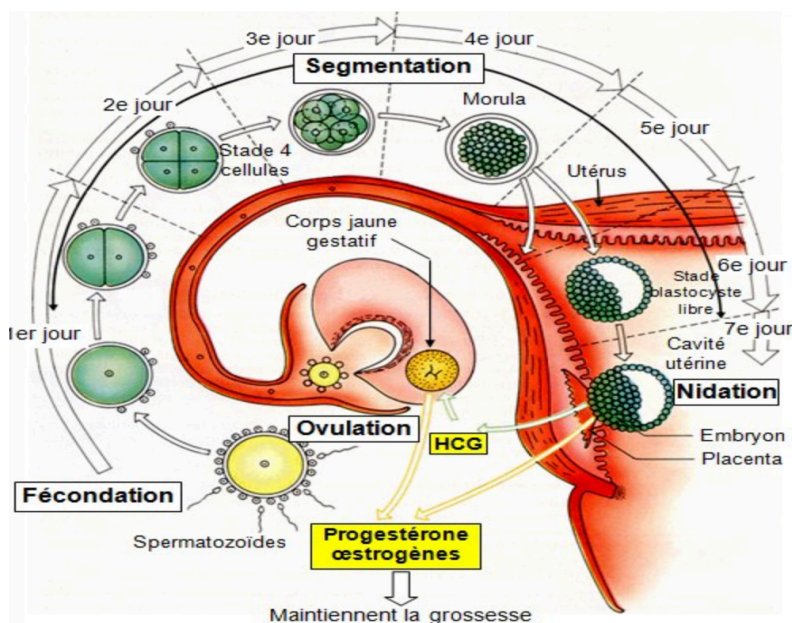
Un cercle vicieux s'installe potentialisant le tableau clinique et biologique.

## 1.8.2. Implantation placentaire

Les anomalies au niveau placentaire qui conduiront à un tableau de prééclampsie s'installent bien avant les signes cliniques. Une des anomalies la plus souvent retrouvée au cours des formes précoces de prééclampsie est une colonisation insuffisante des vaisseaux utérins maternels endométriaux et myométriaux. Pour comprendre ce qui se fait imparfaitement, il est nécessaire de faire un rappel sur l'implantation normale du placenta.

### 1.8.2.1. Phénomènes d'apposition et de pénétration de l'oeuf

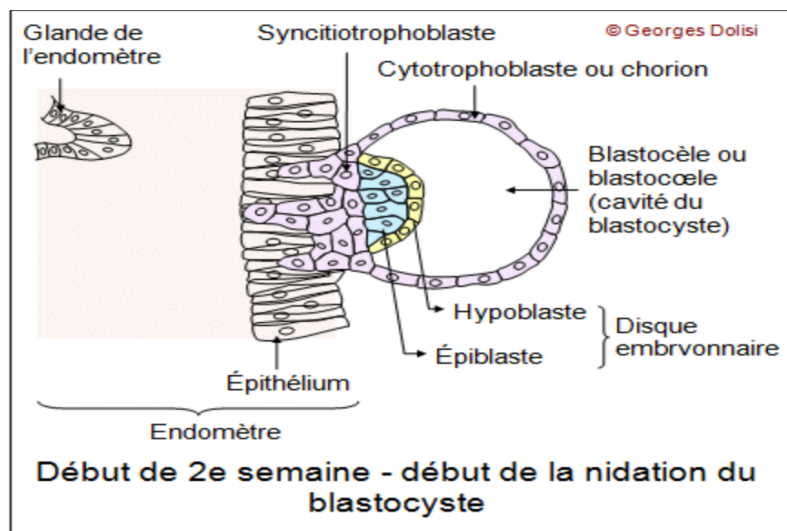
Les éléments décrits dans ce paragraphe résument une revue de la littérature (Staun-Ram and Shalev, 2005). Lors d'une grossesse normale spontanée (**figure 3**), l'œuf formé dans la trompe arrive depuis celle-ci dans la cavité utérine, dès le 5<sup>ème</sup>/6<sup>ème</sup> jour. Le trophoblaste s'accroche alors à l'endothélium utérin.



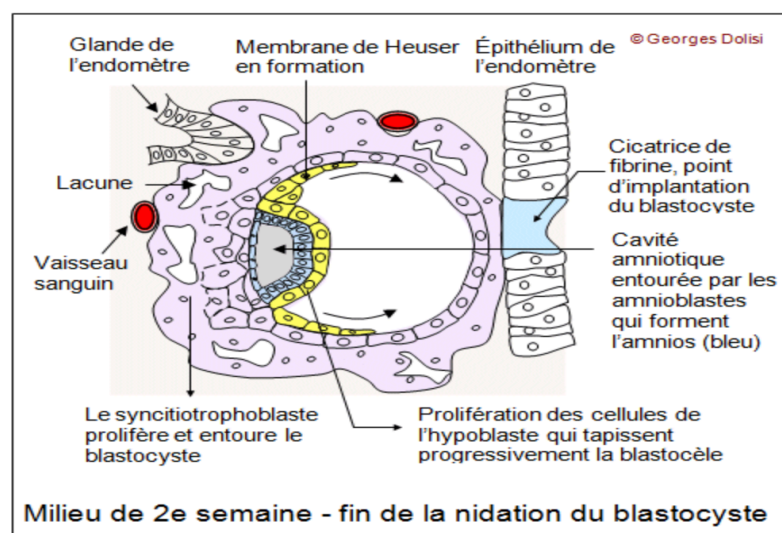
**Figure 3.** De la fécondation à la nidation.

*Avec la permission de Mr G. Dolisi, site BioTop.*

Après ce phénomène d'adhésion, les CTs qui sont disposés en cercle autour de l'œuf et forment une couche irrégulière, se multiplient et fusionnent donnant naissance aux STs invasifs qui forment une couche externe multinucléée. Ces STs induisent une apoptose des cellules endométriales favorisant la création d'une brèche qui permet la pénétration de l'œuf dans l'endomètre décidualisé (**figure 4.A**). Secondairement des lacunes apparaissent dans le tissu syncytial et entre ces lacunes des villosités se développent dès le 13<sup>ème</sup> jour (**figure 4.B**). Elles correspondent à des colonnes de CTs entourées d'une couche de STs qui progressent vers l'endothélium utérin.



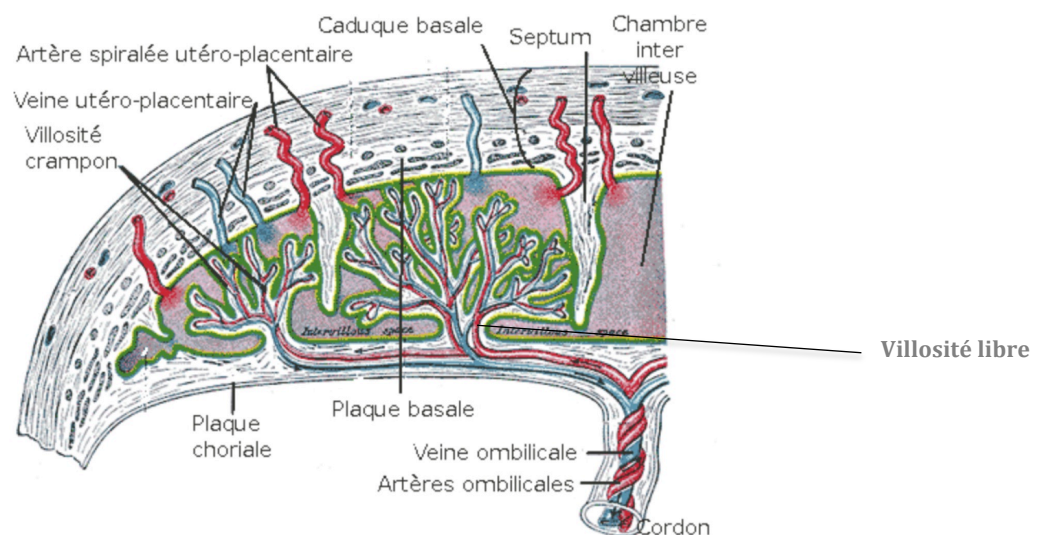
4.A



4.B

**Figure 4.** Implantation trophoblastique.  
Avec la permission de Mr G. Dolisi, site BioTop.

Le mésoblaste extra-embryonnaire pénètre dans le tronc des villosités les transformant en villosités secondaires puis ce mésoblaste se différencie en vaisseaux qui se connectent à ceux de l'embryon les villosités sont alors dites tertiaires. La future circulation fœtale se met elle en place au sein de ces travées et devient opérationnelle dès le 21<sup>ème</sup> jour de grossesse. Les STs érodent les vaisseaux maternels permettant ultérieurement le remplissage des lacunes appelées « chambres intervillieuses ». Les villosités vont se ramifier, certaines comparables aux branches d'un arbre seront libres et flotteront dans les chambres intervillieuses (villosités flottantes) alors que d'autres vont s'ancrer sur l'endothélium utérin (villosités crampons) (**figure 5**). Au bout des villosités crampons, s'installe des CTs prolifératifs en colonnes (en forme de « coquillages »). Cette prolifération de CTs est en contact direct avec l'organisme maternel car la couche de STs au pied des villosités crampons est repoussée latéralement.



**Figure 5.** Chambres intervillieuses et villosités placentaires.

Source *wikipédia*.

### 1.8.2.2. Phénomènes de migration des cellules trophoblastiques

Des CTs appelés CTEVs vont secondairement se détacher de ces colonnes et migrer dans l'endomètre décidualisé<sup>1</sup>, puis le 1<sup>er</sup> tiers du myomètre, avant de former dans ce dernier des agrégats de cellules multinucléées (cellules géantes) ou de migrer vers les vaisseaux maternels (**cf figure 1, article 1**). Les CTEVs ont acquis alors un phénotype invasif qui facilite leur pénétration dans les vaisseaux maternels puis à l'intérieur des vaisseaux, les CTEVs vont exprimer des molécules d'adhésion qui leur donneront des caractéristiques de phénotype endovasculaire (Zhou et al., 1997; Merviel et al., 2001; Challier and Uzan, 2003).

### 1.8.3. Phénomènes de remodelage des vaisseaux utérins

L'invasion des vaisseaux maternels reste encore l'objet de discussion. Il semble cependant qu'elle se fasse de 2 manières, par voie endovasculaire avec des CTs ayant envahi la circulation maternelle depuis l'abouchement des vaisseaux maternels au niveau des chambres intervilleuses mais aussi par voie interstitielle. Dans ce cas là les CTEVs vont pénétrer le vaisseau de l'extérieur vers l'intérieur (Norwitz et al., 2001; Lunghi et al., 2007). Chez l'humain et certains primates c'est cette dernière voie qui semble privilégiée, obligeant ces CTEVs à composer avec les cellules maternelles de l'immunité (en particulier les dNK) qui les laisseront ou non progresser (Carter et al., 2015).

Le phénomène d'invasion et de transformation de la paroi des vaisseaux se fait en 2 étapes.

#### 1.8.3.1. 1ère phase du remodelage : les plugs

Lors de la première étape, il existe des bouchons de CTs (appelés plugs par les anglo-saxons) qui obstruent la lumière des vaisseaux et conduisent à un environnement hypoxique nécessaire pour la néoangiogenèse de l'unité embryon-placenta (Foidart et al.,

---

<sup>1</sup> Transformation des fibroblastes du stroma en cellules épithélioïdes et œdème du stroma



1992). Ces obstructions vasculaires conduisent à une hypoxie tissulaire engendrant une surexpression locale de HIF-1 $\alpha$  (Pringle et al., 2010). Celui-ci va induire l'expression de gènes ayant une séquence HRE comme celui du VEGF (Liu et al., 2002) permettant une prolifération cellulaire et une néoangiogénèse (Wheeler et al., 1995) et celui du TGF $\beta$ 3 inhibant la différenciation cellulaire (Challier and Uzan, 2003). Cette phase initiale d'hypoxie tissulaire est fondamentale (Challier and Uzan, 2003). Localement les vaisseaux utérins perdent leur couche musculaire lisse.

L'invalidation du gène du HIF-1 $\alpha$  ou celle du VEGF induit des morts embryonnaires précoces avec entre autre des malformations vasculaires (Kotch et al., 1999). Une étude cas témoins incluant des patientes au premier trimestre de grossesse avec embryon mort ou anormalement absent « œuf clair » et grossesse normale, appariées par l'âge gestationnel, a montré après évaluation des flux sanguins des vaisseaux utérins myométriaux par Doppler couleur, que les grossesses pathologiques avaient un flux sanguin anormalement élevé (Jauniaux et al., 1994). L'histologie placentaire réalisée montrait une dislocation des « coquillages trophoblastiques » au pied des villosités crampons et une insuffisance de transformation des artères spiralées utérines (Jauniaux et al., 1994).

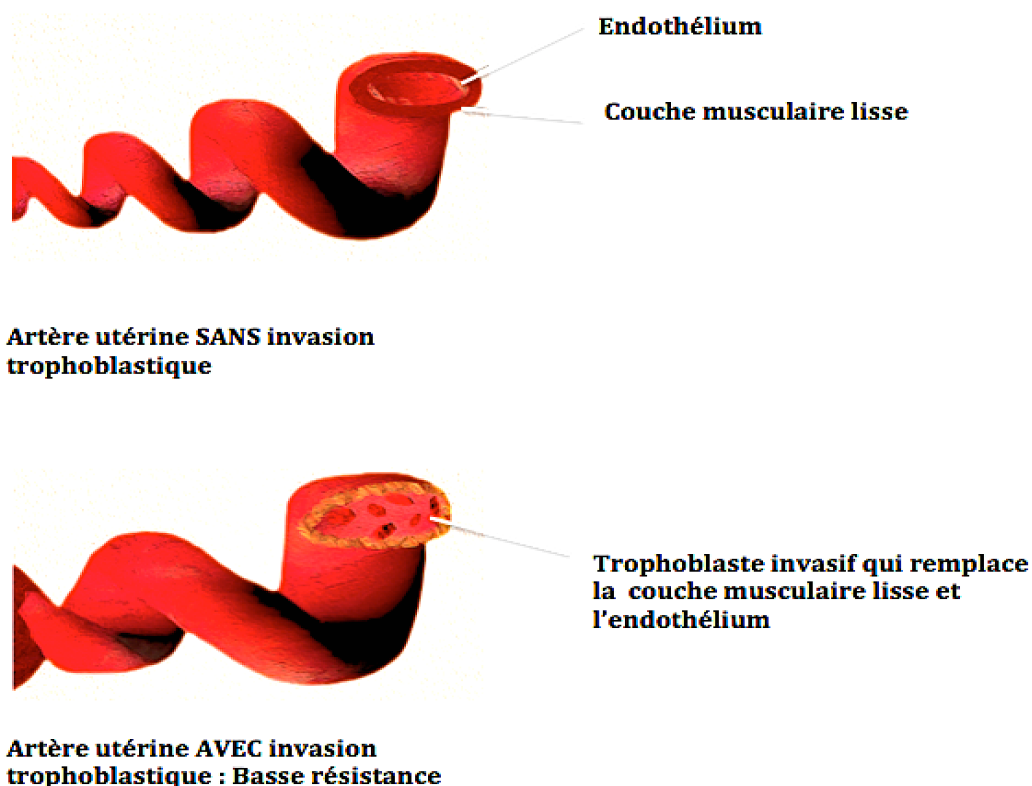
#### **1.8.3.2. 2ème phase du remodelage : des vaisseaux atones**

La deuxième phase d'invasion est marquée par la disparition des bouchons trophoblastiques rétablissant ainsi un environnement normoxique chez des patientes dont les vaisseaux sont devenus atones. La couche musculaire lisse des vaisseaux endométriaux et myométriaux disparaîtra de la fin de l'invasion trophoblastique jusque quelques jours après l'accouchement. Ce que deviennent ces cellules musculaires est encore un sujet de controverse, apoptose au contact des CTEVs ou autres cellules ou bien dé-différenciation,

en tout état de cause, elles ne sont plus visibles lors d'une analyse histologique et sont remplacées par des CTEVs et des dépôts fibrinoïdes (Pijnenborg et al., 2006) (**figure 6**).

La conséquence de cela est un vaisseau de plus grand diamètre atone qui ne répondra pas aux hormones vasopressives tel que le système rénine-angiotensine - qui est activé au cours de la grossesse normale (Whitley and Cartwright, 2009; Wallace et al., 2012).

Ce remodelage permettra un flux sanguin très important au niveau des artères utérines et donc un apport conséquent d'oxygène et de nutriments à l'unité foetoplacentaire ce qui est indispensable à la croissance rapide de cette unité.



**Figure 6.** Remodelage des artères utérines.

Certains considèrent que cette 2ème phase est le plus souvent terminée vers 18/20 SA (Pijnenborg et al., 1983). Cette transformation de vaisseaux de haute à basse résistance est

évaluable par la réalisation de mesures des vitesses sanguines par la réalisation d'un Doppler aux artères utérines.

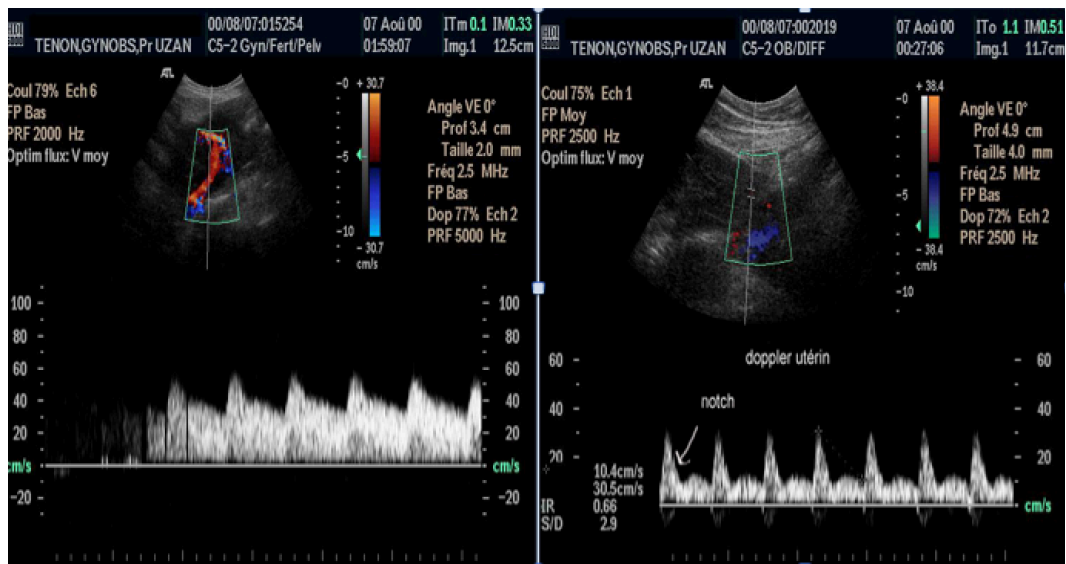
### **1.8.3.3. Défaut d'invasion trophoblastique au cours de la prééclampsie**

Pour des raisons encore inconnues, l'invasion trophoblastique peut être insuffisante, elle est alors dénommée par les anglo-saxons « shallow invasion ». La cause pourrait être une baisse de tolérance immunologique de l'organisme maternel envers l'unité foetoplacentaire (Yeh et al., 2013). Ce type d'anomalies a aussi été décrit dans des situations d'avortements spontanés du 1er trimestre. Ces anomalies s'accompagnent de couches cytotrophoblastiques disloquées au pied des villosités crampons et d'un développement placentaire (trophoblaste et néoangiogénèse) insuffisant (Goldman-Wohl and Yagel, 2002). En l'absence d'un remodelage des vaisseaux les apports en oxygène seront insuffisants ou irréguliers alternant hypoxie et superoxie pour l'unité foetoplacentaire générant une ischémie placentaire qui induit un relargage anormalement élevé de débris membranaires et composants de cellules trophoblastiques dans la circulation maternelle (Knight et al., 1998; Tse et al., 2004).

### **1.8.3.4. Application clinique : Le Doppler aux artères utérines**

Chez les femme non enceintes ou au tout début de leur grossesse on met en évidence sur le spectre Doppler aux artères utérines, des vitesses très diminuées juste après le pic systolique et avant le pic diastolique. En effet si les fibres musculaires restent présentes, elles seront étirées par la puissance de l'onde de pression systolique du flux sanguin puis se contracteront juste après leur étirement. Sur le spectre obtenu, ces vitesses basses lors de cette contraction, dessineront une incisure protodiastolique plus ou moins profonde appelée « notch » (**figure 7. droite**). Par contre si l'implantation et le remodelage vasculaire se font

de manière physiologique, on observera au cours de la grossesse une disparition du notch (**figure 7. gauche**). La persistance de notchs et/ou d'index de résistance élevés de manière bilatérale sont des marqueurs de risque accru de prééclampsie, de RCIU vasculaire, et de MFIU (Giordano et al., 2010).



**7.gauche.**

**7.droite.**

**Figure 7.** Doppler aux artères utérines en 2<sup>ème</sup> partie de grossesse.

*7.gauche. : spectre normal : disparition du notch. 7.droite. : spectre pathologique : persistance du notch.*

#### 1.8.4. La prééclampsie : une maladie spécifique au placenta humain

Une des particularités de la prééclampsie qui freine les avancées scientifiques est son caractère humain. En effet, puisque la prééclampsie est une pathologie du placenta, tous les mammifères devraient être touchés puisque par définition ils sont caractérisés par la présence d'un placenta. Or chez les mammifères hormis les humains, seuls quelques primates (Patas Monkey, singes Rhesus, Babouins, ..) peuvent présenter des tableaux de prééclampsie spontanée (Palmer et al., 1979; Krugner-Higby et al., 2009; Hennessy et al., 1997)(Carter et al., 2015). Les autres mammifères ne présentent pas de prééclampsie en dehors de quelques modèles animaux qui répondent à une hypothèse testée précise et qui

ne reflètent que partiellement le tableau de prééclampsie humaine (Maynard et al., 2003; Kanasaki et al., 2008; Podjarny et al., 2004; Fushima et al., 2016).

Identifier les éléments de la grossesse et du placenta partagés par les humains et les primates susceptibles de présenter une prééclampsie et ceux qui les différencient des autres mammifères pourrait être une voie de recherche originale.

Trois points partagés par les humains et quelques primates et non retrouvés chez les autres mammifères nous semblent essentiels :

- i) la profondeur de l'invasion utérine par les CTEVs*
- ii) le remodelage important des vaisseaux utérins*
- iii) la localisation placentaire de la stéroïdogénèse pendant la grossesse.*

#### **1.8.4.1. La profondeur de l'invasion trophoblastique**

En effet l'invasion trophoblastique – sauf pour le rat – est beaucoup plus superficielle chez les autres mammifères comparée à celle retrouvée chez les humains et les primates (Podjarny et al., 2004; Carter, 2011).

#### **1.8.4.2. Le remodelage des vaisseaux utérins**

Le remodelage vasculaire est absent ou très peu développé chez les autres mammifères. L'équipe de Pijnenborg suggère que c'est le développement du cerveau fœtal au fur et à mesure de l'évolution des espèces, qui a nécessité un remodelage plus important des artères utérines maternelles chez les humains et quelques primates afin que l'apport en oxygène soit suffisant (Carter et al., 2015).

De plus la colonisation des artères utérines dans l'espèce humaine et chez les grands singes se ferait principalement par voie interstitielle depuis l'endomètre alors que chez les autres mammifères les CTEVs coloniseraient principalement les vaisseaux maternels par voie

endovasculaire en pénétrant directement dans la circulation maternelle depuis les villosités sans trajet intra endométrial (Carter et al., 2015). D'ailleurs l'apparition du HLA-C nécessaire d'une part au cross-talk entre CTEVs et cellules dNK maternelles et d'autre part au remodelage des artères utérines ne se produit dans l'évolution des mammifères qu'à partir de l'orang-outan et se retrouve chez les bonobos, gorilles, chimpanzés et humains (Carter, 2011). Ce trajet obligatoire au sein de l'endomètre et du myomètre chez l'humain et certains primates crée une rencontre entre les CTEVs et les cellules de l'immunité maternelle (dNK et autres) qui seront ou non tolérantes (Carter et al., 2015).

#### **1.8.4.3. Le lieu de la stéroïdogénèse**

Un autre point essentiel sépare les grossesses des mammifères, c'est le lieu de la stéroïdogénèse. En effet, chez les humains et quelques primates, le placenta remplace la fonction endocrine des ovaires et devient avant la fin de la 9<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée, le principal voire le seul lieu de la synthèse des oestrogènes et des progestatifs (Castracane and Goldzieher, 1986; Devroey et al., 1990). De ce fait tout dysfonctionnement placentaire risque d'entraîner des anomalies de synthèse des stéroïdes, or ces hormones sont capitales pour le maintien de la grossesse et la croissance normale de l'unité foetoplacentaire. Ce point sera détaillé ultérieurement.

### **1.9. Bases physiopathologiques de la prééclampsie**

#### **1.9.1. Généralités**

Les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la prééclampsie et qui vont mener aux signes cliniques et biologiques ne sont pas clairement connus. On peut cependant affirmer que le placenta est l'élément central générateur de l'apparition d'une prééclampsie.

Une grossesse même non embryonnée peut être associée à une prééclampsie et le retrait du placenta (accouchement) est le seul traitement curatif connu.

Parmi les difficultés pour comprendre ce qui est causal de ce qui est conséquence au niveau placentaire et qu'il s'agit d'une maladie humaine, rendant inopérant les modèles animaux ou en tout cas insuffisamment informatifs et le caractère évolutif des phénomènes d'invasion et de placentation. Enfin, l'étude histologique du placenta chez les humains ne peut se faire qu'après l'accouchement alors que les processus d'invasion trophoblastique et de remodelage des artères utérines surviennent très tôt au cours de la grossesse.

La prééclampsie est marquée par un état anormalement ischémique et/ou inflammatoire et/ou de stress oxydant du placenta qui va conduire à une dysfonction placentaire source de production anormale de protéines et stéroïdes. Ces taux anormaux de protéines et/ou stéroïdes pourraient participer à la survenue du syndrome maternel. Les phénomènes d'ischémie/revascularisation donc l'alternance hypoxie/superoxye ou normoxie sont peut être aussi au moins inducteurs de prééclampsie que la seule ischémie placentaire (Hung et al., 2002) En parallèle en ne fournissant pas en quantité adéquate au fœtus les nutriments et l'oxygène nécessaire à son développement, ce placenta pathologique va conduire à un ralentissement du métabolisme oxydatif fœtal et à un RCIU, et à une souffrance fœtale chronique voire aigue avec risque de décès in utero ou postnatal (cf § 1.5.2.1). Cet état ischémique et inflammatoire placentaire peut être induit par une implantation anormale avec remodelage insuffisant ou absent des artères utérines comme décrit dans le paragraphe précédent. Les prééclampsies précoces représentent la majorité de ce groupe et les formes les plus redoutées (Valensise et al., 2008).

Cependant toutes les prééclampsies ne peuvent être expliquées par un trouble de l'implantation et du remodelage utérin. L'action d'intervenants extérieurs comme le syndrome métabolique, ou les infections placentaires ou générales (Trogstad et al., 2001)

peuvent être aussi à l'origine d'un état proinflammatoire exagéré systémique mais aussi placentaire conduisant à une altération du placenta. Certaines situations maternelles comme l'obésité, le diabète ou l'hypertension chronique sont connues comme associées à la prééclampsie alors même qu'il n'existe pas de troubles de l'implantation chez ces patientes. Les prééclampsies dans ce cas sont le plus souvent d'apparition tardives et liées à un état inflammatoire et proapoptotique des cellules trophoblastiques comme détaillé dans les paragraphes suivants.

## **1.9.2. Situations cliniques, facteurs de risque de prééclampsie**

### **1.9.2.1. L'obésité**

Aux Etats Unis où l'obésité est un problème majeur de santé, deux tiers des femmes en âge de procréer sont en surpoids (Flegal et al., 2010). La localisation de la graisse a aussi son importance, c'est la graisse abdominale qui est le plus associée aux complications cardiovasculaires, incluant la prééclampsie. On a longtemps cru que les adipocytes étaient les cellules pivot de ces complications. Il semble qu'en fait ce soient les macrophages qui résident dans le tissu adipeux qui soient les vecteurs de l'état inflammatoire local via une synthèse de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 mais qui peuvent aussi synthétiser diverses molécules telles que la leptine ou l'adiponectine ((Fain, 2006)) et convertir les androgènes en estrogènes car ils expriment l'aromatase (Harada et al., 1993). Il a été montré que les femmes obèses enceintes ou non présentent une synthèse locale excessive de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 dans le tissu adipeux (Fain, 2006; Berg and Scherer, 2005). Elles ont aussi des taux circulants élevés de leptine et par contre des taux bas d'adiponectine (Turgut et al., 2015). Tout ou partie de la production excessive de leptine serait liée à la synthèse locale de molécules de l'inflammation (Fain, 2006).



La leptine induirait une insulino-résistance et participerait à l'état pro-inflammatoire général (Sethi and Hotamisligil, 1999; Kern et al., 2001; Berg and Scherer, 2005; Fain, 2006; Shoelson et al., 2006). Si il n'est pas admis par tous que les taux de leptine soient élevés au cours de la prééclampsie (Miehle et al., 2012), les femmes obèses avec prééclampsie présentent elles, des taux de leptine plus élevées que leurs contrôles (Turgut et al., 2015). De même, comme montré par Palei *et al.*, une perfusion de leptine à des rates gestantes sans pathologie induit une augmentation des pressions artérielles et une augmentation de la synthèse de TNF- $\alpha$  placentaire (Palei et al., 2015). Cette surexpression de TNF- $\alpha$  induite par la leptine conduit à une augmentation de l'apoptose trophoblastique (CTs et STs) (Garcia-Lloret et al., 2000; Haider and Knöfler, 2009; Higgins et al., 2013). Il est intéressant d'observer que Coya *et al* qui ont perfusé des placentas humains à terme avec différentes doses de leptine ont montré une diminution de la synthèse d'E2 dose-dépendante (Coya et al., 2006).

#### 1.9.2.2. Diabète

Le diabète est un facteur associé à la prééclampsie. L'insulino-résistance est le point clé du diabète gestationnel et du diabète de type II, mais joue aussi un rôle dans le diabète de type I (American Diabetes Association, 2004; Kaul et al., 2015). Un état pro-inflammatoire général est à l'origine d'une insulino-résistance principalement par le biais de cytokines inflammatoires dont le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (Makki et al., 2013). Il est à noter que l'hyperinsulinémie maternelle et foetales vont avoir des effets négatifs sur la fonction placentaire en affectant entre autre la synthèse des stéroïdes (Nestler, 1987; Hiden et al., 2006; Desoye and Hauguel-de Mouzon, 2007; Uzelac et al., 2010; Morisset et al., 2013). Nestler (Nestler, 1987) a décrit que l'insuline inhibait l'expression de l'aromatase. Uzelac *et al.* (Uzelac et al., 2010) ont rapporté chez des femmes enceintes avec diabète

gestationnel, une diminution de la concentration de la protéine CYP19 sans changement des taux d'ARNm comparée à d'autres femmes sans diabète gestationnel suggérant ainsi une action post-transcriptionnelle.

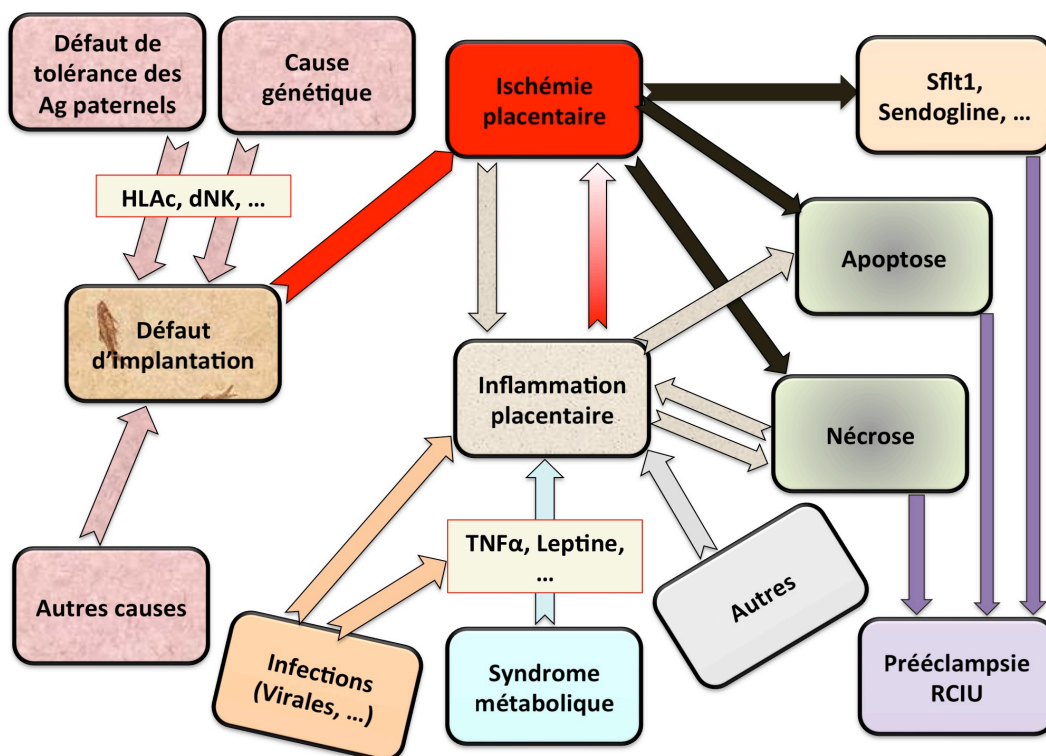
### **1.9.2.3. Hypertension chronique**

L'HTA chronique est une pathologie chez 3% à 5% des femmes enceintes (Seely and Ecker, 2014). Une des causes les plus probables de l'HTA chronique est un excès de stress oxydatif et d'état pro-inflammatoire systémique (Solak et al., 2016) à l'inverse l'HTA peut être source de stress oxydatif. Ce statut inflammatoire va induire une dysfonction endothéliale maternelle généralisée ainsi qu'au niveau placentaire. Ces phénomènes peuvent conduire alors à une apoptose/nécrose trophoblastique et un état prothrombotique et de vasoconstriction maternelle.

### **1.9.2.4. L'infection**

L'association entre prééclampsie et maladie infectieuse a aussi été étudiée mais les résultats ne sont pas clairs. La prééclampsie a été décrite comme la conséquence possible d'une maladie infectieuse (Trogstad et al., 2001; Amarasekara et al., 2015) dont l'agent varie d'une étude à l'autre, tour à tour, le CMV (Xie et al., 2010), l'EBV (Elliott et al., 2016), le chlamydiae trachomatis (Haggerty et al., 2013; Mosbah and Nabel, 2016) ou pneumoniae (Soydinc et al., 2013), l'helicobacter pylori (Mosbah and Nabel, 2016), et même une periodontite bactérienne (Badran et al., 2015; Soucy-Giguère et al., 2016). Les résultats apportés par des études cas-témoins de petites taille sont contradictoires (Zhang and Zhang, 2012; Haggerty et al., 2013; Soydinc et al., 2013) et insuffisamment convaincants à ce jour. Néanmoins une théorie uniciste pourrait réunir l'ensemble de ces études en évoquant l'inflammation locale endo-utérine ou générale qui comme pour le

syndrome métabolique pourrait être un facteur d'inflammation placentaire source de dysfonctionnement placentaire puis maternel. D'autres travaux sont nécessaires pour étudier ce point précis.



**Figure 8.** Physiopathologie de la prééclampsie (hors troubles de la stéroïdogénèse). Ce schéma intègre les hypothèses « étiologiques » de la prééclampsie.

- i) Un défaut d'implantation, fréquemment retrouvé lors des prééclampsies précoces et qui pourrait être la conséquence d'un trouble de la tolérance des antigènes paternels ou d'une cause génétique influant sur le « cross-talk » entre cellules trophoblastiques et cellules de l'immunité maternelle (tout particulièrement, HLA-C et natural killer déciduaux (dNK).
- ii) Le syndrome métabolique plutôt retrouvé dans les formes tardives de prééclampsie.
- iii) Les infections virales, bactériennes périodontales qui peuvent agir localement par un effet inflammatoire.
- iv) Un encart, causes non connues est aussi noté.

### 1.9.3. Déséquilibre entre facteurs angiogéniques/anti-angiogéniques

Le déséquilibre de la balance facteurs angiogéniques/antiangiogéniques au profit d'un état antiangiogénique que nous allons décrire dans le paragraphe suivant fait partie intégrante de la physiopathologie de la prééclampsie (**figure 8**). Les stéroïdes pourraient aussi être impliqués. Leur implication potentielle va être longuement détaillée plus bas. La **figure 8** propose une synthèse de la physiopathologie de la prééclampsie.

# **Des facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques impliqués dans la prééclampsie**

## **VEGF, PlGF, sFlt-1, Sendogline, HCG**

### **2.1. Généralités**

Les facteurs angiogéniques VEGF-A et PlGF sont très importants au cours de la grossesse (Rana *et al.*, 2013) et la mise en évidence au cours de la prééclampsie d'une surexpression placentaire du récepteur soluble du VEGF de type I (sFlt1) qui contrecarrent leurs effets ainsi que ceux du PlGF a été un tournant dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette pathologie.

### **2.2. Le VEGF**

Il est un des principaux régulateurs de la croissance de l'angiogénèse et des vaisseaux sanguins et induit une perméabilité capillaire.

#### **2.2.1. Généralités**

La famille du VEGF inclus 7 facteurs (dont il existe différentes isoformes) : le VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, svVEGF- (snake venom VEGF) et le PlGF. Le gène codant pour VEGF se situe sur le chromosome 17 et celui codant pour PlGF sur le chromosome 14. Le rôle du VEGF est fondamental car la perte d'un seul allèle est létale chez la souris (Carmeliet *et al.*, 2001).

Le VEGF-A est le plus étudié et le plus impliqué dans la prééclampsie. Il comporte 9 isoformes obtenus par épissage alternatif permettant la synthèse de protéine de 121 à 206 acides aminés, une des isoformes, le VEGF<sub>165b</sub>, a un effet antagoniste sur l'angiogénèse (Woolard *et al.*, 2004). L'isoforme principalement sécrétée est le VEGF-A<sub>165</sub>. Il s'agit d'une glycoprotéine dimérique d'environ 34 à 42 kDa liée par des ponts disulfures (Hoeben *et al.*, 2004). L'épissage alternatif porte sur 2 des 8 exons, le 6 et le 7, qui

lorsqu'ils sont présents favorisent la fixation aux protéoglycanes membranaires via le domaine de liaison à l'héparine codée par l'exon 6 qui détermine la liaison à la matrice extracellulaire. Par conséquent les isoformes contenant ce domaine (VEGF- A<sub>145</sub> , VEGF- A<sub>189</sub> , et VEGF- A<sub>206</sub>) sont liés étroitement à des protéoglycanes contenant de l'héparine de surface cellulaire dans la matrice extracellulaire, alors que ceux qui n'ont pas ce domaine sont sécrétés, tel le VEGF- A<sub>165</sub>, qui contient seulement une région de liaison à l'héparine codée par l'exon 7 (Houck et al., 1991; Robinson and Stringer, 2001). Les taux circulants du VEGF sont très bas au cours de la grossesse normale ou compliquée de PE et se situent dans une zone où la majorité des kits ELISA ne sont ni linéaires ni sensibles, la mesure du VEGF n'apparaît de ce fait pas utilisable. Le VEGF est synthétisé par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Pan et al., 2010), les lymphocytes T activés et d'autres cellules comme les cellules trophoblastiques (CTs et STs), les glandes décíduales et les macrophages de la décídua (Clark et al., 1996; Shore et al., 1997; Berkane et al., 2017) ainsi que les cellules tumorales (Barr et al., 2005). Il est nécessaire pour la formation des vaisseaux (vasculogénèse) et la néoangiogénèse (Millauer et al., 1993). Il est aussi un des plus puissants promoteurs de la perméabilité capillaire (50 000 fois plus puissant que l'histamine par exemple) (Senger et al., 1990).

### **2.2.2. La régulation du gène du VEGF**

Le VEGF a une régulation multiple et complexe. L'hypoxie est un important stimulant de la synthèse d'ARNm du VEGF que ce soit in vitro ou in vivo. L'induction hypoxique passe pour partie par le facteur HIF-1 $\alpha$  (Forsythe et al., 1996). En effet, il existe un site de liaison de HIF-1 $\alpha$  sur le promoteur du gène du VEGF ainsi qu'une séquence accessoire pour HIF-1 $\alpha$  dans la zone de réponse à l'hypoxie (HRE). L'estradiol (Mueller et al., 2000) et la progestérone (Mueller et al., 2003) stimulent aussi la synthèse de VEGF dans le tissu

utérin et les tissus hormonosensibles. Le gène du VEGF contient un variant ERE {Mueller:2000kk} (cf § récepteurs aux oestrogènes) et peut donc être régulé par la fixation du couple oestrogène/ER. Il possède aussi au moins 3 séquences PRE (cf § récepteurs à la progestérone) et il semble que la présence des 3 soit nécessaire pour que la progestérone, ou autres ligands agonistes, permettent une expression optimale de VEGF (Mueller et al., 2003). Cependant, l'absence de ces PRE ne bloque pas complètement l'expression de VEGF induite par la progestérone, faisant supposer la possibilité d'autres voies de régulation via des facteurs de transcription comme Sp1 ou AP-1, car le promoteur du gène du VEGF contient des sites Sp1 et AP-1 (Mueller et al., 2003).

### **2.3. Le PlGF**

Le PlGF est un facteur de croissance protéique qui fait partie de la famille des VEGF. Il a une grande homologie dans sa composition en acides aminés avec le VEGF-A (42 % environ). Il a été découvert en 1991 à partir de tissu placentaire où il est synthétisé en grande quantité (Maglione, 1991). Cependant de nombreux autres tissus, tout particulièrement les tumeurs, mais aussi le cerveau, le poumon, le squelette, les cellules endothéliales du derme et les péricytes rétiens peuvent le synthétiser (Yonekura et al., 1999) en faible quantité en situation normale et en grande quantité en cas d'hypoxie ou d'inflammation (Fischer et al., 2008). Pendant la grossesse, les CTs, les STs et les CTEVs ainsi que les cellules déciduales (Clark et al., 1996), et les dNK (Hanna et al., 2006) peuvent sécréter du PlGF. Son gène se situe sur le chromosome 14 et contient 7 exons. Au moins 4 isoformes ont été caractérisées, résultant d'épissage alternatif de l'ARN. Comme pour le VEGF certaines isoformes vont interagir avec la membrane extra cellulaire en fonction de leur liaison à l'héparine (PlGF-2 et PlGF 4), PlGF 1 et PlGF 3, sont elles les principales formes circulantes (Lecarpentier et al., 2016). Le PlGF favorise l'angiogénèse

et la lymphangiogénèse ainsi que la migration cellulaire de même que la stimulation des progéniteurs de la moelle osseuse (Li et al., 2006). Les taux de PlGF circulant augmentent régulièrement au cours des 2 premiers trimestres et baissent après 32 SA (Levine et al., 2004 ; Verlhoren et al., 2014). Cependant en dehors de la grossesse, le PlGF n'est pas indispensable en situation physiologique. En effet, les animaux invalidés pour PlGF sont vivants en bonne santé et sont fertiles (Carmeliet et al., 2001). L'effet du PlGF apparaît dans les situations pathologiques tels que le stress hypoxique, l'inflammation, le cancer et bien sûr pendant la grossesse (Carmeliet et al., 2001). Il est important de noter que lors d'une situation d'hypoxie si la synthèse de PlGF est augmentée dans tous les organes et les tumeurs (Green et al., 2001), il n'en est pas de même pour le placenta. Le GCM1 qui est un important facteur de transcription du PlGF dans les cellules trophoblastiques a une dégradation élevée sous l'effet de l'hypoxie, ceci va induire alors une baisse de la synthèse du PlGF placentaire (Chen et al., 2004)(Chiang et al., 2009). Aussi la baisse du PlGF pendant une prééclampsie aura 2 origines, à la fois une captation par le sFlt-1, mais aussi un défaut de synthèse. A l'inverse les contraintes de cisaillement liées au flux sanguin maternel utérin perçues jusque dans les chambres intervilluses semble promouvoir la synthèse de PlGF par les STs (Lecarpentier et al., 2016).

#### **2.4. Les récepteurs membranaires VEGFR1 et VEGFR 2**

Le VEGF a 3 récepteurs membranaires tyrosine kinase VEGFR.1-3 (**figure 9**) et d'autres (neuropilines non abordés ici). Les gènes codant pour ces 3 récepteurs se situent sur des chromosomes différents, respectivement le chromosome 13, 4, et 5.

Les cellules vasculaires endothéliales et les cellules musculaires lisses des vaisseaux expriment VEGFR1 et VEGFR2 de même que les CTs selon le terme de la grossesse (Zhou et al., 2002; Nevo et al., 2013). Les STs expriment aussi VEGFR1 (Tannetta et al.,

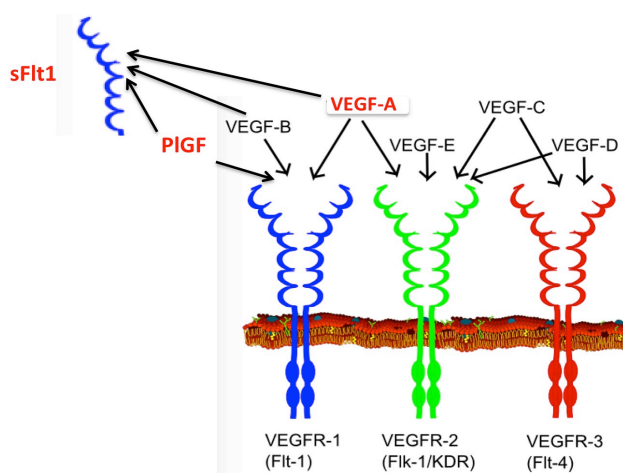
2013). Le gène du VEGFR1 contient un ERE-LS et est donc sous influence des oestrogènes (Menendez et al., 2007). Le VEGFR2 (fetal liver kinase 1 (flk1/kinase domain region KDR)) est un récepteur clé pour l'angiogénèse et la vasodilatation (Olsson et al., 2006). En effet c'est par une fixation à un homodimère du VEGFR2 que le VEGF promeut la prolifération des cellules endothéliales et la synthèse de prostacycline. Sa fixation à un hétérodimère (VEGFR1/2) favorise elle, la synthèse de NO et la migration des cellules endothéliales en vue de la formation des vaisseaux (Shibuya, 2011; Cudmore et al., 2012). La fixation du VEGF à un homodimère VEGFR1 et surtout à un hétérodimère (VEGFR1/2) peut conduire aussi à une transactivation du VEGFR2 par phosphorylation (Cudmore et al., 2012). Toutefois la très grande affinité du VEGF pour le VEGFR1 homodimère et le sFlt-1, comparée à celle pour le VEGFR2, doit faire principalement considérer VEGFR1 et sFlt-1 comme des modulateurs négatifs du VEGF (Park et al., 1994). Globalement il semble que l'action propre du VEGFR1 se révèlent plutôt lors de situations pathologiques de type inflammation ou tumorale.

L'utilisation de mutants sélectifs du VEGFR1 et 2 et du VEGF C a permis de montrer que le VEGFR2 n'avait pas besoin du VEGFR1 (Gille et al., 2001) pour induire la perméabilité capillaire liée au VEGF. L'utilisation de souris knock-out pour VEGFR2, VEGFR2<sup>-/-</sup>, montre un défaut sévère de formation des vaisseaux associé à des troubles hématopoïétiques entraînant le décès au stade embryonnaire J8 ½ (Shalaby et al., 1995).

A l'inverse, les souris knock-out pour VEGFR1<sup>-/-</sup> montre une désorganisation des vaisseaux sanguins avec une prolifération anormale de cellules endothéliales dans la lumière des vaisseaux, les souris décèdent vers J8 1/2- J9 (Fong et al., 1995). Le défaut du seul domaine cytoplasmique (activité tyrosine kinase) du VEGFR1 est compatible avec la vie (Hiratsuka et al., 2005). En effet en utilisant des souris qui n'expriment que le domaine extra-cellulaire et trans-membranaire du VEGFR1 on obtient un effet inhibiteur de



l'angiogénèse par captation du VEGF qui ne se fixera alors pas au VEGFR2 (Hiratsuka et al., 2005). Le VEGFR1 a cependant aussi des actions qui lui sont spécifiques sur les monocytes et les macrophages qui ont la particularité de n'exprimer que le VEGFR1 et non le VEGFR2. En effet chez les souris VEGFR1<sup>-/-</sup> on observe une diminution voire une quasi absence de migration des macrophages normalement induite par le VEGF (Hiratsuka et al., 2005). L'affinité du VEGFR-1 est bien plus importante pour le VEGF-A que pour le PlGF (Christinger et al., 2004), mais la synthèse massive de PlGF par les cellules trophoblastiques au cours de la grossesse normale, alors que le PlGF ne se fixe que sur le VEGFR1 et le sFlt-1, potentialise l'action du VEGF en masquant ces 2 récepteurs le conduisant alors le VEGF à se lier principalement au VEGFR2 (Cudmore et al., 2012).



Häggröm, Mikael (2014). "[Medical gallery of Mikael Häggröm 2014](#)".  
 WikiJournal of Medicine 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.008. ISSN 2002-4436. Public Domain.

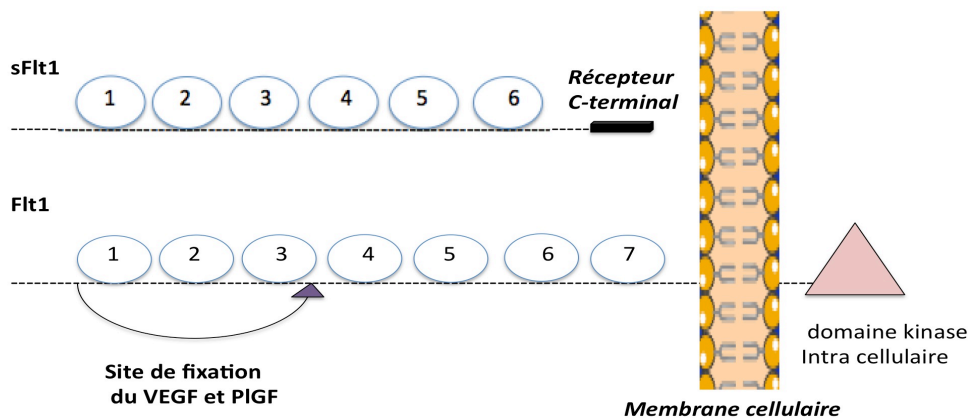
**Figure 9.** Récepteurs tyrosine kinase du VEGF.

## 2.5. Le sFlt-1

### 2.5.1. Historique

En 1993, à partir d'une banque d'ADNc de cellules endothéliales vasculaires, Kendall et Thomas ont identifié quatre séquences ADNc du VEGFR1 (Kendall and Thomas, 1993).

L'identification a pu se faire par hybridation avec une sonde ADN dérivés de domaines extra-cellulaires de ce récepteur et a mis en évidence que deux des clones codaient pour VEGFR1 mais avec une forme tronquée au niveau du résidu C-terminal (VEFR1 soluble alias sVEGFR1 ou sFlt-1) (Kendall and Thomas, 1993) (**figure 10**).



**Figure 10.** Protéines Flt1 et sFlt-1.

*Adapté de Davison et al, JASN, 2004, (Davison et al., 2004).*

Le plus long des clones partageait la séquence codante depuis le domaine immunoglobuline-like jusqu'à la région 3' non codante et au niveau du résidu C-terminal on retrouvait une séquence hydrophile de 31 acides aminés contenant 2 cystéines. Le sFlt-1 est issu d'un épissage alternatif de l'ARN pré-messager (Kendall and Thomas, 1993; He et al., 1999) (**figure 10**). Il est possible aussi qu'une intervention de protéases de surface type ADAM (ex ADAM10) participant à l'augmentation des taux circulants depuis le placenta (Zhao et al., 2010). Le sFlt-1 est produit sous une forme soluble, et n'a pas son effet de signal habituel car il ne contient pas de domaine tyrosine kinase. D'autres formes du sFlt-1 encore plus tronquées (ne contenant pas le domaine 5 ou 5 et 6) ont été décrites ultérieurement (Boocock et al., 1995). En utilisant une protéine sFlt-1 recombinante Kendall et Thomas ont montré que le sFlt-1 induisait un effet anti-mitogénique sur les cellules endothéliales vasculaires en capturant le VEGF (Kendall and Thomas, 1993). Ce concept a dès lors été appliqué en cancérologie par la mise au point d'anticorps anti-

VEGF, permettant une diminution de l'angiogénèse tumorale avec pour conséquence positive une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de la médiane de survie des patients (Harris, 2004). Dans 20 à 60% des cas selon les études, les patients cancéreux traités par anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF de type IgG1 (bevacizumab) ont présenté comme effets secondaires une augmentation des pressions artérielles et/ou une protéinurie (Zhu et al., 2007). Les effets indésirables disparaissaient à l'arrêt du traitement. Il est à noter que les inhibiteurs multicibles de tyrosine kinase dont les cibles principales sont VEGFR2 et VEGFR3 ont le même type d'effets indésirables (Sun et al., 2016). En 1996, Kendall et al ont identifié la protéine naturelle du sFlt-1 à partir de milieux de culture de cellules de veines ombilicales (Kendall et al., 1996). Lors de ce travail ils ont montré la formation possible d'hétérodimères sFlt-1/VEGFR2 et les fonctions d'antagoniste du sFlt-1 avec ou sans hétérodimérisation du récepteur. Clark et al ont montré que les cellules trophoblastiques humaines (villeuses et extravilleuses) synthétisaient du VEGF et du sFlt-1 et exprimaient le VEGFR1 (Clark et al., 1996; Clark et al., 1998). C'est principalement les STs qui synthétisent le sFlt-1 (Nevo et al., 2013). Il faut spécifier qu'en situation normale, le sFlt-1 n'est pas détectable chez l'humain de sexe masculin et la femme non enceinte avec les techniques actuelles (Clark et al., 1998).

### **2.5.2. sFlt-1 et grossesse normale ou prééclampsique**

Au cours de la grossesse, la synthèse du sFlt-1 par les cellules trophoblastiques est présente et varie avec l'âge gestationnel notamment en raison de la masse placentaire. Les taux sont peu élevés voire difficilement détectables au 1<sup>er</sup> trimestre, commencent à augmenter au 2<sup>ème</sup> trimestre puis massivement dès 29/30 SA (Palm et al., 2011). En 2002, Zhou et al ont analysé des surnageants de cultures de cellules placentaires issues de grossesses normales et avec prééclampsie sévère et ont montré une augmentation in vitro de l'expression

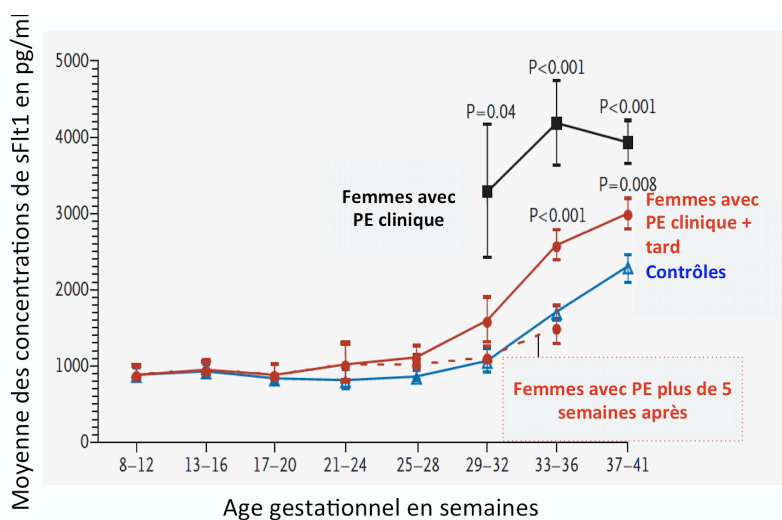
placentaire de sFlt-1 dans le groupe de cellules placentaires issues de grossesses avec prééclampsie (Zhou et al., 2002). En 2003, Maynard et al, par utilisation de technique de puce ARN (microarray) ont mis en évidence une surexpression du sFlt-1 par des placentas issus de grossesses avec prééclampsie comparés à ceux issus de grossesses sans prééclampsie (Maynard et al., 2003). Les taux maternels circulants de sFlt-1 chez les patientes prééclamptiques sont aussi retrouvés significativement plus élevés comparés à ceux des patientes sans prééclampsie et d'autant plus élevés que la prééclampsie est sévère (Maynard et al., 2003). Les auteurs ont aussi souligné le fait que l'augmentation du sFlt-1 était pour partie à l'origine d'une baisse des taux circulants de VEGF et PlGF libres (Maynard et al., 2003). On soulignera cependant que le VEGF circulant est difficile à évaluer (Jelckmann, 2001) et que la baisse du PlGF semble précéder l'augmentation du sFlt-1 circulant (Levine et al., 2004). Enfin dans ce même article, ils ont démontré que les effets antiangiogéniques et vasoconstricteurs du sFlt-1 sont la conséquence de la captation du VEGF et du PlGF (Maynard et al., 2003). En effet, l'effet antiangiogénique a été mis en évidence de la manière suivante, l'apport de sérum de femmes normotensives à des cultures d'HUVEC favorise la formation de tubes vasculaires par contre l'adjonction de sFlt-1 entraîne une inhibition de cette angiogénèse comme on peut l'observer après adjonction de serum de femmes prééclamptiques (Maynard et al., 2003). L'ajout de VEGF et de PlGF à du sérum de femmes prééclamptiques dans des cultures d'HUVEC restaure l'angiogénèse (Maynard et al., 2003). En utilisant un modèle de micro-vaisseau rénal, cette équipe a mis en évidence l'effet vasoconstricteur du sFlt-1 et montré que celui-ci correspond à un antagonisme du VEGF et du PlGF (Maynard et al., 2003). Le sFlt-1 élevé a été montré aussi comme source des lésions rénales (endothéliose glomérulaire) (Maynard et al., 2003). Enfin sur un modèle de rat (Sprague Dawley) auquel a été injecté un adénovirus recombinant exprimant le sFlt-1 pour les sujets étudiés ou un facteur neutre

sFlk1-Fc (pour les contrôles), il a été montré que le sFlt-1 induit chez les rates gestantes ou non gestantes, une hypertension et une protéinurie ainsi que les anomalies histologiques rénales « typiques » de la prééclampsie (endothéliose glomérulaire). Une autre équipe a dans le même temps montré une augmentation du sFlt-1 et une baisse du PIGF et du VEGF libres malgré une augmentation du VEGF total ainsi qu'une baisse du VEGFR1 au niveau du lit placentaire chez des patientes prééclamptiques comparées à des patientes avec grossesses normales (Tsatsaris et al., 2003). D'autres auteurs ont confirmé que des taux élevés de sFlt-1 pouvaient conduire aux signes de prééclampsie (Koga et al., 2003). Il existe des variants de la forme classique du sFlt-1 : sFlt-1-1 et sFlt-1-14 (Souders et al., 2015). Il a été observé que l'élévation du sFlt-1-1 était mieux corrélé à la survenue d'une prééclampsie que le sFlt-1 total, mais ceci reste encore à confirmer (Souders et al., 2015).

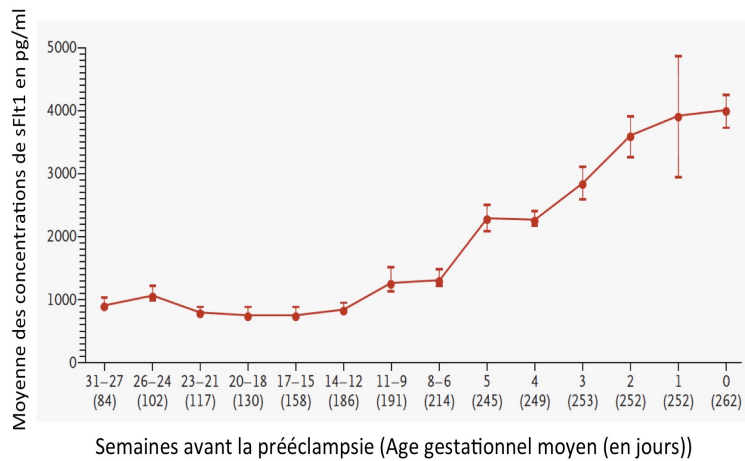
Dans la suite de ces publications démontrant l'implication du sFlt-1 dans l'apparition des signes cliniques de prééclampsie, il est apparu important de déterminer à quel moment de la grossesse les taux circulants de sFlt-1 s'élevaient et ainsi évaluer le caractère prédictif d'un tel dosage. C'est ce à quoi ont voulu répondre deux publications utilisant des sérothèques longitudinales déjà constituées (USA : sérothèque « CPEP trial » (Levine et al., 2004), France : sérothèque « protocole Oxygène » (Hertig et al., 2004)).

La sérothèque « protocole Oxygène » avait été mise en place par mes soins dans le cadre d'un CRC APHP : N° P970611 – CRC 96158). L'objectif initial de l'étude était d'évaluer par un suivi longitudinal, une variation du taux des radicaux libres chez la femme enceinte avec grossesse normale ou compliquée d'hypertension gestationnelle ou de prééclampsie. La publication de l'équipe américaine (Levine et al., 2004) incluait des patientes issues de l'étude CPEP (évaluation de la prévention de la prééclampsie par une prise orale de calcium) (Levine et al., 1997). Ces 2 études étaient rétrospectives et utilisaient des échantillons de serum congelés. Les résultats de Lévine et al (Levine et al., 2004) (**figures**

**11 et 12)** comme les nôtres (Hertig et al., 2004) (**figure 13**) ont mis en évidence des taux plasmatiques maternels de sFlt-1 plus élevés dès 25/28 SA au cours des grossesses compliquées de prééclampsie et une augmentation significative de ceux-ci plusieurs semaines avant la survenue des signes cliniques, respectivement 6 semaines (Levine et al., 2004) et 11,2 semaines (Hertig et al., 2004). Dans la publication américaine, les auteurs (Levine et al., 2004) ont réalisé le suivi longitudinal du sFlt-1 et du PIGF sérique d'un groupe de femmes prééclampsiques (120 PE : 80 non sévères et 40 sévères) issues de la cohortes CPEP (après randomisation) avec 1 femme contrôle (TA normale) par sujet malade. Les femmes étaient appariées par le site d'inclusion et l'âge gestationnel lors du 1<sup>er</sup> prélèvement (< 1 semaine). Toutes les femmes étaient enceintes de fœtus masculin.

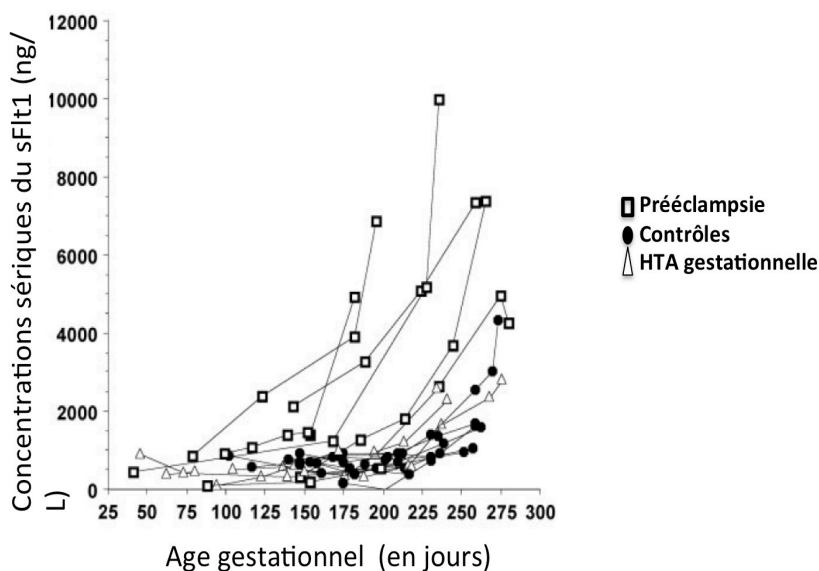


**Figure 11.** Moyenne des concentrations de sFlt-1 avant et après les signes cliniques en fonction de l'âge gestationnel au moment du prélèvement. Adapté de Levine et al (Levine 2004).



**Figure 12.** Concentrations de sFlt-1 en fonction du nombre de semaines avant la survenue d'une prééclampsie.  
Adapté de Levine et al (Levine et al., 2004).

Dans notre série, dès la période de 25-28 SA, il existait une différence significative entre le groupe prééclampsie et le groupe contrôle.



**Figure 13.** Concentrations sériques du sFlt-1 en fonction de l'âge gestationnel.  
Adapté de Hertig et al (Hertig et al., 2004).

Nous avons établi à cette occasion avec la technique de « sandwich ELISA » manuelle de R&D system (Human VEGFR1/Flt1 Quantikine ELISA Kit, Quantikine R&D Systems Inc, Minneapolis, MN 55413), un seuil de sFlt-1 plasmatique de 957 ng/L pour cette

période, avec une spécificité de 100% et une sensibilité de 80% (IC 95%, 28.8 - 96.7%) (Hertig et al., 2004).

Ultérieurement Afin d'améliorer la pertinence du dosage, l'utilisation du ratio sFlt-1/PlGF plutôt que sFlt-1 seul a été proposée dans la seconde moitié de la grossesse (Verlohren et al., 2014). En effet dans ce travail les auteurs rapportent une aire sous la courbe ROC du sFlt-1/PlGF supérieure à celle du sFlt-1 ou du PlGF seul, pour le ratio sFlt-1/PlGF : 0,94 (95% IC, 0,92-0,96), pour le sFlt-1 seul : 0,92 (95% IC, 0,89-0,94) et PlGF seul : 0,91 (95% IC, 0,88-0,93) (Verlohren et al., 2014). Le seuil de 38 a été décrit comme discriminant pour la survenue ou non d'une prééclampsie dans les 7 jours (Zeisler et al., 2016). Dans une autre publication, les résultats d'une comparaison du kit Elecsys (Roche Diagnostic) (ratio sFlt-1/PlGF) et du kit Triage PlGF (Alere) pour diagnostiquer une prééclampsie en cours montre une spécificité plus élevée pour le kit Elecsys ratio sFlt-1/PlGF que ce soit pour le groupe « PE précoce » ou le groupe « PE tardive », mais en particulier pour les formes tardives. Les sensibilités étaient par contre comparables que la prééclampsie soit précoce ou tardive (Stepan et al., 2016). Le seuil utilisé était 33 pour écarter le diagnostic pour les prééclampsies précoces et tardives et de respectivement 85 et 110 pour confirmer le diagnostic en cas de prééclampsie précoce et tardive.

### **2.5.3. Facteurs pouvant modifier le sFlt-1**

La prise d'aspirine (Li et al., 2015) et l'usage du tabac (Jeyabalan et al., 2008) semblent diminuer la synthèse trophoblastique de sFlt-1. La parité semble aussi influencer le taux de sFlt-1 et du ratio sFlt-1/PlGF, en effet une étude a comparé deux groupes de patientes (nullipares et multipares) et a montré que les patientes nullipares avaient des taux de sFlt-1 significativement plus élevés (Bdolah et al., 2014). L'hypoxie est aussi un facteur de stimulation de la synthèse de sFlt-1 comme montré à partir de cultures de cellules



trophoblastiques mises en environnement hypoxique (Nagamatsu et al., 2004)(Li et al., 2005a). Dans les grossesses multiples le sFlt-1 est augmenté et en rapport avec le poids fœtal (Bdolah et al., 2008).

#### **2.5.4. Le sFlt-1 n'intervient pas seul dans la prééclampsie**

Si un excès de sFlt-1 peut expliquer une partie des signes de la prééclampsie, il ne peut par contre répondre seul à l'ensemble du tableau clinique ; par exemple, dans la publication de Maynard et al (Maynard et al., 2003) utilisant un modèle animal qui surexprime le sFlt-1 il n'est pas décrit de thrombopénie ou d'atteinte hépatique. De ce fait, d'autres facteurs sont nécessairement impliqués dans la physiopathologie de la prééclampsie (Venkatesha et al., 2006).

#### **2.6. L'endogline soluble**

L'analyse par puces d'expression Affymetrix des placentas de prééclampsie a mis en évidence une surexpression du sFlt-1 mais aussi une surexpression d'autres ARNm comme celui de l'endogline (Venkatesha et al., 2006). Par technique de Western Blot, la protéine endogline, molécule de 95 kDa a été observée avec une concentration placentaire plus élevée en cas de prééclampsie, ainsi qu'une forme tronquée de 65 kDa (sEndogline) mais sans ARNm raccourci correspondant (Venkatesha et al., 2006).

La forme soluble circulante de l'endogline appelée encore sEndogline ou sEng, a été mise en évidence comme associée à la prééclampsie et agissant de concert avec le sFlt-1 (Venkatesha et al., 2006; Levine et al., 2006; Rana et al., 2012; Perucci et al., 2014). Pour comprendre l'impact de concentrations élevées de la sEng il faut tout d'abord détailler le rôle de l'endogline.

### 2.6.1. Généralités

Encore appelée CD105, l'endogline a été identifiée pour la première fois sur des cellules leucémiques (Gougos and Letarte, 1988). Il s'agit d'une glycoprotéine localisée à la surface des cellules endothéliales et des STs (Gougos et al., 1992; Cheifetz et al., 1992).

Elle partage des similarités structurelles et fonctionnelles avec le bétaglycane (Cheifetz and Massagué, 1991; Cheifetz et al., 1992). On la retrouve aussi exprimée par d'autres cellules telles que les monocytes et les macrophages (Lastres et al., 1992) par exemple. Le gène codant pour l'endogline (15 exons) est situé sur le chromosome 9 (9q34) (Fernández-Ruiz et al., 1993). L'endogline est un homodimère composé de 2 unités identiques de 95 kDa avec un grand domaine extracellulaire, une partie transmembranaire et une petite partie intracellulaire. Il existe 2 isoformes la L-Endogline (forme longue) et la S-Endogline (forme courte) qui diffèrent par leur nombre d'acides aminés et leur distribution tissulaire (Bellón et al., 1993). L'endogline est retrouvée dans les caveolae associées à l'eNOS dont elle régule l'activité (Toporsian et al., 2005). Elle fait partie du complexe protéique TGF $\beta$  et est un co-récepteur de surface du TGF $\beta$ .

Elle joue un rôle complexe de modulateur. Un déficit complet est fatal pour l'embryon par défaut d'angiogénèse et du développement cardiovasculaire (Li et al., 1999; Arthur et al., 2000), alors qu'à l'inverse, un excès d'endogline se retrouve dans les situations de néovascularisation (tumeur, inflammation, ...) (Torsney et al., 2002). Pendant la grossesse, les STs ainsi que les monocytes expriment fortement l'endogline (St-Jacques et al., 1994). L'endogline fixe le TGF $\beta$ 1 et TGF $\beta$ 3 (Yamashita et al., 1994). Il faut noter que le TGF $\beta$ 2, lui, n'est pas un ligand de l'endogline (Yamashita et al., 1994; Venkatesha et al., 2006). Une mutation du gène de l'endogline est à l'origine de télangiectasies hémorragiques avec des dilatations artérioveineuses entrant dans le cadre de la maladie de Rendu Osler (McAllister et al., 1994). Depuis d'autres mutations telles celles d'un promoteur du gène

de l'endogline (Albiñana et al., 2017) ou du gène d'un TGF $\beta$ RI (ACVR1) (Johnson et al., 1996) ont été décrites comme impliquées dans cette maladie.

La forme soluble est issue d'un clivage de l'endogline sous l'effet de protéase type MMP14 et non d'un épissage alternatif de l'ARN (Kaitu'u-Lino et al., 2012), elle a été mise en évidence chez des sujets sains ou atteints de cancer et pendant la grossesse. Pendant la grossesse le taux de sEndogline augmente progressivement jusqu'au terme (Masuyama, 2007). Une augmentation de la forme soluble de l'endogline a aussi été retrouvée chez des femmes atteintes de formes de cancer du sein ou de mélanome à très haut risque de métastases ou avec métastases mais aussi au cours de la prééclampsie (Muraoka-Cook et al., 2004).

### **2.6.2. Le TGF $\beta$**

Les plaquettes, les macrophages et les cellules tumorales entre autres, synthétisent le TGF $\beta$  (facteur de croissance transformant) sous la forme d'un précurseur latent qui peut être activé par différentes protéases (Avallet et al., 1994). Il existe 3 types de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3) et bien que de structure similaire, ils sont codés par 3 gènes distincts. Les TGF $\beta$  contrôlent la prolifération et la différenciation cellulaires. Ils ont aussi d'autres actions plus complexes et parfois contradictoires comme des effets pro-oncogéniques et anti-tumoraux par exemple. Le TGF $\beta$ 1 se fixe à son récepteur pour exercer ses actions.

### **2.6.3. Les récepteurs du TGF $\beta$**

Les récepteurs membranaires du TGF $\beta$  : les TGF $\beta$ RI et RII sont des sérine/thréonine kinases qui permettent d'induire un signal. Le TGF $\beta$ 1 se fixe sur son récepteur : le TGF $\beta$ RII, qui est constitutionnellement phosphorylé (activité kinase intrinsèque) et l'active. Ce complexe va s'associer au TGF $\beta$ RI et induire sa phosphorylation (de

Caestecker, 2004). Le TGF $\beta$ 1 lié à son récepteur tétra-hétérodimérisé TGF $\beta$ RI/RII va fixer des récepteurs accessoires dont le TGF $\beta$  RIII (tels que : endogline, ...) au niveau des cellules endothéliales ou trophoblastiques (de Caestecker, 2004).

L'endogline fixe avec une grande affinité le TGF $\beta$ 1 et 3 qui est déjà lié au TGF $\beta$ RII (Barbara et al., 1999). Comme évoqué plus haut les actions sont complexes, en effet le TGF $\beta$ 1 a un effet de régulation négative sur la prolifération des tumeurs et il a donc à un effet antitumoral mais comme il favorise aussi l'inflammation, la migration et la synthèse de facteurs angiogéniques sur les tumeurs à des stades avancés, il favoriserait aussi la survenue de métastases (Altomonte et al., 1996).

#### **2.6.4. Les actions de la sEng**

Après avoir injecter à des rates gestantes un adénovirus codant pour sFlt-1, sEng ou les 2, l'équipe de Karumanchi a mis en évidence l'effet synergique du sFlt-1 et de la sEng avec apparition d'une HTA et d'une protéinurie mais aussi d'un HELLP syndrome et d'un RCIU (Venkatesha et al., 2006). Seule, la sEng seule ne semble avoir qu'une action modérée sur le rein et le foie (Venkatesha et al., 2006). Il semble que la sEng agisse via un blocage de l'action du TGF  $\beta$ 1 qui induit une inhibition de la eNOS (Venkatesha et al., 2006).

Plus récemment un potentiel de prédiction de la prééclampsie par la mesure de la sEng circulante maternelle a été évoquée (Khalil et al., 2014). Cependant il semble que l'excès de sEng circulante soit une conséquence d'un excès de production d'endogline, ce qui rend plus complexe le raisonnement. Par ailleurs, des récepteurs TGF $\beta$ RIII autres que la sEng ont aussi été décrit au cours de la prééclampsie (Wang et al., 2017). La littérature oncologique sur les rôles de l'endogline et de la sEng doivent rendre très prudent quant aux conclusions à tirer de taux élevés de sEng au cours de la prééclampsie, sachant la diversité

des effets parfois totalement opposés du TGF $\beta$ 1 ou 3. Lorsque des cellules de mélanomes expriment l'endogline l'ajout de TGF $\beta$ 1 va inhiber la croissance des cellules alors que celles qui n'expriment pas l'endogline ne seront pas inhibées (Altomonte et al., 1996). L'exposition d'explants villosus du 1<sup>er</sup> trimestre à des inhibiteurs de l'endogline (anticorps, ADN antisens) ou à des inhibiteurs du TGF  $\beta$ 1 va induire la prolifération et la migration cellulaire (Caniggia et al., 1997). Mais à l'inverse des inhibiteurs de l'endogline sont utilisés comme anti prolifératif tumoral (Rosen et al., 2012). Enfin un dernier point n'est pas résolu, c'est celui de la provenance de la sEng au cours de la prééclampsie, est elle uniquement placentaire ou bien aussi d'origine endothéliale systémique ?

### **2.6.5. Conclusion**

Bien que le suivi longitudinal de la sEng ait montré que la moyenne des concentrations de de sEng était statistiquement différentes entre les groupes prééclampsie et contrôle nous n'avons pas gardé ce facteur comme biomarqueur dans ce travail de recherche car il existait dans une étude que nous avons précédemment réalisée un chevauchement relativement important des 2 groupes même en ne prenant en compte que les femmes enceintes avec prééclampsie précoce (Hertig et al., 2008).

## **2.7. L'hCG**

### **2.7.1. Généralités**

Le placenta est une glande endocrine qui produit de nombreuses hormones protéiques et stéroïdes. Une synthèse anormale de certaines de ces hormones a été décrites chez les femmes enceintes prééclamptiques comparées à des femmes sans prééclampsie. Nous ne pouvons aborder ici l'ensemble des molécules synthétisées par le placenta. Nous allons cependant détailler la synthèse de l'hCG, ses modalités d'actions et son récepteur car cette

hormone dont le dosage est communément réalisé par les cliniciens, a déjà une place reconnue comme biomarqueur de la prééclampsie. Puis nous développerons la synthèse placentaire et le métabolisme des oestrogènes, de la progestérone et de leurs principaux métabolites ainsi que leurs récepteurs, qui sont un des objets de ce travail.

### **2.7.2. Les différentes formes d'hCG**

Cette hormone est bien connue car elle est un des premiers messagers synthétisés par le trophoblaste. Certains cancers du foie, de l'estomac ou du sein et des proliférations tumorales de cellules germinales peuvent aussi exprimer l'hCG.

Il s'agit d'une glycoprotéine présentant un polymorphisme important du à une glycosylation variable d'où une taille variable de 37-45 kDa (Choi and Smitz, 2014). Sa structure est dimérique avec une sous-unité  $\alpha$  spécifique d'espèce dont la chaîne protéique est commune à la FSH, la LH et la TSH et une sous-unité  $\beta$  différente selon l'hormone étudiée (Tsampalas et al., 2010).

La sous-unité  $\alpha$  est codée par un seul gène (chromosome 6) alors que la sous-unité  $\beta$  est codée par 6 gènes localisés sur le chromosome 19 (Policastro et al., 1986). Les formes circulantes peuvent être des chaînes libres  $\alpha$  ou  $\beta$  ou dimériques  $\alpha$ - $\beta$ . L'hCG possède 6 sites de glycosylation et il existe ainsi plusieurs isoformes d'hCG qui diffèrent par leur taux de glycosylation. Les formes très glycosylées semblent avoir une demi-vie plus longue mais une affinité diminuée pour leur récepteur (Choi and Smitz, 2014).

L'hCG via le récepteur LH/hCG a un rôle lutéotrophique et favorise la transformation du corps jaune cyclique en corps jaune gestatif favorisant ainsi la synthèse d'oestrogènes et de progestérone. Les 3 à 4 premières semaines de grossesse, la forme circulante principale d'hCG est une forme hyperglycosylée (Norris et al., 2011; Evans, 2016). Celle-ci pourrait favoriser le développement de la couche de CTs ainsi que promouvoir le caractère invasif

des CTs via une interaction avec les TGF $\beta$  (Norris et al., 2011; Evans, 2016). Après cette période, c'est une forme classique d'hCG qui prend le relai (Guibourdenche et al., 2010; Norris et al., 2011; Evans, 2016).

**Tableau 3.** Principaux effets de l'hCG au cours de la grossesse.

*Adapté de* (Makrigiannakis et al., 2017)

Actions	Conséquences possibles
↓ IgFBP1	Favorise la décidualisation et l'implantation
↑ LIF ↓ IL6 ↓ M-CSF and M-CSF receptor	Favoriser la décidualisation et l'implantation ↑ Tolérance immunitaire
↑ MMP-9 ↓ TIMP	Régulateur du remodelage tissulaire

Cette hormone qui présente une communauté de structure avec le TGF $\beta$  présente aussi des effets angiogéniques et des effets immunorégulateurs favorisant l'immunotolérance (Tsampalas et al., 2010). En terme d'angiogénèse, l'hCG stimule l'expression du VEGF et du VEGFR1 et 2 (Islami et al., 2003; Reisinger et al., 2007) principalement la forme hyperglycosylée (Berndt et al., 2013) mais aussi diverses autres cibles angiogéniques telles que les angiopoïétines et leurs récepteurs (Tie2), le PDGF, et le basic fibroblast growth factor (Reisinger et al., 2007). L'hCG augmente le taux d'IL10 et attire les cellules T régulatrices vers les cellules trophoblastiques ce qui favorise l'immunotolérance vis à vis des antigènes paternels (Schumacher et al., 2009; Norris et al., 2011; Furcron et al., 2016). Les principaux effets de l'hCG au cours de la grossesse sont résumés dans le **tableau 3**.

Des taux anormaux d'hCG et/ou une dérégulation de l'organisation temporelle de la synthèse d'hCG pourraient conduire à une angiogénèse et une immunotolérance imparfaite (Norris et al., 2011).

### **2.7.3. Synthèse de l'hCG**

Au cours de la grossesse cette hormone est synthétisée par l'œuf fécondé dès le stade 4/8 cellules (Licht et al., 2007) et est détectée dans le sang maternel dès le 9ème jour de grossesse. L'hCG est considérée comme synthétisée par les STs tout au long de la grossesse mais les CTs peuvent aussi la synthétiser (Snegovskikh et al., 2007; Handschuch et al., 2007), leur part respective reste encore à déterminer. Le pic d'hCG (vers 100 000 UI/L) est atteint à la 8ème SA puis va redescendre vers 18/20 SA pour atteindre un plateau vers 5000 UI/L jusqu'à l'accouchement, avant de se négativer 5 jours après l'accouchement.

Une association a été décrite entre des taux élevés d'hCG (totale) au cours du 2<sup>ème</sup> trimestre et une augmentation du risque de prééclampsie et/ou de RCIU (Lambert-Messerlian et al., 2000)(Olsen et al., 2012). Sachant le rôle d'angiogénèse et d'immunomodulation de cette hormone, on peut supposer que cette augmentation au 2<sup>ème</sup> trimestre chez les patientes qui vont développer une prééclampsie n'est pas un mécanisme causal mais correspond plutôt à un effet compensateur pour répondre à l'insuffisance syncytiale. Par contre une association entre la survenue d'une prééclampsie et des taux bas de la fraction libre  $\beta$  de l'hCG au 1<sup>er</sup> trimestre est suspectée par certaines équipes (Ranta et al., 2011). Ceci pourrait être lié au défaut d'invasion mais mérite d'être encore parfaitement établi.



#### 2.7.4. Le récepteur de l'hCG

Il est commun à l'hCG et à la LH. Le gène codant pour ce récepteur est un gène de grande taille qui comprend 11 exons et est localisé sur le chromosome 2 (2p21) (Tsampalas et al., 2010). Les sous-unités  $\beta$  de l'hCG et de la LH comporte 80% d'homologie. La spécificité d'action est due à la sous unité  $\beta$  et c'est la forme dimérique d'hCG qui est principalement active. Comparée à celle de la LH, l'affinité du récepteur à l'hCG est 10 fois supérieure et la liaison bien plus stable (Roess et al., 1997).

Le récepteur à LH/hCG est un récepteur glycoprotéique couplé aux protéines G qui présente un volumineux domaine extracellulaire, 7 passages transmembranaires et 1 domaine intracellulaire (Grzesik et al., 2015). Il est exprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux utérins (Toth et al., 1994), les cellules de la granulosa et de la thèque interne. Situé à la surface des cellules, il subit une internalisation via des vésicules recouvertes et des corps multivésiculaires jusqu'aux lysosomes en vue de dégradation. Il existe enfin, un phénomène de recyclage vers la surface (Bhaskaran and Ascoli, 2005). Cette internalisation est très faible de manière constitutive mais est très importante en présence d'hormones (Bhaskaran and Ascoli, 2005). Par phénomène de transcytose l'hCG peut, après fixation à son récepteur et internalisation, traverser la cellule endothéliale à l'intérieur de vésicules puis être relarguée au côté opposé de la lumière des vaisseaux dans le but d'être concentrée dans des zones sous endothéliales au plus près des cellules cibles (Misrahi et al., 1996). Après fixation de l'hCG à son récepteur membranaire, la signalisation se fait essentiellement par stimulation de l'adénylate cyclase et induction de la stéroïdogénèse.

## **2.8. Utilisation du dosage de ces facteurs en clinique**

La mise en évidence de modifications des concentrations des facteurs angiogéniques ou antiangiogéniques au cours de la prééclampsie a ouvert des pistes de recherche pour les cliniciens quant à leur utilisation en routine clinique. Selon la période gestationnelle d'utilisation, la mesure d'un /ou d'une combinaison de ces facteurs pourrait permettre de i) prédire la survenue d'une prééclampsie, ii) confirmer ou infirmer la présence d'une prééclampsie en situation de cas suspect iii) voire d'en suivre l'évolution.

### **2.8.1. Au premier trimestre : Le dépistage très précoce**

Sur le modèle du dépistage sérique en routine de la trisomie 21, l'idée d'une modélisation du risque de prééclampsie a été développée en incluant des facteurs classiques de prééclampsie à des données cliniques et biologiques. Les combinaisons testées avec succès ont été celles qui associaient i) des données anamnestiques comme l'âge maternel, les antécédents obstétricaux, la présence d'un diabète ou d'une HTA chronique, ii) des données cliniques/échographiques : la valeur des pressions artérielles moyenne et de l'IP aux artères utérines (Doppler), et iii) de marqueurs biologiques modifiés lors d'une placentation anormale tels que PP13, PAPP-A, PIGF, ADAM12,  $\beta$ hCG et inhibine (Cuckle, 2011). Au 1<sup>er</sup> trimestre entre 11 et 13 semaines d'aménorrhée, la combinaison de certaines données anamnestiques et de la concentration sérique maternelle du PIGF et de la PAPP-A, avec la valeur des pressions artérielles moyennes et de l'IP aux artères utérines permettait pour un taux de faux positifs de 10% un taux de détection de 96% des prééclampsies précoces avant 34 SA, de 77% des prééclampsies avant 37 SA et de 54% de celles avant 42 SA (Poon and Nicolaides, 2014). Cette modalité de dépistage semble intéressante surtout si elle est comparée à la capacité de prédiction des caractéristiques

cliniques seules, qui est inférieure à 1/3 que ce soit pour les prééclampsies tardives ou précoces.

L'intérêt d'un dépistage au 1<sup>er</sup> trimestre est de pouvoir proposer un traitement préventif par aspirine (Beaufils et al., 1985; Uzan et al., 1991; Askie et al., 2007). L'essai interventionnel ASPRE « ASpirin for evidence-based PREeclampsia prevention » (Poon and Nicolaides, 2014; Rolnik et al., 2017; Marrs and Costantine, 2017) a inclus des femmes enceintes avec grossesse unique considérées comme ayant un risque de prééclampsie d'au moins 1/100, - ce risque était établi par un algorithme combinant des facteurs maternels, l'IP au Doppler des artères utérines, le dosage du PIGF et de la PAPP-A entre 11 et 13 semaines d'aménorrhée (Poon and Nicolaides, 2014). Les auteurs de l'essai ASPRE ont mis en évidence qu'une prise d'aspirine entre 11-14 SA jusqu'à 36 SA, réduisait le risque de prééclampsie précoce avec un odd ratio de 0,38 (CI 95% ; 0,20-0,74) soit 1,6% (13/798) versus 4,3% (35/822), mais n'avait pas d'impact sur le risque de prééclampsie tardive (Rolnik et al., 2017). Aussi enthousiasmant que soient ces résultats, ils méritent d'être vérifiés sur d'autres populations, ce d'autant que les études en sous-groupes qui ont été publiées ultérieurement par la même équipe soulèvent déjà des questions, par exemple pour les patientes hypertendues qui ne semblent pas bénéficier d'un effet de l'aspirine (Poon et al., 2017).

### **2.8.2. Au 2<sup>ème</sup> trimestre : dépistage précoce et aide au diagnostic**

L'hCG, le PIGF, le sFlt-1 et le ratio sFlt-1/PIGF ont été tour à tour testés comme biomarqueurs de prééclampsie à venir. Une augmentation des concentrations d'hCG (Chandra et al., 2003), de sFlt-1 (Coolman et al., 2012) ou du ratio sFlt-1/PIGF (Verlohren et al., 2014) semblent associés à la survenue d'une prééclampsie, de même qu'un taux abaissé de PIGF (Coolman et al., 2012). Néanmoins, une évaluation de l'impact de tels

dosages en terme de morbidité/mortalité maternelle et fœtale ainsi que leur coût/bénéfice restent une nécessité avant toute utilisation en routine puisque dans cette période la prescription préventive d'aspirine semble inopérante.

### **2.8.3. Le cas particulier des suspicions de prééclampsie**

Devant les limites de ces tests pour prédire la survenue future d'une prééclampsie, les équipes explorant les biomarqueurs de la prééclampsie ont repensé l'approche en s'intéressant cette fois-ci non pas à la prédiction très en amont de la prééclampsie mais au diagnostic d'absence de prééclampsie en cours devant des cas suspects avec un effet de prédiction d'absence de complication dans les 7 jours suivants (parfois un peu plus), utilisant ainsi l'excellente valeur prédictive négative du ratio sFlt-1/PlGF (Zeisler et al., 2016) ou du PlGF (Sibiude et al., 2012).

Une revue de la littérature incluant 4 études suggère qu'il existe un intérêt économique à utiliser ces tests en routine en cas de suspicion de prééclampsie (Frampton et al., 2016), cependant des études à venir restent encore nécessaires pour évaluer à grande échelle l'impact des faux négatifs sur la morbidité et la mortalité maternelle et fœtale.

# La stéroïdogénèse au cours de la grossesse normale et de la prééclampsie

## 3.1. Généralités

### 3.1.1. Historique

Au début des années 70, le développement des connaissances sur les stéroïdes et leurs taux particulièrement élevés au cours de la grossesse ont conduit à rechercher leur implication en physiologie et au cours des grossesses compliquées d'une prééclampsie. Des taux anormalement bas d'œstrogènes sanguins et/ou urinaires ont été retrouvés associés à la présence d'une prééclampsie, mais les études ultérieures ont rapportés des résultats contradictoires faisant abandonner cette piste (Rahman et al., 1975; Thompson et al., 1977; Notation et al., 1977; Rosing et al., 1984; Zamudio et al., 1994). Une des grande faiblesse des études anciennes était le manque de spécificité des techniques utilisées (ELISA et RIA) qui a pu grandement participer à la variabilité des résultats et des conclusions (Krasowski et al., 2014). L'accès récent à des techniques de dosages des œstrogènes de type GC/MS ou LC/MS donne maintenant de la spécificité aux mesures des stéroïdes. De plus, ces techniques ont un apport supplémentaire majeur, elles permettent la réalisation d'un profil stéroïdien complet à partir d'un échantillon de sang unique, permettant ainsi - par calcul de ratio produit/substrat - une approche de l'activité/expression des enzymes impliquées.

Le protocole de dosage des stéroïdes est fondamental et conditionne la fiabilité des résultats et conclusions, nous le détaillerons dans le chapitre méthodologie. Ici, nous abordons la stéroïdogénèse et ses particularités au cours de la grossesse: stéroïdes, protéines de transport, récepteurs et voies de signalisation ainsi que les liens avec la prééclampsie.

### 3.1.2. Stéroïdes et grossesse

Au cours de la grossesse normale, les taux d'estradiol et de progestérone augmentent de manière très importante depuis 100 pg/ml (phase lutéale) à plus de 10000 pg/ml pour l'estradiol et depuis 1-25ng/ml à plus de 100-200ng/ml pour la progestérone (Levitz and Young, 1977; Abbassi-Ghanavati et al., 2009).

Les cycles des oestrogènes et des progestatifs présentent plusieurs particularités au cours de la grossesse chez l'humain et certains primates :

- i) cette synthèse se situe principalement ou totalement dans le placenta dès la 9<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée,
- ii) l'entrée du cholestérol dans les mitochondries des cellules placentaires utilise des molécules spécifiques,
- iii) le capital enzymatique nécessaire à la synthèse des oestrogènes n'est pas complet dans le placenta et nécessite l'appui des surrénales maternelles et fœtales,
- iv) et enfin les surrénales maternelles et fœtales participeraient aussi à la synthèse de la progestérone maternelle.

Nous avons publié dans le journal *Endocrine Reviews* une revue de la littérature qui décrit la synthèse des oestrogènes au cours de la grossesse normale et de la prééclampsie (**article 1**). Nous nous attacherons à souligner les points essentiels et à détailler les points non abordés dans cette publication.

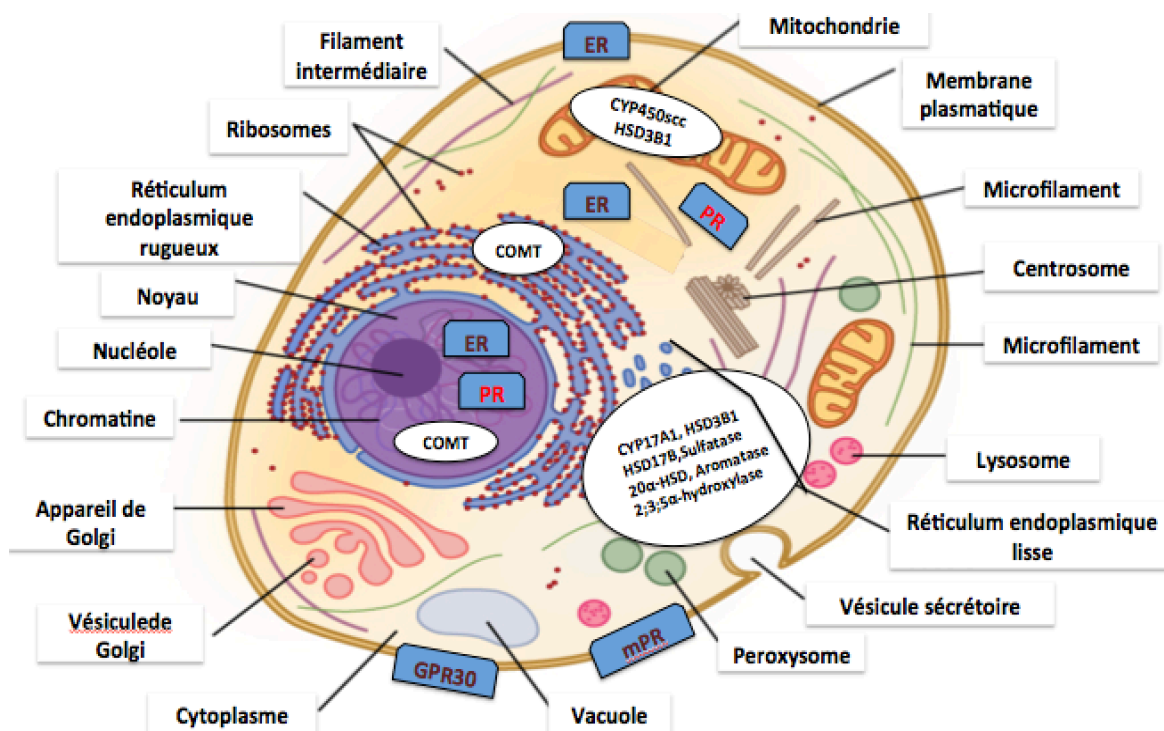
### 3.1.3. La synthèse des stéroïdes par le placenta et autres cellules

Au sein du placenta, ce sont surtout les STs qui synthétisent les stéroïdes. Mais localement d'autres cellules (cellule endothéliales des vaisseaux, décidua, macrophages, ...) expriment

une ou plusieurs enzymes (aromatase, HSD17B1, HSD17B2, COMT) et permettent donc aussi la conversion locale d'un stéroïde en un autre (**figure 1 de l'article 1**).

### 3.1.4. Répartition des enzymes de la stéroïdogénèse au sein de la cellule

La **figure 14** illustre la répartition des enzymes et récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone selon les connaissances actuelles.



**Figure 14.** Répartition des enzymes et récepteurs aux estrogènes et progestagènes.

La CYP450scc est de localisation mitochondriale (Hanukoglu, 1992), les autres enzymes sont principalement localisées au niveau du réticulum endoplasmique lisse (Miller and Auchus, 2011)(Mueller et al., 2015)(Morel et al., 2016) sauf la COMT qui est localisée au niveau du réticulum endoplasmique rugueux mais aussi du noyau (Ulmanen et al., 1997). Les récepteurs aux estrogènes (ER, GPR30) se retrouvent dans le noyau et à la surface des membranes ou proche de la membrane plasmique, les récepteurs à la progestérone (PR) siègent au niveau du noyau et dans le cytoplasme proche du réticulum endoplasmique rugueux (Perrot-Applanat et al., 1994) ou de la membrane (mPR). *Schéma de la cellule adapté de wikipédia.*

### 3.1.5. L'utilisation du cholestérol

Le placenta humain n'exprime pas la protéine StAR (Tuckey, 2005) qui est nécessaire à l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie en vue de sa transformation en hormones

stéroïdes. Au niveau placentaire cette fonction semble sous la dépendance de 2 molécules: la SCP2 et la MLN64 (Strauss et al., 2000).

### **3.1.6. La problématique de l'absence de la CYP17A1**

Le placenta ne possède pas l'enzyme CYP17A1 (encore appelée 17 $\alpha$ -hydroxylase) qui permet la conversion de la prégnénolone et de la progestérone en respectivement DHEA et androstènedione - qui sont les précurseurs des oestrogènes - (Pion et al., 1965; Siiteri and MacDonald, 1966). Aussi pour pouvoir synthétiser des oestrogènes, le placenta va devoir utiliser le SDHEA provenant des surrénales maternelles et fœtales (**figure 15**). Les surrénales fœtales produisent au moins 50% de ce SDHEA utilisé et probablement plus en fin de grossesse. La mère et le fœtus sont donc des acteurs indispensables de la synthèse des oestrogènes au cours de la grossesse.

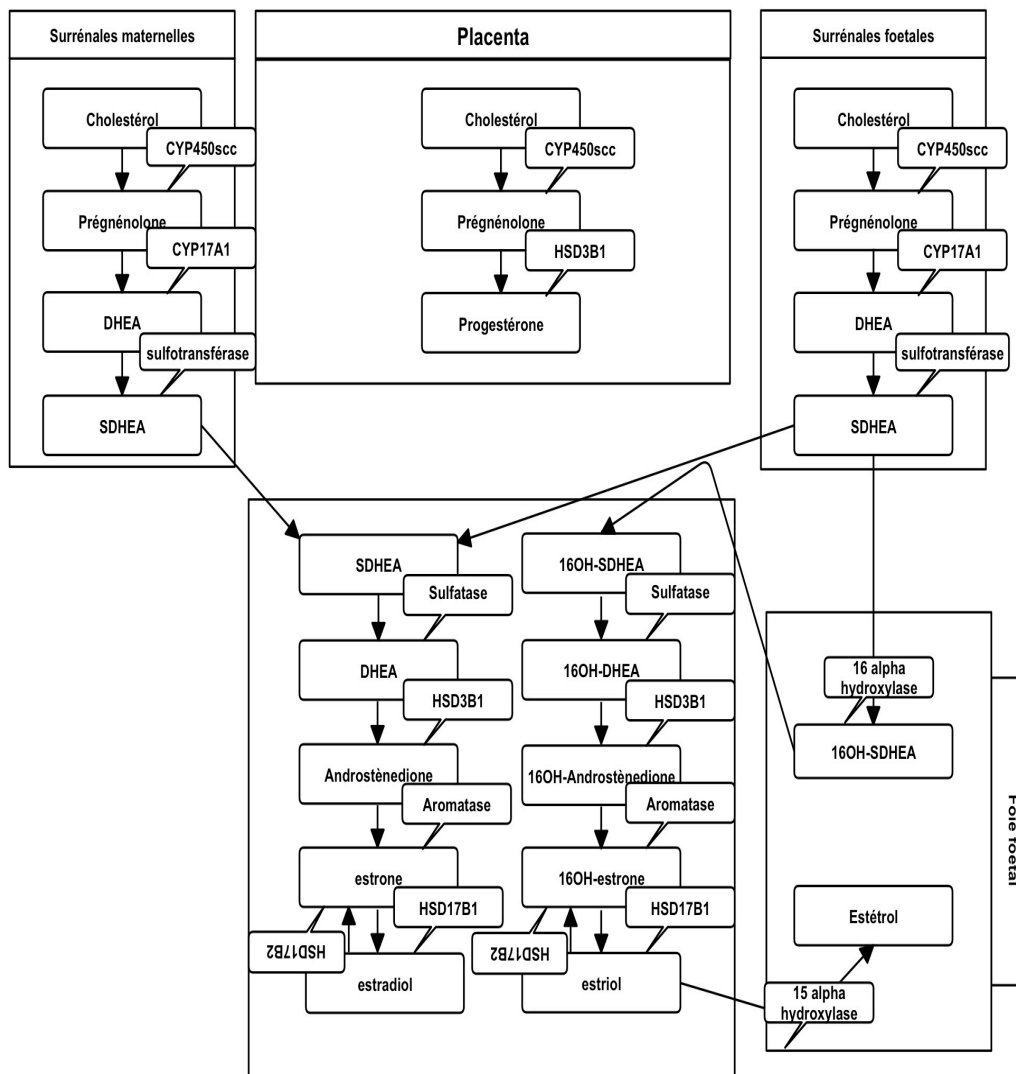
## **3.2. La synthèse des oestrogènes**

### **3.2.1. Généralités**

Cette synthèse est décrite dans la **figure 15** et la revue publiée et nous ne la reprenons pas ici. Nous soulignerons simplement la nécessité de 4 enzymes clés: la STS, l'aromatase, la HSD17B1 et la COMT. Contrairement à d'autres tissus, le placenta ne contient pas ou de manière anecdotique de la HSD17B3 qui convertit l'androstènedione en testostérone et la HSD17B5 qui a une fonction identique est présente à un taux très bas (Li et al., 2005b). De ce fait le placenta ne peut pas synthétiser de testostérone qui aurait pu être secondairement aromatisée en estradiol (Albrecht and Pepe, 1990; Peltoketo et al., 1999). Par ailleurs, l'aromatase a une affinité bien plus importante pour l'androstènedione que pour la testostérone (Yoshida and Osawa, 1991). On doit donc conclure que la voie de la



testostérone pour obtenir de l'estradiol est à considérer comme négligeable au cours de la grossesse.

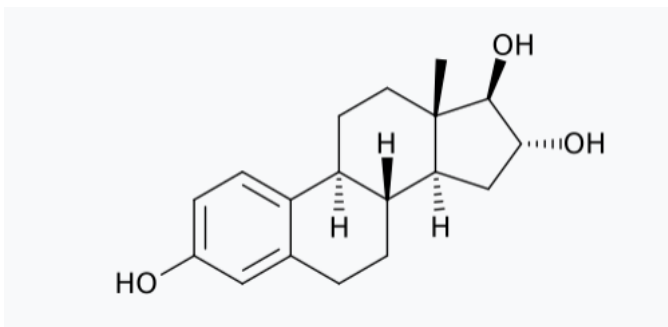


**Figure 15.** Stéroïdogénèse au cours de la grossesse.

### 3.2.2. L'estriol et l'estérol : des estrogènes d'origine fœtale

#### 3.2.2.1. L'estriol

Si l'estrone et l'estradiol sont synthétisés par le placenta à partir de SDHEA d'origine maternelle et fœtale, l'estriol (**figure 16**) a quant à lui, comme principal précurseur la 16 $\alpha$ OH-SDHEA qui est d'origine fœtale (Zbella et al., 1986; Kaludjerovic and Ward, 2012). L'hydroxylation au niveau du carbone 16 du SDHEA se fait dans le foie fœtal à partir de SDHEA d'origine surrénalienne fœtale (Kaludjerovic and Ward, 2012).



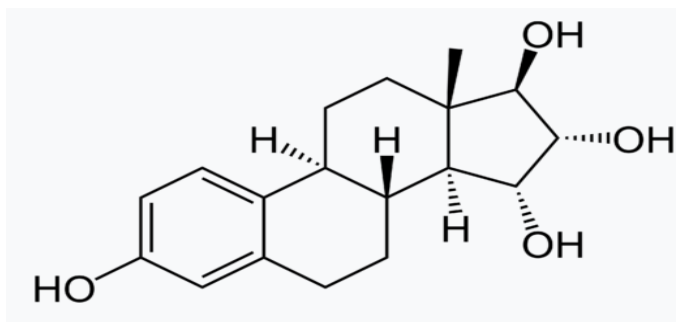
**Figure 16.** Molécule d'estriol.

Une part à priori négligeable d'estriol provient de la 16 $\alpha$ -hydroxylation de l'estradiol synthétisé par le placenta passant dans la circulation fœtale puis secondairement converti par le foie fœtal. L'affinité de l'estriol pour les récepteurs aux estrogènes est inférieure à celle de l'estrone et de l'estradiol (Kuiper et al., 1997). L'attention portée à ce stéroïde est probablement insuffisante car bien que décrit comme un estrogène faible en raison de sa faible affinité aux récepteurs des estrogènes (14% pour ER $\alpha$  et 21% pour ER) (Kuiper et al., 1997), il est néanmoins synthétisé en très grande quantité pendant la grossesse, environ 40 mg par jour à terme soit bien plus que l'estradiol (Siiteri and MacDonald, 1966; Albrecht and Pepe, 1990; Siiteri, 2005) et sa forme circulante est active contrairement à celle des autres estrogènes, il ne se fixe que très peu à la protéine de transport SHBG. Comme il a été montré que l'estriol augmentait de manière importante le flux au niveau des vaisseaux utérins (Clewel et al., 1977), on peut conclure que le fœtus est indirectement actif dans la régulation de ses apports.

### 3.2.2.2. L'estétrol

La 15 $\alpha$ -hydroxylation de l'estriol ou la 15 $\alpha$ -16 $\alpha$ -hydroxylation de l'estradiol par le foie fœtal vont conduire à la synthèse de l'estétrol (**figure 17**). Cette 15 $\alpha$ -hydroxylase est une enzyme qui a la particularité de n'être exprimée par le foie que lors de la vie fœtale (Schwers et al., 1965). Elle apparaît tardivement dans l'évolution des espèces, seuls

certains primates non humains en produisent en toute fin de grossesse et peu, environ 1% des taux humains (Foidart, data non publié).



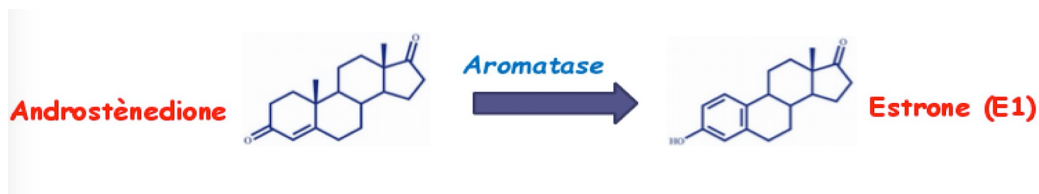
**Figure 17.** Molécule d'estérol.

L'adjonction du radical hydroxyl prolonge de manière importante la demi-vie de cette molécule : la demi-vie de l'E3 est de 10 minutes alors que la demi-vie de l'E4 passe à 20/28 heures (Visser et al., 2008). Les taux d'estérol circulants sont faibles de l'ordre de moins de 2 pg/L mais la SHBG ne lie pas cette hormone (Hammond et al., 2008). Cependant l'affinité aux récepteurs aux estrogènes est modérée (Coelingh, 2008). Ses fonctions sont mal ou non connues. Des travaux récents montrent que ce stéroïde doit être considéré comme un SERM avec des effets agonistes ou antagonistes de l'E2 selon les tissus et les situations (Holinka et al., 2008). Sa présence dans l'évolution des espèces semble associée au développement cérébral et l'estérol pourrait avoir un rôle protecteur et promoteur du développement du cerveau foetal (Tskitishvili et al., 2014).

### 3.2.3. Le cas particulier de l'aromatase

#### 3.2.3.1. Généralités

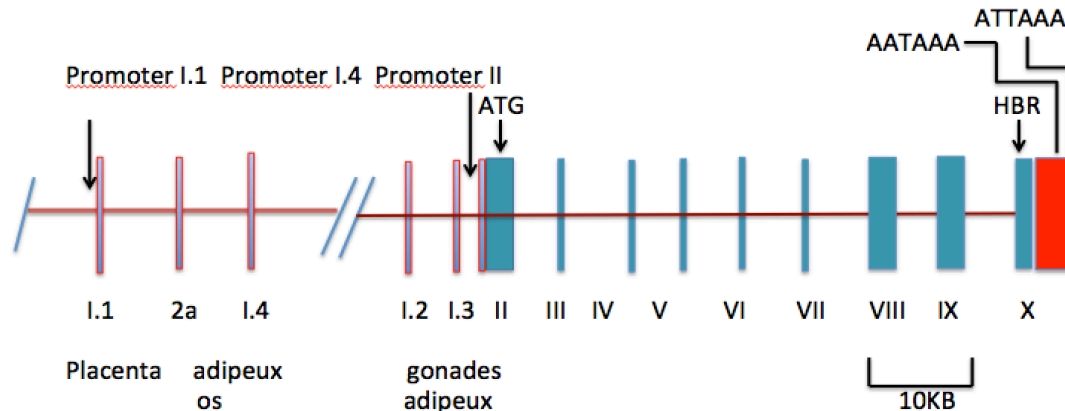
Dans ce travail je me suis intéressée à une enzyme particulière, l'aromatase qui convertit les androgènes en oestrogènes. Comme évoqué plus haut, le placenta va convertir l'androstènedione en estrone (**figure 18**).



**Figure 18.** L'aromatase.

L'aromatase est une enzyme qui fait partie des enzymes du CYP450, elle comprend une protéine spécifique du CYP450 (CYP19) de 55Da et une NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase.

Elle est localisée dans le réticulum endoplasmique (Nelson et al., 1996) et est une étape limitante de la synthèse des oestrogènes. Elle est exprimée par de nombreux tissus : le placenta mais aussi les gonades, le foie, les cellules endothéliales et musculaires lisses des vaisseaux ainsi que par les macrophages le tissu adipeux et conjonctif (Toda et al., 1994; Mor et al., 1998; Kragie, 2002).



**Figure 19.** Représentation du gène de l'aromatase.

Le gène humain codant pour la CYP19 se situe sur le chromosome 15 (15q21.1), il a une longueur de 123kb et comprend des exons II à X codants et plusieurs exons I non codants qui sont associés à des promoteurs spécifiques de tissu (**figure 19**), si bien que la protéine est identique quelque soit le tissu d'origine. Le promoteur placentaire est le plus à distance du site ATG translationnel il contient des sites de fixation pour les activateurs et les

inhibiteurs de l'expression du gène de la CYP19 (Kamat et al., 1998). L'aromatase n'est pas exprimée par les CTs avant qu'ils ne fusionnent pour former des STs (Fournet-Dulguerov et al., 1987).

### **3.2.3.2. Régulation du gène de l'aromatase**

#### **3.2.3.2.1. Les polymorphismes du gène**

Tout d'abord il existe des polymorphismes du gène de l'aromatase dont on sait qu'ils induisent une diminution de la quantité de protéine CYP19 et/ou une activité moindre de l'aromatase (Ma et al., 2005). A ce jour plus de 88 sont connus et certains d'entre eux ont été retrouvés associés à la survenue d'une prééclampsie (Shimodaira et al., 2012).

A notre connaissance, une seule étude présente des conclusions contradictoires en décrivant une hypométhylation du gène de l'aromatase dans la région du promoteur I.1 avec de ce fait une expression augmentée (ARNm), dans un groupe de patientes avec prééclampsie précoce comparé à un groupe contrôle (Hogg et al., 2013).

#### **3.2.3.2.2. L'hypoxie**

L'hypoxie est aussi un facteur influençant l'expression de l'aromatase. L'étude de cultures de STs humains exposées à l'hypoxie montre une diminution de l'expression de l'aromatase en milieu hypoxique (Jiang and Mendelson, 2003). Cette inhibition était médiée par 2 facteurs de transcription : USF1 et USF2 (Jiang and Mendelson, 2003). Si les cultures étaient remises en environnement normoxique, USF1 et USF2 étaient dégradés et l'expression de l'aromatase augmentait à nouveau permettant une synthèse d'estradiol qui en retour stimulait l'expression de l'aromatase via une liaison à son récepteur ER $\alpha$  et/ou à d'autres facteurs de transcription (Jiang and Mendelson, 2003).

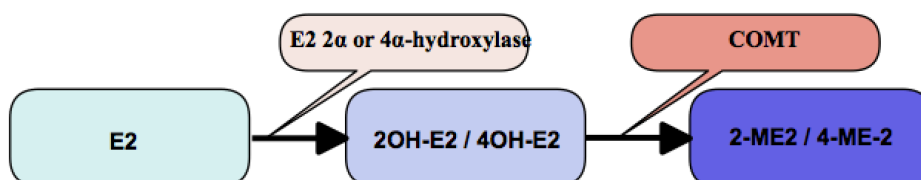
### 3.2.3.2.3. Les miARNs

En situation physiologiques des miARNs exprimés dans les CTs dont miR-19b et miR106a répriment l'expression du gène de l'aromatase et pour miR-19b réprime aussi l'expression du gène du hGCM1. Ces 2 miARNs sont sous le contrôle positif de c-Myc et déclinent dans les STs (Kumar et al., 2013).

En comparant des placentas de grossesses avec prééclampsie à d'autres issus de grossesses sans hypertension, il a été mis en évidence des taux plus élevés de miR-19b et miR106a ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes du hGCM1 et de l'aromatase dans le groupe PE. Sachant que hGCM1 est un important facteur de transcription pour la différenciation des CTs en STs, une baisse de ce facteur conduit aussi à une diminution de l'expression de l'aromatase. (Kumar et al., 2013). Il est cependant difficile de dire si cette augmentation des miARNs est initiale et causale où simplement un marqueur d'une absence de différenciation des CTs.

### 3.2.4. La COMT

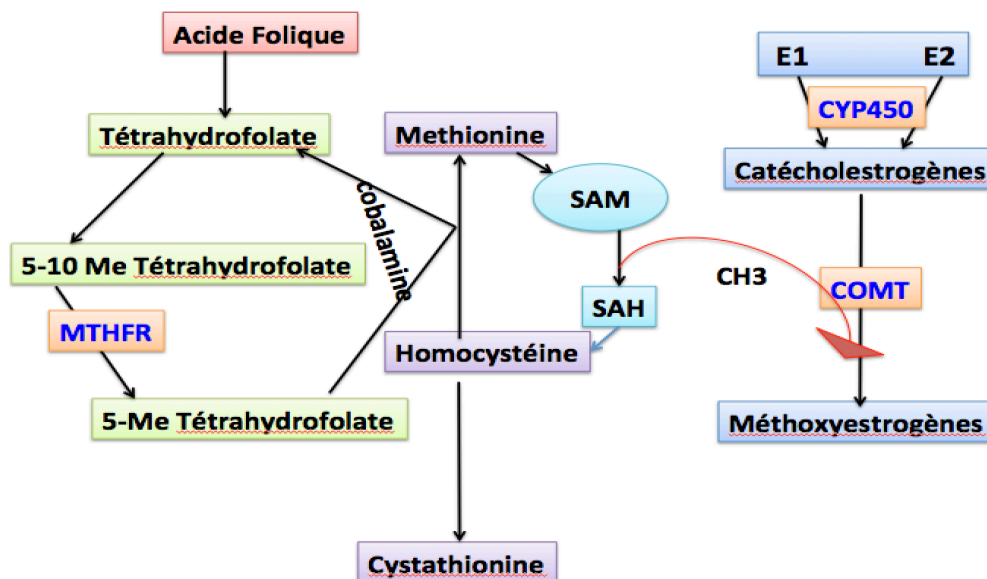
Les catécholoestrogènes : 2-OH-E1, 4-OH-E1, 2-OH-E2, 4-OH-E2 sont des substrats pour la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), qui les convertit en méthoxy-oestrogènes (**figure 20**). Les taux plasmatiques du 2-ME2 retrouvés à terme sont autour de 2000 ng/L.



**Figure 20.** Place de la COMT dans le métabolisme des oestrogènes.

Les principaux substrats de la COMT en compétition avec les catécholoestrogènes sont les catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine). Cette enzyme catalyse le transfert

d'un groupe méthyl depuis la S adénosyl méthionine (SAM) vers les catécholestrogènes en présence de  $Mg^{2+}$  (Guldberg and Marsden, 1975) (**figure 21**).



**Figure 21.** Représentation de la conversion des catécholestrogènes en méthoxyestrogènes.

La méthionine est un acide aminé apporté à l'organisme par l'alimentation, mais il peut aussi être issu de la reméthylation de l'homocystéine par le transfert d'un groupe méthyle 5-méthyltétrahydrofolate (**figure 21**). Ceci est sous la dépendance de la MTHFR mais aussi de l'acide folique issu de l'alimentation. Aussi un déficit en acide folique ou une mutation de la MTHFR peut diminuer la synthèse de méthionine et influencer de manière négative l'activité de la COMT.

La COMT est exprimée par de nombreux tissus dont le placenta (Lunström, 1991) ainsi que l'endothélium vasculaire de l'utérus, de l'aorte et des coronaires (Dubey et al., 2003). Son gène se situe sur le chromosome 22q11.2, il existe un seul gène mais 2 isoformes, une forme soluble (S-COMT) (la principale chez les vertébrés et une forme liée aux membranes intracellulaires (MB-COMT) (Guldberg and Marsden, 1975). Les polymorphismes du gène peuvent favoriser ou inhiber l'activité enzymatique. Un des plus étudiés est le polymorphisme (Val108/158Met). Comparé à l'allèle variant (Met), l'allèle

Val (allèle sauvage) est associé à une plus grande activité de la COMT (Liang et al., 2012) et semble induire une diminution des concentrations plasmatiques d'estradiol (étude incluant des femmes ménopausées prenant de l'estradiol per os) (Worda et al., 2003).

### **3.2.5. Autres voies de métabolisme des estrogènes**

#### **3.2.5.1. Généralités**

Les estrogènes peuvent être métabolisés d'une manière réversible en hormones par sulfatation, glucuronidation ou la formation de quinones. Ces dérivés conjugués sont excrétés dans la bile ou les urines.

#### **3.2.5.2. Sulfatation**

La sulfatation des stéroïdes est d'une part une voie de stockage des oestrogènes (ex sulfate d'estrone) car la sulfatation est réversible sous l'effet de sulfatases, et d'autre part une voie de détoxification conduisant à des produits désactivés hydrophiles prêt à être excrétés dans les urines. Le radical sulfonyl  $\text{SO}_3^-$  est transféré depuis le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) à un groupe hydroxyl (Gamage et al., 2006) grâce à des sulfotransférases (SULTs). Les estrogènes sulfatés fixent l'albumine avec une grande affinité et sont alors inactifs biologiquement car ils sont incapables de fixer les récepteurs (Gamage et al., 2006). La plus importante de ces enzymes est la SULT1E1, synthétisée par les STs et plusieurs autres tissus maternels et foetaux, incluant le foie, les surrénales, le tractus digestif et les seins (Miki et al., 2002). SULT1E1 a une forte affinité pour E1 et E2 à des concentrations nanomolaires qui sont habituelles pendant la grossesse (Falany et al., 1994). Un des rôles le plus probable de cette enzyme est une protection du fœtus contre les effets des oestrogènes sous forme active. (Kallen, 2004). Les souris Knockout pour SULT1E1 ont une fertilité apparente réduite liée à un taux élevé de morts fœtales (Tong et



al., 2005). Ces décès surviennent dans un contexte de thromboses intraplacentaires qui sont prévenues par l'adjonction d'anticoagulant et d'antioestrogènes (Tong et al., 2005).

### **3.2.5.3. Glucuronidation**

Les oestrogènes glucuroconjugués sont solubles dans l'eau et inactifs. Pendant la grossesse la glucuronidation survient principalement dans le foie mais aussi dans le placenta (Aitio, 1974; Paakki et al., 2000). Cette conversion est réversible et il existe des  $\beta$ -glucuronidases y compris dans le placenta qui peuvent déconjuguer les métabolites through out the body (Ginsberg and Rice, 2009).

### **3.2.5.4. Formation de quinones**

Les catécholoestrogènes peuvent être convertis de manière réversible en semi-quinones et quinones qui sont génotoxiques. Les semi-quinones peuvent aussi être détoxifiées par conversion en conjugués glutathion via la glutathion S transférase (Yager and Davidson, 2006).

### **3.2.6. L'HSD17B2 : une protection fœtale à l'interface materno-fœtale ?**

Après leur synthèse par les STs, les stéroïdes sexuels sont en partie déversés dans les chambres intervilluses (circulation maternelle), l'autre partie traverse les couches de CTs et le tissu stromal pour atteindre la circulation fœtale. La répartition hormonale est différente entre les circulations maternelles et fœtales (Hill et al., 2010a), suggérant une possible conversion hormonale avant l'entrée dans le sang fœtal (Gurpide et al., 1982). Une réduction réversible médiée par l'HSD17B2 a été observée avant le passage vers les vaisseaux fœtaux (Drolet et al., 2007; Hill et al., 2010a). Cette enzyme est exprimée par les cellules endothéliales qui longent le compartiment fœtal (Moghrabi et al., 1997).

L'HSD17B2 convertit l'estradiol, la testostérone et la 20 $\alpha$ -DHP en respectivement l'estrone, la  $\Delta$ 4-Dione et la progestérone, (Wu et al., 1993; Blomquist, 1995). Cette conversion pourrait avoir plusieurs buts : tout d'abord un rôle de protection du fœtus contre un excès d'estrogènes ou d'androgènes bioactifs afin d'éviter une féminisation ou une virilisation foetale, mais aussi une protection du cerveau foetal par un apport important de progestérone (Moghrabi et al., 1997).

### **3.3. Les récepteurs aux oestrogènes**

#### **3.3.1. Généralités**

Les récepteurs aux oestrogènes connus sont les ER $\alpha$  et ER $\beta$  mais aussi le GPER (anciennement récepteur orphelin GPR30). Les ERs appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires de type I mais il est admis qu'ils peuvent être aussi localisés dans le cytoplasme (Raam et al., 1983) et, fixés à la membrane cellulaire par palmitoylation ou myristoylation (Acconcia et al., 2003), car ils ne possèdent pas de domaine transmembranaire (Marino and Ascenzi, 2008). Quelque soit leur localisation, les ERs nécessitent une homo ou une hétérodimérisation pour agir. On les retrouve dans de nombreux tissus : placenta, utérus, sein, gonade, cerveau, os, artère, prostate, poumon, tube digestif et tissu adipeux (Arts et al., 1997; Kuiper et al., 1997; Welsh et al., 2012; Pastore et al., 2012) La localisation des récepteurs aux oestrogènes au niveau placentaire et utérin a été détaillée dans la revue de la littérature (**article 1**) et ne sera pas abordée ici.

#### **3.3.2. Structure des ERs**

Ces récepteurs possèdent plusieurs isoformes et variants d'épissage. ER $\alpha$  apparaît comme nécessaire pour le développement des organes génitaux et gonades et ER $\beta$  pour la maturation fonctionnelle (Förster et al., 2002). Le gène codant pour ER $\alpha$  est localisé sur le

chromosome 6 (6q25.1) et celui codant pour ER $\beta$  sur le chromosome 14 (14q23-24.1). ER $\alpha$  transactive les gènes de prolifération alors que ER $\beta$  semble avoir des effets partiellement opposés (pro-apoptiques et anti-prolifération) (Gustafsson, 1999; Gustafsson and Warner, 2000; Helguero et al., 2005) mais d'une manière tissu dépendante (Schultz et al., 2005). ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont tous les 2 composés de 5 domaines A/B, C, D, E et F. Les domaines A/B sont la région N-terminale qui est impliquée dans l'activation et l'expression des gènes cibles de l'estradiol. Cette région contient une fonction d'activation de transcription (AF1) capable d'activer la transcription de gènes en l'absence de ligand (Beato and Klug, 2000; Kumar et al., 2011; Chakraborty et al., 2012). Le domaine C est le domaine de liaison à l'ADN (DBD), c'est la région qui va se lier aux ERE dans l'ADN. Le domaine D est une région charnière entre les domaines C et E/F (Kumar et al., 2011). Les domaines E et F constituent la région C-terminale, avec le domaine de liaison aux ligands (LBD), la fonction transactivation AF2, et les régions impliquées dans la dimérisation des ERs (Kumar et al., 2011). Le domaine E est habituellement composé de 12 hélices 1 à 12. La liaison à un ligand agoniste va induire un changement conformationnel de l'hélice 12 conduisant à i) une compaction du LBD, ii) une ouverture des sites (AF2) qui interagissent avec des coactivateurs et iii) une stabilisation du récepteur dimérisé sur les séquences de régulation des promoteurs (Kumar et al., 2011). La liaison d'un ligand antagoniste conduit à un mouvement de l'hélice 12 dans une position qui va masquer les sites de liaison des coactivateurs (Curtis et al., 1996). Seuls les hétérodimères incluant ER $\beta$ 1 ou ER $\alpha$  peuvent transactiver un promoteur (Leung et al., 2006). Les hétérodimères ER $\alpha$ /ER $\beta$  diminuent l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$ , particulièrement avec ER $\beta$ 2 qui est clairement considéré comme un dominant négatif (Ogawa et al., 1998). Les ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont une distribution tissulaire qui se recoupent mais qui n'est pas identique, de même l'expression

tissulaire de ces récepteurs est différente (Gruber et al., 2002; Chakraborty et al., 2012; Schultz et al., 2005).

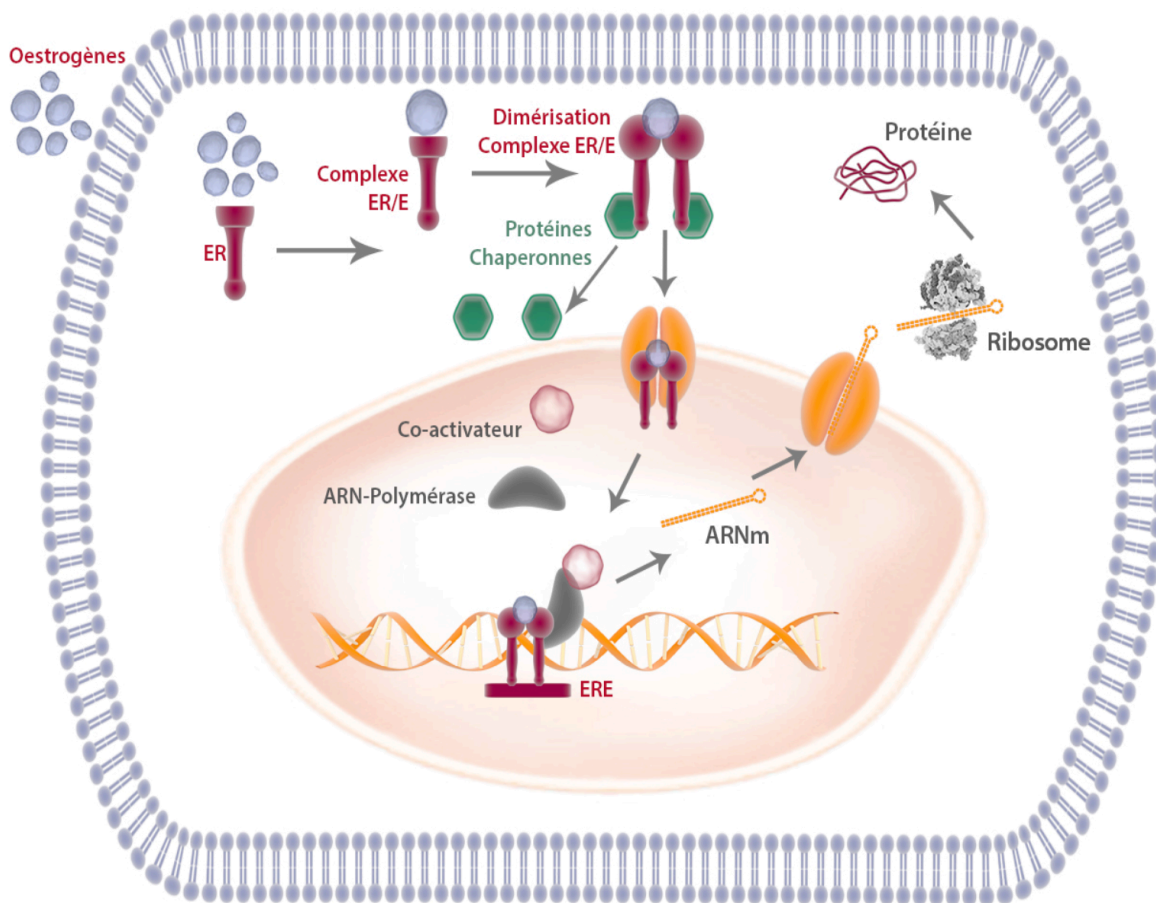
### 3.3.3. Affinité des ERs à leurs ligands

Les domaines de liaison à l'ADN sont similaires pour ER $\alpha$  et ER $\beta$  mais les domaines de liaison aux ligands partagent seulement 55% des acides aminés et expliquent pourquoi les affinités des sous-types de ERs sont différentes pour un même ligand (Green et al., 1986; Witkowska et al., 1997; Girdler and Brotherick, 2000; Choi et al., 2001). Les estrogènes naturels estrone, estradiol et les 2-, 4-, et 16 $\alpha$ - hydroxymétabolites se lient aux ERs (Schütze et al., 1994; Gupta et al., 1998; Miller and Duckles, 2008), mais avec des affinités différentes pour chaque sous-type et isoforme et avec des cinétiques de dissociation différentes (Barnea et al., 1983). Les études montrent qu'à côté de l'estradiol qui a une affinité de 100% pour ER $\alpha$  et ER $\beta$ , le 16 $\alpha$ -OH-E1 a une affinité élevée pour les ERs (Gupta et al., 1998), et l'estrone à un potentiel oestrogénique faible du à une affinité pour les ERs à seulement 60% pour ER $\alpha$  et 37% pour Er $\beta$  (Kuiper et al., 1997). Cependant ces études ont évalué l'affinité des ER en utilisant des tissus spécifiques et des modalités d'études particulières; aussi une extrapolation aux autres tissus pourrait être erronée. Par exemple, l'estriol est connu comme un œstrogène faible avec une faible affinité à un ER humain in vitro (14% pour ER $\alpha$  et 21% pour ER $\beta$ ) comme montré à partir d'un modèle de rat (Kuiper et al., 1997) mais, il présente une haute affinité pour les ERs dans les lignées de cellules cancéreuses humains cultivées (i.e. MCF-7 and T47D cells) (Gupta et al., 1998). Les oestrogènes hydroxylés, tels que le 16 $\alpha$ -OH et les 4 $\alpha$ -OH métabolites présentent des activité oestrogéniques (Westerlind et al., 2000), alors que les 2 $\alpha$ -OH-métabolites ont une affinité très basse pour ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Martucci and Fishman, 1979; Kuiper et al., 1997), ainsi qu'une dissociation plus rapide que le 4 $\alpha$ -OH-estrone (Barnea et al., 1983) et

finalement une métabolisation rapide par la COMT. Aussi, les  $2\alpha$ -OH-oestrogènes pourraient être considérés comme des anti-oestrogènes pour ce qui concerne la prolifération cellulaire liée aux oestrogènes (Schneider et al., 1984; Gupta et al., 1998).

### 3.4. Voies de signalisation des oestrogènes

#### 3.4.1. Généralités



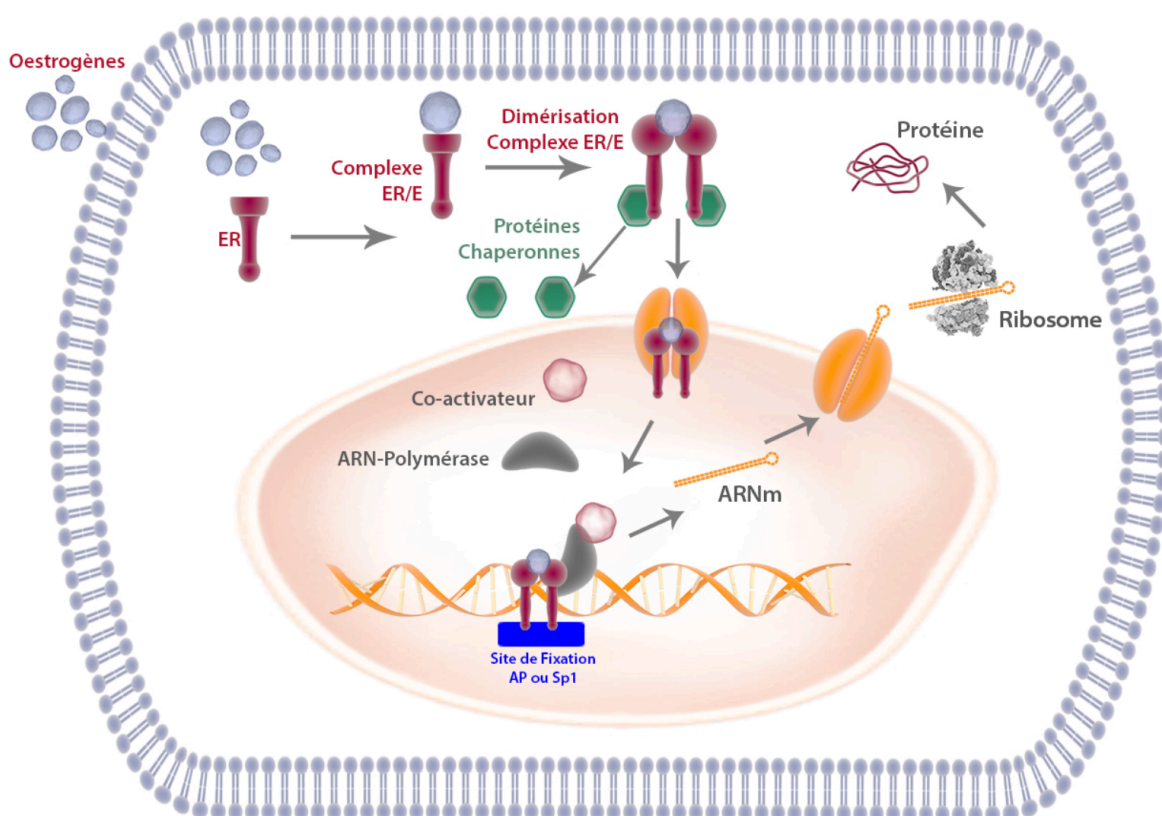
**Figure 22 A.** Voies de signalisation génomiques des récepteurs aux oestrogènes. ER : récepteur aux oestrogènes ; ER/E complexe récepteur aux oestrogènes/oestrogènes ; ARN acide ribonucléique ; ARNm : ARN messenger, ERE : estrogen response element.

Les oestrogènes peuvent avoir des effets génomiques après couplage à leurs récepteurs nucléaires (Chakraborty et al., 2012; Gruber et al., 2002) mais peuvent aussi avoir des effets non génomiques après couplage à leurs récepteurs membranaires (Filardo et al.,

2000; Koganti et al., 2014; Prossnitz et al., 2008; Revankar et al., 2005; Stormshak and Bishop, 2008). La **figure 22** (en 3 parties **A**, **B** et **C**) résume ces voies de signalisation.

### 3.4.2. Les effets génomiques

Les actions génomiques peuvent se faire après fixation d'un récepteur dimérisé à des séquences ERE spécifiques des gènes cibles ou des séquences partielles mais suffisantes pour la fixation, encore appelées ERE-LS (Chakraborty et al., 2012) (**figure 22 A**).

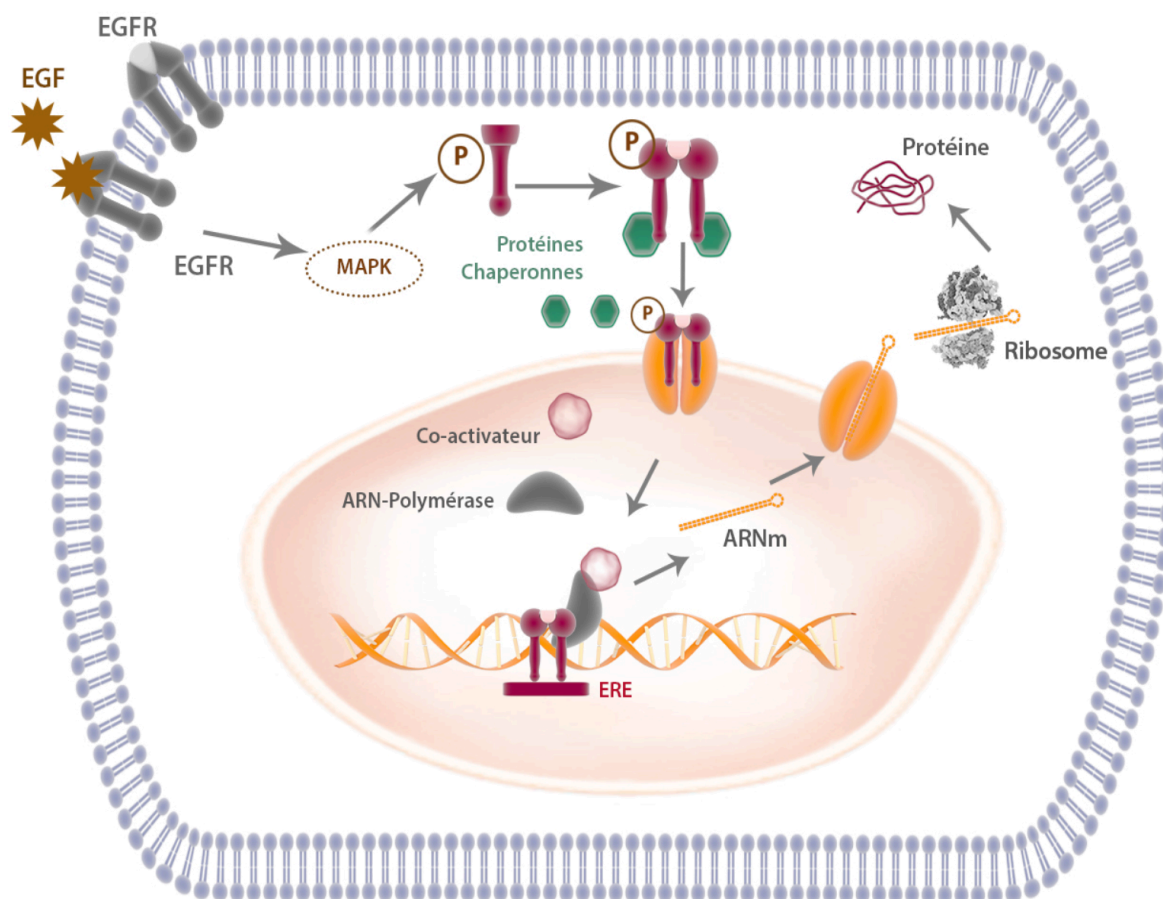


**Figure 22 B.** Voies de signalisation génomiques des récepteurs aux oestrogènes, phénomène de docking.

ER : récepteur aux oestrogènes ; ER/E complexe récepteur aux oestrogènes/oestrogènes ; ARN acide ribonucléique ; ARNm : ARN messager.

Cependant les oestrogènes peuvent utiliser un mécanisme dit de « docking » (**figure 22 B**) et ainsi réguler des gènes sans séquences ERE ou ERE-LS par association à des facteurs transcriptionnels comme SP1 ou le complexe cFos/cJun aussi appelé AP1 (Schultz et al.,

2005). Des mécanismes de docking sans même la liaison des récepteurs aux oestrogènes ont aussi été décrits (Schultz et al., 2005). Enfin une phosphorylation des récepteurs aux oestrogènes peut être induite après le couplage de EGF, IGF ou  $TGF\alpha$  à leurs propres récepteurs (Bunone et al., 1996)(Curtis et al., 1996) (**figure 22 C**).



**Figure 22 C.** Voies de signalisation génomiques des récepteurs aux oestrogènes, couplage avec d'autres récepteurs.

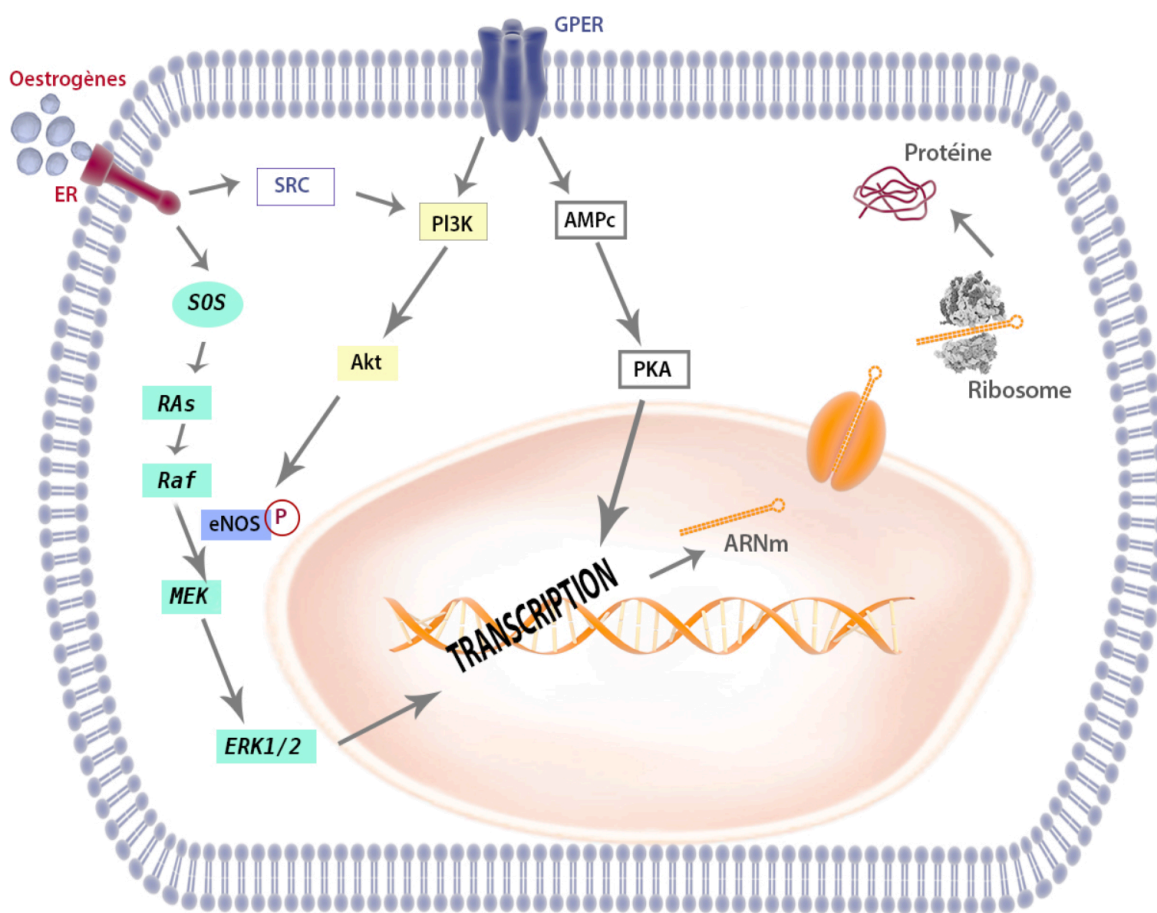
EGF : epidermal growth factor ; EGFR :récepteur de EGF ; MAPK : voie des « mitogen activated protein » kinases ; P : molécule de phosphate; ER : récepteur aux oestrogènes ; ARN acide ribonucléique ; ARNm : ARN messenger.

### 3.4.3. Les effets non-génomiques

Après avoir donné de l'estradiol à un patient ou animal de laboratoire on observe que certains effets apparaissent trop rapidement pour être liés à l'activation d'un ou plusieurs gènes. C'est sur cette base que l'hypothèse de récepteurs membranaires a été initialement



évoquée (Sutter-Dub, 2002; Filardo et al., 2002). Ces actions non génomiques semblent médiées par le GPER (Revankar et al., 2005), un récepteur non conventionnel des oestrogènes - faisant partie de la famille des récepteurs à 7 traversées membranaires - couplé à une protéine G (Filardo et al., 2002; Filardo et al., 2007), ou pour d'autres auteurs par  $Er\alpha$  et  $Er\beta$  qui peuvent être maintenus à la membrane par palmitoylation ou myristoylation (Corcoran et al., 2014).



**Figure 23.** Voies de signalisation non- génomiques des récepteurs aux oestrogènes.

ER : récepteur aux oestrogènes; GPER : récepteur aux oestrogènes couplé à la protéine G; PI3K : phosphoinositide 3-kinase; akt : protéine kinase B ; P : phosphate; ARN : acide ribonucléique ; ARNm : ARN messenger ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique; PKA : protéine kinase A; eNOS : endothelial nitric oxide synthase; ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases. Le schéma montre l'activation par le complexe E/ER ou E/GPER de la voie Ras/MAPK, de la voie PI3k/Akt et de la voie de l'AMPc.

Ces effets non génomiques sont à l'origine de la vasorelaxation, via la voie de signalisation PI3K/Akt et conduisent à une phosphorylation de l'eNOS permettant le relargage de NO



(Caulin-Glaser et al., 1997; Dimmeler et al., 1999; Haynes et al., 2000; Hisamoto et al., 2001; Simoncini et al., 2002) (**figure 23**).

L'estradiol va agir aussi en mobilisant le calcium intra-cellulaire dans les cellules endothéliales artérielles (Stefano et al., 2000). Cette augmentation du calcium cytosolique  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  favorise l'activation de l'eNOS (Stefano et al., 2000) et conduit aussi à une vasorelaxation via la voie du NO/GMPc (Darkow et al., 1997). En parallèle de la synthèse de NO, les oestrogènes induisent une synthèse rapide de prostacycline (5-15 min) par les HUVEC (Alvarez et al., 2002) via les récepteurs membranaires (ER +/- GPER) et les mobilisations calciques (Sherman et al., 2002).

#### **3.4.4. Les effets mixtes**

Les actions non génomiques des oestrogènes peuvent conduire aussi à une activation de transcription via la phosphorylation de cFos par ERK 1/ 2 favorisant l'expression d'eNOS (Chambliss and Shaul, 2002) et la synthèse de Cox-2 (Sobrino et al., 2009) qui vont promouvoir la synthèse de NO et de prostacycline dans les cellules endothéliales et permettre une diminution du vasotonus.

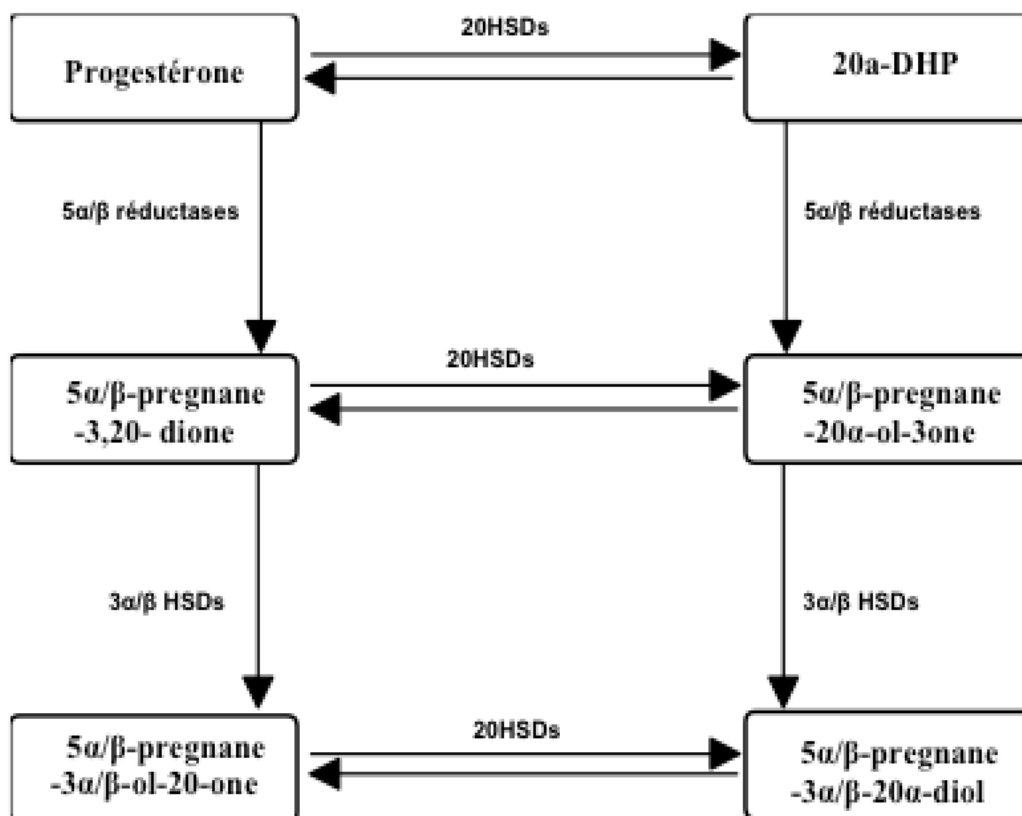
#### **3.4.5. Les autres effets des oestrogènes**

Les oestrogènes semblent aussi directement influencer les canaux ioniques des fibres musculaires lisses des vaisseaux (Stefano et al., 2000; Salom et al., 2001)(Younglai et al., 2005) et induire une inhibition des canaux calciques voltage-dépendants (Salom et al., 2001; Montgomery et al., 2003) ainsi qu'une hyperpolarisation membranaire via une activation des canaux potassiques (Orshal and Khalil, 2004). D'ailleurs, certaines études suggèrent que la vasorelaxation induite par les catécholoestrogènes (C-2 et C-4) résultent principalement d'un effet via les canaux calciques (Das et al., 1998; Stice et al., 1987).

### 3.5. Synthèse et métabolisme de la progestérone

#### 3.5.1. Progestérone et métabolites

La progestérone est une hormone stéroïdienne dérivée du cholestérol, sa forme circulante est d'origine ovarienne sauf lors de la grossesse humaine où le placenta est le lieu essentiel de sa synthèse dès 6-8 SA (**figure 15**).



**Figure 24.** Métabolisme de la progestérone au cours de la grossesse.

Dans les STs, le cholestérol est métabolisé en prégnénolone par la CYP450sc et finalement en progestérone par la HSD3B1. Cependant il n'est pas exclu que le sulfate de prégnénolone surrénalien soit aussi un substrat permettant la synthèse de progestérone (Kaludjerovic and Ward, 2012; Hill et al., 2010b).

D'autres organes comme le système nerveux central ou les glandes surrénales synthétisent de la progestérone. Elle est aussi le précurseur d'autres hormones telles que les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les androgènes.

### 3.5.2. Métabolisme et Elimination de la Progestérone

Le métabolisme de la progestérone se produit principalement dans le foie mais des études récentes montrent que de nombreux tissus peuvent métaboliser la progestérone (Wiebe, 2006). Dans le placenta, la progestérone est convertie par plusieurs enzymes principalement les 5, 20 et 3 hydroxylases qui vont produire différents métabolites (**figure 24**). Les métabolites anciennement considérés comme peu ou non actifs (Wiebe, 2006) ; en fait certains d'entre eux, par exemple, le 5 $\alpha$ -DHP peuvent se fixer au récepteur de la progestérone et avoir une action agoniste (Wiebe et al., 2013). Les autres 20 $\alpha$ -DHP, 3 $\alpha$ / $\beta$ -DHP, ou les métabolites obtenus après plusieurs hydroxylations (3 $\alpha$ / $\beta$ -5 $\alpha$ / $\beta$ -THP, 3 $\alpha$ / $\beta$ -5 $\alpha$ / $\beta$ -20 $\alpha$ -HHP, ...) n'ont pas la capacité de fixer le récepteur de la progestérone. De ce fait la conversion de la progestérone en ces derniers métabolites conduit à une inactivation de la progestérone et à des effets « opposés » à ceux de la progestérone que régulièrement à tort on attribue à celle-ci (Wiebe, 2006). Le rôle de ces métabolites est en cours d'étude tout particulièrement en cancérologie du sein. Les 5 $\alpha$ -DHP semblent stimuler la tumorigénèse alors que les 3 $\alpha$ -DHP exhibent des effets supprimeurs (Wiebe et al., 2013). La 20 $\alpha$ -DHP est le métabolite principal de la progestérone et puisque le métabolite obtenu ne se lie pas aux récepteurs de la progestérone, la 20 $\alpha$ -hydroxylase exerce de fait une action de modulation de la progestérone. L'élimination se fait via les 5 $\alpha$ / $\beta$  puis 3 $\alpha$ / $\beta$  puis 20 $\alpha$ / $\beta$ -20 $\alpha$  hydroxylations, formant alors des métabolites type pregnanediols hémahydrogénés qui peuvent être conjugués par glucuronidation et/ou sulfatation par le foie ou d'autres organes puis excrétés par le rein dans les urines. (Stanczyk, 2003).

### **3.5.3. Les effets de la progestérone**

Les effets attribués à la progestérone sont variables et contradictoires. Ils dépendent du tissu étudié; par exemple sur le sein, la progestérone exerce des effets prolifératifs et tumorigéniques (Kim et al., 2013) et à l'opposé sur l'endomètre, on retrouve des effets suppresseurs de l'effet prolifératif des oestrogènes (Kim and Chapman-Davis, 2010), enfin au niveau ovarien les effets sont protecteurs vis à vis du cancer (Modugno et al., 2012).

Ses effets sont très probablement dépendant des conversions enzymatiques locales conduisant à tel ou tel métabolite (Wiebe et al., 2013) mais aussi évidemment, à l'expression cellulaire des récepteurs à la progestérone et en particulier du type de récepteur car leur signalisation peut induire des effets opposés (cf § récepteurs à la progestérone). La progestérone est indispensable à la survenue et au maintien d'une grossesse en agissant sur l'endomètre par action de blocage des effets des estrogènes, et mise en place d'une réceptivité de l'endomètre à la grossesse (décidualization) (Young and Lessey, 2010). La progestérone agit aussi sur le myomètre en favorisant un état de quiescence utérine comme le souligne les effets bénéfiques de traitements par progestérone chez certaines patientes pour lutter contre la menace d'accouchement prématuré (Romero et al., 2018).

La progestérone et ses métabolites agissent par voie génomique, mais comme pour les oestrogènes des effets rapides ont été décrits qui sont la conséquence de voies non génomiques (Dressing et al., 2011; Moussatche and Lyons, 2012).

## **3.6. Les récepteurs de la progestérone**

### **3.6.1. Les récepteurs propres de la progestérone**

Le récepteur classique de la progestérone appartient au 3ème sous-groupe des récepteurs nucléaires avec ceux des androgènes, des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes

(Evans et al., 1987)(Mangelsdorf et al., 1995). Le récepteur se présente sous la forme de 2 principales isoformes PRA et PRB. PRA est une forme courte de 94 kDa et 780 acides aminés, PRB est une forme longue de 114/116 kDa et 933 acides aminés (Giangrande and McDonnell, 1999). Ces 2 isoformes sont liées à des transcriptions alternatives à partir de 2 promoteurs différents régulés par  $Era$  mais aussi par d'autres régulateurs (Flötotto et al., 2004). PRA se comporte comme un inhibiteur des actions de la progestérone médiées par PRB. Par technique de RT-PCR seul PRA a été retrouvé au niveau placentaire (Shanker and Rao, 1999; Viglierchio et al., 2015) alors qu'une étude plus récente a conclu que c'est une 3<sup>ème</sup> isoforme du récepteur de 60 kDa, PRC qui serait l'isoforme placentaire majoritaire (Taylor et al., 2009). Cette 3<sup>ème</sup> isoforme localisée dans le cytoplasme ne provient pas d'une protéolyse de PRA ou PRB mais est issue d'un ARNm spécifique (Wei et al., 1996). PRC n'a pas de domaine de liaison à l'ADN mais a un signal localisé dans le noyau et 2 domaines de dimérisation et peut s'associer à des facteurs de transcription ou une fonction cytoplasmique (Wei et al., 1996). C'est probablement un modulateur de PRA et PRB tout particulièrement en agissant comme un inhibiteur de PRB (Wei et al., 1996; Condon et al., 2006; Goldman and Shalev, 2007), d'autres études restent encore nécessaires pour confirmer ces premières observations. Enfin des récepteurs membranaires de la progestérone appelés mPR ( $mPR\alpha$ ,  $mPR\beta$ ,  $mPR\gamma$ ) ont aussi été décrits, ils sont sans analogie de structure avec les récepteurs nucléaires et appartiennent à la famille des récepteurs à la progestérone et l'adiponectine (PAQRs) (Thomas, 2008; Pang et al., 2015). La régulation des récepteurs de la progestérone au cours de la grossesse semble complexe (Fernandes, 2005; Zachariades et al., 2012) et nécessite de futurs travaux pour en comprendre la signalisation au cours de la grossesse normale. Cette phase est indispensable à une interprétation univoque des variations de concentrations de la progestérone et de ses métabolites au cours de la grossesse normale et de la prééclampsie.

### **3.6.2. Les autres récepteurs qui fixent la progestérone**

La progestérone et certains de ses métabolites peuvent se lier aux récepteurs des androgènes et des minéralocorticoïdes. Sur le récepteur aux androgènes, la progestérone exerce des actions agonistes et antagonistes partielles (Maness et al., 1998). Pour ce qui est du récepteur aux minéralocorticoïdes, la progestérone a une affinité plus importante que l'aldostérone elle-même, elle exerce alors un effet antagoniste (Quinkler et al., 2002). La 20 $\alpha$ -DHP, a une affinité plus faible pour le récepteur des minéralocorticoïdes évaluée à 30% de celle de l'aldostérone mais ce métabolite induit un effet agoniste partiel pouvant induire de ce fait une hypertension artérielle (Quinkler et al., 2002).

## **3.7. Protéines de transport des oestrogènes et de la progestérone**

### **3.7.1. Généralités**

Les stéroïdes sexuels retrouvés dans le sang maternel sont peu solubles dans l'eau et circulent majoritairement sous une forme liée à des protéines ou glycoprotéines de transport. Les protéines de transport sont principalement pour les oestrogènes et les androgènes : la SHBG et l'albumine et pour les progestatifs : la transcortine (encore appelée corticosteroid binding globulin ou CBG) et l'albumine (Klieber et al., 2007; Round et al., 2018). La forme biodisponible des hormones correspond à la somme de la forme libre et de celle liée à l'albumine. Ces 2 formes permettent une diffusion dans les cellules pour atteindre leurs cellules cibles car la liaison à l'albumine est faible (Nguyen et al., 2008), alors que la liaison à la SHBG et la transcortine rendent les stéroïdes inopérants. Il est intéressant de noter que l'estriol, lui n'est principalement lié qu'à l'albumine (Moutsatsou and Oakey, 1988).

### 3.7.2. La SHBG

La SHBG est une glycoprotéine d'environ 90kDa qui se présente sous forme d'homodimère (Westphal, 1986). Elle a une synthèse hépatique et une régulation dépendante des hormones ; en effet la testostérone et l'insuline inhibent la synthèse de la SHBG (Preziosi et al., 1993) alors que les estrogènes l'augmentent (Rosner, 1990). Des situations particulières tels que l'hypothyroïdie, l'obésité ou la présence d'un SOPK diminuent la concentration de SHBG, à l'inverse un régime pauvre en graisse augmente sa synthèse (Reed et al., 1987; Rosner, 1990). Cette glycoprotéine de transport a une affinité différente pour les stéroïdes : DHT > testostérone > androstènediol > estradiol > estrone. En effets les stéroïdes qui comportent un groupe 17 $\alpha$ -hydroxyl se lient très bien à la SHBG (testostérone, DHT, androstènediol et estradiol) alors que les kétostéroïdes C19 (DHEA,  $\Delta$ 4-Dione) ont une liaison bien plus faible (Cunningham et al., 1981). Lors de la grossesse les taux de SHBG sont multipliés par un facteur 10 sous l'effet des oestrogènes. Chez les femmes qui vont présenter une prééclampsie les résultats sont contradictoires, il a été mis en évidence une association entre des taux bas de SHBG au 1<sup>er</sup> ou 2<sup>nd</sup> trimestre et la survenue d'une prééclampsie par certains (Tamimi et al., 2003; Yu et al., 2004). Mais d'autres auteurs ne retrouvent pas de différence entre les groupes PE et les groupes contrôles (Spencer et al., 2005).

### 3.7.3. La transcortine

La transcortine appartient à la famille des serpinés, Il s'agit d'une alphaglobuline (Hammond, 2016). Les estrogènes stimulent la synthèse de la transcortine (Evans et al., 1987). La transcortine lie le cortisol mais aussi la progestérone (Hammond, 2016). En présence de taux élevés de progestérone, il se produit un déplacement du cortisol fixé vers

sa forme libre (Hammond, 2016). La concentration plasmatique de transcortine s'élève régulièrement au cours de la grossesse (Jung et al., 2011) pour atteindre des taux 3 fois supérieurs à ceux d'une femme non enceinte. Il a été rapporté une baisse des concentrations de transcortine au cours de la prééclampsie (Ho et al., 2007).

### **3.8. Problématiques des mesures de concentrations des stéroïdes**

Le dosage des hormones stéroïdiennes mesure le plus souvent la forme libre et l'ensemble des formes liées. Si en dehors de la grossesse la mesure de la forme biodisponible semble plus fiable pour refléter l'activité biologique de l'E2 ou de la progestérone par exemple (Nguyen et al., 2008), pendant la grossesse l'augmentation des concentrations en estradiol ou en progestérone est si importante et tellement supérieure à celle de la SHBG ou de la transcortine que les conclusions tirées à partir de dosages totaux de E2 ou de progestérone par exemple doivent être considérés comme un bon reflet de l'activité de ces hormones.

### **3.9. Stéroïdes et prééclampsie**

#### **3.9.1. Généralités**

C'est à partir d'une publication de Kanasaki et al (Kanasaki et al., 2008) que le débat sur l'implication des oestrogènes dans la survenue de la prééclampsie a été réouvert. En utilisant un modèle de souris déficientes pour le gène codant pour l'enzyme COMT - enzyme de synthèse des méthoxyœstrogènes (2-ME<sub>2</sub>,...) – cette équipe a mis en évidence : i) une association de taux bas de 2ME-2 et la survenue d'une prééclampsie et ii) la prévention du tableau de prééclampsie par l'apport de 2ME-2 chez ces souris. Cette équipe retrouvait aussi des taux plus bas de 2ME-2 dans un groupe de femmes avec prééclampsie comparé à un groupe contrôle (Kanasaki et al., 2008). Cette séduisante hypothèse se heurtait tout de même au fait que si cette anomalie génétique était la cause principale de



survenue d'une prééclampsie, elle serait à l'origine de prééclampsies à répétition, alors que le plus souvent, la prééclampsie survient chez des patientes nullipares et ne récidive pas.

### **3.9.2. Interaction entre implantation trophoblastique et stéroïdogénèse**

L'estradiol et la progestérone ainsi que leurs métabolites participent aux phénomènes physiologiques de l'implantation en favorisant la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire ainsi que l'angiogénèse (Berkane et al., 2017). A l'inverse comme la source de ces hormones est placentaire chez les humains et certains primates, on pourrait supposer qu'un placenta dysfonctionnel puisse être à l'origine d'une stéroïdogénèse anormale par i) une diminution du nombre de STs qui synthétisent les stéroïdes, et/ou ii) une diminution d'activité ou d'expression des enzymes en raison de l'hypoxie locale, et/ou iii) une augmentation d'activité ou d'expression d'enzymes qui accentueraient le métabolisme de certains stéroïdes. Il est possible que la réalité soit un « mix » de toutes ces hypothèses.

### **3.9.3. Oestrogènes et prééclampsie**

Dans les études qui ont suivi le travail de Kanasaki et al (Kanasaki et al., 2008), la mesure de plusieurs stéroïdes et la réalisation de profil stéroïdien large ont permis de mettre en évidence une association entre prééclampsie et défaut d'aromatisation établi par un ratio produit/substrat (Hertig et al., 2010) ou par un taux bas d'estrone et/ou d'estradiol au niveau sanguin (Jobe et al., 2013; Yin et al., 2013; Bussen and Bussen, 2011; Salas et al., 2006) ou au sein du tissu placentaire (Açıkgöz et al., 2013).

### **3.9.4. Progestatifs et prééclampsie**

Peu d'études ont porté sur la modification des concentrations plasmatiques de progestérone et aucune sur le profil des métabolites de la progestérone chez les femmes prééclampsiques. Les résultats rapportés sont contradictoires, les taux de progestérone sont augmentés, identiques ou abaissés selon les publications (Salas et al., 2006; Walsh, 1988; Zamudio et al., 1994; Zeisler et al., 2000; Luisi et al., 2000). On doit souligner tout d'abord qu'en dehors de mesures réalisées par GC/MS ou LC/MS il est illusoire de discuter de concentrations de progestérone. En effets, les techniques de RIA ou ELISA distinguent très mal la progestérone et la  $20\alpha$ -DHP son principal métabolite (data du labo). Or, ce point est fondamental comme on pourra le voir dans le 3<sup>ème</sup> article de ce travail.

#### **3.9.5. Les précurseurs des oestrogènes et des progestatifs et prééclampsie**

Dans l'étude réalisée en 2010 (Hertig et al., 2010) nous avons retrouvé un taux significativement très bas de sulfate de prégnénolone chez les patientes prééclampsiques à l'accouchement mais nous ne l'avons pas interprété faute d'explications satisfaisantes et démontrables.

# Traitements de la prééclampsie

## 4.1. Traitements préventifs

### 4.1.1. Aspirine

Nous sommes démunis en terme de traitement préventif. Seule, l'aspirine prescrite très précocement à des doses antiagrégantes (75- 160 mg) semble diminuer partiellement le risque de survenue d'une prééclampsie ou de complications de la grossesse dans certains groupes ou sous-groupes de populations étudiés (Beaufils et al., 1985; Uzan et al., 1991; CLASP collaborative Group, 1994; Askie et al., 2007; Roberge et al., 2017; Meher et al., 2017). Mais ce traitement doit être initié tôt dans la grossesse et être poursuivi jusqu'au terme pour avoir un effet (Roberge et al., 2017).

### 4.1.2. Héparine

Une métaanalyse récente a analysé l'apport d'héparine fractionnée associé à l'aspirine dans les récurrences de prééclampsie et n'a pas retrouvé d'effets positifs (Rodger et al., 2016). Le même manque d'efficacité a été observé dans un essai randomisé français qui s'intéressait aux patientes ayant eu un antécédent de prééclampsie sévère (Haddad et al., 2016).

### 4.1.3. Traitement par la progestérone

La progestérone a été proposée comme traitement préventif de la prééclampsie, mais une revue de la Cochrane souligne l'absence de conclusions fiables des essais ou études rapportées et conclue que l'efficacité d'un tel traitement reste encore à démontrer (Meher and Duley, 2006).

## **4.2. Traitements curatifs**

Il n'existe pas de traitement curatif de la pathologie hormis l'accouchement qui par le retrait du placenta fait cesser dans les jours ou semaines qui suivent les signes maternels.

### **4.2.1. Traitements expérimentaux en cours d'évaluation**

#### **4.2.1.1. Epuration du sang maternel en sFlt-1**

Thadhani et al (Thadhani et al., 2011) ont fait une étude pilote suivi d'une étude plus conséquente et ont suggéré que diminuer le sFlt-1 circulant dans le sang maternel permettrait de prolonger les grossesses et de diminuer la prématurité (Thadhani et al., 2016). Cette épuration extracorporelle ou aphérèse par adsorption de sFlt-1 est basée sur la charge électrique du sFlt-1 (chargé positivement). Le sFlt-1 peut être fixé par des colonnes d'aphérèse habituellement utilisées pour fixer les LDL lors d'hyperlipidémie familiale. Cependant un protocole de recherche français qui a voulu reproduire ce travail a été interrompu au bout de 2 patientes pour effets indésirables (NCT02286284). A cette heure on doit donc rester prudent devant cette technique séduisante d'un point de vue théorique mais à un stade encore très expérimental.

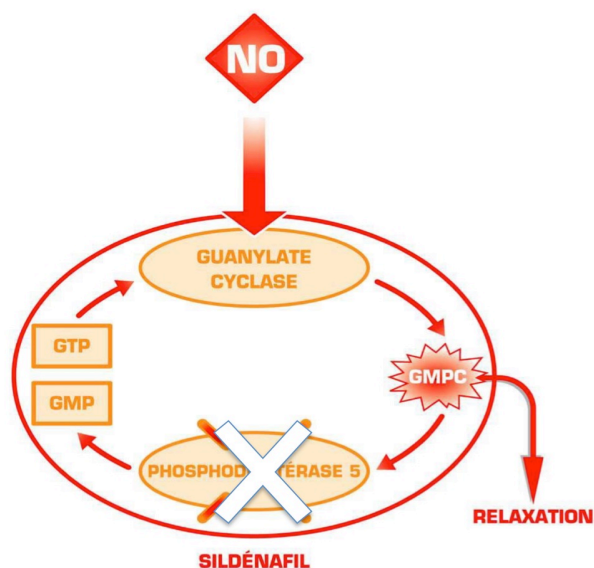
#### **4.2.1.2. Statines**

Cette classe de médicaments a pour but de baisser la synthèse endogène du cholestérol et semble baisser le risque de récurrence d'accident vasculaire. Elle est utilisée chez le sujet non enceinte avec antécédent vasculaire ou à haut risque. Toutes les statines ne se valent pas tant pour leurs effets positifs qu'indésirables. Le choix doit se porter en premier lieu sur la pravastatine. Si l'effet de baisse du cholestérol n'est pas contesté, son efficacité sur la mortalité est elle actuellement controversée de même que son absence d'innocuité (Culver, 2012)(DuBroff, 2015). De plus le cholestérol est une molécule importante pour le

développement du fœtus et particulièrement de son cerveau. La pravastatine a donc été proposée à des femmes enceintes présentant une prééclampsie précoce (Brownfoot et al., 2015; Marrs and Costantine, 2017). Cette molécule semble diminuer le taux de sFlt-1 et contenir les pressions artérielles et la protéinurie (Brownfoot et al., 2015). Compte tenu des controverses sur les patients non enceintes, une grande prudence dans l'étude de ces molécules chez la femme enceinte doit s'imposer.

#### 4.2.1.3. Sildénafil (Viagra)

Le NO est une molécule vasorelaxante par son action sur la guanylate cyclase qui favorise la synthèse de GMPc. Par un phénomène de régulation, ce dernier est transformé à nouveau en GMP par la phosphodiesterase 5. Le sildénafil favorise la relaxation vasculaire par son action d'inhibition sur la phosphodiesterase 5 en maintenant un taux élevé de GMPc (figure 25).



**Figure 25.** Mode d'action du Sildénafil.

L'essai chez la femme enceinte prééclamptique a été fait avec une efficacité relative, les grossesses ont été prolongées de 4 jours chez des femmes avec prééclampsie modérée (Trapani et al., 2016) Une analyse intermédiaire d'une étude interventionnelle néerlandaise

réalisée entre 2015 et 2018, sildenafil contre placebo, pour améliorer l'issue des grossesses avec RCIU a alerté sur un surrisque de mortalité chez les fœtus du groupe sildenafil (19/93 versus 9/90 dans le groupe placebo). De plus sur les 19 fœtus morts, 11 étaient à mettre en lien avec une HTAP alors qu'aucun des 9 décès du groupe placebo ne présentait d'HTAP (the international STRIDER Consortium et al., 2017; Groom et al., 2018). Même si d'autres études ne rapportent pas ce surrisque, voire rapportent des effets bénéfiques pour le fœtus en RCIU (Maged et al., 2018), ou avec oligoamnios (Maher et al., 2017), une grande prudence doit être de mise quant à la prescription de ce médicament au cours de la grossesse humaine (Groom et al., 2018).

**Hypothèses**

**Méthodes**

**Objectifs de l'étude**

# Hypothèses, Méthodes et Objectifs de l'étude

## Hypothèses :

### 5.1. Généralités

Nos travaux antérieurs avaient conforté le lien entre des taux élevés de sFlt-1 et la prééclampsie, non seulement à l'accouchement, mais aussi plusieurs semaines avant le diagnostic de prééclampsie (dès la période 25-28 SA) (Hertig et al., 2004). J'avais en parallèle participé à un travail effectué au sein du laboratoire (U1195 Inserm) qui avait montré que le profil stéroïdien à l'accouchement des femmes enceintes avec prééclampsie, différent de celui de patientes contrôles (Hertig et al., 2010). Une diminution des taux d'estradiol avait été mise en évidence et le mécanisme suspecté, était un dysfonctionnement dans l'expression et/ou l'activité de l'enzyme aromatasé. Dans le cadre d'un contrat de recherche clinique APHP, j'ai pu créer une cohorte de patientes nullipares (n=1022), les patientes étaient incluses dans un essai randomisé (MOMA Study, NCT00763672). Notre travail rapporté ici inclut l'étude MOMA, une des études ancillaires (le profil stéroïdien à 24-29 SA) et l'étude de l'expression de l'aromatasé placentaire.

### 5.2. Hypothèses

**Hypothèse 1 : *La connaissance d'un taux élevé de sFlt-1 permet d'améliorer l'issue de la grossesse.***

Si un taux élevé de sFlt-1 a été démontré comme associé à la survenue d'une prééclampsie, et ce plusieurs semaines avant les signes cliniques, l'implémentation de sa mesure en routine n'a de sens que si elle apporte une plus value dans la prise en charge des patientes et améliore l'issue de grossesse.



**Hypothèse 2 : *La prééclampsie est marquée par une perturbation globale et spécifique de la stéroïdogénèse qui précède l'apparition des signes cliniques.***

Les études récentes ont mis en évidence des anomalies de la stéroïdogénèse lorsqu'une patiente présente une prééclampsie. Cependant si l'on veut envisager certains stéroïdes comme biomarqueurs il faut que les modifications constatées soient spécifiques et surviennent plusieurs semaines avant les signes cliniques de prééclampsie.

**Hypothèse 3 : *La prééclampsie est caractérisée par un défaut d'expression de l'aromatase placentaire.***

Le ratio E1/ $\Delta$ 4-Dione abaissé au cours de la prééclampsie suggère une baisse de l'expression de l'aromatase. Néanmoins les résultats pourraient être biaisés par un métabolisme excessif en aval par exemple. Aller à l'expression du gène permettra de confirmer ou non les conclusions issues des dosages plasmatiques.

## Méthodologie

### 5.3. Analyse bibliographique (article 1)

Les stéroïdes sexuels sont synthétisés par le placenta en très grande quantité au cours de la grossesse normale. Comme détaillé dans la première partie de ce manuscrit, ils ont pour la majorité d'entre eux des effets vasodilatateurs et angiogéniques. Ils favorisent aussi la prolifération et la différenciation trophoblastique. Enfin tant le trophoblaste que l'utérus et les vaisseaux maternels expriment certains des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone. Tous ces effets sont nécessaires au déroulement d'une grossesse normale. Les premières études sur la stéroïdogénèse au cours de la prééclampsie s'étant révélées contradictoires le sujet a été délaissé. L'utilisation récente de techniques de GC/MS ou LC/MS a permis de réévaluer de manière plus fiable l'association entre stéroïdogénèse anormale et prééclampsie.

Nous avons réalisé une revue bibliographique (**article 1**) spécifiquement sur l'estradiol, ses métabolites et ses précurseurs. Nous avons développé dans cette revue les particularités de leur synthèse, métabolisme, récepteurs et voies de signalisation au cours de la grossesse normale et pathologique. Les liens entre facteurs angiogéniques et antiangiogéniques et oestrogènes ont aussi été abordés. La recherche bibliographique a porté sur la littérature publiée sur l'ensemble de ces points. Pour les études portant sur les concentrations en oestrogènes et la prééclampsie nous nous sommes principalement intéressés aux études récentes. Les moteurs de recherche utilisés ont été Google et Google scholar, les bases de données : Pubmed (Medline) Embase et The Cochrane Library enfin le catalogue de bibliothèque BIU santé et l'archive ouverte HAL pour l'accès aux thèses antérieures. Cette revue de la littérature correspond au 1<sup>er</sup> article de ce travail, publié dans la revue Endocrine Reviews (Berkane et al., 2017).

#### **5.4. Méthodologie clinique : Essai MOMA (article 2)**

Pour mettre en évidence la validité de notre 1<sup>ère</sup> hypothèse (*la connaissance d'un taux élevé de sFlt-1 permet d'améliorer l'issue de la grossesse*), nous avons mis en place un essai interventionnel randomisé contrôlé à 2 bras, le bras intervention (résultat du sFlt-1 connu) et le bras contrôle (résultat du sFlt-1 non connu). Un seul prélèvement sanguin permettant la mesure des concentrations de sFlt-1 était réalisé au cours de la grossesse et ce dans la période >24 SA et 29 SA<. Ce travail constitue le corps de l'article 2 soumis à la revue BJOG.

##### **5.4.1. Type d'étude**

Il s'agit d'une étude randomisée contrôlée (1:1) stratifiée par le résultat de la mesure du Doppler aux artères utérines. La randomisation par bloc de 4 était faite par le laboratoire de Biochimie de l'hôpital Tenon à partir d'une liste générée par ordinateur. Les patientes (individuellement ou par le biais d'une association) n'ont pas participé à la conception de l'étude. En raison de l'absence de risque maternel ou fœtal attendu il n'a pas été prévu de comité de surveillance de l'essai. Cet essai a été financé par un contrat de recherche clinique (CRC05143-P051060). Les sponsors n'ont pas participé à l'écriture du protocole ou des articles issus de cet essai. Le protocole a été enregistré avec le numéro (NCT00763672) sur le site « ClinicalTrials.gov ». Le protocole et les amendements ont été approuvés par le comité d'éthique (Comité de Protection des Personnes, Paris Ile de France - I), Paris, France. Toutes les patientes devaient donner leur consentement par écrit avant de pouvoir participer à cette étude et il ne devait pas y avoir de barrière linguistique gênant la compréhension de l'information claire et loyale délivrée. Le consentement signé des patientes autorisait que la plasmathèque et l'urinothèque réalisées puissent être

utilisées pour des études ancillaires ultérieures non génétiques portant sur l'hypertension au cours de la grossesse et le RCIU.

#### **5.4.2. Les critères d'inclusion et d'exclusion**

Les critères d'inclusion étaient les suivants: i) un âge maternel  $\geq 18$  ans, ii) être enceinte de sa première grossesse évolutive (pas d'antécédent de grossesse  $\geq 22$  SA), iii) une grossesse unique iv) être suivie à la maternité de Tenon avant 29 SA. L'âge gestationnel était calculé en utilisant la date des dernières règles ou le résultat de l'échographie du 1<sup>er</sup> trimestre en cas de différence de plus de 5 jours. Le critère d'exclusion était une absence de couverture sociale.

#### **5.4.3. Les définitions utilisées pour cet essai**

Un Doppler aux artères utérines était considéré comme pathologique lorsqu'il persistait des notchs et/ou des index de résistance élevés ( $> 0.65$ ) de manière bilatérale après 25 SA. L'hypertension était définie comme des PAS  $\geq 140$  mmHg ou des PAD  $\geq 90$  mmHg mesurées 2 fois dans un intervalle de 2h à 2 jours. La protéinurie était définie comme présente et pathologique si  $\geq 300$  mg/L à 2 occasions successives. La prééclampsie était définie comme l'apparition d'une hypertension et d'une protéinurie après 20 SA ou avant de quitter l'hôpital (post-partum). L'hypertension chronique était définie comme une hypertension diagnostiquée avant la grossesse ou avant 20 SA et une prééclampsie surajoutée était définie comme une prééclampsie survenant chez une patiente hypertendue chronique. La définition de petit pour l'âge gestationnel correspondait à un nouveau-né dont le poids de naissance était inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile selon nos courbes (Salomon et al., 2007). L'éclampsie était définie comme la présence de convulsions et/ou d'un coma inexpliqué au cours de la grossesse ou dans la période du post-partum chez les femmes

avec des symptômes de prééclampsie. L'hématome rétroplacentaire était défini comme un décollement placentaire d'un placenta normalement inséré avant la naissance de l'enfant. Une hémorragie de la délivrance était définie comme la survenue dans les 24 heures suivant l'accouchement de pertes sanguines  $\geq 500$  mL après un accouchement par les voies naturelles et  $\geq 1000$  mL après une césarienne.

**Tableau 4.** Critère composite de morbidité et mortalité maternofoetale.

<b>Complications maternelles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Décès</li> <li>- Eclampsie</li> <li>- HRP</li> <li>- Hématome sous capsulaire du foie</li> <li>- PAS <math>\geq 160</math> mm Hg and/or PAD <math>\geq 110</math> mm Hg</li> <li>- ASAT/ALAT <math>&gt; 240</math> IU/L</li> <li>- Créatininémie <math>&gt; 110</math> <math>\mu\text{mol/L}</math></li> <li>- Protéinurie <math>&gt; 3</math> g/24 h or /L</li> <li>- Oligurie <math>&lt; 30</math> mL/h</li> </ul>
<i>Les items suivants sont inclus lorsqu'ils sont associés à un contexte vasculaire (HTA, PE, ...).</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hémorragie de la délivrance</li> <li>- Transfusion sanguines ou perfusion de plasma frais</li> <li>- Perfusion de fibrinogène</li> <li>- Admission en Réanimation maternelle</li> <li>- Troubles de la coagulation:</li> <li>- Thrombocytopénie <math>&lt; 100^3/\text{mm}^3</math></li> <li>- D-dimères <math>&gt; 400</math> <math>\mu\text{g/L}</math></li> <li>- Fibrinogène <math>&lt; 2.5</math> g/L</li> <li>- Temps de Quick <math>&lt; 70\%</math></li> <li>- TCA <math>&gt; 1.26</math></li> </ul>
<b>Complications foetales ou néonatales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mort foetale in utero ou <math>&lt; 28</math> jours de vie</li> <li>- Poids foetal à la naissance <math>\leq 3^{\text{eme}}</math> percentile</li> <li>- Admission en réanimation néonatale</li> <li>- Absence de corticothérapie pour maturation pulmonaire foetale alors qu'elle était indiquée</li> </ul>

#### 5.4.4. Objectifs primaire et secondaires de l'étude

L'objectif primaire a été défini comme un critère composite de morbidité et de mortalité maternelles et foetales en rapport avec une hypertension (**Tableau 4**). Un des items initiaux « séquelles à 3 mois chez l'enfant » a du être retiré du critère composite en raison d'un pourcentage insuffisant de questionnaires récupérés (52.5%).

Un prélèvement urinaire était réalisé en même temps que le prélèvement sanguin dans le but de mesurer la concentration en PIGF urinaire.

#### **5.4.5. Nombre de sujets nécessaires**

La prévalence de ce critère composite dans une population de nullipares de la maternité de Tenon a été évaluée à 10 % sur 2 années d'accouchement. Pour l'essai, nous voulions montrer une diminution de 50% de la prévalence dans le bras intervention, pour une puissance de 85% avec un risque  $\alpha=5\%$ , nous devions donc inclure 994 femmes.

#### **5.4.6. Procédure de l'essai**

Les patientes nullipares dont l'âge gestationnel était entre 12 et 28 SA + 6 jours, étaient repérées par les consultants du service (médecins et sage-femmes). Elles étaient alors informées par un des co-investigateurs de l'étude sur l'objet de l'étude MOMA et les contraintes du protocole. Si elles étaient d'accord pour participer à l'étude, elles signaient un consentement de participation à l'étude. Les critères d'inclusion et d'exclusion étaient vérifiés par un attaché de recherche clinique de l'URCEST (unité de recherche clinique de l'est parisien). Une signalétique de rappel était alors mise en place dans le dossier médical de la patiente afin que le prélèvement de 10 mL de sang sur tube EDTA et le prélèvement de 10 mL d'urine prévus entre >24 SA et 29 SA< soient réalisés. Une fois les prélèvements réalisés entre >24 SA et 29 SA<, ils étaient adressés immédiatement au laboratoire de biochimie pour centrifugation, aliquotage et stockage à -40°C. En dehors de l'identité de la femme, seul le statut du Doppler aux artères utérines était connu par le laboratoire qui faisait la randomisation. La patiente était incluse dans le groupe intervention ou contrôle par le biochimiste - suivant une liste de randomisation préétablie – Cette liste était stratifiée par le résultat normal ou anormal des dopplers utérins. Le dosage du sFlt-1

plasmatique était réalisé dans les 15 jours. Le prélèvement urinaire était conservé en vue de dosages ultérieurs de biomarqueurs de la prééclampsie.

Les cliniciens n'étaient informés que du résultat du dosage du sFlt-1 des femmes incluses dans le bras intervention (résultat connu). Par ailleurs, ce résultat était donné sous un format qualitatif - normal ou anormal - afin qu'un résultat quantitatif (taux proche du seuil ou très élevé) n'influe pas sur la prise en charge. Le seuil choisi était 957 ng/L (cf introduction article 2). Si le résultat du sFlt-1 était considéré comme « anormal » Les patientes étaient prévenues par courrier et recevaient une prescription de suivi rapproché (échographie , ...). Ce programme de suivi rapproché appliqué jusqu'à l'accouchement est détaillé dans le **tableau 5**. Les soins étaient ajustés en fonction de l'apparition de complications. Les femmes qui avaient un Doppler aux artères utérines considéré comme anormal bénéficiaient du même protocole de suivi qu'elles soient dans le groupe intervention ou dans le groupe contrôle.

**Tableau 5.** Protocole de surveillance rapprochée.

<b>Protocole de Surveillance</b>	<b>Intervention</b>	<b>Fréquence</b>
<b>Suivi clinique</b>	Auto-mesure des pressions artérielles*	3/ semaine
<b>Suivi urinaire</b>	Auto-mesure de la proteinurie (croix)*	3/ semaine
<b>Tests sanguins</b>	NFS, uricémie, créatininémie, ASAT, ALAT	Mensuellement
<b>Suivi échographique</b>	Biométrie fœtale Doppler artère ombilicale +/- artère cérébrale	Mensuellement

Les autres femmes incluses (groupe intervention avec résultat du sFlt-1 et Doppler utérins normaux, et groupe contrôle avec Doppler utérins normaux) avaient un suivi de routine ou

si complications, adapté aux bonnes pratiques obstétricales issues des recommandations françaises. Toutes les femmes et les nouveau-nés étaient suivis jusqu'à la sortie de l'hôpital et un questionnaire était remis et à remplir par le pédiatre lors de la visite du 3<sup>ème</sup> mois de l'enfant.

#### **5.4.7. Choix du Plasma**

Le plasma a été choisi au lieu du sérum car il semble que la coagulation au sein d'un tube de sérum pourrait induire une augmentation artificielle des taux de sFlt-1 par activation plaquettaire (Tsatsaris et al., 2004).

#### **5.4.8. Choix de la population**

La population incluse dans cet essai était des femmes nullipares (enceinte de leur première grossesse évolutive). Le choix de cette population a été fait car la majorité des prééclampsies surviennent chez ce type de femmes (Khan et al., 2006) mais qu'à l'inverse la majorité d'entre elles n'auront pas de prééclampsie si bien qu'on ne peut pas appliquer une prise en charge particulière systématique à l'ensemble des femmes enceintes de leur première grossesse évolutive. Aussi une identification d'un sous-groupe de femmes à risque au sein de cette population nous semblait primordial. La période choisie a été celle de 24-29 semaines d'aménorrhée car c'est à partir de cette période que nous avons dans notre étude initiale mis en évidence une différence entre les groupes de patientes prééclamptiques et contrôles (Hertig et al., 2004). Cette période permettait d'identifier les prééclampsies précoces mais aussi une partie des formes tardives puisque le délai moyen entre l'augmentation anormale du sFlt-1 et la naissance était selon les études de 5 à 11 semaines. (Levine et al., 2004; Hertig et al., 2004). Débuter une prescription d'aspirine à cette période a été démontré comme inefficace (Sullivan et al., 1999; Subtil et al., 2003;



Goffinet et al., 2001) c'est pour cela que l'intervention proposée a été un suivi clinique biologique et échographique « rapproché », c'est à dire la prise en charge habituellement proposée aux patientes à haut risque. Certes ces recommandations sont basées sur des évidences de faible niveau de preuve ou des avis d'experts (Milne et al., 2005; Redman, 2011b; Magee et al., 2014; English et al., 2015) et le suivi détaillé ainsi que son rythme ne sont pas clairement décrits, mais elles existent et sont une aide pour le clinicien. Le protocole de suivi proposé dans cet essai (**tableau 5**) était celui appliqué dans le service d'obstétrique de Tenon pour les patientes à haut risque de prééclampsie et il s'inscrit dans les grandes lignes des recommandations citées plus haut.

#### **5.4.9. Choix de la stratification par le Doppler aux artères utérines**

Le but de notre étude était de mettre en évidence l'apport du sFlt-1 à notre pratique habituelle. Sachant que nous considérons les patientes qui présentent un résultat anormal du Doppler aux artères utérines comme à haut risque de prééclampsie et qu'elles bénéficieraient dans le service d'un suivi rapproché, il nous a paru illogique de les exclure de l'étude mais anti-éthique si elles étaient incluses dans l'étude de ne pouvoir bénéficier du suivi rapproché habituellement appliqué, c'est pour cela que nous avons stratifié cet essai en fonction du résultat du Doppler aux artères utérines.

### **5.5. Méthodologie clinique : Etude Stéroïde (article 3)**

Nous avons à notre disposition la cohorte MOMA avec des prélèvements sanguins réalisés entre 24 et 29 SA avant les signes cliniques de prééclampsie. Les patientes avaient donné leur accord pour une utilisation de cette plasmathèque afin d'évaluer d'autres marqueurs de la prééclampsie.

#### **5.5.1. Objectifs**

Nous avons souhaité utiliser cette plasmathèque pour répondre à l'hypothèse 2 (*La prééclampsie est marquée par une perturbation globale et spécifique de la stéroïdogénèse qui précède l'apparition des signes cliniques*). Notre second travail a donc été basé sur l'identification et la quantification de la concentration de nombreux stéroïdes (profil stéroïdien) sur un même échantillon sanguin.

#### **5.5.2. Nombre de femmes à inclure**

Pour cela nous avons inclus 3 groupes de femmes, soient :

- i) un groupe contrôle de femmes avec grossesse normale,
- ii) 2 groupes pathologiques l'un avec des femmes dont l'issue de grossesse a été compliquée d'une prééclampsie et le 2<sup>ème</sup> dont l'issue de grossesse a été compliquée d'un petit poids de naissance dans un tableau dit « vasculaire » mais sans prééclampsie. Ce dernier groupe avait pour but de répondre à la question du caractère spécifique à la prééclampsie des éventuelles perturbations biologiques retrouvées.

Nous avons calculé le nombre de patientes à inclure pour mettre en évidence une différence d'une déviation standard dans les groupes pathologiques avec une puissance de 90% et un risque  $\alpha$  de 5%. Dans chaque groupe pathologique, 25 femmes et 40 dans le groupe contrôle étaient nécessaires. Nous avons donc inclus 90 grossesses. En effet, le

profil stéroïdien ayant un coût encore élevé nous ne pouvions inclure toute la cohorte MOMA dans cette étude.

### **5.5.3. Etude du défaut d'aromatation**

La réalisation de ce profil stéroïdien par technique de GC/MS permet le calcul rapport produit/substrat et d'approcher l'expression/activité des enzymes. Le calcul du ratio E1/ $\Delta$ 4-Dione est utile pour apporter des réponses à l'hypothèse 3 (*la prééclampsie est caractérisée par un défaut de l'aromatase placentaire*). Sous réserve que cette anomalie survienne précocement chez les femmes qui vont ultérieurement développer une prééclampsie.

## **5.6. Méthodologie clinique : Expression de l'Aromatase (article 3)**

Pour valider l'hypothèse 3 (*la prééclampsie est caractérisée par un défaut de l'aromatase placentaire*), nous avons mis en place une autre étude « étude aromatase ».

### **5.6.1. Objectifs**

Le défaut d'aromatation semble associé à la prééclampsie nous avons voulu vérifier la présence d'un défaut d'aromatation associé à la prééclampsie par une étude de l'expression de l'aromatase au niveau placentaire grâce à des analyses de Rtg-PCR et Western Blot.

### **5.6.2. Femmes incluses**

L'étude MOMA ne comprenant pas de récupération placentaire, une cohorte a été créée après accord du comité d'éthique (CPP ile de France 1, 2013-Dec-13432), le titre du protocole proposé était le suivant : « *Etude des dysfonctionnements de la stéroïdogénèse* ».

*placentaire et des anomalies d'expression et d'activité des enzymes impliquées au cours de la grossesse avec prééclampsie à partir de sérum maternels et d'extraits placentaires* ». Il était prévu le recrutement d'environ 10 patientes prééclamptiques et 10 patientes avec grossesse normale sur le site de la maternité de Poissy-Saint Germain en Laye. Mon départ pour une mobilité à l'étranger a limité ce recrutement à 5 patientes avec prééclampsie et 10 avec grossesses normales. Des problèmes techniques (décongélation de tubes lors des transports) ont limité le nombre de tubes analysables aussi des échantillons placentaires collectés par Mme Alfeidy (U1036 INSERM Grenoble, France) - patientes avec prééclampsie ou grossesse normale - ont été adjoints afin d'arriver à un nombre d'échantillons analysés suffisant pour une interprétation. Au total les échantillons testés ont été pour l'analyse ARNm : 20 prééclampsies et 10 contrôles et pour le Western Blot : 6 prééclampsies et 8 contrôles. Ces résultats sont rapportés par l'**article 3** de ce travail publié dans *Placenta* (Berkane et al., 2018).

### **5.6.3. Technique de récupération des placentas**

#### ***- Pour les patientes issues de notre recrutement :***

La patiente donnait son accord pour participer à l'étude. J'étais présente sur le site de Poissy lors de l'accouchement. Le placenta était récupéré immédiatement de manière stérile et déposé sur un champ stérile posé sur un papier aluminium lui-même déposé sur un lit de glace. Le placenta était manipulé avec des gants stériles. Les prélèvements étaient réalisés au centre de la face maternelle du placenta. Une calotte superficielle sur la face maternelle du placenta était enlevée au bistouri froid et des échantillons étaient immédiatement prélevés, plusieurs échantillons étaient lavés au sérum physiologique stérile en vue de retirer le sang maternel puis mis dans un tube collecteur (un échantillon par tube) et déposés dans l'azote, l'autre partie des échantillons n'était pas lavée, ils étaient

mis dans des tubes collecteurs (un échantillon par tube) puis dans l'azote liquide. Les tubes étaient alors transportés au laboratoire pour être conservés et congelés à -80°C. Les échantillons lavés étaient utilisés pour les analyses de RT-qPCR et Western Blot et les échantillons non lavés pour l'analyse du profil stéroïdien. Nous avons opté pour un non lavage des échantillons destinés au profil stéroïdien par crainte que le lavage ne puisse éliminer totalement ou partiellement les stéroïdes.

***- Pour les patientes issues de la collection personnelles de Mme Alfaidy***

Les ARNm et protéines étaient déjà extraits et conservés en banque. Les données des femmes incluses (diagnostic, âge gestationnel à l'accouchement) nous ont été fournis.

## **5.7. Méthodologie analytique**

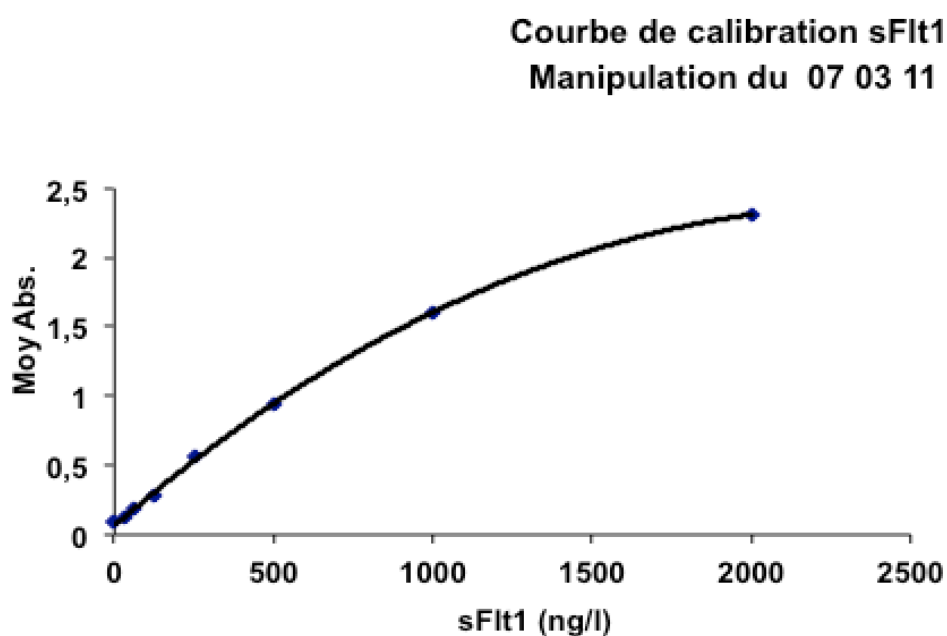
Pour réaliser les différentes parties de ce travail nous avons utilisés différentes techniques d'analyse.

- La mesure des concentrations plasmatiques de sFlt-1 a été faite par technique « sandwich ELISA » manuelle, au sein du laboratoire de Biochimie de l'hôpital Tenon, APHP, Paris. - L'évaluation des concentrations plasmatiques et placentaires de stéroïdes a été réalisée par technique de GC/MS précédée d'une technique d'HPLC, au sein de l'Unité INSERM 1195 Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre.
- Enfin ce sont les techniques de RT-qPCR et Western Blot qui ont permis d'évaluer l'expression placentaire de l'aromatase, elles ont été réalisées au sein de l'Unité INSERM 1036, Institut de biosciences et de biotechnology, Grenoble.

### **5.7.1. Dosage du sFlt-1**

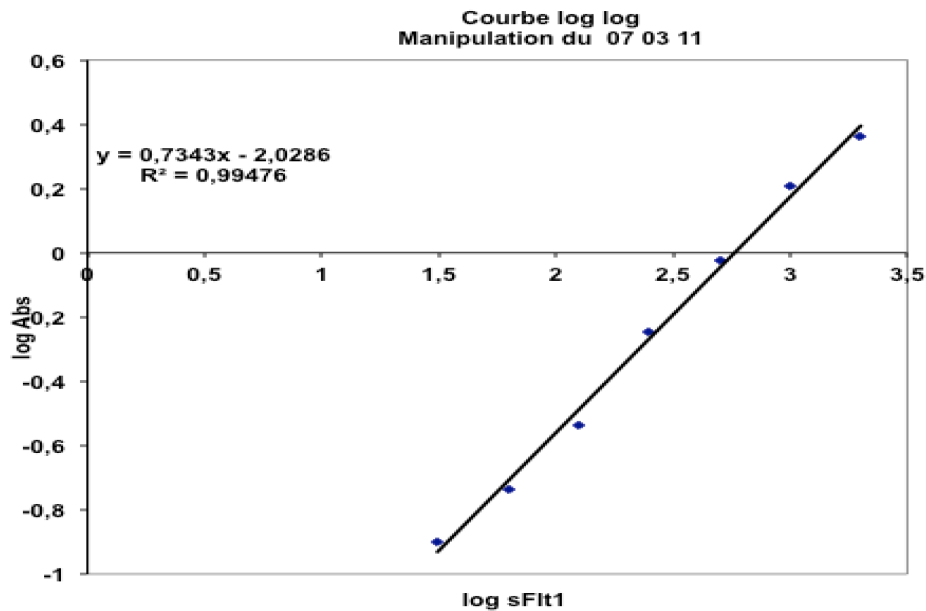
Le kit utilisé dans ce travail pour les dosages est la technique « sandwich ELISA » manuelle de R&D system (Human VEGFR1/Flt1 Quantikine ELISA Kit, Quantikine R&D Systems Inc, Minneapolis, MN 55413). Son usage suit les instructions du fabricant. C'est une technique quantitative immunoenzymatique type sandwich. Un anticorps monoclonal spécifique du VEGFR1 humain est fixé sur une microplaque. Les calibrateurs (niveaux de concentration) et les échantillons sont déposés dans les puits. L'ensemble du sFlt-1 présent dans l'échantillon est lié à l'anticorps immobilisé. Après lavage pour éliminer toute substance non liée, un anticorps polyclonal anti-VEGFR1 humain lié à une enzyme spécifique est ajouté aux puits. Après un lavage une solution de substrat est ajoutée aux puits. Après arrêt de la réaction enzymatique, l'intensité de la coloration mesurée est proportionnelle à la quantité de sFlt-1 liée. Toutes les analyses ont été réalisées en double.

La détermination de la concentration obtenue se fait en reportant le résultat de l'intensité optique de l'échantillon analysé sur la courbe déterminée d'après les valeurs des calibrateurs. Un exemple de courbe de calibration est fourni par les **figures 26 et 27**. Les échantillons sanguins (10 mL collectés EDTA) adressés immédiatement au laboratoire ont été centrifugés à 2500 g pendant 10 minutes. Le plasma aliquoté a été conservé à -40°C. La mesure du sFlt-1 était réalisée dans un délai maximal de 2 semaines après le prélèvement. Le kit permet un dosage du sFlt-1 à partir de différentes sources, sérum, plasma, cellule ou liquide folliculaire par exemple. Dans ce travail, le plasma EDTA a été préféré au sérum en raison de l'interférence potentielle de la coagulation sur le relargage plaquettaire du sFlt-1 (Tsatsaris et al., 2004). La concentration minimale détectable en sFlt-1 était de 5 ng/L.



**Figure 26.** Exemple de courbe de calibration du sFlt-1 : données brutes.

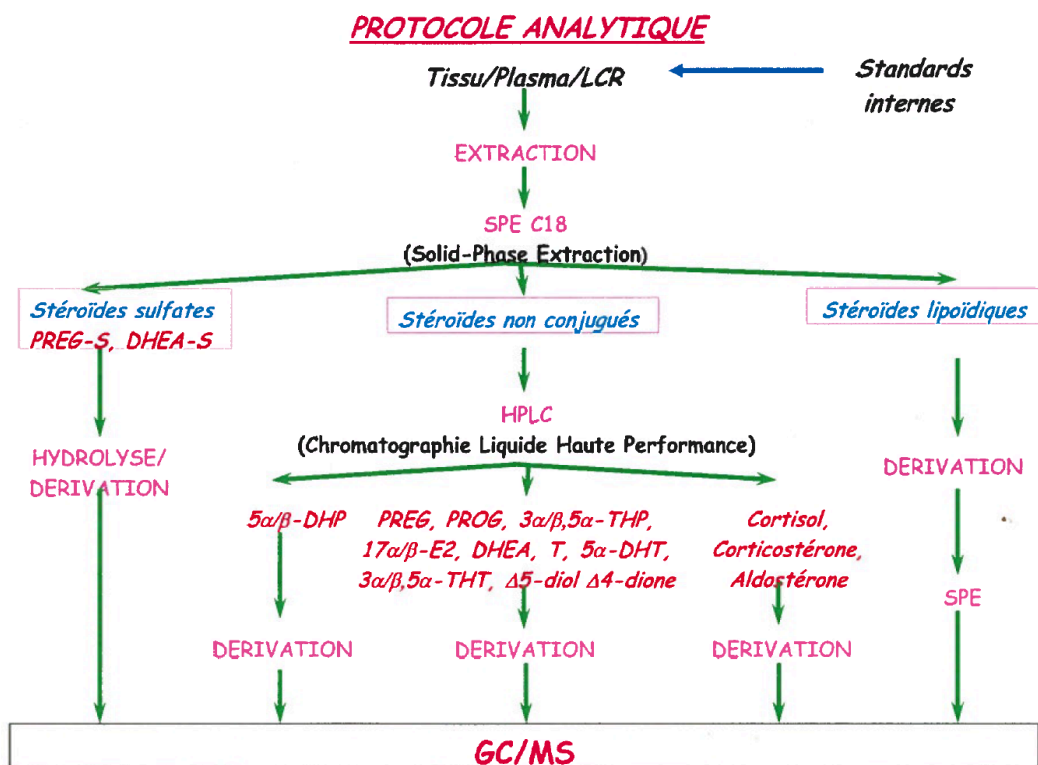
La reproductibilité intra et inter essai était respectivement 13% et 5% à 330 et 940 ng/L. La lecture de la concentration obtenue se fait en reportant le résultat de lecture optique de l'échantillon analysé sur la courbe réalisée après analyse des échantillons standards réalisée de manière concomitante.



**Figure 27.** Exemple de courbe de calibration du sFlt-1 : après transformation logarithmique.

## 5.7.2. Evaluation du profil stéroïdien par GC/MS

### 5.7.2.1. Méthodologie d'analyse : Schéma récapitulatif



**Figure 28.** Protocole analytique.



**Tableau 6.** Validation des paramètres de mesure des stéroïdes par GC/MS  
Validation établie sur du plasma de femmes enceintes. *Adapté de (Hertig et al., 2010).*

<b>Stéroïdes</b>	<b>Concentration ng/mL ± SEM</b>	<b>Ion Diagnostic m/z</b>	<b>Variation inter analyse</b>	<b>Coefficient de corrélation</b>	<b>% de recouvre ment</b>	<b>Limite de détection pg/mL</b>
<b>Pregnénolone</b>	2,64 ± 0,18	283 et 298	15,2	0,9972	90,8	10
<b>Progestérone</b>	78,5 ± 3,18	495 et 510	9	0,9996	91,8	5
<b>5<math>\alpha</math>-DHP</b>	29,7 ± 0,86	445 et 460	6,4	0,9998	98,1	25
<b>5<math>\beta</math>-DHP</b>	0,46 ± 0,01	445 et 460	5,8	0,9993	92,6	25
<b>20<math>\alpha</math>-DHP</b>	24,7 ± 1,02	693 et 708	9,2	0,9991	95,3	75
<b>20<math>\beta</math>-DHP</b>	0,31 ± 0,02	693 et 708	16,1	0,9951	89	75
<b>16<math>\alpha</math>-OHP</b>	8,27 ± 0,44	508 et 722	9,2	0,9934	96,9	100
<b>17<math>\alpha</math>-OHP</b>	3,73 ± 0,23	369 et 465	12,2	0,9962	91,4	10
<b>3<math>\alpha</math>5<math>\alpha</math>-THP</b>	8,31 ± 0,08	496 et 514	1,8	0,9924	108	10
<b>3<math>\alpha</math>5<math>\beta</math>-THP</b>	5,00 ± 0,05	496 et 514	1,4	0,9998	102,3	10
<b>5<math>\alpha</math>20<math>\alpha</math>-THP</b>	20,6 ± 1,60	499 et 514	17,3	0,9955	89,9	250
<b>3<math>\alpha</math>5<math>\alpha</math>20<math>\alpha</math>-HHP</b>	10,62 ± 1,24	697 et 712	20,1	0,993	90,2	100
<b>DOC</b>	0,22 ± 0,02	707 et 722	18,2	0,9919	101,3	50
<b>3<math>\alpha</math>5<math>\alpha</math>THDOC</b>	2,01 ± 0,12	499 et 512	13,4	0,9932	99,3	50
<b>Corticostérone</b>	4,53 ± 0,23	705 et 720	9,9	0,9999	104,2	50
<b>Cortisone</b>	13,1 ± 0,53	684 et 734	9,2	0,9921	94,3	500
<b>Cortisol</b>	195,6 ± 14,27	463 et 677	14,6	0,9983	98,8	500
<b>PregS</b>	99,6 ± 2,85	283 et 298	4	0,9986	97,3	20
<b>SDHEA</b>	2361 ± 64,9	255 et 270	2,7	0,9988	104,1	20
<b>Testostérone</b>	0,34 ± 0,02	665 et 680	14,7	0,9997	101,1	2
<b><math>\Delta</math>4-Dione</b>	0,40 ± 0,02	467 et 482	12,5	0,9999	94,9	2
<b>DHEA</b>	1,82 ± 0,13	255 et 270	16,4	0,9988	97,1	10
<b>5<math>\alpha</math>-DHT</b>	0,42 ± 0,02	414 et 486	8,4	0,9935	104	10
<b>Estrone</b>	4,75 ± 0,09	422 et 466	2,5	0,9955	102,9	50
<b>Estradiol</b>	9,07 ± 0,24	451 et 664	6,4	0,9987	99,7	2
<b>Estriol</b>	2,21 ± 0,08	663 et 876	7,2	0,9984	99	5
<b>2-ME2</b>	1,60 ± 0,09	481 et 694	9,4	0,9954	98,5	10

### 5.7.2.2. La technique GC/MS

La GC/MS est une technique analytique bidimensionnelle couplant la chromatographie en phase gazeuse à haute résolution avec la spectrométrie de masse. Chaque stéroïde est ainsi caractérisé par un temps de rétention très précis, obtenu par la chromatographie, et un spectre de masse spécifique, obtenu par la spectrométrie de masse. C'est une technique extrêmement adaptée à l'analyse des stéroïdes, car elle permet la distinction des stéréoisomères, par exemple 5 $\alpha$ -DHP versus 5 $\beta$ -DHP. C'est donc la technologie idéale pour réaliser un profil stéroïdien (progestatifs, glucocorticoïdes, androgènes, oestrogènes, stéroïdes sulfates) à partir d'un tissu ou fluide biologique. Cette technique s'applique à des molécules non thermolabiles et dont le poids moléculaire est inférieur à 1000 Da.

### 5.7.2.3. Protocole analytique

Malgré la sensibilité et la spécificité analytique de la GC/MS, il est déterminant d'introduire en amont, des techniques de purification et de fractionnement d'échantillons qui vont permettre une analyse finale robuste et précise (Liere et al., 2000; Liere et al., 2004). Ce protocole analytique a déjà été validé pour tous les stéroïdes testés en utilisant un pool de plasma provenant de femmes enceintes (25 à 35 semaines d'aménorrhée). Les calculs des limites de détection, de linéarité, de précision et de précision inter-dosage ont montré que la méthodologie GC/MS utilisée convenait parfaitement aux analyses de stéroïdes dans le plasma de femmes enceintes (Hertig et al., 2010). Le **tableau 6** fournit les résultats des tests de validation du profil stéroïdien par GC/MS. Le synoptique du protocole analytique est illustré **figure 28**.

#### 5.7.2.4. Extraction

Les stéroïdes sont extraits à partir de 1 ml de plasma en utilisant du méthanol. Des standards internes sont systématiquement ajoutés dans chaque extrait plasmatique car ils sont nécessaires à la quantification de chaque stéroïde ciblé. Les standards internes utilisés sont soit des stéroïdes marqués avec plusieurs atomes de deutérium (isotope stable de l'hydrogène) soit des stéroïdes exogènes de structure proche des stéroïdes à quantifier. Dans notre protocole, les standards internes suivants ont été ajoutés aux extraits plasmatiques ; 5ng de  $^2\text{H}_6$ -5 $\alpha$ -dihydroprogestérone (DHP) (CDN Isotopes, Sainte Foy la Grande, France) pour le 5 $\alpha$ / $\beta$ -DHP, 2ng de  $^2\text{H}_5$ -testostérone pour la testostérone, 2ng de  $^2\text{H}_5$ -17 $\beta$ -estradiol pour l'estradiol et l'estrone,  $^2\text{H}_5$ -2-méthoxyestradiol pour 2-ME2, 2ng de épiétiocholanolone (Steraloids, Newport, Rhode Island) pour la DHEA, l'androstènediol, l'étiocolanolone, le 5  $\alpha$  -DHT, la prégnénolone, le 20 $\alpha$ -dihydroprégnénolone, la 17 $\alpha$ -OHPREG, la 3 $\alpha$ / $\beta$  5 $\alpha$ / $\beta$  -THP, 5 $\alpha$ / $\beta$  20 $\alpha$ -THP, 3 $\alpha$ / $\beta$  5 $\alpha$ / $\beta$  20 $\alpha$ -HHP et le 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -THDOC, 2ng de 19-norPROG pour la progestérone (P), la 20 $\alpha$ -DHP, la 3 $\alpha$ -DHP, la 16 $\alpha$ -OHP, la 17 $\alpha$ -OHP, la 5 $\alpha$ / $\beta$ -DHDOC et l'androstènedione, 2ng de  $^2\text{H}_8$ -DOC pour la DOC, 10ng de  $^2\text{H}_8$ -corticostérone pour la corticostérone, 100ng de  $^2\text{H}_4$ -cortisol pour le cortisol et le 11-déoxycortisol, 50ng de  $^2\text{H}_7$ -cortisone pour la cortisone, 2ng de 3 $\alpha$ 6 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\beta$ -prégnane-20-one pour l'estriol (E3) et l'estétrol (E4), et 5ng of  $^2\text{H}_4$ -sulfate de prégnénolone pour le sulfate de prégnénolone et le SDHEA.

#### 5.7.2.5. Purification par SPE

Les échantillons sont analysés de la manière suivante : les extraits plasmatiques sont purifiés et fractionnés par SPE (Solid Phase Extraction) pour séparer les stéroïdes sulfates des stéroïdes non conjugués (Liere et al., 2004) (**figure 28**).

Les échantillons sont dissous dans 1ml de MeOH et déposés sur une colonne C18 (500mg, 6ml, International Sorbent Technology, IST), suivi de 5ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (85/15). Le flux sortant qui contient les stéroïdes sulfates et libres est collecté et séché. Après un reconditionnement de la même cartouche avec 5ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (20/80), les échantillons séchés sont repris par du MeOH/H<sub>2</sub>O (20/80) et déposés à nouveau sur la cartouche. Celle-ci est ensuite lavée avec 5ml d'H<sub>2</sub>O et les stéroïdes sulfates sont élués avec du MeOH/H<sub>2</sub>O (50/50) et les stéroïdes non conjugués avec 5ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (90/10). La fraction des stéroïdes sulfates est dérivée directement et analysée tandis que celle des stéroïdes non conjugués est purifiée et fractionnée par HPLC.

#### **5.7.2.6. Dérivation des stéroïdes sulfates**

La fraction des stéroïdes sulfates est directement dérivée par 20µl d'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) avec 100µl d'acétone anhydre pendant 30 min à 20°C puis analysée par GC/MS.

#### **5.7.2.7. HPLC et dérivaison des stéroïdes non conjugués**

La fraction des stéroïdes non conjugués est filtrée puis purifiée et fractionnée par HPLC. Le système HPLC se compose d'un passeur d'échantillon WPS-3000SL et d'un gradient de pompe quaternaire LPG-3400SD couplé à un collecteur de fraction SR-3000 (Thermoscientific, USA). La séparation par HPLC est réalisée sur une colonne Lichrosorb Diol (25cm, 4.6mm, 5µm) dans un bloc thermostatique à 30°C. La colonne est équilibrée par un solvant composé de 90% d'hexane et de 10% d'un mélange hexane/isopropanol (85/15). 180µl de l'échantillon est injecté sur le système HPLC et l'élution est réalisée à un débit de 1ml/min, avec un mélange 90% d'hexane et 10% d'hexane/isopropanol (85/15) pendant 8 minutes, puis avec un gradient linéaire de 100% d'hexane/isopropanol

(85/15) pendant 2 minutes. Cette phase mobile est maintenue constante pendant 10 min puis un gradient linéaire à 100% de MeOH est appliqué en 5 minutes et la colonne est ensuite lavée avec du MeOH pendant 15 minutes.

***Trois fractions sont collectées à partir du système HPLC et sont dérivées puis analysées par GC/MS***

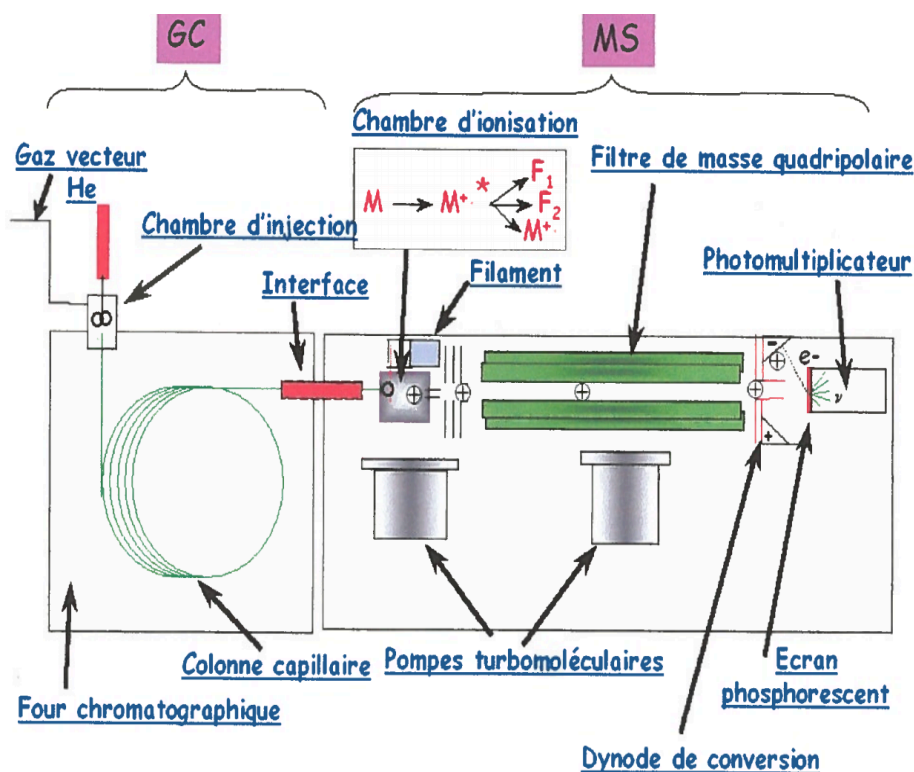
1. La première fraction HPLC (3-13 min) contenant les 5 $\alpha$ / $\beta$ -DHP est ensuite silylée avec 50  $\mu$ l d'un mélange de N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétamide/iodure d'ammonium/dithioérythritol (1000 : 2: 5 vol / wt / wt) pendant 15 minutes à 70 ° C.
2. La deuxième fraction (13-25 min) contenant la PREG et ses dérivés, PROG, DOC, testostérone et leurs précurseurs et métabolites réduits et hydroxylés, E1, 17 $\beta$ -E2 et 2-ME2 est dérivée avec 25  $\mu$ l d'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) et 25  $\mu$ l d'acétone anhydre pendant 1 heure à 20°C.
3. La troisième fraction (25-33 min) contenant le cortisol, la cortisone, le 11-désoxycortisol, la corticostérone, l'E3 et l'E4 est dérivée avec 25  $\mu$ l de HFBA et 25  $\mu$ l d'acétonitrile anhydre pendant 1 heure à 80°C.

Toutes les fractions sont séchées sous azote, reconcentrées et remises en suspension dans de l'hexane pour l'analyse par GC/MS.

#### **5.7.2.8. L'analyse GC/MS**

Cette technique d'analyse combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse (un chromatographe Focus GC (Thermoscientific, USA), pour la séparation des stéroïdes d'un échantillon, et celles de la spectrométrie de masse (spectromètre de masse DSQII (Thermoscientific)) (**figure 29**), pour la détection et l'identification des stéroïdes en fonction de leur rapport masse-sur-charge ( $m/z$ ), sachant que  $z=1$  car des ions monochargés sont formés dans la chambre d'ionisation.

### 5.7.2.8.1. La chromatographie en phase gazeuse (GC)



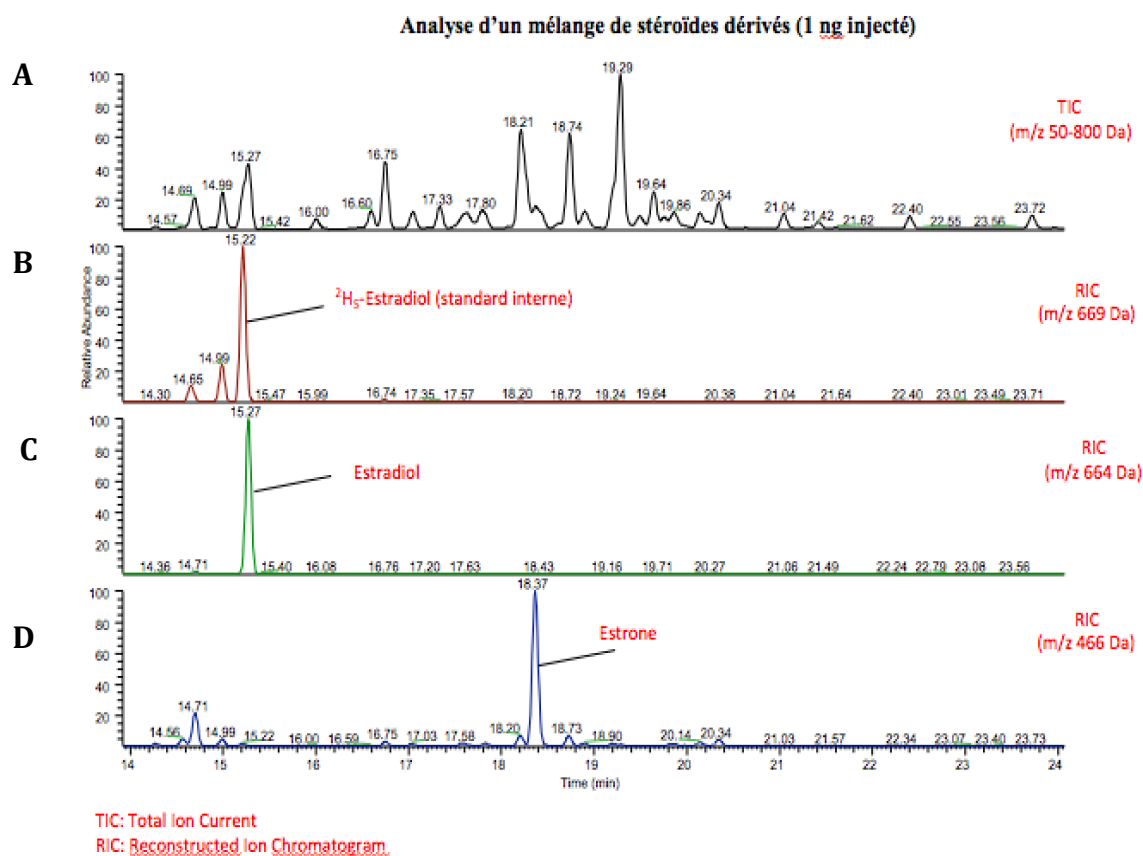
**Figure 29.** Schéma du couplage GC/MS.

Le passeur d'échantillon injecte 1 à 2  $\mu\text{l}$  de l'échantillon dans un liner d'injection à 250°C. L'échantillon est volatilisé et entraîné vers la colonne chromatographique par le gaz vecteur, ici l'Hélium, d'épaisseur 0.25  $\mu\text{m}$  dans un four thermostaté. La séparation des stéroïdes est réalisée par un programme de gradient de température du four contenant la colonne. La température du four GC est initialement maintenue à 50 °C pendant 1 minute et augmente de 50 à 200 °C à 20 °C/min, puis à 285 °C à 5 °C/min et à 350 °C à 30 °C/min. Le chromatographe en phase gazeuse contient une colonne capillaire de 30 mètres de long, de 0.25 mm de diamètre avec un revêtement interne (la phase stationnaire) apolaire. Le débit de gaz vecteur d'hélium est maintenu constant à 1 ml/min pendant l'analyse. La différence des propriétés physico-chimiques entre les stéroïdes permet de les séparer grâce à leurs interactions spécifiques avec la phase stationnaire de la colonne chromatographique

selon leur polarité mais également selon leur volatilité. Les stéroïdes sont ainsi caractérisés ainsi par un temps de rétention spécifique, qui représente le temps de résidence des stéroïdes dans la colonne (**figure 30**).

Il est impératif de dériver chimiquement les stéroïdes avant l'analyse GC/MS à la fois pour des raisons chromatographiques et spectrométriques.

1<sup>ère</sup> étape: identification GC/MS pour repérer le temps de rétention des stéroïdes et le profil du spectre de masse



**Figure 30.** Profil chromatographique d'un mélange de stéroïdes dérivés (A), du  $^2\text{H}_5$ -estradiol (B), de l'estradiol (C) et de l'estrone (D).

Si on injecte par exemple un échantillon contenant de l'estradiol sans dérivation, l'estradiol a spontanément tendance à s'adsorber à des résidus silanols dans l'injecteur à 250°C avec des interactions avec ses 2 groupements hydroxylés (carbone 3 et 17). C'est pourquoi on réalise la dérivation chimique avant l'analyse GC/MS, ici avec l'anhydride heptafluorobutyrique (HFBA) afin d'acyler les 2 fonctions hydroxyles de l'estradiol et de

former des di-heptafluorobutyrate d'estradiol : celui-ci ne s'adsorbe plus dans l'injecteur et devient plus volatile. L'estriol qui contient 3 groupements hydroxylés formera un dérivé tri-heptafluorobutyrate, après dérivation il sera plus volatile que l'estradiol dérivé et aura donc un temps de rétention plus court. Avec seulement une fonction hydroxyle, l'estrone formera un mono-heptafluorobutyrate et aura un temps de rétention plus long que celui de l'estradiol dérivé (**figures 30**).

#### 5.7.2.8.2. La spectrométrie de masse

Les stéroïdes en phase gazeuse sont ensuite élués vers la source du spectromètre de masse en aval où ils vont être ionisés et fragmentés. Les températures de la ligne de transfert et de la chambre d'ionisation sont respectivement de 300°C et 220°C. Les stéroïdes sont élués en phase gazeuse dans la chambre d'ionisation sous vide et sont bombardés par des électrons émis par le filament de tungstène chauffé. L'ionisation par impact électronique est réalisée avec une énergie d'ionisation (différence de potentiel) de 70eV. Les stéroïdes vont ainsi perdre 1 électron et produire des ions moléculaires positifs monochargés plus ou moins stables ( $M^{+.*}$ ). Ceux-ci vont produire des ions fragments (F1, F2, etc) ou se stabiliser en ions moléculaires ( $M^{+}$ ). L'ensemble des ions formés va être dirigé via plusieurs lentilles vers le filtre de masse quadripolaire et analysé suivant leur rapport masse-sur-charge pour constituer le spectre de masse de chaque composé. Les ions sont ensuite détectés par un photomultiplicateur. La dérivation chimique va permettre également de produire des stéroïdes de plus haut poids moléculaire (PM) permettant de stabiliser les ions moléculaires et donc de favoriser les ions de rapport  $m/z$  plus élevés ; entraînant par conséquent une meilleure spécificité analytique et une meilleure sensibilité. Par exemple, l'estradiol de poids moléculaire (PM) 272 Da, va former un di-heptafluorobutyrate de PM 664 Da après dérivation avec le HFBA. Comme illustré sur la **figure 31** c'est l'ion



moléculaire  $M^+$ . 664 Da qui est le plus abondant et de plus haute masse sur le spectre de masse de l'estradiol dérivé, ce qui permet d'obtenir une excellente sensibilité ( $\approx 500$  fg/ml). Le couplage GC/MS permet ainsi de caractériser chaque stéroïde avec un paramètre temporel (le temps de rétention) et spectrométrique (le spectre de masse). Ces deux dimensions analytiques permettent l'identification spécifique et sensible de stéroïdes dans un échantillon biologique (**figure 30**).

### **5.7.2.9. Mesures des concentrations de stéroïdes par GC/MS**

#### **5.7.2.9.1. Pré-test**

L'appareil est testé avant chaque série de dosage. En effet une solution contenant un mélange de stéroïdes dérivés (1 ng de chaque stéroïde) est analysée par GC/MS. Si la sensibilité et la résolution chromatographique sont satisfaisantes, l'analyse des extraits biologiques peut être réalisée. Dans le cas contraire, il faut réaliser une maintenance de l'appareil au niveau de l'injecteur du chromatographe en phase gazeuse, de la chambre d'ionisation et/ou des lentilles du spectromètre de masse.

#### **5.7.2.9.2. Identification de stéroïdes**

L'identification des stéroïdes est obtenue par leur temps de rétention et leur spectre de masse. La figure 30 illustre le courant ionique total (TIC) d'un mélange de stéroïdes dérivés contenant de l'estradiol, de l'estrone ainsi que le standard interne, le 2H5-estradiol. Le profil chromatographique montre tous les stéroïdes du mélange. Le TIC montre l'ensemble du profil avec en abscisse le temps de rétention et en ordonnée l'abondance relative (figure 30A). Les spectres de masse de l'estradiol, du 2H5-estradiol et de l'estrone sont illustrés sur la figure 31. A partir de ces spectres de masse, pour repérer les stéroïdes et les quantifier avec la meilleure sensibilité et spécificité, on va choisir les ions

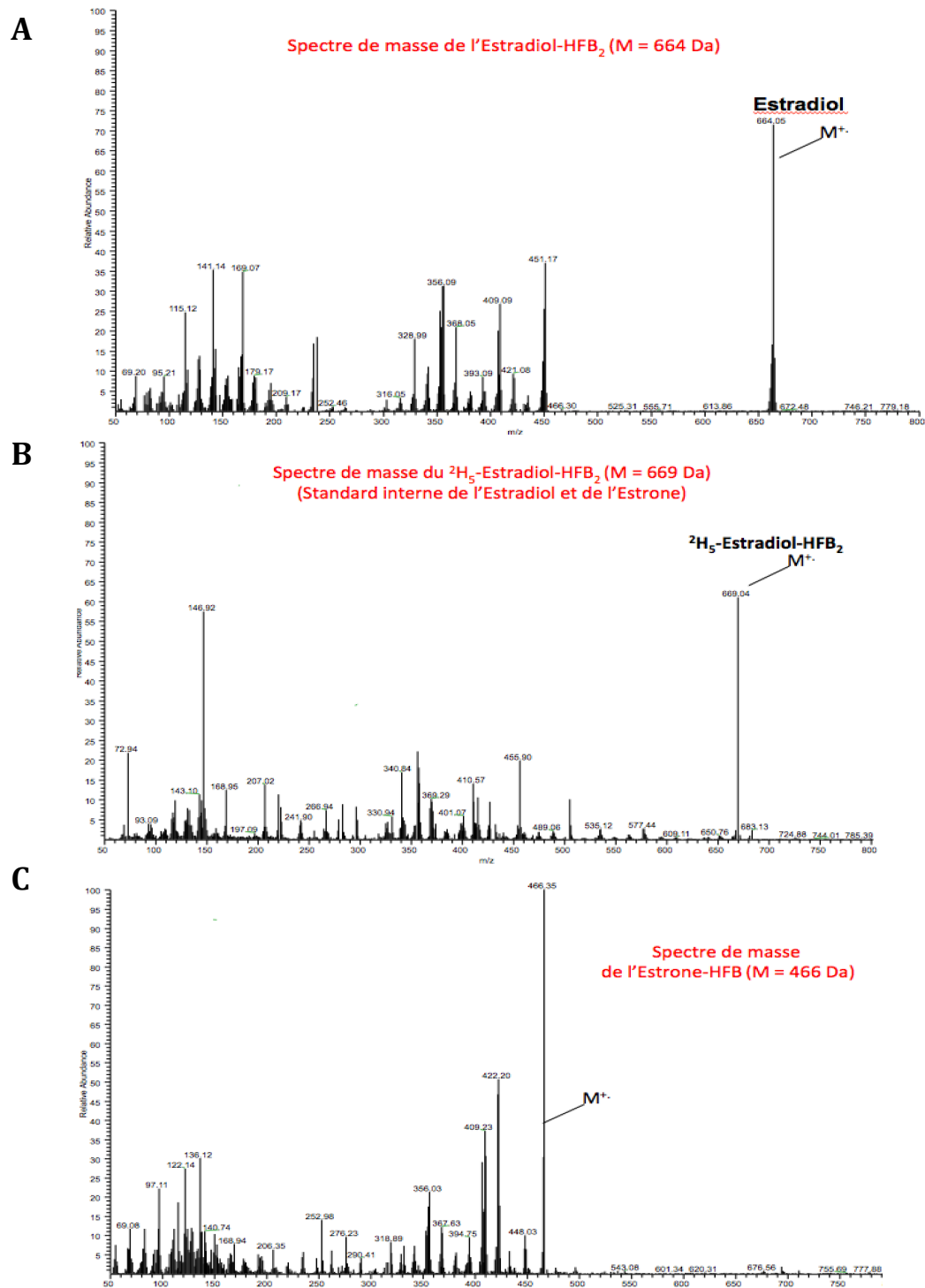
diagnostics, les plus abondants et avec la plus haute masse possible.

#### **5.7.2.9.3. Quantification des stéroïdes**

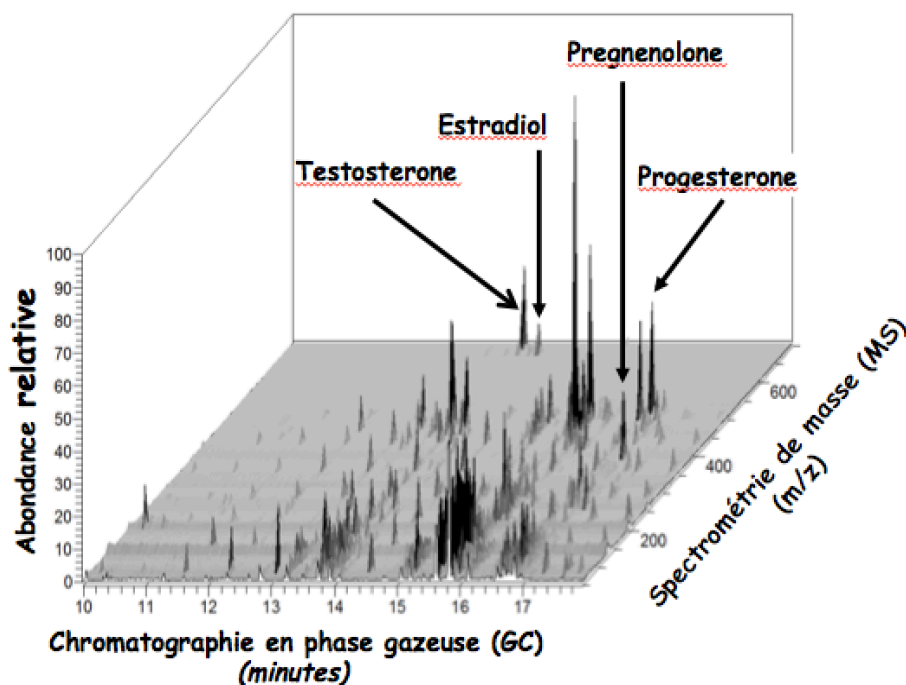
La concentration des stéroïdes dans les extraits plasmatiques est mesurée de la manière suivante : 5 solutions étalons sont injectées et analysées. Elles contiennent une quantité fixe du standard interne par exemple : 50 pg de  $^2\text{H}_5$ -17  $\beta$  -estradiol et une dose croissante d'estradiol (5-10-25-50-100 pg). Les aires des signaux des profils chromatographiques RICs sont calculées pour les stéroïdes endogènes et leur standard interne. Par exemple pour l'estradiol, une droite d'étalonnage est ainsi obtenue, avec en ordonnée le rapport d'aire sous la courbe du signal de l'estradiol sur celui de son standard interne, le  $^2\text{H}_5$ -17  $\beta$  -estradiol, et en abscisse la quantité croissante d'estradiol. Les extraits plasmatiques sont ensuite analysés à leur tour et le rapport d'aire de chaque échantillon est reporté sur la droite d'étalonnage pour obtenir la quantité de stéroïde dans le plasma analysé (lecture en abscisse). Il s'agit donc d'une méthode de quantification par étalonnage interne.

#### **5.7.2.9.4. Evaluation du profil stéroïdien placentaire**

Les échantillons placentaires ont été pesés puis transférés dans des tubes Falcon 50 ml, préalablement tarés. L'extraction a été réalisée par 18 ml de MeOH puis les échantillons ont été soniqués (par un bain d'ultrasons) pendant 5 minutes. Cette sonication a été suivie d'un nouveau lavage avec le même volume de MeOH et d'une centrifugation. Les extraits étaient ensuite séchés et un volume de 20 ml de MeOH rajouté à chaque échantillon. Enfin un aliquot de 50 mg d'extrait placentaire a été prélevé et les standards internes ont été ajoutés à chacun de ces aliquots. L'analyse du profil stéroïdien a été réalisée par technique de GC/MS selon les modalités décrites précédemment. Nous n'avons pas eu de problèmes apparents lors du temps de préparation des aliquots et de l'analyse.



**Figure 31 (A, B, C).** Spectres de masse de l'estradiol (A), du <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-estradiol (B) et de l'estrone (C) dérivés.



**Figure 32.** Représentation en 3 dimensions de l'analyse GC/MS d'un mélange de stéroïdes dérivés.

### 5.7.3. Evaluation de l'expression de l'aromatase placentaire

#### 5.7.3.1. Expression de l'aromatase au niveau de l'ARN messager.

L'ARN total a été extrait des échantillons placentaires en utilisant un tri-réactif à base d'acide-guanidinium-phénol, le Trizol (Invitrogen, France) (Brouillet et al., 2013). La transcription inverse a été réalisée à partir de 1 µg d'ARN total (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Les amorces sens et anti-sens étaient les suivantes : 5'-TGGAATTATGAGGGCACATCC-3' et 5'-GTCCAATTCCCATGCAGTAGC-3' pour l'aromatase humaine (hCYP19), et 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3' et 5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3' pour le 18S humain (contrôle interne). Dans ce travail nous avons aussi utilisé les amorces sens et anti-sens suivantes pour les gènes de standardisation (RPL13A) et GAPDH, 5'-TTAATTCCTCATGCGTTGCCTGCC-3'; et 5'-TTCCTTGCTCCCAGCTTCCTATGT-3' pour RPL13A et 5'-CC CAT GTT CGT CAT GGG TGT-3'; 5'-TG GTC ATG AGT CCT TCC ACG ATA-3' pour GAPDH. Le choix d'au moins 2 gènes de standardisation suit les recommandations (Lanoix et al.,

2012a)(Lanoix et al., 2012b). L'expression des ARN de l'aromatase et du 18S humain étaient quantifiées par RTq-PCR utilisant un système de détection Biorad CFX96 et and GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, France) Go-TaqMan probe et Universal mastermix (Applied Biosystems). Pour évaluer la linéarité et efficacité de l'amplification par PCR (35 cycles), des courbes standards de référence constituées par l'amplification de gamme de dilution progressives d'ADNc de concentrations connues ont été réalisées. Les résultats étaient standardisés par rapport à 18S.

#### **5.7.3.2. Quantification de la protéine aromatase : Western Blot**

Les échantillons placentaires étaient homogénéisés dans une solution de lyse lee RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodécyl sulfate, 1% Triton X-100, 1 mM phénylméthylsulfonylfluoride, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin) (Brouillet et al., 2013). Tout d'abord 30 µg de protéines placentaires étaient chargés sur un gel 4–20% SDS-PAGE polyacrylamide (Biorad, France) puis transférés sur des membranes de nitrocellulose 0.2-µm en (Biorad, France) en utilisant le système Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Les blots étaient lavés avec 0.1% de tampon de lavage (PBS-Tween) et incubés une heure à température ambiante dans une solution bloquante (5 % lait dans du PBS-Tween 0,1%). Par la suite, les membranes étaient incubées pendant une nuit à 4°C en présence d'un anticorps anti-aromatase 1µg/ml (Pab50183 Covalab, France), puis rincées avec une solution de PBS-T et incubées avec un anticorps secondaire (anticorps anti-lapin marqué à la peroxydase; Fisher Scientific) pendant 1 heure à température ambiante. Les blots étaient lavés 3 fois avec du PBS-T et les complexes anticorps/antigène étaient détectés en utilisant le système de détection ECL-plus (Biorad). La  $\beta$ -actine était utilisée comme protéine de normalisation.

## Objectifs

Nous avons voulu étudier l'intérêt d'un dépistage systématique de la prééclampsie par le dosage d'un facteur antiangiogénique, le sFlt-1, dans le but d'améliorer les issues maternelles et néonatales grâce à une modification de la prise en charge des patientes identifiées comme à risque (étude MOMA).

Nous avons aussi voulu en utilisant une partie (10%) de la plasmathèque de la cohorte MOMA, i) vérifier si des anomalies de la stéroïdogénèse précèdent les signes cliniques, ii) mettre en évidence les enzymes dysfonctionnelles et iii) confirmer ou infirmer le défaut d'expression de l'aromatase dans les placentas issus de grossesses compliquées de prééclampsie.

*Le travail expérimental est divisé en quatre chapitres.*

- *Le premier chapitre* est consacré à une analyse bibliographique sur la place des oestrogènes dans la grossesse normale et leur potentielle implication dans la survenue d'une prééclampsie en se focalisant chaque fois que possible sur les articles récents utilisant des techniques de mesures fiables. (**article 1 publié**)
- *Le deuxième chapitre* porte sur l'essai interventionnel MOMA qui teste l'impact sur l'issue de grossesse d'un suivi rapproché de femmes nullipares identifiées à risque de prééclampsie par une mesure du sFlt-1 entre 24 et 29 SA (MOMA study) (**article 2 soumis**).
- *Le troisième chapitre* porte 1) sur la réalisation d'un profil stéroïdien plasmatique en milieu de grossesse (patientes issues de la cohorte MOMA) chez des patientes avec prééclampsie, RCIU sans prééclampsie ou grossesse normale, et 2) sur l'expression de l'aromatase placentaire à partir d'une cohorte différente de patientes (**article 3 publié**).
- Enfin dans *la quatrième et dernière partie* je propose une discussion de l'ensemble des

résultats et des données de la littérature en essayant d'intégrer la stéroïdogénèse anormale dans le cadre physiopathologique actuellement établi de la prééclampsie. Ce travail se termine par un paragraphe sur les perspectives futures.

Sont inclus dans cette thèse 2 articles publiés et un article soumis pour publication.

1 - Le premier article est une revue bibliographique qui fait le point sur les oestrogènes et leurs liens avec la prééclampsie et certains facteurs angiogéniques et antiangiogéniques, il est publié dans la revue Endocrine Reviews (Berkane et al., 2017).

2 - Le deuxième rapporte l'essai randomisé MOMA, il est soumis à la revue « BJOG ».

3 - Le troisième est la traduction des résultats expérimentaux de l'évaluation du profil stéroïdien plasmatique au cours de la grossesse normale, ou compliquée \* de prééclampsie ou \* de RCIU sans prééclampsie. Il rapporte aussi les résultats de l'étude de l'expression de l'aromatase par le placenta normal et pathologique (prééclampsie) présentés dans le 3<sup>ème</sup> chapitre du travail expérimental, il est publié dans la revue Placenta (Berkane et al., 2018).

## **Articles scientifiques**



## Introduction de l'article 1

**Titre :** « *From Pregnancy to Preeclampsia : A Key Role for Estrogens* ».

Il s'agit d'une revue de la littérature acceptée et publiée dans le journal *Endocrine Reviews* (Berkane et al., 2017) s'intéressant à la place des oestrogènes au cours de la grossesse normale et compliquée de prééclampsie.

### 6.1. Contexte et présentation de la publication

Chez les mammifères, les stéroïdes sexuels circulants (oestrogènes, progestérone et certains métabolites) sont principalement synthétisés par les ovaires. Cependant dans l'espèce humaine lors de la grossesse, un switch lutéo-placentaire s'opère avant la 9<sup>ème</sup> semaine d'aménorrhée et c'est le syncytiotrophoblaste qui devient le lieu de synthèse de ces stéroïdes. Le placenta peut de manière autonome produire de la progestérone; par contre en raison de l'absence d'expression de l'enzyme 17 $\alpha$ -hydroxylase (CYP17A1), le placenta nécessite un apport exogène de SDHEA pour pouvoir synthétiser des oestrogènes.

Ce sont les surrénales fœtales et maternelles qui vont approvisionner le placenta en permettant alors la synthèse placentaire d'oestrogènes selon le schéma suivant : conversion du SDHEA en DHEA puis en  $\Delta$ 4-Dione, ce dernier est secondairement aromatisé en estrone, enfin l'estrone est réduit en estradiol. Les synthèses de l'estriol et de l'estétrol dépendent des surrénales fœtales mais aussi du foie fœtal. Les oestrogènes et en particulier l'estradiol ont des effets angiogéniques et de prolifération cellulaire ainsi que des effets vasodilatateurs. Seul le 2-ME2 métabolite de l'estradiol a un puissant effet anti-angiogénique et joue probablement un rôle de régulateur. Les oestrogènes agissent via leurs récepteurs nucléaires ou membranaires mais aussi par des actions directes sur des canaux voltage-dépendants. Les voies de signalisation des oestrogènes semblent pour beaucoup communes avec celles des facteurs angiogéniques tels que le VEGF et le PlGF et

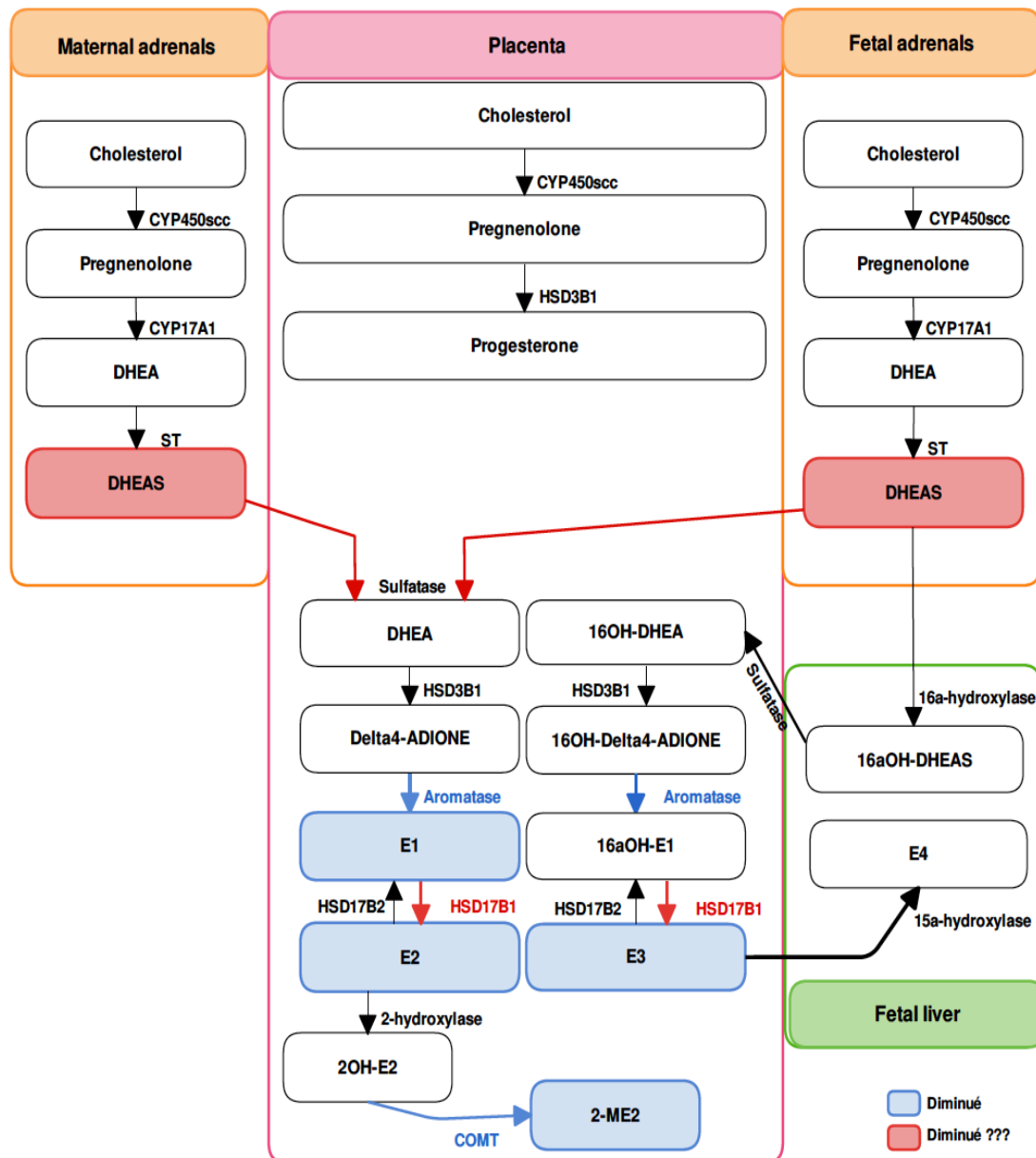
il est fait l'hypothèse que tout ou partie des effets des oestrogènes se font via le VEGF. Les quantités considérables d'oestrogènes au cours d'une grossesse normale sont en faveur d'un rôle majeur des oestrogènes. Une synthèse anormale (diminuée) des oestrogènes au cours de la prééclampsie a déjà été suspectée il y a plusieurs décennies mais rapidement les études se sont révélées contradictoires. Une des faiblesses de ces études était des techniques d'analyse (ELISA ou RIA) imprécises avec de nombreuses réactions croisées. La mise à disposition de techniques permettant des mesures fiables (GC/MS, LC/MS) et la publication de Kanazaki et al. (Kanasaki et al., 2008) ont réouvert cette voie de recherche. Les premiers travaux évaluant un profil stéroïdien ou des mesures spécifiques de stéroïdes semblent mettre en évidence une baisse significative ou une tendance à la baisse des concentrations plasmatiques de l'estradiol et d'autres précurseurs ou métabolites chez les femmes avec grossesse compliquée de PE (Salas et al., 2006; Kanasaki et al., 2008; Hertig et al., 2010; Bussen and Bussen, 2011; Jobe et al., 2013).

Le tableau 1 de l'article 1 rapporte les publications récentes sur les concentrations de certains stéroïdes dans des groupes de femmes avec prééclampsie comparées à celles obtenues à partir de groupe contrôle. Les atteintes enzymatiques mises en évidence sont listées dans le tableau 2. La **figure 33** résume les principales modifications rapportées par les études citées dans l'article.

Dans cette revue nous soulignons plusieurs points :

- Les concentrations d'estrone et d'estradiol sont diminuées au cours de la prééclampsie et cela pourrait être la conséquence d'un défaut d'aromatation.
- L'estriol qui a une synthèse un peu différente est lui aussi impacté par le défaut d'aromatation mais il peut y avoir d'autres explications tel qu'un dysfonctionnement du foie foetal avec altération locale du fonctionnement enzymatique.

- Des taux bas de 2-ME2 ont aussi été décrit au cours de la prééclampsie, un défaut de COMT a été montré par certains mais cela reste encore à valider. L'existence d'une diminution des concentrations des précurseurs du 2-ME2, tel que l'estradiol pourrait aussi participer aux taux bas de 2-ME2.



**Figure 33.** Modifications des concentrations de stéroïdes et expression enzymatique au cours de la prééclampsie.

Enfin beaucoup d'inconnues reste encore à élucider. Tous les stéroïdes et toutes les enzymes n'ont pas été étudiés. La réalisation de profil stéroïdien plutôt qu'un dosage isolé

de tel ou tel stéroïde donne une photographie instantanée des concentrations plasmatiques de stéroïdes spécifiques mais aussi de leurs précurseurs et métabolites et permet une approche plus réaliste des dysfonctionnements enzymatiques.

## **6.2. En conclusion**

Cette revue de la littérature fait le point sur la synthèse, les voies de signalisation et le rôle des oestrogènes au cours de la grossesse normale. Pour ce dernier, notre propos s'est focalisé sur la prolifération cellulaire endothéliale et placentaire, l'angiogénèse et la vasorelaxation. Les liens avec les facteurs angiogéniques et antiangiogéniques sont aussi discutés. Le caractère spécifique de la prééclampsie à l'espèce humaine est enfin abordé sous l'angle des particularités de la stéroïdogénèse dans le placenta humain.

# FROM PREGNANCY TO PREECLAMPSIA: A KEY ROLE FOR ESTROGENS

Nadia Berkane<sup>1,2</sup>, Philippe Liere<sup>2</sup>, Jean-Paul Oudinet<sup>2</sup>, Alexandre Hertig<sup>3,4</sup>, Guillaume Lefèvre<sup>5</sup>,  
Nicola Pluchino<sup>1</sup>, Michael Schumacher<sup>2</sup>, Nathalie Chabbert-Buffet<sup>6,7</sup>.

<sup>1</sup>Department of Gynecology and Obstetrics of University Hospital of Geneva (HUG), Boulevard de la Cluse, 30, 1205, Genève, Switzerland.

<sup>2</sup>U1195, INSERM and University Paris Sud, 80 rue du Général Leclerc, 94276, Kremlin Bicêtre, France.

<sup>3</sup>Department of Nephrology, Tenon Hospital, APHP, UPMC, 4 rue de la Chine, 75020, Paris, France.

<sup>4</sup>INSERM, UMR-S1155, 4 rue de la Chine, 75020, Paris, France.

<sup>5</sup>Department of Biochemistry and Hormonology, Tenon Hospital, APHP, UPMC, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France,

<sup>6</sup>Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine APHP Tenon Hospital, Sorbonne University, Univ. Paris 06, 4 rue de la Chine, F-75020 Paris, France,

<sup>7</sup>INSERM, UMR S-938, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), F-75012 Paris, France,

**Abbreviated Title:** Low Estrogen levels and Preeclampsia

**Key terms:** Preeclampsia, Estrogen, Estradiol, VEGF, sFlt1, Trophoblast

**Word count:** 8920

**Number of figures and tables:** 3 tables and 2 figures

*Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:*

Nadia Berkane

Department of Gynecology and Obstetrics, HUG

Boulevard de la cluse, 30, 1205 Genève, Switzerland

Phone: +41795532343

Email: nadia.berkane@hcuge.ch

**Disclosure Statement:** The authors have nothing to disclose

**28 ABSTRACT**

29 Preeclampsia (PE) results of placental dysfunction and is one of the primary causes of maternal and  
30 fetal mortality and morbidity.. During pregnancy, estrogen is produced primarily in the placenta by  
31 conversion of androgen precursors originating from maternal and fetal adrenal glands. These processes  
32 lead to increased plasma estrogen concentrations compared to non-pregnant women. Aberrant  
33 production of estrogens could play a key role in PE symptoms, since they are exclusively produced by  
34 the placenta and they promote angiogenesis and vasodilation. Former assessments of estrogen  
35 synthesis during PE gave conflicting results, possibly due to lack of specificity of assays. However,  
36 with the introduction of reliable analytical protocols using liquid-chromatography-mass spectrometry  
37 (LC/MS) or gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), more recent studies suggest a marked  
38 decrease in estradiol (E2) levels in PE. The aim of this review is to summarize current knowledge of  
39 estrogen synthesis, regulation in the placenta and biological effects during pregnancy and PE.  
40 Moreover, we highlight the links between the occurrence of PE, estrogen biosynthesis, angiogenic  
41 factors, and cardiovascular risk factors. A close link between estrogen dysregulation and PE  
42 occurrence might validate estrogen levels as a biomarker but also could reveal a potential approach for  
43 PE prevention or cure.

44

- 45 I. Introduction
- 46 II. Implantation and trophoblast invasion during normal pregnancy and PE
- 47 A. Physiology of implantation
- 48 B. Physiology of uterine vessel invasion
- 49 C. Implantation and uterine vessel invasion during PE
- 50 D. Characteristics of placental implantation and invasion in Primates
- 51 III. Estrogen biosynthesis pathway in pregnancy: a true maternofetal unit
- 52 A. Overview
- 53 B. Steroidogenesis in apes and humans
- 54 IV. Estrogen metabolism pathways in pregnancy
- 55 A. Two singular estrogens: E3 and E4
- 56 B. Catecholesterogen synthesis
- 57 C. Methoxyestrogen synthesis
- 58 D. Conjugated estrogen synthesis
- 59 V. PE and estrogen deficiency
- 60 A. Estrogen levels in PE
- 61 1. Estrogens: E1, E2, E3,
- 62 a. E2
- 63 b. E1 and E3
- 64 2. Catecholestrogens and 2-ME2
- 65 a. Catecholestrogens
- 66 b. 2-ME2
- 67 3. Other E2 metabolites
- 68 4. Estrogen precursors
- 69 B. Placental expression of enzymes involved in estrogen biosynthesis in PE
- 70 1. Aromatase
- 71 a. Expression and regulation
- 72 b. Regulation by transcription factors and miRNA

- 73 c. Expression and activity in PE
- 74 d. Congenital aromatase deficiency and PE
- 75 2. HSD17B1
- 76 3. COMT
- 77 a. Expression and activity in pregnancy
- 78 b. COMT knockout mice and PE
- 79 VI. Signaling and biological effects of E2 and its metabolites in pregnancy: a key link between
- 80 estrogen deficiency and PE
- 81 A. Signaling pathways of estrogens
- 82 1. Genomic signaling pathways
- 83 2. Non-genomic signaling pathways
- 84 3. ER expression in placental and uterine cells
- 85 a. Placental expression of ERs
- 86 b. Uterine expression of ERs
- 87 4. ERs and PE
- 88 B. Biological effects of estrogens in normal pregnancy and PE : the link with angiogenesis and
- 89 maternal uterine and systemic vascular tone
- 90 1. Estrogens and angiogenesis
- 91 2. Estrogens and uterine blood flow increase
- 92 3. Estrogens and maternal blood pressure decrease
- 93 4. Estrogens and placental and uterine cell differentiation and proliferation
- 94 5. Estrogens and regulation of their precursors synthesis by fetal adrenals
- 95 VII. PE risk factors and estrogen synthesis/signaling deficiencies
- 96 A. Obesity
- 97 B. Diabetes
- 98 C. Chronic hypertension
- 99 D. Kidney transplantation
- 100 VIII. Therapeutic implications



101 IX. Future directions

102

**103 I. Introduction**

104 Preeclampsia (PE) occurs in 3 to 7% of pregnancies (1) and represents one of the main causes of  
105 maternal and fetal/neonatal morbidity and mortality (2,3). Its most common feature is the association  
106 of high blood pressure (BP) (systolic BP  $\geq$  140 mm Hg and/or diastolic BP  $\geq$  90 mm Hg) together with  
107 proteinuria ( $\geq$  0.3 g/24h), both occurring after 20 weeks of gestation. Other features include high BP  
108 without proteinuria associated with elevated liver enzyme activities increased blood creatinine,  
109 thrombocytopenia, seizures, or intra-uterine growth retardation (IUGR) (4). Two types of PE have  
110 been described : early-onset PE (type I) with occurrence of clinical signs before 34 weeks of gestation  
111 and late-onset PE (type II). The only known therapy for either type of PE is delivery.

112 This multi-system disorder affects the maternal vascular endothelium and leads to ischemic and  
113 edematous phenomena in many organs (brain, liver, kidney, ...). Biological abnormalities observed  
114 during PE are activated coagulation (5), excessive inflammatory response (6,7) and an imbalance  
115 between angiogenic and antiangiogenic factors (8-14).

116 It is now accepted that PE is a placental disease (15,16). Placental examination shows excess cell  
117 necrosis, fibrinoid deposits, vessel thrombosis and acute atherosclerosis in the vessel walls (17).

118 While the specific causes of PE remain a matter of debate, several pathophysiological mechanisms  
119 leading to the clinical signs of PE have been identified, including imbalance between angiogenic and  
120 antiangiogenic factors (8-14), nitric oxide (NO) synthesis deficiency (18), increased plasma tumor  
121 necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) (19-21) and impaired maternal vascular endothelial functions (21-23).

122 Steroids, such as estradiol (E2), can modulate vascular endothelium functions and synthesis of both  
123 angiogenic and stress factors. E2 is synthesized by the placenta in very large amounts during  
124 pregnancy and promotes angiogenesis and vasodilation (24). Indeed, E2 has been shown to increase  
125 NO synthesis (25-27) and angiogenic factor levels such as vascular endothelial growth factor (VEGF)  
126 (28-30), and placental growth factor (PlGF) (31), as well as to inhibit TNF $\alpha$ -macrophage synthesis  
127 (32). Although conflicting results were previously reported regarding the link between low plasma  
128 estrogens levels and PE (33-36), several recent studies performed with reliable assays such as liquid-  
129 chromatography-mass spectrometry (LC/MS) or gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)  
130 have consistently reported low plasma E2 levels in preeclamptic women (37,38). These contradictory

131 results were probably a consequence of using non-specific and less sensitive methods for E2 assays,  
132 such as radioimmun (RIA) and enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assays. The mass  
133 spectrometry coupled with LC or GC together with purification steps have, considerably improved the  
134 reliability for determining estrogen concentrations (39).

135 Spontaneous PE is a disease primarily restricted to humans though a few primate cases have also been  
136 reported in the Patas Monkey (40), the Rhesus Monkey (41), and in baboons with twin pregnancies  
137 (42). Interestingly, these mammals share specific placentation and steroidogenesis patterns during  
138 pregnancy. In this review, estrogen synthesis and metabolism during pregnancy as well as the estrogen  
139 deficiency occurring during PE will be described. The crosstalk between estrogens and  
140 angiogenic/antiangiogenic factors in the pathogenesis of PE will be also discussed. Finally, we look  
141 into how some PE risk factors could negatively impact placental steroidogenesis, thus strengthening  
142 the “estrogen deficiency hypothesis” as the common pathway to develop PE signs.

143

## 144 **II. Implantation and trophoblast invasion during normal pregnancy and PE**

### 145 **A. Physiology of implantation**

146 Human implantation and trophoblast invasion (which are detailed elsewhere) (43), result in the  
147 attachment of the trophoctoderm onto the uterine endometrium on day 6 post-fecundation (44). From  
148 the trophoctoderm, the cytotrophoblast cells (CTs) multiply and fuse to form an external  
149 syncytiotrophoblastic layer after adhesion to the endometrium. These syncytiotrophoblast cells (STs)  
150 facilitate penetration of the conceptus into the decidua and are involved in maternofetal exchanges  
151 (O<sub>2</sub>, nutrients) and endocrine secretion (such as progesterone and estrogens). Development of the  
152 trophoblast is marked by the emergence and development of villi, some of which are attached to  
153 maternal tissues (anchoring villi). The distal parts of these villi are constituted by CTs which  
154 proliferate to form CT shells and are in direct contact with uterine maternal cells and vessels (Figure  
155 1). Extra villous trophoblast cells (EVTs) detach from the basement membrane, migrate and spread  
156 into the decidua and the first third of the myometrium and are involved in the remodeling process of  
157 the uterine arteries (45-47) (Figure 1).

158 .

**159 B. Physiology of uterine vessel invasion**

160 CTs invade the uterine spiral arteries, initiating a major remodeling of the uterine arterial wall caused  
161 by apoptosis, dedifferentiation of the muscular layer, and replacement by EVT and fibrinoid deposits  
162 (48,49). This results in a complete loss of vascular tone, and insensitivity to all vasoactive substances.  
163 Furthermore, during the first trophoblast invasion wave, there is a transient accumulation of EVT  
164 plugs in the spiral artery lumen, which is responsible for a hypoxic state in the placenta and a  
165 consequent high local overexpression of hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) which stimulates  
166 VEGF synthesis (50). These factors promote vasculogenesis, angiogenesis and placental development  
167 (51). The plugs disappear progressively before 14 weeks of pregnancy (52). This return to a normoxic  
168 environment is essential for the continuation of fetal and placental development.

**169 C. Implantation and uterine vessel invasion during PE**

170 While clinical signs of PE occur in the second part of pregnancy, preclinical abnormalities occur  
171 during the trophoblast invasion phase, particularly for early-onset PE. During PE, trophoblast cell  
172 migration and invasion into the decidua, myometrium and vessels are typically incompletely achieved  
173 and the development of angiogenesis and trophoblast cell proliferation are consequently impaired (53).  
174 This “shallow invasion” induces placental ischemia caused by insufficient uterine blood flow (UBF).  
175 Subsequently shedding of trophoblast debris (54,55) and over-secretion of antiangiogenic soluble fms-  
176 like tyrosine kinase 1 (sFlt1) into the maternal circulation occur (9-14,56,57). This participates in the  
177 dysfunction of the systemic maternal vascular endothelium, leading to hypertension and glomerular  
178 nephropathy. Meanwhile, the associated inflammation leads to an increase in vascular permeability,  
179 particularly via TNF  $\alpha$  and IL6 (7,58).

180 E2, progesterone and their metabolites have been shown to participate in angiogenesis as well as in  
181 normal trophoblast development and invasion, through an upregulation of cell proliferation,  
182 differentiation and migration of CTs (see below). Low E2 levels are likely to lead to insufficient  
183 trophoblast development and angiogenesis processes, which in turn may further contribute to low E2  
184 levels, promoting a vicious circle between hormonal imbalance and disrupted implantation.

**185 D. Characteristics of placental implantation and invasion in Primates**

186 A comparison between trophoblast invasion during implantation and placentation in primates may  
187 provide clues for understanding why apes are the only other mammals to experience spontaneous PE  
188 (59). Apes and humans share a common high UBF that involves considerable remodeling of the  
189 uterine artery wall. This remodeling process preferentially involves interstitial trophoblasts, and  
190 requires deep invasion of these cells that depends on an efficient crosstalk between CTs and maternal  
191 natural killer cells (NK). In contrast, in other primates and mammals (with the exception of rats) the  
192 invasion is mostly superficial. While artery remodeling does occur, invasion is preferentially  
193 endovascular, therefore limiting the risk of abnormal maternal immune reaction (59). In addition, in  
194 the ape the placenta is the main estrogen provider during pregnancy, while in other mammals  
195 steroidogenesis takes place in the ovaries throughout gestation (60,61).

### 196 **III. Estrogen biosynthesis pathway in pregnancy: a true maternofetal unit**

#### 197 **A. Overview**

198 During normal pregnancy, maternal plasma E2 levels increase progressively starting from 367 pM  
199 (luteal phase) up to 11000 pM - 37000 pM at the end of pregnancy (62,63). At the very early human  
200 pregnancy, estrogens are mainly synthesized by the corpus luteum. At approximately 9 weeks of  
201 gestation (60), a hormonal ovary-to-placenta shift occurs, resulting in placental production of E2,  
202 while the gonadotrope axis is blunted. STs become then the main source of estrogens (64). Besides  
203 STs, placental macrophages may also contribute, albeit in a minor way, to placental estrogen  
204 production (Hofbauer cells) (65,66).

205 To our knowledge, all but one recent study (67) agree that the human placenta is an incomplete  
206 steroidogenic organ which needs to interact with fetal and maternal steroidogenic organs, since it lacks  
207 some of the required enzymes (See Figure 2). For example,  $17\alpha$ -hydroxylase-17,20 lyase is not  
208 expressed (68,69). Consequently, the human placenta is unable to convert pregnenolone and  
209 progesterone into the estrogen precursors, dehydroepiandrosterone (DHEA) and  $\Delta 4$ -androstenedione,  
210 respectively (Figure 2). Therefore, human placental estrogen synthesis depends on DHEA and its  
211 sulfated form (DHEAS), produced both by maternal and fetal adrenal glands.

212 DHEA is sulfated by sulfotransferase 2A1 (SULT2A1), an enzyme highly expressed in the maternal  
213 and fetal adrenal glands and liver (70,71) to obtain DHEAS. Plasma concentrations of DHEAS  
214 decrease from the beginning of pregnancy until 38 weeks of gestation, after which a 2-fold increase is  
215 observed at delivery (72).

216 Further conversion of DHEAS to E2 by the placenta requires four key enzymes (Figure 2). These  
217 enzymes are cell specific (Figure 1). Sulfatases expressed by STs, convert DHEAS into DHEA (73).  
218 Type I 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/ $\Delta$ 5 $\Delta$ 4isomerase (HSD3B1) expressed by STs and  
219 invasive CTs, converts DHEA into  $\Delta$ 4-androstenedione. Some authors have found that plasma  
220 concentrations of this weak androgen increase gradually throughout pregnancy and then particularly at  
221 delivery (74), while others report an increase at delivery only (75). Aromatase is a further step that  
222 irreversibly converts  $\Delta$ 4-androstenedione into estrone (E1). E1 can also be sulfated resulting in E1S, a  
223 compound with a longer half-life (10-12 hours vs. 20-30 minutes for E1). In addition, E1S is  
224 reversibly convertible to E1 (76) and is thus a circulating source of E1 (77). Finally, E1 is converted  
225 into E2 by 17 beta-hydroxysteroid deshydrogenase type 1 (HSD17B1). E2 is delivered by the  
226 placental vessel cells to the maternal circulation but can also be locally synthesized within the uterus,  
227 since uterine artery smooth muscle cells express aromatase (77,78) and invasive CTs express  
228 HSD17B1 (79) (Figure 1). Aromatization of testosterone (80) is negligible during pregnancy due to a  
229 much higher affinity of aromatase for  $\Delta$ 4-androstenedione (81). Some amounts of E2 can also be  
230 produced in maternal adipose tissue (82).

### 231 **B. Steroidogenesis in apes and humans**

232 Humans and apes, the only mammals that develop spontaneous PE, share three common features of  
233 steroidogenesis. First, a lack of placental 17  $\alpha$  hydroxylase leading to a dependence on maternal and  
234 fetal adrenal glands (68,69,83); second, a luteo-placental shift that leads to a dependence on placental  
235 aromatase activity (60,61); and finally a conversion of E1 into E2 that takes place exclusively in the  
236 placenta leading to a dependence on the presence of HSD17B1 in this tissue (84) (Figure 1).

237

### 238 **IV. Estrogen metabolism pathways in pregnancy**

239 Once synthesized, E1 and E2 can be further catabolized into estriol (E3), estetrol (E4), catechol- or  
240 methoxyestrogens and conjugated forms following the main pathways described below.

#### 241 **A. Two singular estrogens: E3 and E4**

242 Although displaying a weak biological activity, E3 is synthesized in very large amounts during  
243 pregnancy (85). E3 is a marker of fetal liver function mainly derived from 16  $\alpha$ -hydroxylated  
244 DHEAS, a fetal liver product. E3 can also be produced in the fetal liver by 16  $\alpha$ -hydroxylation of E2  
245 (86). Conversion of E2 into E3 (87) is mainly considered irreversible, although Jobe *et al* (38)  
246 suggested a possible interconversion via an intermediate 16 keto E2.

247 E4 is the product of 15  $\alpha$ /16  $\alpha$ -hydroxylation of E2, which takes place in the fetal liver (88-90) and its  
248 concentration is found much higher in the fetal rather than in the maternal circulation (91). The 15 $\alpha$ -  
249 hydroxylase enzyme is specific to the fetal liver and is no longer expressed after birth. Consequently,  
250 E4 is no longer synthesized after birth (90). The role of this particular estrogen remains unknown but  
251 it probably acts as a selective estrogen receptor modulator (SERM) (92-94).

#### 252 **B. Catecholesterogen synthesis**

253 Catecholestrogens result from the hydroxylation of carbon 2 or 4 of E1 and E2 in an irreversible  
254 manner. The resulting hydroxylated metabolites of estrogens (2-OH-E2, 4-OH-E2, 2-OH-E1, and 4-  
255 OH-E1) are active molecules with genomic and non-genomic effects (95-98). These hydroxylation  
256 processes are mediated by different cytochrome P450 (CYP450) isoforms, which are mostly expressed  
257 in the placenta and liver. In the placenta, the 2-hydroxylation step occurs mainly through CYP1A1 and  
258 CYP3A4 activities (99).

#### 259 **C. Methoxyestrogen synthesis**

260 Catecholestrogens are converted by placental catechol-*O*-methyltransferase (COMT) into  
261 methoxyestrogens. One of the main methoxyestrogens is 2-methoxyestradiol (2-ME2) that is produced  
262 by the placenta but also by local synthesis at the implantation site, since maternal arterial endothelial  
263 and decidual cells express COMT (97-100) (Figure 1).

#### 264 **D. Conjugated estrogen synthesis**

265 Estrogens can also be further and reversibly metabolized into inactive hormones by sulfation,  
266 glucuronidation or quinone synthase processes. These conjugated products are excreted into the bile  
267 and/or urine.

268 Conversion into sulfated estrogens is mediated by cytosolic sulfotransferases (SULTs). This is part of  
269 a detoxification pathway leading to water-soluble deactivated products readily excreted in the urine.  
270 Sulfated estrogens have a high albumin binding affinity rendering them unable to bind to ERs and are  
271 thus biologically inactive hormones (101). One of the most important SULTs for estrogens is  
272 SULT1E1 (also called EST), synthesized by STs, as well as in several maternal and fetal tissues  
273 including liver, adrenal glands, breast and gastrointestinal epithelial cells (102). SULT1E1 has a  
274 strong affinity for E1 and E2 at nanomolar concentrations (i.e. in the physiological range during  
275 pregnancy) (70). SULT1E1 knockout mice have an apparent reduced fertility due to an excess of fetal  
276 death (103). These deaths are related to placental thrombosis, a consequence of the excess of estrogen  
277 found in these mice. In fact fetal loss can be prevented by antiestrogen or anticoagulant treatment  
278 (103). Sulfation is a reversible process: as enzymes called “sulfatases” can convert sulfated estrogens  
279 into desulfated active hormones. Estrogens can also be glucuronidated (104,105) or converted into  
280 quinones or semi-quinones (106).

281

## 282 **V. PE and estrogen deficiency**

### 283 **A. Estrogen levels in PE**

284 Levels of estrogens, their precursors and by-products have been evaluated in a limited numbers of  
285 women with pregnancy-related hypertensive disease. Table 1 summarizes available data.

#### 286 **1. Estrogens : E1,E2,E3**

##### 287 **a. E2**

288 The use of GC or LC/MS has allowed extensive and reliable steroid profiling. Furthermore, enzyme  
289 activity can be assessed by calculating product/substrate ratios. We performed in the plasma of women  
290 with PE and normal pregnancies, collected at delivery, a whole GC/MS steroid profiling and  
291 demonstrated a lower E2 levels in the PE group (37). Other recent studies reported similar conclusions  
292 using different assays such as LC/MS (38), ELISA (107) or RIA (108,109). Indeed, low plasma E2



293 concentrations were observed in both severe (37,38,108,109) and mild PE (37,38) as well as in  
294 placental tissue from pregnancies with PE (110). Additionally, a recent study using an ELISA  
295 technique reported a trend to low E2 levels in women with PE compared to healthy pregnant women  
296 (111).

#### 297 b. E1 and E3

298 E1 and E3 concentrations were also measured at delivery in PE and control groups (37,38,108). While  
299 Jobe *et al* (38) found a lower plasma levels of both E1 and E3 in severe PE , we only observed a trend  
300 to lower E1 concentrations in severe PE, as well as a trend to lower E3 concentrations in both mild  
301 and severe PE groups (37). Furthermore, E3 was significantly lower in PE placental tissue compared  
302 to normal pregnancies (110). Only one recent study comparing plasma E3 levels using RIA technique  
303 in PE, HELLP syndrome did not find differences with normal pregnancy (108).  
304 Taken together, these recent studies suggest that at delivery, plasma E2 concentration is always lower  
305 in PE groups and that E1 and E3 are lower, or tend to be lower, with the use of a more sensitive assay  
306 i.e., GC/MS and LC/MS.

### 307 2. Catecholestrogens and 2-ME2

#### 308 a. Catecholestrogens

309 To our knowledge, only one study has measured catecholestrogens in PE (38). The authors found  
310 lower levels of 2-OHE1 and 2-OHE2 in mild and severe PE together with a high level of 4-OHE1 and  
311 16-OHE1 in severe and mild PE respectively, suggesting potential CYP450 hydroxylase alterations  
312 during PE (38).

#### 313 b. 2-ME2

314 Kanasaki *et al* (112) reported lower 2-ME2 levels, assessed by the LC/MS/MS technique at 22 to 29  
315 weeks of gestation, in women with PE compared to controls. Furthermore, 2-ME2 levels were  
316 assessed by LC/MS/MS between 11 and 14 weeks of gestation in Chilean women who subsequently  
317 developed PE and normal pregnancies (113). In this study, lower 2-ME2 levels were observed in the  
318 PE group compared to controls (113).

319 A Few studies have assessed at delivery 2-ME2 concentrations with GC or LC/MS. Jobe *et al* (38)  
320 observed lower 2-ME2 levels in severe PE compared to controls. Similarly, we found a trend to lower  
321 2-ME2 levels in severe PE compared to mild PE and controls (37).

322 Furthermore, three studies (using ELISA) reported lower 2-ME2 levels in PE compared to controls  
323 (111,114,115). In these studies blood samples were collected at the time of diagnosis, close to 29  
324 weeks (111) and at different periods of gestation (114), respectively. Only one study using ELISA  
325 found higher plasma 2-ME2 concentrations at delivery (third trimester) in a late-onset PE vs control  
326 group (115). All told, 2-ME2 synthesis is also impaired during PE.

327

### 328 **3. Other E2 metabolites**

329 One E2 metabolite, 16-ketoE2, had been identified as a likely candidate for a potential PE biomarker  
330 (38). 16-ketoE2 possibly the result of an interconversion between E2 and E3 has been found in  
331 maternal blood at high concentrations during severe PE (38). However, this finding needs to be  
332 confirmed by further studies. Finally, low levels of E3 metabolites, i.e., 16- and 17-epiE3 have been  
333 reported in severe PE by the same authors (38). Since 16- and 17-epiE3 demonstrate anti-  
334 inflammatory effects, it has been suggested that their low levels could partly contribute to the  
335 excessive inflammatory response encountered during PE (38).

336

### 337 **4. Estrogen precursors**

338 Estrogen precursors in PE have been understudied and reported results are mainly contradictory. At  
339 delivery, we found very low DHEAS plasma concentrations in mild and severe PE (37). In contrast,  
340 Rosing *et al* (35) described an increased DHEA/DHEAS ratio in the PE vs control group. Finally,  
341 another study, using ELISA to assess DHEAS levels did not find any difference (117).

342 To our knowledge, our paper was the only one to report  $\Delta$ 4-androstenedione assay by GC/MS during  
343 PE to assess the aromatase activity. This estrogen precursor measured at delivery in mild and severe  
344 PE was not different with the control group (37). On the contrary, two studies using ELISA (116-118)  
345 found that mean  $\Delta$  4-androstenedione levels were higher in women with pregnancy related

346 hypertension. Furthermore, women with severe hypertension showed the highest  $\Delta$ 4-androstenedione  
347 levels (118).

## 348 **B. Placental expression of enzymes involved in estrogen biosynthesis in PE**

349 Dysfunction of enzymes involved in estrogen biosynthesis could be the cornerstone of low or high  
350 estrogen levels found in PE. Indeed, placental E2 biosynthesis is dependent on a sufficient androgen  
351 supply, i.e. DHEAS, but also on downstream placental enzyme expression and/or activity (sulfatase,  
352 HSD3B1, aromatase and HSD17B1). 2-ME2 is also dependent on placental COMT expression and/or  
353 activity. Table 2 summarizes the main data on enzymes involved in estrogen synthesis in PE.

354

### 355 **1. Aromatase**

#### 356 **a. Expression and regulation in normal pregnancy**

357 Among steroidogenic enzymes involved in the estrogen synthesis pathway, aromatase (P450arom) is  
358 the rate-limiting enzyme. Aromatase, encoded by the CYP19 gene is expressed in numerous tissues  
359 (gonads, brain, fetal liver, vascular smooth muscle (VSM) cells, endothelial cells, macrophages,  
360 adipocytes and connective tissues) (119-121), and widely expressed in the placenta (122). The  
361 placental promoter contains binding sites for both inhibitors and enhancers of CYP19 gene expression  
362 (123). An autocrine loop stimulates placental aromatase expression by E2 via the estrogen receptor  $\alpha$   
363 (ER  $\alpha$ ) (124). Placental aromatase is only expressed by trophoblasts which have undergone  
364 differentiation and fusion to become STs (125) (Figure 1).

#### 365 **b. Regulation by transcription factors and miRNA**

366 Two specific micro-RNAs (miRNAs), namely mir-19b and mir-106a, have been identified in CTs as  
367 transcriptional inhibitors of aromatase gene expression (126). These two miRNAs promote CT  
368 proliferation and inhibit CT differentiation and their expression has been found to decline in STs  
369 (126).

370 Other transcriptional factors, namely the upstream stimulatory factors 1 (USF1) and 2 (USF2), have  
371 been reported to decrease CT differentiation and aromatase expression in a low O<sub>2</sub> environment via  
372 the binding of these two factors on two E-boxes located upstream and within the aromatase-specific

373 exon I.1 of the CYP19 gene (127). On the contrary, an increase in O<sub>2</sub> levels leads to degradation of  
374 USF1 and USF2 by the proteasome and increases CT differentiation and aromatase expression,  
375 therefore re-establishing estrogen synthesis (127). Aromatase activity and/or expression also seems to  
376 be influenced by ethnicity as demonstrated by Charles *et al* who reported a higher aromatase activity  
377 assessed by the E1/  $\Delta$  4-androstenedione ratio in Andean women compared to their European  
378 counterparts (ancestry) suggesting the existence of potential polymorphisms in humans (128).

379 c. Expression and activity in PE

380 A defect in aromatase is suspected to be the biggest culprit in PE pathophysiology. This hypothesis is  
381 supported by *in vitro* radiometric evaluation of aromatase using [19-<sup>3</sup>H<sub>3</sub>]androstenedione in human  
382 placental microsomes from both normal and hypertensive pregnancies (129) as well as by studies on  
383 CYP 19 gene polymorphisms (130).

384 As reported by Jobe *et al*, assessment of low E1 concentrations in PE suggests an abnormal aromatase  
385 activity (38). We found a reduction of the E1/  $\Delta$  4-A ratio in PE which was not significant possibly due  
386 to an insufficient sample size (37). On the contrary, Moon *et al* did not find abnormal aromatase  
387 activity (131). However, in this study a potential bias may have been a premature delivery in the  
388 control group, suggesting abnormal pregnancy (mean gestational age at delivery: 34.7 $\pm$ 2.9 weeks).

389 Looking at mechanistic factors, Perez-Sepevuelta *et al.* demonstrated that aromatase expression was  
390 lower in PE placentas compared to controls and suggested that hypoxia could explain this decrease  
391 after comparing the aromatase expression pattern of the choriocarcinoma cell line JEG-3 cultured  
392 under hypoxic conditions (132). These authors also demonstrate a lower placenta aromatase expression  
393 in a pregnant rabbit model of placental ischemia (132).

394 On the contrary, Charles *et al* showed that chronic hypoxia, due to residence at high altitudes,  
395 increases aromatase activity or expression in individuals of Andean as well of European ancestry  
396 (128). However, placental hypoxia in women with PE occurs in the second part of pregnancy while  
397 residents at high altitude are exposed to a hypoxic environment throughout the pregnancy. This  
398 suggests that increased aromatase activity may be beneficial for placental development in the first  
399 trimester but not at later stages. Nevertheless, Charles's data obtained in a very specific population in

400 term of genetics and environment may not be extrapolated to other populations. A recent study clearly  
401 underlined underscoring the role of environment on extraplacental aromatase activity by demonstrating  
402 that the estrogen/estrogen metabolite ratio was 3 times higher in Asian postmenopausal women living  
403 in the USA compared to Asian postmenopausal women living in Shanghai (133).

404 To further support the pathological role of aromatase deficiency, some gene polymorphisms (up to 88  
405 recorded) leading to impaired aromatase expression and activity (134) have been found to be  
406 associated with PE occurrence (130). Furthermore, Kumar *et al* found higher levels of mir-19b and  
407 mir-106a in the placenta of women with PE compared to the placenta from gestation-matched  
408 normotensive women (126).

#### 409 d. Congenital aromatase deficiency and PE

410 Paradoxically, women with placental CYP19 mutations leading to a complete aromatase expression  
411 deficiency do not display PE (135-138). The only complication that arises during these pregnancies is  
412 virilization of both the mother and the female fetus due to an excess of circulating androgens  
413 (137,138). Under these conditions the placenta fails to convert  $\Delta^4$ -androstenedione into E1 giving rise  
414 to high peripheral and placental concentrations of testosterone (138). Even though androgens have  
415 been shown to reduce vascular relaxation and negatively regulate placenta oxygenation (139), they  
416 may also promote angiogenesis via VEGF as demonstrated by Sieveking *et al* (140) in female  
417 endothelial cells overexpressing androgen receptors. We hypothesize that low estrogen levels due to  
418 genetic aromatase deficiency might result in a high expression of androgen receptors and androgen  
419 levels (lack of physiological estrogen down-regulation) giving rise to androgen-mediated  
420 angiogenesis. Moreover, during PE there is an imbalance between pro- and antiangiogenic estrogens, a  
421 situation different from genetic deficiency of aromatase, whereas it has been shown that different  
422 ratios between estrogen metabolites with pro- or antiangiogenic properties can modulate both VEGF  
423 production and angiogenic activity (141).

424 X-linked placental steroid sulfatase deficiency gives rise to very low estrogen levels (142) (certainly  
425 including both pro- and antiangiogenic estrogens) and normal or slightly increased testosterone levels  
426 and does not constitute an antiangiogenic condition, similarly to genetic aromatase deficiency.

## 427 2. HSD17B1

428 HSD17B1 is another enzyme potentially involved in PE (143,144). HSD17B1 mainly (145), but also  
429 the isoforms 3,5,7,12,13, exhibit a reductase NADPH-dependent activity and are responsible for the  
430 conversion of E1 into E2, while isoforms 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 14 exhibit mostly an oxidative NAD-  
431 dependent activity leading to the conversion of E2 into E1 (146). HSD17B1 is found in numerous cells  
432 including STs, CTs, stromal cells of the intervillous space (145) and also in EVT's (79) allowing local  
433 E2 synthesis during trophoblastic invasion (Figure 1).

434 Significantly lower plasma HSD17B1 protein levels have been found in women with PE compared to  
435 normal pregnancies (143,144). HSD17B1 has been described as being dysregulated post-  
436 transcriptionally by mir-210 and mir-518c, which are highly expressed in PE placentas (143). ~~This~~  
437 These overexpressions could be a consequence of placental hypoxia (143). However, we did not  
438 observe any difference in HSD17B1 activity as reflected by E2/E1 ratios in mild or severe PE  
439 compared to controls (37). Further evidence of a potential HSD17B1 dysregulation during PE is  
440 required.

441

### 442 3. COMT

#### 443 a. Expression and activity in pregnancy

444 COMT is found in numerous tissues including brain, placenta and artery endothelial cells (uterus,  
445 aorta, coronary) (95). Although there is only one COMT gene, specific COMT transcripts are  
446 expressed into two forms: soluble (S-COMT) and bound to intracellular membranes (MB-COMT)  
447 (147). MB-COMT is predominantly expressed in the brain whereas S-COMT is predominant found in  
448 peripheral tissues (148). Placental S-COMT significantly increases throughout pregnancy (115).  
449 Several COMT regulation pathways have been described in endometrial stroma cells (149) or in  
450 cancer cells (150). The placental COMT regulation pathway remains unknown to date and  
451 polymorphisms of this gene could result in a low or high COMT activity.

452 Reports on the association between the COMT polymorphisms and PE occurrence vary depending on  
453 which polymorphism(s) are assessed as well as the ethnicity of the studied cohort (113,115,116,151-  
454 156).

#### 455 b. COMT knockout mice and PE

456 As PE is specific to humans, attempts to study the occurrence of this pathological condition using  
457 experimental animal models are extremely scarce. Kanasaki *et al.* (112) were the first to suggest that  
458 COMT is involved in PE pathophysiology. These authors described *COMT*<sup>-/-</sup> mice as presenting a mild  
459 PE-like syndrome with acute atherosclerosis and glomerular endotheliosis along with low 2-ME2 levels and  
460 high placental HIF-1  $\alpha$  expression until the end of gestation. The authors hypothesized that low 2-  
461 ME2 enhances shallow implantation and placental insufficiency, which in turn decrease estrogen  
462 synthesis. They also suggested that significant placental COMT deficiency is required to trigger the  
463 syndrome since *COMT*<sup>-/-</sup> females crossed with *COMT*<sup>+/-</sup> males did not present with PE. Interestingly,  
464 2-ME2 treatments improved placenta weights and clinical signs (proteinuria and blood pressure)  
465 which are altered during PE. However, even if 2-ME2 is involved in PE physiopathology, the model  
466 of *COMT*<sup>-/-</sup> mice described by Kanasaki *et al.* (112) does not fit with the epidemiology of PE. A  
467 genetic cause such as *COMT*<sup>-/-</sup> would suggest repeated PE, while most women with a history of PE  
468 have no recurrence.

469 Kanasaki *et al.* (112) suggested that PE-like syndrome is due to an impaired catabolism of  
470 catecholestrogens and not catecholamines based on the fact that they found no difference in dopamine,  
471 adrenalin and noradrenalin concentrations in pregnant *COMT*<sup>+/+</sup> and *COMT*<sup>-/-</sup> mice. Moreover,  
472 administration of an inhibitor of monoamine oxidase (which also catabolizes catecholamines) to three  
473 pregnant *COMT*<sup>+/+</sup> mice did not result in an increase in blood pressure despite an increase  
474 in noradrenalin and adrenalin concentrations. However, not only was the sample size small but it was  
475 also difficult to obtain precise measurements of catecholamines (157) so this remains to be confirmed.

## 476 VI. **Signaling and biological effects of E2 and its metabolites in pregnancy: a key link** 477 **between estrogen deficiency and PE**

478 During pregnancy, E2 and some of its metabolites promote a) angiogenesis; b) vasodilation and  
479 uterine blood flow increase; c) maternal blood pressure decrease; d) placental cell differentiation and  
480 proliferation; and e) biosynthesis of estrogen precursors in fetal adrenal glands. Estrogens are also  
481 involved in lactation, uterus contraction/relaxation and fetal development which will not be developed  
482 here. Table 3 summarizes main available data on estrogen effects on the uterus and placenta.

### 483 A. **Signaling pathways of estrogens in normal placenta and in PE**

**484 1. Genomic signaling pathways**

485 The genomic signaling pathway in estrogens target tissues have been extensively reviewed elsewhere  
486 (158-167). Estrogen receptors (ERs) interact with specific DNA sequences (estrogen responsive  
487 elements: ERE) (159,161) or with specific ERE-like sequence (ERE-LS) that differs slightly from the  
488 consensus ERE (123,168,169). For example, the effects of the estradiol/ER $\alpha$  complex on aromatase  
489 expression is mediated by an ERE-LS in the promoter region of the aromatase gene (124).

490 However, many estrogen-target genes do not possess ERE or ERE-LS. In such cases, an indirect  
491 association of ER with DNA through different transcription factors such as Sp1 or c-Fos/c-Jun  
492 complex, also called (activated protein 1 (AP1), has been shown (170,171). This mechanism, called  
493 'tethering', stabilizes the DNA binding of transcription factor and/or recruits coactivators to the  
494 complex (171).

495 Although all estrogens (mainly E1, E2, E3, E4 and catecholestrogens) bind to ERs, they display  
496 different affinities for each ER subtype (ER  $\alpha$  and ER  $\beta$ ) and their isoforms, as well as different  
497 kinetics of dissociation (172). E2 has been shown to be the most potent effector (161). However, some  
498 metabolites of E2 such as 2-catecholestrogens should actually be considered as antiestrogens for E2-  
499 mediated cell proliferation (173,174) since they show a very low affinity for ER $\alpha$  and ER $\beta$  and are  
500 associated with a rapid kinetic dissociation. These metabolites are also converted by COMT into 2-  
501 ME2 (161,175), a potent antiproliferative molecule (176).

**502 2. Non-genomic signaling pathways**

503 Non-genomic pathways of estrogen effects are also involved in vasodilation via the  
504 phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway, leading to eNOS phosphorylation  
505 and promoting NO release (25-27,177,178). Besides NO production, E2 promotes vasodilation by  
506 inducing a rapid (5-15 min) prostacyclin synthesis, as demonstrated in human umbilical vein  
507 endothelial cells (179). Using uterine artery endothelial cells, another study showed that estrogen  
508 metabolites also stimulate prostacyclin production in an ER-independent manner presumably  
509 involving GPER (180).

**510 3. ER expression in placental and uterine cells**

511 a. Placenta expression of ERs



512 Studies focusing on placental expression of both nuclear ER isoforms (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) report  
513 conflicting results. While some did not find any ER expression within the placenta (181-185) others,  
514 in contrast, observed that E2 bound to this tissue (186-188). Bukovsky *et al* (186) showed that villous  
515 CTs as well as villous vascular pericytes and amniotic fibroblasts express ER $\alpha$ . They also showed that  
516 CT differentiation leading to multinucleated STs was associated with changes in ER expression  
517 depending on the differentiation state, from ER $\alpha$ + / ER $\beta$ - CTs into ER $\alpha$ + / ER $\beta$ + young and ER $\alpha$ - / ER $\beta$ +  
518 mature STs (187). In addition, they observed that ER $\beta$  was expressed by STs, villous endothelial cells,  
519 amniotic epithelium and EVT $\alpha$ s (187). On the contrary, Kumar *et al* (124) showed that ER $\alpha$  mRNA  
520 was expressed in CTs and increased during differentiation while ER $\beta$  was less expressed and declined  
521 with differentiation. For some authors, placental characteristics impact ER expression: while normal  
522 placentas exhibit strong ER $\alpha$  expression, abnormal placentas with signs of senescence and/or severe  
523 villous immaturity do not express this receptor (186). ER expression-could be disrupted during PE as  
524 chronic placental hypoxia has been shown to decrease ER $\alpha$  expression in ovine arteries (189).

#### 525 b. Uterine expression of ERs

526 ER expression in endometrial, myometrial and vascular uterine cells has also been studied. Some  
527 authors observed that decidual cells expressed ERs (182,187,190), mainly ER $\beta$  (187), while others  
528 reported low levels of expression or no expression during pregnancy in the endometrium and spiral  
529 arteries (182). mRNA expression of both nuclear ER $\alpha$  and GPER has been observed in human  
530 pregnant myometrium. However, the ER $\alpha$  protein is largely undetectable due to a rapid turnover by  
531 proteosomal processing (191). Finally, in all but one study (182), uterine vascular cells have been  
532 shown to express both ER $\alpha$  and ER $\beta$  (192,193).

### 533 4. ERs and PE

534 Although estrogen receptors are fundamental for estrogen effects, the literature describing ERs and PE  
535 is limited. Studies evaluating the potential links between two polymorphisms of the ER $\alpha$  gene (PvuII  
536 and XbaI), potentially involved in vascular disease, have yielded contradictory results. A positive  
537 association of ER polymorphisms with severe PE was described in a case-control study including only  
538 Caucasian women (194) while no association was described in a case-control study including only  
539 Chinese women (195).

540 **B. Biological effects of estrogens in normal pregnancy and PE : the link with angiogenesis**  
541 **and maternal uterine and systemic vascular tone**

542 **1. Estrogens and angiogenesis**

543 Angiogenesis during pregnancy is mainly regulated by the angiogenic factors VEGF and PlGF (196)  
544 and crosstalk with estrogens have been reported (197,198). Interestingly, E2 and VEGF/PlGF have  
545 been reported as having similar biological effects during pregnancy. Indeed, E2 also promotes uterine  
546 angiogenesis, migration and proliferation of endothelial cells (199-201). Numerous studies emphasize  
547 that a crosstalk between estrogen and angiogenic factors occurs and is mainly responsible for  
548 regulating the angiogenesis processes (197,198,202-204).

549 VEGF and PlGF share similar signaling pathways with E2, i.e., PI3K/Akt and activation of c-Fos and  
550 c-Jun (202-205). Moreover, the VEGF gene contains a variant ERE (197) and E2 upregulates VEGF  
551 (30,197,198) which in turn upregulates PlGF and VEGFR-1 expression (206). Additionally, E2  
552 upregulates the VEGFR-1 gene which contains an ERE-LS (203) and might directly upregulate  
553 VEGFR-2 expression in endothelial cells via the ER $\alpha$ /Sp1 pathway (tethering) (204). Thus, estrogens  
554 modulate placental vascular cell proliferation (199-201) which is essential to expand the maternofetal  
555 contact surface and uterine myocyte proliferation via several pathways (207-209).

556 Therefore, low E2 levels as found in PE may slow down angiogenesis as well as vasculogenesis  
557 leading to insufficient placental development and maternofetal exchanges.

558 On the contrary, the E2 metabolite 2-ME2 is a potent antiangiogenic factor with no proliferative  
559 activity (97). 2-ME2 inhibits both VEGF synthesis and vascular tubule formation and induces  
560 disruption of tubulin polymerization (210). It also decreases HIF-1 $\alpha$ , a major transcription factor  
561 induced by hypoxia which promotes VEGF synthesis (112,210-212). Following 2-OHE2 or 4-OHE2  
562 treatment, a biphasic concentration-dependent proliferation of uterine artery endothelial cells has been  
563 shown *in vitro* (97).

564 **2. Estrogens and uterine blood flow increase**

565 Transformation from a single cell to a healthy 3.5 kg baby in only 9 months requires a high input of  
566 nutrients and oxygen to the fetal unit through a considerably increased ( $\approx$  4-fold) uterine blood flow  
567 UBF (213). UBF change is mediated by a nearly 50% increase in maternal cardiac output (214,215)

568 together with an increase in uterine artery vasodilation. Vasodilation begins very early in pregnancy  
569 and involves multiple effectors. During pregnancy, the classical renin–angiotensin system (RAS) is  
570 activated (215) as well as the non-classical RAS (216), resulting in vasodilation, antiproliferative and  
571 antiangiogenic effects through ang 1-7, a metabolite of angiotensin II (217). Interestingly, plasma ang  
572 1-7 levels are lower in PE when compared to normal pregnancy (216).

573 Both estrogens and progesterone induce uterine (182,218,219) and systemic (220,221) artery  
574 vasodilation. The estrogen-mediated vasodilation of the uterine arteries depends on NO and eNOS,  
575 since NOS inhibitors decrease estrogen-induced UBF (222). Increased expression of eNOS has also  
576 been shown to be associated with an eNOS activation during pregnancy, in both ewes (223) and  
577 women (224). E2-mediated NO and prostacyclin upregulation could be partially mediated by VEGF  
578 upregulation (225). In turn, NO stimulates VEGF synthesis by vascular endothelial cells (226). E2  
579 may also induce vasodilation through direct non genomic actions on membrane ion-channels of VSM  
580 (227-231). Other estrogens, such as catecholestrogens, can also participate to increase UBF by  
581 inducing prostacyclin synthesis and modifying calcium channel activities in endothelial and VSM  
582 cells (98). E1 (24) and E3 (232) are likewise described as powerful inducers of increased UBF and,  
583 since E3 is a fetal by-product, it has been suggested that fetal “well-being” and growth are self-  
584 regulated by the fetus itself. Interestingly, E4 is a weak vasodilator with no effect on eNOS or NO  
585 production (233,234).

586 2-ME2, which is highly increased during pregnancy (235,236), also promotes vasodilation and  
587 increased UBF via uterine artery wall remodeling. Indeed, as shown in cultured human CTs, under  
588 low oxygen supply, 2-ME2 enables differentiation of CTs into invasive CTs (237). In addition, 2-ME2  
589 also promotes prostacyclin and NO synthesis (238).

590 E2 and its metabolites are potent uterine vasodilators. Consequently, their low levels during PE lead to  
591 decreased oxygen supply to the feto-placental unit and placental overexpression of sFlt1, negatively  
592 impacting UBF and worsening the clinical situation by decreasing steroid biosynthesis.

### 593 **3. Estrogens and maternal blood pressure regulation**

594 Blood pressure is decreased during a normal pregnancy except during the last month when it returns to  
595 non-pregnant levels. This can be explained by a decrease in PIGF coupled with an increase in the  
596 sFlt1/PIGF ratio (239).

597 As discussed above, during normal pregnancy, estrogens lower maternal blood pressure through  
598 arterial vasodilation but also through an upregulation of HSD11B2, which converts active cortisol into  
599 inactive cortisone (240). This results in a decrease in the vasoconstrictive activity of glucocorticoids  
600 through mineralocorticoid receptors (241). During PE, low E2 levels may downregulate HSD11B2  
601 expression leading to systemic vasoconstriction (242,243).

#### 602 **4. Estrogens and placental and uterus cell differentiation and proliferation**

603 E2 contributes to trophoblast cell proliferation but also stimulates villous CT differentiation into STs  
604 which in turn synthesize estrogens and enhance both CT proliferation and maturation (186,187). U-  
605 shaped association with placental weight has been described in late PE when both very small and large  
606 placentas are observed (244). Low E2 levels could lead to small placentas found in early PE.

#### 607 **5. Estrogens and regulation of their precursors synthesis by fetal adrenals**

608 Estrogens modulate the fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis through the upregulation of placental  
609 HSD11B2 (245), resulting in a decrease in fetal cortisol concentration (242,246). These low fetal  
610 cortisol levels stimulate ACTH release from the fetal pituitary gland which then increases DHEA  
611 synthesis by the fetal adrenal glands. However, fetal adrenal glands express ER  $\alpha$  and ER  $\beta$  and their  
612 activity is controlled by estrogens (247). High estrogen levels inhibit the fetal adrenal gland response  
613 to ACTH (247,248). Interestingly, it has also been shown that a marked decrease in E2 levels leads to  
614 an increase in fetal adrenal gland size and an upregulation of DHEA synthesis (249). All these  
615 findings suggest a tight retroregulation of its own precursor synthesis (i.e., DHEA) by E2. Therefore,  
616 low E2 levels during PE may induce higher fetal cortisol levels thus decreasing DHEA, the fetal  
617 adrenal-derived E2 precursor.

#### 618 **VII. PE risk factors and estrogen synthesis/signaling deficiencies**

619 We reviewed available data on potential links between well-established risk factors of PE and  
620 abnormal E2 synthesis and/or signaling, in order to strengthen the hypothesis that PE is associated  
621 with estrogen deficiency. Maternal conditions such as obesity, diabetes and chronic hypertension, are

622 well known risk factors of PE (16). Similarly, the risk of PE is increased in women with renal  
623 transplantation (250). Although these risk factors often coexist in patients, we arbitrarily describe the  
624 specific association of each aforementioned condition with estrogen biosynthesis and signaling.

#### 625 **A. Obesity**

626 Over two thirds of women of reproductive age are overweight or obese in the United States (251), i.e.,  
627 with a body mass index over 25 and 30 kg/m<sup>2</sup>, respectively. Central distribution of body fat (marker of  
628 visceral fat) is the main risk factor for cardiovascular disease including PE (252). Adipocytes/adipose  
629 tissue-resident macrophages produce estrogens by converting androgens through CYP 19  
630 aromatization (119) and also synthesize leptin, adiponectin and several other molecules (253). Obese  
631 individuals display high levels of blood leptin and low levels of blood adiponectin (254). Excessive  
632 production of TNF- $\alpha$  and interleukin (IL)-6 by adipose tissue-resident macrophages has been  
633 described in both obese pregnant and non-pregnant women (253,255). These pro-inflammatory  
634 adipokines display paracrine effects (local increase of leptin synthesis) (253), promote insulin  
635 resistance and participate in the systemic low-grade inflammatory state (253,255-258).

636 During PE, inconsistent leptin levels have been reported (259). Nevertheless, plasma leptin levels have  
637 been found to be higher in obese women with PE than in controls (254). As shown by Palei *et al.*,  
638 leptin infusion to normal pregnant rats increases blood pressure and placental TNF- $\alpha$  synthesis (260).

639 While TNF- $\alpha$  stimulates aromatase expression in adipose tissue stromal cells (261), leptin-mediated  
640 TNF- $\alpha$  upregulation induces an excess of CT and ST apoptosis in the placenta (262-264), thus  
641 decreasing placental steroid biosynthesis. Using cultured term placentas incubated with different leptin  
642 concentrations, Coya *et al* found a dose-dependent decrease in E2 release (265).

#### 643 **B. Diabetes**

644 Insulin resistance is the hallmark of gestational diabetes mellitus (GDM) and type 2 diabetes and it  
645 also plays a role in type 1 diabetes (266,267). Chronic low-grade inflammation promotes insulin  
646 resistance mainly via TNF- $\alpha$  and IL-6 but also via other inflammatory cytokines (268). Maternal as  
647 well as fetal reactive hyperinsulinemia affect placental cells (269). All but one study (270) indicate  
648 that pregnant women with GDM have decreased plasma estrogen levels and increased plasma

649 androgen levels (271)(272). Nestler *et al.* (273) reported a decrease in aromatase expression due to an  
650 inhibitory effect of insulin. Uzelac *et al* (271) reported reduced aromatase protein concentrations but  
651 no change in placental mRNA levels in women with GDM compared to those without GDM. This  
652 result suggests a post-transcriptional event. Increases in insulin-like growth factor-I and II (IGF-I and  
653 II), which share structural similarities with insulin (271,273,274) seem to be involved as well (274),  
654 though controversial results have been reported about IGF-I and II plasma levels during GDM or type 2  
655 diabetes (275).

#### 656 **C. Chronic hypertension**

657 Chronic hypertension (CH) is estimated to be present in 3 to 5% of pregnancies (276). An excess of  
658 oxidative stress and chronic low-grade inflammation have been proposed as potential etiologies of CH  
659 (277). Based on the obesity model, we suggest that the low-grade inflammation present in CH induces  
660 endothelial dysfunction and placental inflammation and could enhance placental necrosis/apoptosis  
661 and insulin resistance thus contributing to E2 deficiency, which could lead to PE.

#### 662 **D. Kidney transplantation**

663 Women with a kidney transplant represent a paradigm of high vascular risk. These patients frequently  
664 gain weight early after transplantation leading to overweight or obesity (278). They also commonly  
665 present with some degrees of chronic renal insufficiency and CH. It has been suggested that in such  
666 women, CH is associated with subclinical atherosclerosis and inflammation (279). This pattern could  
667 be related to numerous factors such as immune response to the grafted tissues and possibly to disease-  
668 related renal impairment. As described above, chronic inflammation could promote endothelial injury,  
669 placental apoptosis and insulin resistance, and then facilitate the subsequent disruption of placental  
670 steroidogenesis. Finally, in addition to kidney disease itself, drugs such as prednisone not only induce  
671 diabetes (280) but have also been shown to enhance placental vasoconstriction, induce fetal and  
672 placental growth restriction and prevent normal vascularization in rat placenta via a reduction in  
673 VEGF expression (281). Similarly, cyclosporine (282) as well as tacrolimus can induce hypertension  
674 and the latter has been shown to increase the inflammatory state (283).

675 Although all these risk factors of PE can promote direct systemic endothelial injury, they also have a  
676 negative impact on the placenta, including inflammation and excess of placental necrosis/apoptosis, as

677 well as impacting aromatase production. They may thus induce an estrogen deficiency which further  
678 strengthens arguments for the role of estrogen in PE.

679

### 680 **VIII. Therapeutic implications**

681 Attempts to prevent PE by estrogen supplementation remain limited. Kanasaki *et al* (112) successfully  
682 reverted PE features with a subcutaneous administration of 2-ME2 in COMT<sup>-/-</sup> mice. Djordevic *et al*  
683 (284) showed that intramuscular short-term administration of E2 in women with PE reduced mean  
684 arterial blood pressure. Furthermore, Genistein, a phytoestrogen with ER  $\beta$  selectivity as well as an  
685 affinity for GPER (285,286), has also been assessed in the prevention of PE (287). Fernandez *et al* in a  
686 case-control study and showed that women with the lowest genistein intake were four times more  
687 likely to develop PE than women with the highest genistein intake (287).

688 The mechanisms of action of genistein may include GPER binding, SF1 activation and aromatase  
689 modulation. The regulation of aromatase expression, and therefore its activity, is highly tissue specific.  
690 To our knowledge, placental aromatase regulation by genistein has not been evaluated yet. All in all,  
691 these data open up an interesting potential therapeutic field using estrogen itself or regulators of its  
692 synthesis and activities that deserves to be further explored.

### 693 **Future Directions**

694 Abnormal estrogen levels and dysregulation of the enzymes involved in estrogen biosynthesis have  
695 been described during PE. An increasing number of studies highlight a marked decrease of estrogens  
696 in maternal circulation, especially E2, the most potent ER ligand. However, published studies report  
697 conflicting results possibly due to small sample sizes and mixed PE types (early and late onset).  
698 Moreover, most of the studies only focus on specific targeted steroids rather than comprehensive  
699 steroid profiling and also fail to assess their bioactivities. The mechanisms of E2 deficiency may  
700 include changes in the regulation of expression of the main steroidogenic enzymes (aromatase,  
701 HSD17B1) possibly via miRNAs and transcription factors such as USF1 and 2.

702 However, the major role of estrogens during physiological placental development and pregnancy  
703 supports the hypothesis that low estrogen levels may play a central role in PE physiopathology.  
704 Moreover, the close interaction between estrogens and angiogenic/antiangiogenic balance, which are

705 known to contribute to the pathophysiology of PE, reinforces the “estrogen hypothesis”. This includes  
706 both regulation of angiogenic/antiangiogenic factors by E2 and the common molecular regulatory  
707 pathways of placental and vascular functions.

708 Further studies are required to confirm previous findings and develop clinical applications. We would  
709 encourage larger studies with comprehensive steroid profiling using only analytically reliable mass  
710 spectrometric procedures.

711 Major pending issues for clinical applications include: a) determining if estrogen deficiency is a  
712 consequence of a hypoxic placenta or rather *the cause or one of the initial* causes of PE; b) evaluating  
713 potential useful biomarkers of estrogens for PE screening and; c) assessing if natural estrogens and/or  
714 ER agonists and/or SERM are potential treatment lines for PE.

715

716 **Acknowledgments:** We thank Dr Jessica Vincent for her help in designing figure 1 and Felicity  
717 Neilson for English language editing.



## References

1. **Savitz DA, Danilack VA, Engel SM, Elston B, Lipkind HS.** Descriptive Epidemiology of Chronic Hypertension, Gestational Hypertension, and Preeclampsia in New York State, 1995–2004. *Matern. Child Health J.* 2014;18:829–838.
2. **Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PFA.** WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet.* 2006;367:1066–1074.
3. **Kuklina EV, Ayala C, Callaghan WM.** Hypertensive disorders and severe obstetric morbidity in the United States. *Obstet. Gynecol.* 2009;113:1299–1306.
4. **Berkane N.** Définitions et conséquences des hypertensions artérielles de la grossesse. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* 2010;29:e1–e6.
5. **Heilmann L, Rath W, Pollow K.** Hemostatic abnormalities in patients with severe preeclampsia. *Clin. Appl. Thromb.* 2007;13:285–291.
6. **Catarino C, Santos-Silva A, Belo L, Rocha-Pereira P, Rocha S, Patrício B, Quintanilha A, Rebelo I.** Inflammatory Disturbances in Preeclampsia: Relationship between Maternal and Umbilical Cord Blood. *J. Pregnancy* 2012;2012:1–10.
7. **Redman CW, Sacks GP, Sargent IL.** Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999;180:499–506.
8. **Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ.** Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am. J. Pathol.* 2002;160:1405–1423.
9. **Hertig A, Berkane N, Lefevre G, Toumi K, Marti H-P, Capeau J, Uzan S, Rondeau E.** Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia. *Clin. Chem.* 2004;50:1702–1703.
10. **Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim K-H, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA.**

Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:672–683.

11. **Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim K-H, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA.** Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* 2003;111:649–658.
12. **Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA.** Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003;188:177–182.
13. **Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant J-F, Pignon M-R, Noel A, Schaaps J-P, Cabrol D, Frankenne F, Foidart J-M.** Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:5555–5563.
14. **Tsatsaris V, Goffin F, Foidart JM.** Circulating angiogenic factors and preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:2003–2004;
15. **Redman CWG, Sargent IL.** Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta* 2009;30 Suppl A:S38–42.
16. **Redman CW, Sargent IL.** Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592–1594.
17. **Labarrere CA.** Acute atherosclerosis. A histopathological hallmark of immune aggression? *Placenta* 1988;9:95–108.
18. **Lowe DT.** Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 2000;4:441–458.
19. **Chen G, R Wilson null, Wang SH, Zheng HZ, Walker JJ, McKillop JH.** Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia. *Clin. Exp. Immunol.* 1996;104:154–159.

20. **Lau SY, Guild S-J, Barrett CJ, Chen Q, McCowan L, Jordan V, Chamley LW.** Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2013;70:412–427.
21. **Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW.** Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1995;102:20–25.
22. **Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK.** [Pre-eclampsia: a disorders of the endothelial cells?]. *Gynäkol.* 1992;25:2–6.
23. **Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM.** Preeclampsia is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1988;159:908–914.
24. **Rosenfeld CR, Rivera R.** Circulatory responses to systemic infusions of estrone and estradiol-17alpha in nonpregnant, oophorectomized ewes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1978;132:442–448.
25. **Caulin-Glaser T, García-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR.** 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ. Res.* 1997;81:885–892.
26. **Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y.** Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2001;276:3459–3467.
27. **Simoncini T, Genazzani AR, Liao JK.** Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation* 2002;105:1368–1373.
28. **Cullinan-Bove K, Koos RD.** Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with

estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 1993;133:829–837.

29. **Hervé M a. J, Meduri G, Petit FG, Domet TS, Lazennec G, Mourah S, Perrot-Applanat M.** Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. *J. Endocrinol.* 2006;188:91–99.
30. **Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN.** Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996;81:3112–3118.
31. **Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Reynolds LP.** Effects of estradiol-17beta on expression of mRNA for seven angiogenic factors and their receptors in the endometrium of ovariectomized (OVX) ewes. *Endocrine* 2006;30:333–342.
32. **Shanker G, Sorci-Thomas M, Adams MR.** Estrogen modulates the expression of tumor necrosis factor alpha mRNA in phorbol ester-stimulated human monocytic THP-1 cells. *Lymphokine Cytokine Res.* 1994;13:377–382.
33. **Notation AD, Tagatz GE.** Unconjugated estriol and 15alpha-hydroxyestriol in complicated pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1977;128:747–756.
34. **Rahman SA, Hingorani V, Laumas KR.** Biosynthesis of oestrogens and their inter-conversion in human placentae from normal and toxæmic pregnancies. *Clin. Endocrinol.* 1975;4:333–341.
35. **Rosing U, Carlström K.** Serum levels of unconjugated and total oestrogens and dehydroepiandrosterone, progesterone and urinary oestriol excretion in pre-eclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 1984;18:199–205.
36. **Zamudio S, Leslie KK, White M, Hagerman DD, Moore LG.** Low serum estradiol and high serum progesterone concentrations characterize hypertensive pregnancies at high altitude. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 1994;1:197–205.

37. **Hertig A, Liere P, Chabbert-Buffet N, Fort J, Pianos A, Eychenne B, Cambourg A, Schumacher M, Berkane N, Lefevre G, Uzan S, Rondeau E, Rozenberg P, Rafestin-Oblin M-E.** Steroid profiling in preeclamptic women: evidence for aromatase deficiency. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010;203:477.e1–9.
38. **Jobe SO, Tyler CT, Magness RR.** Aberrant synthesis, metabolism, and plasma accumulation of circulating estrogens and estrogen metabolites in preeclampsia implications for vascular dysfunction. *Hypertension* 2013;61:480–487.
39. **Handelsman DJ, Wartofsky L.** Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98:3971–3973.
40. **Palmer AE, London WT, Sly DL, Rice JM.** Spontaneous preeclamptic toxemia of pregnancy in the patas monkey (*Erythrocebus patas*). *Lab. Anim. Sci.* 1979;29:102–106.
41. **Krugner-Higby L, Luck M, Hartley D, Crispin HM, Lubach GR, Coe CL.** High-risk pregnancy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a case of ectopic, abdominal pregnancy with birth of a live, term infant, and a case of gestational diabetes complicated by pre-eclampsia. *J. Med. Primatol.* 2009;38:252–256.
42. **Hennessy A, Gillin AG, Painter DM, Kirwan PJ, Thompson JF, Horvath JS.** Evidence for Preeclampsia in a Baboon Pregnancy with Twins. *Hypertens. Pregnancy* 1997;16:223–228.
43. **Staub-Ram E, Shalev E.** Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005;3:56.
44. **Genbacev OD, Prakobphol A, Foulk RA, Krtolica AR, Ilic D, Singer MS, Yang Z-Q, Kiessling LL, Rosen SD, Fisher SJ.** Trophoblast L-selectin-mediated adhesion at the maternal-fetal interface. *Science* 2003;299:405–408.
45. **Challier J-C, Uzan S.** [The human placenta and its pathologies: focus on oxygen]. *Médecine Sci.* 2003;19:1111–1120.

46. **Merviel P, Challier JC, Carbillon L, Foidart JM, Uzan S.** The role of integrins in human embryo implantation. *Fetal Diagn. Ther.* 2001;16:364–371.
47. **Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH.** Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.* 1997;99:2139–2151.
48. **Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE.** Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum. Reprod. Update* 2012;18:458–471.
49. **Whitley GSJ, Cartwright JE.** Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. *J. Anat.* 2009;215:21–26.
50. **Liu LX, Lu H, Luo Y, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Goldberg M, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C.** Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;291:908–914.
51. **Wheeler T, Elcock CL, Anthony FW.** Angiogenesis and the placental environment. *Placenta* 1995;16:289–296.
52. **Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M.** The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. *Placenta* 2006;27:939–958.
53. **Goldman-Wohl D, Yagel S.** Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002;187:233–238.
54. **Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL.** Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1998;105:632–640.
55. **Tse C, Lefevre G, Berkane N, Flahault A, Toumi K, Brault D, Capeau J, Uzan S.** Increased serum maternal levels of the HER2 oncoprotein p105 ectodomain in preeclampsia. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2004;42:142–146.
56. **Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M, Zou L, Yamashita T, Osuga Y, Momoeda M, Kozuma S, Taketani Y.** Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1

expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology* 2004;145:4838–4845.

57. **Li H, Gu B, Zhang Y, Lewis DF, Wang Y.** Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta* 2005;26:210–217.
58. **Hofmann S, Grasberger H, Jung P, Bidlingmaier M, Vlotides J, Janssen OE, Landgraf R.** The tumour necrosis factor-alpha induced vascular permeability is associated with a reduction of VE-cadherin expression. *Eur. J. Med. Res.* 2002;7:171–176.
59. **Carter AM, Enders AC, Pijnenborg R.** The role of invasive trophoblast in implantation and placentation of primates. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2015;370:20140070.
60. **Devroey P, Camus M, Palermo G, Smitz J, Van Waesberghe L, Wisanto A, Wijbo I, Van Steirteghem AC.** Placental production of estradiol and progesterone after oocyte donation in patients with primary ovarian failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990;162:66–70.
61. **Castracane VD, Goldzieher JW.** Timing of the luteal-placental shift in the baboon (*Papio cynocephalus*). *Endocrinology* 1986;118:506–512.
62. **Levitz M, Young BK.** Estrogens in pregnancy. *Vitam. Horm.* 1977;35:109–147.
63. **Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG.** Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet. Gynecol.* 2009;114:1326–1331.
64. **Oakey RE.** The progressive increase in estrogen production in human pregnancy: an appraisal of the factors responsible. *Vitam. Horm.* 1970;28:1–36.
65. **Tang Z, Tadesse S, Norwitz E, Mor G, Abrahams VM, Guller S.** Isolation of hofbauer cells from human term placentas with high yield and purity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2011;66:336–348.

66. **Schmidt M, Kreutz M, Löffler G, Schölmerich J, Straub RH.** Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J. Endocrinol.* 2000;164:161–169.
67. **Escobar JC, Patel SS, Beshay VE, Suzuki T, Carr BR.** The human placenta expresses CYP17 and generates androgens de novo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96:1385–1392.
68. **Pion R, Jaffe R, Eriksson G, Wiqvist N, Diczfalusy E.** Studies on the metabolism of C-21 steroids in the human foetoplacental unit. I. Formation of a beta-unsaturated 3-ketones in midterm placentas perfused in situ with pregnenolone and 17-alpha-hydroxypregnenolone. *Acta Endocrinol.* 1965;48:234–248.
69. **Siiteri PK, MacDonald PC.** Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1966;26:751–761.
70. **Falany CN, Wheeler J, Oh TS, Falany JL.** Steroid sulfation by expressed human cytosolic sulfotransferases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1994;48:369–375.
71. **Siiteri PK.** The continuing saga of dehydroepiandrosterone (DHEA). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:3795–3796.
72. **Peter M, Dörr HG, Sippell WG.** Changes in the concentrations of dehydroepiandrosterone sulfate and estriol in maternal plasma during pregnancy: a longitudinal study in healthy women throughout gestation and at term. *Horm. Res.* 1994;42:278–281.
73. **Salido EC, Yen PH, Barajas L, Shapiro LJ.** Steroid sulfatase expression in human placenta: immunocytochemistry and in situ hybridization study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990;70:1564–1567.
74. **Mizuno M, Lobotsky J, Lloyd CW, Kobayashi T, Murasawa Y.** Plasma androstenedione and testosterone during pregnancy and in the newborn. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1968;28:1133–1142.



75. **Rivarola MA, Forest MG, Migeon CJ.** Testosterone, androstenedione and dehydroepiandrosterone in plasma during pregnancy and at delivery: concentration and protein binding. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1968;28:34–40.
76. **Ruder HJ, Loriaux L, Lipsett MB.** Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J. Clin. Invest.* 1972;51:1020–1033.
77. **Mueller JW, Gilligan LC, Idkowiak J, Arlt W, Foster PA.** The Regulation of Steroid Action by Sulfation and Desulfation. *Endocr. Rev.* 2015;36:526–563.
78. **Calzada-Mendoza CC, Sánchez EC, Campos RR, Becerril AM, Madrigal EB, Sierra AR, Mendez EB, Ocharán EH, Herrera NG, Ceballos-Reyes G.** Differential aromatase (CYP19) expression in human arteries from normal and neoplastic uterus: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 2006;11:389–393.
79. **Bonenfant M, Provost PR, Drolet R, Tremblay Y.** Localization of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA and protein in syncytiotrophoblasts and invasive cytotrophoblasts in the human term villi. *J. Endocrinol.* 2000;165:217–222.
80. **Albrecht ED, Pepe GJ.** Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr. Rev.* 1990;11:124–150.
81. **Yoshida N, Osawa Y.** Purification of human placental aromatase cytochrome P-450 with monoclonal antibody and its characterization. *Biochemistry (Mosc.)* 1991;30:3003–3010.
82. **MacKenzie SM, Huda SS, Sattar N, Fraser R, Connell JMC, Davies E.** Depot-specific steroidogenic gene transcription in human adipose tissue. *Clin. Endocrinol.* 2008;69:848–854.
83. **Pepe GJ, Albrecht ED.** Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr. Rev.* 1995;16:608–648.
84. **Husen B, Adamski J, Brüns A, Deluca D, Fuhrmann K, Möller G, Schwabe I, Einspanier A.** Characterization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7 in reproductive tissues of the marmoset monkey. *Biol. Reprod.* 2003;68:2092–2099.

85. **Milewich L, MacDonald PC, Carr BR.** Estrogen 16 alpha-hydroxylase activity in human fetal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986;63:404–406.
86. **Zbella EA, Ileakis J, Scommegna A, Benveniste R.** Competitive studies with dehydroepiandrosterone sulfate and 16 alpha-hydroxydehydroepiandrosterone sulfate in cultured human choriocarcinoma JEG-3 cells: effect on estrone, 17 beta-estradiol, and estriol secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1986;63:751–757.
87. **Cantineau R, Kremers P, De Graeve J, Gielen JE, Lambotte R.** 15- and 16-hydroxylations of androgens and estrogens in the human fetal liver: a critical step in estetrol biosynthesis. *J. Steroid Biochem.* 1985;22:195–201.
88. **Gurpide E, Schwers J, Welch MT, Vande Wiele RL, Lieberman S.** Fetal and maternal metabolism of estradiol during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1966;26:1355–1365.
89. **Holinka CF, Diczfalusy E, Coelingh Bennink HJT.** Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2008;110:138–143.
90. **Schwers J, Eriksson G, Diczfalusy E.** 15alpha-hydroxylation: a new pathway of estrogen metabolism in the human fetus and newborn. *Biochim. Biophys. Acta* 1965;100:313–316.
91. **Benassi L, Alfieri L, Debiasi D, Trentadue R.** Unconjugated estetrol in normal pregnancy. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 1982;9:243–245.
92. **Abot A, Fontaine C, Buscato M, Solinhac R, Flouriot G, Fabre A, Drougard A, Rajan S, Laine M, Milon A, Muller I, Henrion D, Adlanmerini M, Valéra M-C, Gompel A, Gerard C, Péqueux C, Mestdagt M, Raymond-Letron I, Knauf C, Ferriere F, Valet P, Gourdy P, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Lenfant F, Greene GL, Foidart J-M, Arnal J-F.** The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor  $\alpha$  modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. *EMBO Mol. Med.* 2014;6:1328–1346.

93. **Pluchino N, Santoro AN, Casarosa E, Giannini A, Genazzani A, Russo M, Russo N, Petignat P, Genazzani AR.** Effect of estetrol administration on brain and serum allopregnanolone in intact and ovariectomized rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2014;143:285–290.
94. **Coelingh Bennink HJT, Verhoeven C, Zimmerman Y, Visser M, Foidart J-M, Gemzell-Danielsson K.** Clinical effects of the fetal estrogen estetrol in a multiple-rising-dose study in postmenopausal women. *Maturitas* 2016;91:93–100.
95. **Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, Barchiesi F, Imthurn B, Jackson EK.** CYP450- and COMT-derived estradiol metabolites inhibit activity of human coronary artery SMCs. *Hypertension* 2003;41:807–813.
96. **Dubey RK, Tofovic SP, Jackson EK.** Cardiovascular pharmacology of estradiol metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004;308:403–409.
97. **Jobe SO, Ramadoss J, Koch JM, Jiang Y, Zheng J, Magness RR.** Estradiol-17beta and its cytochrome P450- and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites stimulate proliferation in uterine artery endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha versus estrogen receptor-beta. *Hypertension* 2010;55:1005–1011.
98. **Stice SL, Ford SP, Rosazza JP, Van Orden DE.** Interaction of 4-hydroxylated estradiol and potential-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels in altering uterine blood flow during the estrous cycle and early pregnancy in gilts. *Biol. Reprod.* 1987;36:369–375.
99. **Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT.** Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology* 2003;144:3382–3398.
100. **Casey ML, MacDonald PC.** Characterization of catechol-O-methyltransferase activity in human uterine decidua vera tissue. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1983;145:453–457.
101. **Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, McManus ME.** Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol. Sci.* 2006;90:5–22.

102. **Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, Hidaka K, Shiotsu Y, Kusaka H, Sasano H.** Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:5760–5768.
103. **Tong MH, Jiang H, Liu P, Lawson JA, Brass LF, Song W-C.** Spontaneous fetal loss caused by placental thrombosis in estrogen sulfotransferase-deficient mice. *Nat. Med.* 2005;11:153–159.
104. **Aitio A.** UDPglucuronosyltransferase of the human placenta. *Biochem. Pharmacol.* 1974;23:2203–2205.
105. **Paakki P, Stockmann H, Kantola M, Wagner P, Lauper U, Huch R, Elovaara E, Kirkinen P, Pasanen M.** Maternal drug abuse and human term placental xenobiotic and steroid metabolizing enzymes in vitro. *Environ. Health Perspect.* 2000;108:141–145.
106. **Yager JD, Davidson NE.** Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2006;354:270–282.
107. **Yin G, Zhu X, Guo C, Yang Y, Han T, Chen L, Yin W, Gao P, Zhang H, Geng J, Wang J, Liang L.** Differential expression of estradiol and estrogen receptor  $\alpha$  in severe preeclamptic pregnancies compared with normal pregnancies. *Mol. Med. Rep.* 2013;7:981–985.
108. **Bussen S, Bussen D.** Influence of the vascular endothelial growth factor on the development of severe pre-eclampsia or HELLP syndrome. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2011;284:551–557.
109. **Salas SP, Marshall G, Gutiérrez BL, Rosso P.** Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* 2006;47:203–208.

110. **Açıkgoz S, Bayar UO, Can M, Güven B, Mungan G, Doğan S, Sümbüloğlu V.** Levels of oxidized LDL, estrogens, and progesterone in placenta tissues and serum paraoxonase activity in preeclampsia. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:862982.
111. **Zhang Y, Wang T, Shen Y, Wang X, Baker PN, Zhao A.** 2-Methoxyestradiol deficiency is strongly related to hypertension in early onset severe pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2014;4:215–219.
112. **Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, Parry S, Augustin HG, Gattone VH, Folkman J, Strauss JF, Kalluri R.** Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 2008;453(7198):1117–1121.
113. **Pérez-Sepúlveda A, Torres MJ, Valenzuela FJ, Larraín R, Figueroa-Diesel H, Galaz J, Nien JK, Serra R, Michea L, Illanes SE.** Low 2-methoxyestradiol levels at the first trimester of pregnancy are associated with the development of pre-eclampsia. *Prenat. Diagn.* 2012;32:1053–1058.
114. **Pertegal M, Fenoy FJ, Hernández M, Mendiola J, Delgado JL, Bonacasa B, Corno A, López B, Bosch V, Hernández I.** Fetal Val108/158Met catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and placental COMT activity are associated with the development of preeclampsia. *Fertil. Steril.* 2016;105:134–143.e3.
115. **Shen Z, Wu Y, Chen X, Chang X, Zhou Q, Zhou J, Ying H, Zheng J, Duan T, Wang K.** Decreased maternal serum 2-methoxyestradiol levels are associated with the development of preeclampsia. *Cell. Physiol. Biochem.* 2014;34:2189–2199.
116. **Seol H-J, Cho G-J, Oh M-J, Kim H-J.** 2-methoxyoestradiol levels and placental catechol-O-methyltransferase expression in patients with late-onset preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2013;287:881–886.
117. **Sharifzadeh F, Kashanian M, Fatemi F.** A comparison of serum androgens in pre-eclamptic and normotensive pregnant women during the third trimester of pregnancy. *Gynecol. Endocrinol.* 2012;28:834–836.

118. **Martin JD, Hähnel ME, Hähnel R.** Plasma androstenedione in normotensive and hypertensive pregnancy. *Steroids* 1986;48:315–329.
119. **Harada N, Utsumi T, Takagi Y.** Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90:11312–11316.
120. **Kragie L.** Aromatase in primate pregnancy: a review. *Endocr. Res.* 2002;28:121–128.
121. **Toda K, Simpson ER, Mendelson CR, Shizuta Y, Kilgore MW.** Expression of the gene encoding aromatase cytochrome P450 (CYP19) in fetal tissues. *Mol. Endocrinol.* 1994;8:210–217.
122. **Nakajin S, Shinoda M, Hall PF.** Purification to homogeneity of aromatase from human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986;134:704–710.
123. **Kamat A, Alcorn JL, Kunczt C, Mendelson CR.** Characterization of the regulatory regions of the human aromatase (P450arom) gene involved in placenta-specific expression. *Mol. Endocrinol.* 1998;12:1764–1777.
124. **Kumar P, Kamat A, Mendelson CR.** Estrogen receptor alpha (ERalpha) mediates stimulatory effects of estrogen on aromatase (CYP19) gene expression in human placenta. *Mol. Endocrinol.* 2009;23:784–793.
125. **Fournet-Dulguerov N, MacLusky NJ, Leranth CZ, Todd R, Mendelson CR, Simpson ER, Naftolin F.** Immunohistochemical localization of aromatase cytochrome P-450 and estradiol dehydrogenase in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1987;65(4):757–764.
126. **Kumar P, Luo Y, Tudela C, Alexander JM, Mendelson CR.** The c-Myc-regulated microRNA-17~92 (miR-17~92) and miR-106a~363 clusters target hCYP19A1 and hGCM1 to inhibit human trophoblast differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2013;33:1782–1796.

127. **Jiang B, Mendelson CR.** USF1 and USF2 mediate inhibition of human trophoblast differentiation and CYP19 gene expression by Mash-2 and hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:6117–6128.
128. **Charles SM, Julian CG, Vargas E, Moore LG.** Higher Estrogen Levels During Pregnancy in Andean Than European Residents of High Altitude Suggest Differences in Aromatase Activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014;99:2908–2916.
129. **Hähnel ME, Martin JD, Michael CA, Hähnel R.** Metabolism of androstenedione by placental microsomes in pregnancy hypertension. *Clin. Chim. Acta.* 1989;181:103–108.
130. **Shimodaira M, Nakayama T, Sato I, Sato N, Izawa N, Mizutani Y, Furuya K, Yamamoto T.** Estrogen synthesis genes CYP19A1, HSD3B1, and HSD3B2 in hypertensive disorders of pregnancy. *Endocrine* 2012;42:700–707.
131. **Moon J-Y, Moon MH, Kim KT, Jeong DH, Kim YN, Chung BC, Choi MH.** Cytochrome P450-mediated metabolic alterations in preeclampsia evaluated by quantitative steroid signatures. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2014;139:182–191.
132. **Perez-Sepulveda A, Monteiro LJ, Dobierzewska A, España-Perrot PP, Venegas-Araneda P, Guzmán-Rojas AM, González MI, Palominos-Rivera M, Irrarrazabal CE, Figueroa-Diesel H, Varas-Godoy M, Illanes SE.** Placental Aromatase Is Deficient in Placental Ischemia and Preeclampsia. *PLoS One* 2015;10:e0139682.
133. **Moore SC, Matthews CE, Ou Shu X, Yu K, Gail MH, Xu X, Ji B-T, Chow W-H, Cai Q, Li H, Yang G, Ruggieri D, Boyd-Morin J, Rothman N, Hoover RN, Gao Y-T, Zheng W, Ziegler RG.** Endogenous Estrogens, Estrogen Metabolites, and Breast Cancer Risk in Postmenopausal Chinese Women. *J. Natl. Cancer Inst.* 2016;108. doi:10.1093/jnci/djw103.
134. **Ma CX, Adjei AA, Salavaggione OE, Coronel J, Pellemounter L, Wang L, Eckloff BW, Schaid D, Wieben ED, Adjei AA, Weinshilboum RM.** Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res.* 2005;65:11071–11082.

135. **Bulun SE.** Aromatase and estrogen receptor  $\alpha$  deficiency. *Fertil. Steril.* 2014;101:323–329.
136. **Hauri-Hohl A, Meyer-Böni M, Lang-Muritano M, Hauri-Hohl M, Schoenle EJ, Bignon-Lauber A.** Aromatase deficiency owing to a functional variant in the placenta promoter and a novel missense mutation in the CYP19A1 gene. *Clin. Endocrinol.* 2011;75:39–43.
137. **Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, Lippuner K, Jaeger P, Harada H.** Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new point mutations in the P450arom gene: impact of estrogens on hypergonadotropic hypogonadism, multicystic ovaries, and bone densitometry in childhood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82:1739–1745.
138. **Ludwikowski B, Heger S, Datz N, Richter-Unruh A, González R.** Aromatase deficiency: rare cause of virilization. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 2013;23:418–422.
139. **Maliqueo M, Echiburú B, Crisosto N.** Sex Steroids Modulate Uterine-Placental Vasculature: Implications for Obstetrics and Neonatal Outcomes. *Front. Physiol.* 2016;7:152.
140. **Sieveking DP, Lim P, Chow RWY, Dunn LL, Bao S, McGrath KCY, Heather AK, Handelsman DJ, Celermajer DS, Ng MKC.** A sex-specific role for androgens in angiogenesis. *J. Exp. Med.* 2010;207:345–352.
141. **Henríquez S, Kohen P, Xu X, Veenstra TD, Muñoz A, Palomino WA, Strauss JF, Devoto L.** Estrogen metabolites in human corpus luteum physiology: differential effects on angiogenic activity. *Fertil. Steril.* 2016;106:230–237.e1.
142. **Rabe T, Hösch R, Runnebaum B.** Sulfatase deficiency in the human placenta: clinical findings. *Biol. Res. Pregnancy Perinatol.* 1983;4:95–102.
143. **Ishibashi O, Ohkuchi A, Ali MM, Kurashina R, Luo S-S, Ishikawa T, Takizawa T, Hirashima C, Takahashi K, Migita M, Ishikawa G, Yoneyama K, Asakura H, Izumi A, Matsubara S, Takeshita T, Takizawa 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* 2012;59:265–273.

144. **Ohkuchi A, Ishibashi O, Hirashima C, Takahashi K, Matsubara S, Takizawa T, Suzuki M.** Plasma level of hydroxysteroid (17- $\beta$ ) dehydrogenase 1 in the second trimester is an independent risk factor for predicting preeclampsia after adjusting for the effects of mean blood pressure, bilateral notching and plasma level of soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 2012;35:1152–1158.
145. **Li Y, Isomaa V, Pulkka A, Herva R, Peltoketo H, Vihko P.** Expression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, P450 aromatase, and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 5 and 7 mRNAs in human early and mid-gestation placentas. *Placenta* 2005;26:387–392.
146. **Saloniemi T, Jokela H, Strauss L, Pakarinen P, Poutanen M.** The diversity of sex steroid action: novel functions of hydroxysteroid (17 $\beta$ ) dehydrogenases as revealed by genetically modified mouse models. *J. Endocrinol.* 2012;212:27–40.
147. **Guldberg HC, Marsden CA.** Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacol. Rev.* 1975;27:135–206.
148. **Tenhunen J, Salminen M, Jalanko A, Ukkonen S, Ulmanen I.** Structure of the rat catechol-O-methyltransferase gene: separate promoters are used to produce mRNAs for soluble and membrane-bound forms of the enzyme. *DNA Cell Biol.* 1993;12:253–263.
149. **Salih SM, Salama SA, Fadl AA, Nagamani M, Al-Hendy A.** Expression and cyclic variations of catechol-O-methyl transferase in human endometrial stroma. *Fertil. Steril.* 2008;90:789–797.
150. **Salama SA, Jamaluddin M, Kumar R, Hassan MH, Al-Hendy A.** Progesterone regulates catechol-O-methyl transferase gene expression in breast cancer cells: distinct effect of progesterone receptor isoforms. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007;107:253–261.

151. **Liang S, Liu X, Fan P, Liu R, Zhang J, He G, Liu Y, Bai H.** Association between Val158Met functional polymorphism in the COMT gene and risk of preeclampsia in a Chinese population. *Arch. Med. Res.* 2012;43:154–158.
152. **Lim JH, Kim SY, Kim DJ, Park SY, Han HW, Han JY, Lee SW, Yang JH, Ryu HM.** Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and cytochrome P450c17  $\alpha$  in preeclampsia. *Pharmacogenet. Genomics* 2010;20:605–610.
153. **Hill LD, York TP, Kusanovic JP, Gomez R, Eaves LJ, Romero R, Strauss JF.** Epistasis between COMT and MTHFR in maternal-fetal dyads increases risk for preeclampsia. *PLoS One* 2011;6:e16681.
154. **Roten LT, Fenstad MH, Forsmo S, Johnson MP, Moses EK, Austgulen R, Skorpen F.** A low COMT activity haplotype is associated with recurrent preeclampsia in a Norwegian population cohort (HUNT2). *Mol. Hum. Reprod.* 2011;17:439–446.
155. **Barnea ER, MacLusky NJ, DeCherney AH, Naftolin F.** Catechol-o-methyl transferase activity in the human term placenta. *Am. J. Perinatol.* 1988;5:121–127.
156. **Palmer K, Saglam B, Whitehead C, Stock O, Lappas M, Tong S.** Severe early-onset preeclampsia is not associated with a change in placental catechol O-methyltransferase (COMT) expression. *Am. J. Pathol.* 2011;178:2484–2488.
157. **Grouzmann E, Cavadas C, Grand D, Moratel M, Aubert J-F, Brunner HR, Mazzolai L.** Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice. *Arch. Eur. J. Physiol.* 2003;447:254–258.
158. **Böttner M, Thelen P, Jarry H.** Estrogen receptor beta: tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2014;139:245–251.
159. **Chakraborty S, Willett H, Biswas PK.** Insight into estrogen receptor beta-beta and alpha-beta homo- and heterodimerization: A combined molecular dynamics and sequence analysis study. *Biophys. Chem.* 2012;170:42–50.

160. **Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC.** Production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:340–352.
161. **Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA.** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863–870.
162. **Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson J-A, Haldosén L-A.** Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 2005;24:6605–6616.
163. **Gustafsson JA, Warner M.** Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2000;74:245–248.
164. **Gustafsson JA.** Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J. Endocrinol.* 1999;163:379–383.
165. **Beato M, Klug J.** Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update* 2000;6:225–236.
166. **Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF, Korach KS.** Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;93:12626–12630.
167. **Kumar R, Zakharov MN, Khan SH, Miki R, Jang H, Toraldo G, Singh R, Bhasin S, Jasuja R.** The dynamic structure of the estrogen receptor. *J. Amino Acids* 2011;2011:812540.
168. **Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IML, Wieser F, Huber JC.** Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 2004;15:73–78.
169. **Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC.** A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:647–663.

170. **Schultz JR, Petz LN, Nardulli AM.** Cell- and ligand-specific regulation of promoters containing activator protein-1 and Sp1 sites by estrogen receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* 2005;280:347–354.
171. **Heldring N, Isaacs GD, Diehl AG, Sun M, Cheung E, Ranish JA, Kraus WL.** Multiple sequence-specific DNA-binding proteins mediate estrogen receptor signaling through a tethering pathway. *Mol. Endocrinol.* 2011;25:564–574.
172. **Barnea ER, MacLusky NJ, Naftolin F.** Kinetics of catechol estrogen-estrogen receptor dissociation: a possible factor underlying differences in catechol estrogen biological activity. *Steroids* 1983;41:643–656.
173. **Gupta M, McDougal A, Safe S.** Estrogenic and antiestrogenic activities of 16alpha- and 2-hydroxy metabolites of 17beta-estradiol in MCF-7 and T47D human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998;67:413–419.
174. **Schneider J, Huh MM, Bradlow HL, Fishman J.** Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 1984;259:4840–4845.
175. **Martucci CP, Fishman J.** Impact of continuously administered catechol estrogens on uterine growth and luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 1979;105:1288–1292.
176. **Fotsis T, Zhang Y, Pepper MS, Adlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schweigerer L.** The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* 1994;368:237–239.
177. **Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM.** Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601–605.
178. **Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR.** Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ. Res.* 2000;87:677–682.

179. **Alvarez A, Hermenegildo C, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz M-J.** Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation. *Circ. Res.* 2002;91:1142–1150.
180. **Jobe SO, Ramadoss J, Wargin AJ, Magness RR.** Estradiol-17 $\beta$  and its cytochrome P450- and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites selectively stimulate production of prostacyclin in uterine artery endothelial cells: role of estrogen receptor- $\alpha$  versus estrogen receptor- $\beta$ . *Hypertens.* 2013;61:509–518.
181. **Padayachi T, Pegoraro RJ, Rom L, Joubert SM.** Enzyme immunoassay of oestrogen and progesterone receptors in uterine and intrauterine tissue during human pregnancy and labour. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990;37:509–511.
182. **Perrot-Applanat M, Deng M, Fernandez H, Lelaidier C, Meduri G, Bouchard P.** Immunohistochemical localization of estradiol and progesterone receptors in human uterus throughout pregnancy: expression in endometrial blood vessels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994;78:216–224.
183. **Rossmannith WG, Wolfahrt S, Ecker A, Eberhardt E.** The demonstration of progesterone, but not of estrogen, receptors in the developing human placenta. *Horm. Metab. Res. Horm.* 1997;29:604–610.
184. **Taddei G, Noei I, Periti E, Borri P, Torricelli F, Tozzi P, Moncini D, Paglierani M, Branconi F.** Chorion villosum does not express progesterone and estrogen receptors during the first trimester of pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest.* 1996;42:77–79.
185. **Wu WX, Ma XH, Smith GC, Nathanielsz PW.** Differential distribution of ER $\alpha$  and ER $\beta$  mRNA in intrauterine tissues of the pregnant rhesus monkey. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000;278:C190–198.
186. **Bukovsky A, Cekanova M, Caudle MR, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF.** Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal

term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003;1:13.

187. **Bukovsky A, Caudle MR, Cekanova M, Fernando RI, Wimalasena J, Foster JS, Henley DC, Elder RF.** Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant--comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003;1:36.
188. **Younes MA, Besch NF, Besch PK.** Estradiol and progesterone binding in human term placental cytosol. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1981;141:170–174.
189. **Dasgupta C, Chen M, Zhang H, Yang S, Zhang L.** Chronic hypoxia during gestation causes epigenetic repression of the estrogen receptor- $\alpha$  gene in ovine uterine arteries via heightened promoter methylation. *Hypertension* 2012;60:697–704.
190. **Tessier C, Deb S, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gibori GB, Shiu RP, Gibori G.** Estrogen receptors alpha and beta in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin. *Endocrinology* 2000;141:3842–3851.
191. **Welsh T, Johnson M, Yi L, Tan H, Rahman R, Merlino A, Zakar T, Mesiano S.** Estrogen receptor (ER) expression and function in the pregnant human myometrium: estradiol via ER $\alpha$  activates ERK1/2 signaling in term myometrium. *J. Endocrinol.* 2012;212:227–238.
192. **Pastore MB, Jobe SO, Ramadoss J, Magness RR.** Estrogen receptor- $\alpha$  and estrogen receptor- $\beta$  in the uterine vascular endothelium during pregnancy: functional implications for regulating uterine blood flow. *Semin. Reprod. Med.* 2012;30:46–61.

193. **Byers MJ, Zangl A, Phernetton TM, Lopez G, Chen D-B, Magness RR.** Endothelial vasodilator production by ovine uterine and systemic arteries: ovarian steroid and pregnancy control of ERalpha and ERbeta levels. *J. Physiol.* 2005;565:85–99.
194. **Molvarec A, Vér A, Fekete A, Rosta K, Derzbach L, Derzsy Z, Karádi I, Rigó J.** Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia. *Hypertens. Res.* 2007;30:205–211.
195. **Zhang J, Bai H, Liu X, Fan P, Liu R, Huang Y, Wang X, He G, Liu Y, Liu B.** Genotype distribution of estrogen receptor alpha polymorphisms in pregnant women from healthy and preeclampsia populations and its relation to blood pressure levels. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009;47:391–397.
196. **Cudmore MJ, Hewett PW, Ahmad S, Wang K-Q, Cai M, Al-Ani B, Fujisawa T, Ma B, Sissaoui S, Ramma W, Miller MR, Newby DE, Gu Y, Barleon B, Weich H, Ahmed A.** The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat. Commun.* 2012;3:972.
197. **Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN.** Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97:10972–10977.
198. **Bausero P, Ben-Mahdi M, Mazucatelli J, Bloy C, Perrot-Applanat M.** Vascular endothelial growth factor is modulated in vascular muscle cells by estradiol, tamoxifen, and hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000;279:H2033–2042.
199. **Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW.** Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* 1995;91:755–763.
200. **Losordo DW, Isner JM.** Estrogen and angiogenesis: A review. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21:6–12.
201. **Rauschemberger MB, Sandoval MJ, Massheimer VL.** Cellular and molecular actions displayed by estrone on vascular endothelium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011;339:136–143.

202. **Holmes DIR, Zachary I.** Placental growth factor induces FosB and c-Fos gene expression via Flt-1 receptors. *FEBS Lett.* 2004;557:93–98.
203. **Menendez D, Inga A, Snipe J, Krysiak O, Schönfelder G, Resnick MA.** A single-nucleotide polymorphism in a half-binding site creates p53 and estrogen receptor control of vascular endothelial growth factor receptor 1. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27:2590–2600.
204. **Gargett CE, Zaitseva M, Bucak K, Chu S, Fuller PJ, Rogers PAW.** 17Beta-estradiol up-regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in human myometrial microvascular endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha and -beta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:4341–4349.
205. **Hou HH, Cheng SL, Liu HT, Yang FZ, Wang HC, Yu CJ.** Elastase induced lung epithelial cell apoptosis and emphysema through placenta growth factor. *Cell Death Dis.* 2013;4:e793.
206. **Zhang Z, Neiva KG, Lingen MW, Ellis LM, Nör JE.** VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell Death Differ.* 2010;17:499–512.
207. **Jaffer S, Shynlova O, Lye S.** Mammalian target of rapamycin is activated in association with myometrial proliferation during pregnancy. *Endocrinology* 2009;150:4672–4680.
208. **Shynlova O, Tsui P, Dorogin A, Langille BL, Lye SJ.** Insulin-like growth factors and their binding proteins define specific phases of myometrial differentiation during pregnancy in the rat. *Biol. Reprod.* 2007;76:571–578.
209. **Shynlova O, Tsui P, Jaffer S, Lye SJ.** Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2009;144 Suppl 1:S2–10.
210. **Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, Willard MT, Zhong H, Simons JW, Giannakakou P.** 2ME2 inhibits tumor growth and



- angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell* 2003;3:363–375.
211. **Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL.** Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 1996;16:4604–4613.
212. **Perez-Sepulveda A, España-Perrot PP, Norwitz ER, Illanes SE.** Metabolic pathways involved in 2-methoxyestradiol synthesis and their role in preeclampsia. *Reprod. Sci.* 2013;20:1020–1029.
213. **Thaler I, Manor D, Itskovitz J, Rottem S, Levit N, Timor-Tritsch I, Brandes JM.** Changes in uterine blood flow during human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990;162:121–125.
214. **Mabie WC, DiSessa TG, Crocker LG, Sibai BM, Arheart KL.** A longitudinal study of cardiac output in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994;170:849–856.
215. **Mone SM, Sanders SP, Colan SD.** Control mechanisms for physiological hypertrophy of pregnancy. *Circulation* 1996;94:667–672.
216. **Merrill DC, Karoly M, Chen K, Ferrario CM, Brosnihan KB.** Angiotensin-(1-7) in normal and preeclamptic pregnancy. *Endocrine* 2002;18:239–245.
217. **Chappell MC, Marshall AC, Alzayadneh EM, Shaltout HA, Diz DI.** Update on the Angiotensin converting enzyme 2-Angiotensin (1-7)-MAS receptor axis: fetal programming, sex differences, and intracellular pathways. *Front. Endocrinol.* 2014;4:201.
218. **Rupnow HL, Phernetton TM, Shaw CE, Modrick ML, Bird IM, Magness RR.** Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VII. Estrogen and progesterone effects on eNOS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001;280:H1699–1705.
219. **Rupnow HL, Phernetton TM, Modrick ML, Wiltbank MC, Bird IM, Magness RR.** Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VIII. Estrogen and progesterone effects on cPLA2, COX-1, and PGIS protein expression. *Biol. Reprod.* 2002;66:468–474.

220. **Resnik R, Killam AP, Battaglia FC, Makowski EL, Meschia G.** The stimulation of uterine blood flow by various estrogens. *Endocrinology* 1974;94:1192–1196.
221. **Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, Shan J, Bing L, Karpinski E, Pang PKT, Resnick LM.** Vascular Effects of Progesterone: Role of Cellular Calcium Regulation. *Hypertension* 2001;37:142–147.
222. **Miller SL, Jenkin G, Walker DW.** Effect of nitric oxide synthase inhibition on the uterine vasculature of the late-pregnant ewe. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1999;180:1138–1145.
223. **Magness RR, Sullivan JA, Li Y, Phernetton TM, Bird IM.** Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VI. Ovarian and pregnancy effects on eNOS and NO(x). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001;280:H1692–1698.
224. **Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL, Sanchez JM.** Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ. Res.* 2000;87:406–411.
225. **Storment JM, Meyer M, Osol G.** Estrogen augments the vasodilatory effects of vascular endothelial growth factor in the uterine circulation of the rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2000;183:449–453.
226. **Kimura H, Esumi H.** Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim. Pol.* 2003;50:49–59.
227. **Montgomery S, Shaw L, Pantelides N, Taggart M, Austin C.** Acute effects of oestrogen receptor subtype-specific agonists on vascular contractility. *Br. J. Pharmacol.* 2003;139:1249–1253.
228. **Salom JB, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Torregrosa G, Alborch E.** Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entry inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001;21:422–429.
229. **Orshal JM, Khalil RA.** Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004;286:R233–249.

230. **Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Cadet P, Fimiani C, Welters I, Fricchione GL, Breton C, Lassalle P, Salzet M, Bilfinger TV.** Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation* 2000;101:1594–1597.
231. **Darkow DJ, Lu L, White RE.** Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *Am. J. Physiol.* 1997;272:H2765–2773.
232. **Clewell WH, Carson BA, Meschia G.** Comparison of uterotrophic and vascular effects of estradiol-17beta and estriol in the mature organism. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1977;129:384–388.
233. **Levine MG, Miodovnik M, Clark KE.** Uterine vascular effects of estetrol in nonpregnant ewes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1984;148:735–738.
234. **Hilgers RHP, Oparil S, Wouters W, Coelingh Bennink HJT.** Vasorelaxing effects of estetrol in rat arteries. *J. Endocrinol.* 2012;215:97–106.
235. **Berg D, Thaler F, Kuss E.** Concentrations of 2-hydroxyoestrogens in human sera measured by a heterologous immunoassay with an 125I-labelled ligand. *Acta Endocrinol.* 1982;100:154–160.
236. **Berg D, Sonsalla R, Kuss E.** Concentrations of 2-methoxyoestrogens in human serum measured by a heterologous immunoassay with an 125I-labelled ligand. *Acta Endocrinol.* 1983;103:282–288.
237. **Lee SB, Wong AP, Kanasaki K, Xu Y, Shenoy VK, McElrath TF, Whitesides GM, Kalluri R.** Preeclampsia: 2-methoxyestradiol induces cytotrophoblast invasion and vascular development specifically under hypoxic conditions. *Am. J. Pathol.* 2010;176:710–720.
238. **Dubey RK, Jackson EK.** Potential vascular actions of 2-methoxyestradiol. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009;20:374–379.
239. **Lobmaier SM, Figueras F, Mercade I, Crovetto F, Peguero A, Parra-Saavedra M, Ortiz JU, Crispi F, Gratacós E.** Levels of maternal serum angiogenic factors in third-

trimester normal pregnancies: reference ranges, influence of maternal and pregnancy factors and fetoplacental Doppler indices. *Fetal Diagn. Ther.* 2014;36:38–43.

240. **Baggia S, Albrecht ED, Pepe GJ.** Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the baboon placenta by estrogen. *Endocrinology* 1990;126:2742–2748.
241. **Krozowski ZS, Funder JW.** Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1983;80:6056–6060.
242. **Schoof E, Girstl M, Frobenius W, Kirschbaum M, Dörr HG, Rascher W, Dötsch J.** Decreased gene expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in human placenta of patients with preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86:1313–1317.
243. **He P, Chen Z, Sun Q, Li Y, Gu H, Ni X.** Reduced expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in preeclamptic placentas is associated with decreased PPAR $\gamma$  but increased PPAR $\alpha$  expression. *Endocrinology* 2014;155:299–309.
244. **Dahlstrøm B, Romundstad P, Øian P, Vatten LJ, Eskild A.** Placenta weight in preeclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2008;87:608–611.
245. **Pepe GJ, Albrecht ED.** Comparison of cortisol-cortisone interconversion in vitro by the human and baboon placenta. *Steroids* 1984;44:229–240.
246. **Doody KM, Carr BR, Rainey WE, Byrd W, Murry BA, Strickler RC, Thomas JL, Mason JI.** 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in the fetal zone and neocortex of the human fetal adrenal gland. *Endocrinology* 1990;126:2487–2492.
247. **Kaludjerovic J, Ward WE.** The Interplay between Estrogen and Fetal Adrenal Cortex. *J. Nutr. Metab.* 2012;2012:837901.

248. **Albrecht ED, Babischkin JS, Davies WA, Leavitt MG, Pepe GJ.** Identification and developmental expression of the estrogen receptor alpha and beta in the baboon fetal adrenal gland. *Endocrinology* 1999;140:5953–5961.
249. **Albrecht ED, Aberdeen GW, Pepe GJ.** Estrogen elicits cortical zone-specific effects on development of the primate fetal adrenal gland. *Endocrinology* 2005;146:1737–1744.
250. **Bramham K, Nelson-Piercy C, Gao H, Pierce M, Bush N, Spark P, Brocklehurst P, Kurinczuk JJ, Knight M.** Pregnancy in renal transplant recipients: a UK national cohort study. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2013;8:290–298.
251. **Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR.** Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 2010;303:235–241.
252. **Roberts JM, Bodnar LM, Patrick TE, Powers RW.** The role of obesity in preeclampsia. *Pregnancy Hypertens. Int. J. Womens Cardiovasc. Health* 2011;1(1):6–16.
253. **Fain JN.** Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam. Horm.* 2006;74:443–477.
254. **Turgut A, Ozler A, Goruk NY, Tunç SY, Sak ME, Evsen MS, Evliyaoglu O, Gul T.** Serum levels of the adipokines, free fatty acids, and oxidative stress markers in obese and non-obese preeclamptic patients. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 2015;42:473–479.
255. **Berg AH, Scherer PE.** Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2005;96:939–949.
256. **Sethi JK, Hotamisligil GS.** The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1999;10:19–29.
257. **Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G.** Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001;280:E745–751.

258. **Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB.** Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2006;116:1793–1801.
259. **Miehle K, Stepan H, Fasshauer M.** Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin. Endocrinol.* 2012;76:2–11.
260. **Palei AC, Spradley FT, Granger JP.** Chronic hyperleptinemia results in the development of hypertension in pregnant rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2015;308:R855–861.
261. **Zhao Y, Nichols JE, Valdez R, Mendelson CR, Simpson ER.** Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activating protein-1 binding site upstream of promoter 1.4. *Mol. Endocrinol.* 1996;10:1350–1357.
262. **Higgins L, Mills TA, Greenwood SL, Cowley EJ, Sibley CP, Jones RL.** Maternal obesity and its effect on placental cell turnover. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med.* 2013;26:783–788.
263. **Haider S, Knöfler M.** Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and Endometrium. *Placenta* 2009;30:111–123.
264. **Garcia-Lloret MI, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ.** Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF- $\alpha$ . A model for hematogenous initiation of placental inflammations. *J. Leukoc. Biol.* 2000;68:903–908.
265. **Coya R, Martul P, Algorta J, Aniel-Quiroga MA, Busturia MA, Señarís R.** Effect of leptin on the regulation of placental hormone secretion in cultured human placental cells. *Gynecol. Endocrinol.* 2006;22:620–626.
266. **American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;27 Suppl 1:S5–S10.
267. **Kaul K, Apostolopoulou M, Roden M.** Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2015;64:1629–1639.

268. **Makki K, Froguel P, Wolowczuk I.** Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflamm.* 2013;2013:1–12.
269. **Desoye G, Hauguel-de Mouzon S.** The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care* 2007;30 Suppl 2:S120–126.
270. **McRobie DJ, Korzekwa KR, Glover DD, Tracy TS.** The effects of diabetes on placental aromatase activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1997;63:147–153.
271. **Uzelac PS, Li X, Lin J, Neese LD, Lin L, Nakajima ST, Bohler H, Lei Z.** Dysregulation of Leptin and Testosterone Production and Their Receptor Expression in the Human Placenta with Gestational Diabetes Mellitus. *Placenta* 2010;31:581–588.
272. **Morisset A-S, Dubé M-C, Drolet R, Pelletier M, Labrie F, Luu-The V, Tremblay Y, Robitaille J, John Weisnagel S, Tchernof A.** Androgens in the maternal and fetal circulation: association with insulin resistance. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med.* 2013;26:513–519.
273. **Nestler JE.** Modulation of aromatase and P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme activities of human placental cytotrophoblasts by insulin and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1987;121:1845–1852.
274. **Nestler JE.** Regulation of the aromatase activity of human placental cytotrophoblasts by insulin, insulin-like growth factor-I, and -II. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993;44:449–457.
275. **Schneider HJ, Friedrich N, Klotsche J, Schipf S, Nauck M, Völzke H, Sievers C, Pieper L, März W, Wittchen H-U, Stalla GK, Wallaschofski H.** Prediction of incident diabetes mellitus by baseline IGF1 levels. *Eur. J. Endocrinol.* 2011;164:223–229.
276. **Seely EW, Ecker J.** Chronic Hypertension in Pregnancy. *Circulation* 2014;129:1254–1261.

277. **Solak Y, Afsar B, Vaziri ND, Aslan G, Yalcin CE, Covic A, Kanbay M.** Hypertension as an autoimmune and inflammatory disease. *Hypertens. Res.* 2016. doi:10.1038/hr.2016.35.
278. **Stanfill A, Bloodworth R, Cashion A.** Lessons learned: experiences of gaining weight by kidney transplant recipients. *Prog. Transplant.* 2012;22:71–78.
279. **Azancot MA, Ramos N, Torres IB, García-Carro C, Romero K, Espinel E, Moreso F, Seron D.** Inflammation and Atherosclerosis Are Associated With Hypertension in Kidney Transplant Recipients. *J. Clin. Hypertens.* 2015;17(12):963–969.
280. **Donihi AC, Raval D, Saul M, Korytkowski MT, DeVita MA.** Prevalence and predictors of corticosteroid-related hyperglycemia in hospitalized patients. *Endocr. Pract.* 2006;12:358–362.
281. **Hewitt DP, Mark PJ, Waddell BJ.** Glucocorticoids prevent the normal increase in placental vascular endothelial growth factor expression and placental vascularity during late pregnancy in the rat. *Endocrinology* 2006;147:5568–5574.
282. **Curtis JJ, Luke RG, Jones P, Diethelm AG.** Hypertension in cyclosporine-treated renal transplant recipients is sodium dependent. *Am. J. Med.* 1988;85:134–138.
283. **Chiasson VL, Talreja D, Young KJ, Chatterjee P, Banes-Berceli AK, Mitchell BM.** FK506 binding protein 12 deficiency in endothelial and hematopoietic cells decreases regulatory T cells and causes hypertension. *Hypertens.* 2011;57:1167–1175.
284. **Djordjević NZ, Babić GM, Marković SD, Ognjanović BI, Stajin AS, Sačić ZS.** The antioxidative effect of estradiol therapy on erythrocytes in women with preeclampsia. *Reprod. Toxicol.* 2010;29:231–236.
285. **Pisani SL, Neese SL, Doerge DR, Helferich WG, Schantz SL, Korol DL.** Acute genistein treatment mimics the effects of estradiol by enhancing place learning and impairing response learning in young adult female rats. *Horm. Behav.* 2012;62:491–499.



286. **Petrie WK, Dennis MK, Hu C, Dai D, Arterburn JB, Smith HO, Hathaway HJ, Prossnitz ER.** G protein-coupled estrogen receptor-selective ligands modulate endometrial tumor growth. *Obstet. Gynecol. Int.* 2013;2013:472720.
287. **Fernandez AR, Omar SZ, Husain R.** Role of Genistein in Preeclampsia: A Case-Control Study. *J. Reprod. Med.* 2016;61:47-51.

Table 1. Estrogens and Preeclampsia

<i>Steroids</i>	<i>Tissue</i>	<i>Levels</i>	<i>Techniques</i>	<i>References</i>
<b>Estradiol</b>	<i>Plasma</i>	Decreased	GC/MS	37
			LC/MS	38
			RIA	108, 109
			ELISA	107
<b>Estrone</b>	<i>Placenta</i>	Decreased	ELISA	110
	<i>Plasma</i>	Decreased	GC or LC/MS	37*, 38
<b>Estriol</b>	<i>Placenta</i>	No modification	RIA	108
		Decreased	ELISA	110
<b>2-ME2</b>	<i>Plasma</i>	Decreased	GC/MS	37* 21
			LC/MS	38 22
			LC/MS/MS	111, 112 23
			ELISA	111, 114, 245
<b>DHEAS</b>	<i>Plasma</i>	Increased	ELISA	116 25
		Decreased	GC/MS	37 26
			ELISA	35
		No modification	ELISA	117 30
<b><math>\Delta</math>4-Adione</b>	<i>Plasma</i>	No modification	GC/MS	37 31
		Increased	ELISA	117, 318 34

\* non significant trend

1

Table 2. Estrogen-synthesizing enzymes and controlling miRNAs in preeclampsia relative to normotensive subjects.

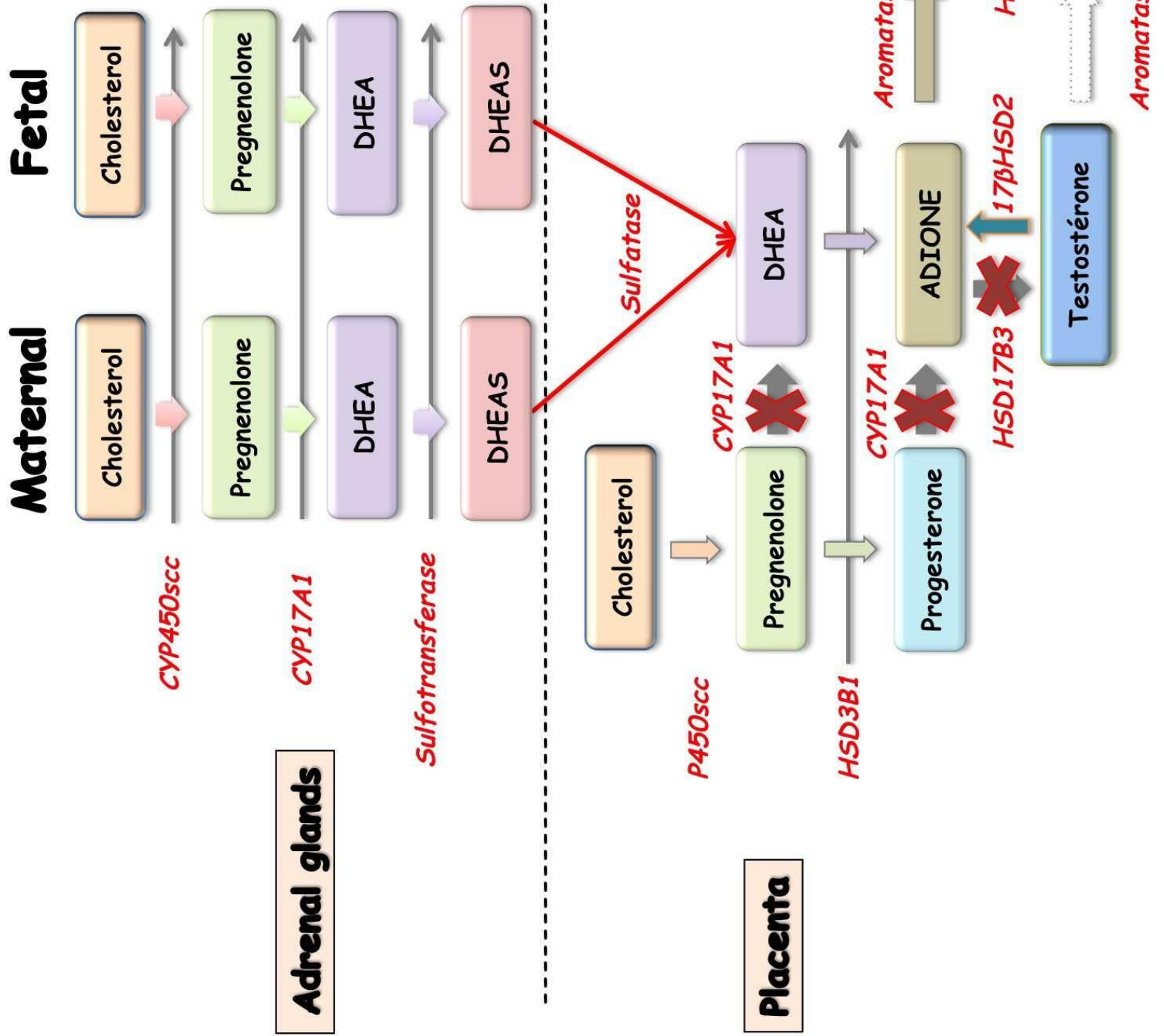
Enzymes	Levels	Techniques	References			
Aromatase	Activity in plasma	Decreased	GC/MS LC/MS RIA, WB, qRT-PCR	37* 38 132	4 5 7	Activity in placenta
		Decreased	RIA	129	8	
	miRNA Expression	Increased mir-19b & 106a	HTS, Real-Time PCR	126		
	HSD17B1	Plasma level	Decreased	ELISA	143, 144	
	miRNA Expression	Increased mir-210 & 518c	qRT-PCR, Real-Time PCR	143		
COMT	Expression in placenta	Not modified	WB, Rt-PCR WB			

GC: Gas Chromatography; LC: Liquid Chromatography; MS : Mass spectrometry; RIA: Radioimmunoassay, ELISA: Enzyme –Linked Immuno Assay; WB :Western Blot ; qRT-PCR : quantitative Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction; HTS: High throughput screening. \* non significant trend.

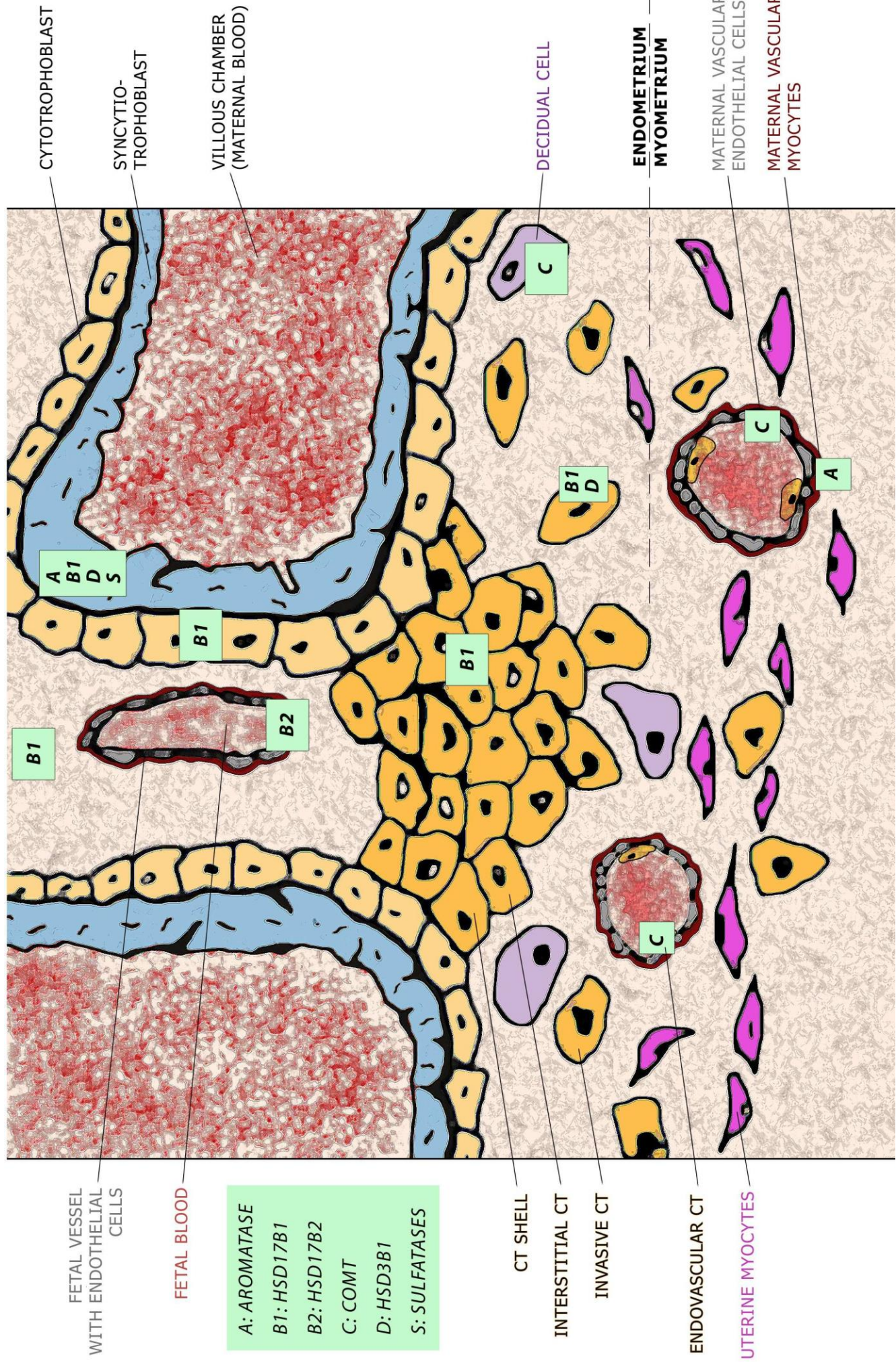
Table 3. Main estrogen effects in placenta and uterus

Estrogens	Angiogenesis	Uterine arteries	Trophoblast cells	References
Estradiol	* <b>↑</b> VEGF *E. cells <b>↑</b> Migration <b>↑</b> Proliferation	<b>↑</b> Blood flow through <i>vasodilation</i> <b>↑</b> VEGF, NO, PGI <sub>2</sub> , Ca <sup>++</sup> (E. cells) <i>Activation K<sup>+</sup> channels, Membrane hyperpolarization,</i>	<b>↑</b> Proliferation <b>↑</b> Differentiation CTs into Sts	24,25, 27, 97, 177-180, 199- 201, 225, 228, 230,
Estrone	No data	<b>↑</b> Blood flow through <i>vasodilation</i>	No data	24
Estriol	No data	<b>↑</b> Blood flow through <i>vasodilation</i>	No data	232
2-ME2	<b>Inhibitor</b>	<b>↑</b> Blood flow through <i>vasodilation</i> <b>↑</b> NO, PGI <sub>2</sub> <i>wall remodeling</i>	<b>↑</b> Invasive phenotype	97, 112, 180, 210, 212, 237, 238
2-OHE2	* <b>↑</b> Proliferation (low levels) * <b>↓</b> Proliferation (high levels)	<b>↑</b> Blood flow through <i>vasodilation</i> <b>↑</b> PGI <sub>2</sub>	No data	97, 172, 173, 180
4-OHE2	* <b>↑</b> Proliferation (low levels) * <b>↓</b> Proliferation (high levels)	<b>↑</b> Blood flow through <i>vasodilation</i> <b>↑</b> PGI <sub>2</sub> , Blockade of Ca <sup>++</sup> channels(VSM)	No data	97, 98, 180
4-ME2	* <b>↑</b> Proliferation	<b>↑</b> Blood flow through <i>vasodilation</i> <b>↑</b> PGI <sub>2</sub>	No data	97, 180
Estetrol	No data SERM effects ?	<b>Weak vasodilator</b> No effect on eNOS or NO production SERM effects ?	No data SERM effects?	92, 93, 233, 234

**↑** : Increased, PGI<sub>2</sub> : prostacyclin, E. cells : Endothelial cells, VSM : vascular smooth muscle cells, SERM : selective estrogen receptor modulator, CTs: cytotrophoblast cells, ST: syncytiotrophoblast cells.







CYTOTROPHOBLAST  
 SYNCYTIOTROPHOBLAST  
 VILLOUS CHAMBER (MATERNAL BLOOD)

DECIDUAL CELL

ENDOMETRIUM  
 MYOMETRIUM

MATERNAL VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS  
 MATERNAL VASCULAR MYOCYTES

FETAL VESSEL WITH ENDOTHELIAL CELLS  
 FETAL BLOOD

A: AROMATASE  
 B1: HSD17B1  
 B2: HSD17B2  
 C: COMT  
 D: HSD3B1  
 S: SULFATASES

CT SHELL  
 INTERSTITIAL CT  
 INVASIVE CT  
 ENDOVASCULAR CT  
 UTERINE MYOCYTES

**Figure 1. Anchoring villi with localization of the required enzymes for estrogen biosynthesis.**

A single layer of cytotrophoblast cells (CTs) which fuse to form a multinucleated layer of syncytiotrophoblast cells (STs) which is in contact with maternal blood. The thin outer CT shells proliferate and split through the ST layer in direct contact with maternal cells. CTs called extravillous trophoblast cells (EVTs) then detach from the basement membrane and migrate and spread into the decidua and the first third of the myometrium. During the migration to uterine vessels some EVT cells acquire an invasive phenotype to facilitate penetration into maternal vessels and express adhesion molecules (45-47). The decidual and myometrial invasion of EVT cells occurs via two pathways: a) an endovascular pathway and b) an interstitial pathway.

**Figure 2. Steroidogenesis in pregnancy**

In the syncytiotrophoblasts, cholesterol is converted into pregnenolone by cytochrome P450 steroid chain cleavage (CYP450scc), and then into progesterone by 3- $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase,  $\Delta^4$ - $\Delta^5$ -isomerase (HSD3B1). Estradiol is synthesized by the placenta during pregnancy but requires DHEAS provided by maternal and fetal adrenal glands as there is no 17 $\alpha$ -hydroxylase, 17,20 lyase (CYP17A1) in the placenta. Estradiol mainly results from aromatization of  $\Delta^4$ androstenedione as placental 17 $\beta$ HSD3 is lacking and aromatase has a higher affinity for  $\Delta^4$ androstenedione than for circulating testosterone (81).



## Essential points

- Humans and apes are the only mammals synthesizing estrogens exclusively in the placenta and developing spontaneous preeclampsia
- Estrogens promote placental angiogenesis and uterine artery vasodilation during pregnancy
- Aromatase deficiency and estrogen dysregulation could play a key role in preeclampsia symptoms
- The close interaction between estrogens and angiogenic/antiangiogenic factors reinforces the "estrogen" hypothesis
- The use of reliable analytical technology such as liquid-mass spectrometry (LC/MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), is now compulsory to evaluate steroid profiles un pregnancy
- Assessments of estrogen levels could play a key role in predicting preeclampsia, and potentially lead to preventive treatments.





## Introduction à l'article 2

**Titre de l'article :** « *Close antenatal monitoring guided by sFlt-1 and uterine artery Doppler to reduce hypertension-related complications: A randomised trial* ».

Soumis au journal "BJOG"

### 7.1. Rationnel

L'idée de ce travail résulte d'une discussion avec un professeur de santé publique à qui j'avais présenté notre travail sur le caractère prédictif du dosage du sFlt-1 et les développements techniques permettant une réalisation simple et fiable de ces dosages en routine. Cet épidémiologiste avait calmé mon enthousiasme en me demandant à quoi pouvait bien servir un dépistage en routine, sans traitement à proposer aux femmes ... en dehors du fait de générer un coût de santé supplémentaire inutile !

La stratégie pour répondre à cette question a été basée sur le fait que

- i) la prise en charge des femmes considérées en milieu de grossesse comme à risque de prééclampsie en raison de leurs antécédents obstétricaux par exemple, repose sur une surveillance rapprochée
- ii) les patientes nullipares représentent la majorité des patientes prééclamptiques,
- iii) mais la majorité des patientes nullipares va présenter une grossesse normale, on ne peut donc pas sur le seul critère de nulliparité, appliquer un suivi rapproché.

J'ai donc mis en place de manière collaborative un protocole afin de tester l'apport d'une surveillance rapprochée chez les femmes nullipares dépistées à risque par le sFlt-1. Cet essai utilise une augmentation pathologique de la concentration du sFlt-1 et non un résultat négatif comme cela a été étudié pour éliminer une prééclampsie chez des femmes présentant un tableau suspect de prééclampsie (Zeisler et al., 2016).

## **7.2. Modalités administratives**

Le protocole de recherche a été soumis aux appels à projets de l'APHP (CRC : contrat de Recherche Clinique) et a été retenu, bénéficiant ainsi d'un financement.

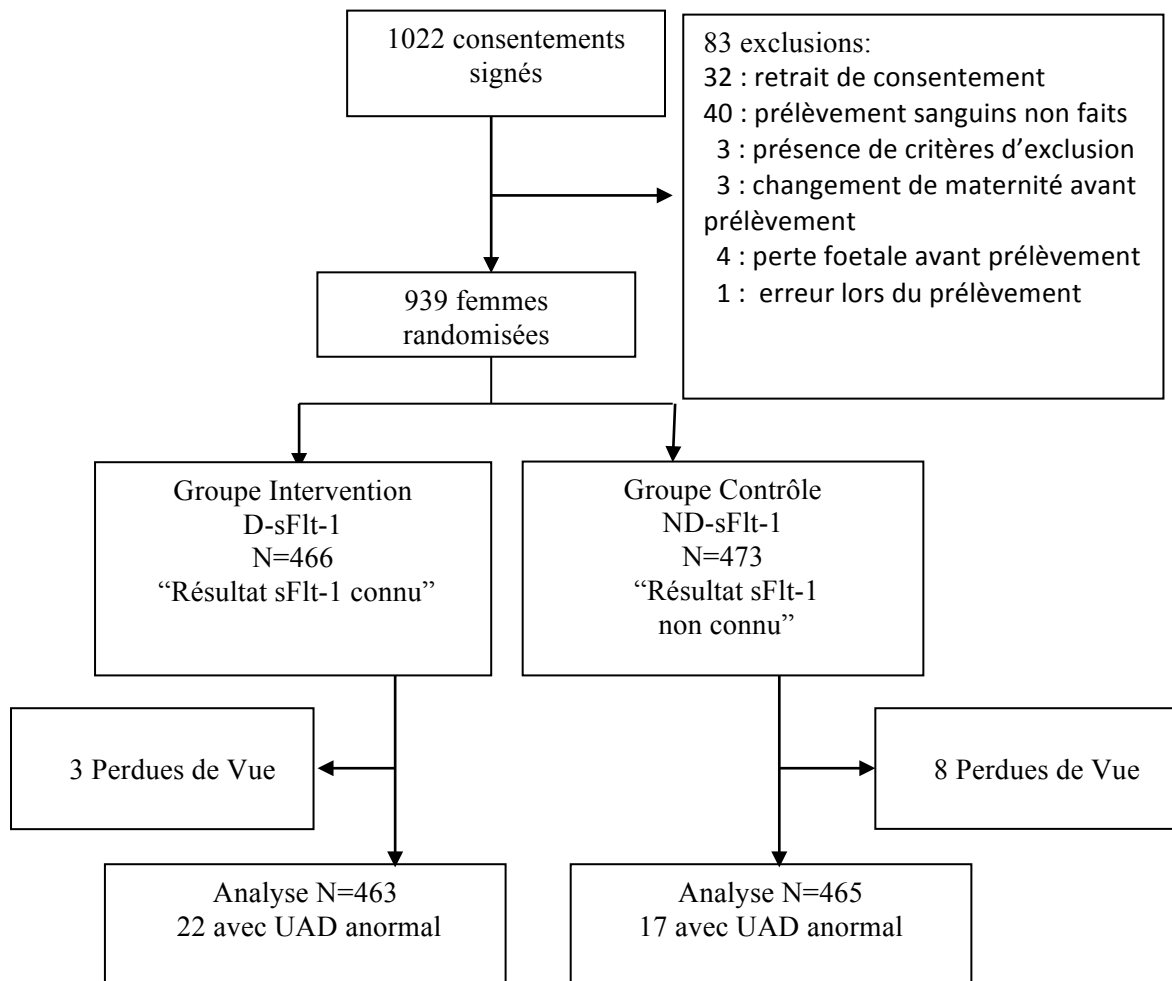
## **7.3. Objectif de l'essai MOMA**

L'objectif de l'essai MOMA est la mise en évidence d'une diminution de la fréquence de la morbidité maternelle et fœtale lorsqu'on applique un suivi rapproché aux patientes identifiées comme à risque par une mesure du sFlt-1 plasmatique (concentration élevée) entre 24 et 29 SA. Notre hypothèse était que l'identification des femmes à risque par le sFlt-1 (sFlt-1 au dessus du seuil choisi, cf § seuil), qui bénéficieraient alors d'un suivi rapproché à la fois clinique, biologique et échographique et ce jusqu'à l'accouchement réduirait de 50% les complications en lien avec l'HTA au cours de la grossesse. Pour cela un score composite de complications a été établi, il a été évalué à environ 10% dans notre population de femmes nullipares. Pour un risque  $\alpha$  bilatéral de 5% et une puissance de 85%, il nous fallait inclure et randomiser 994 femmes.

## **7.4. Type d'essai et Modalités**

Il s'agit d'un essai monocentrique randomisé « dépistage versus absence de dépistage ». Une stratification des patientes sur leur résultat du Doppler aux artères utérines était réalisée puis la randomisation des patientes en 2 groupes (groupe sFlt-1 connu et groupe contrôle). Le 1er groupe (intervention) correspond aux patientes dont la concentration du sFlt-1 est connue des obstétriciens et le 2ème groupe (contrôle) correspond aux patientes dont la concentration du sFlt-1 n'est pas connue des obstétriciens. Dans le 1er groupe, les patientes ayant une concentration élevée de sFlt-1 ont un suivi rapproché. Le résultat du sFlt-1 était rendu aux cliniciens sous un mode qualitatif (au dessus ou au dessous du seuil).

Les patientes ayant un résultat *anormal* du Doppler aux artères utérines bénéficiaient systématiquement d'un suivi rapproché même si elles étaient incluses dans le groupe contrôle.



**Figure 34.** Diagramme de l'essai.

Le résultats du sFlt-1 était connu dans le groupe intervention et un suivi rapproché (intervention) était appliqué en cas de résultat anormal. Les femmes avec un UAD anormal bénéficiaient d'un suivi quelque soit leur groupe d'appartenance.

sFlt-1: soluble fms-like tyrosine kinase 1; D-sFlt-1: disclosure of sFlt-1 : résultat du sFlt-1 connu ; ND : non-disclosure of sFlt-1 : résultat du sFlt-1 non connu ; UAD: uterine artery Doppler : Doppler aux artère utérines.

### 7.5. La cohorte

La période d'inclusion et de randomisation s'est étalée du 6 avril 2008 au 20 Avril 2011.

La dernière femme a été suivie jusqu'au 7 Novembre 2011. Nous avons eu 1022 patientes

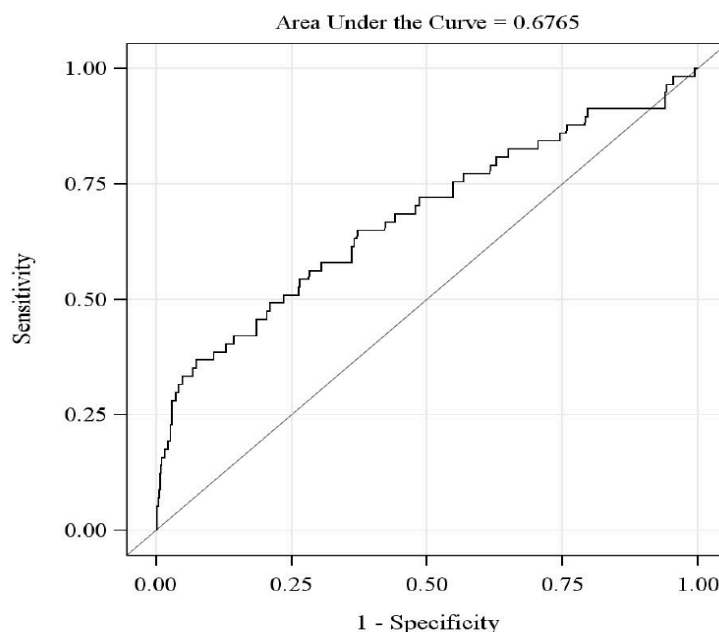
qui ont signé un accord de participation (consentement d'inclusion dans l'étude). Entre la signature du consentement et la randomisation, 83 femmes (8,1%) ont été exclues pour retrait du consentement ou oubli du prélèvement principalement. Le diagramme de l'essai est présenté **figure 34**.

Nous avons pu randomiser 939 femmes, : 466 dans le groupe sFlt-1 connu et 473 dans le groupe contrôle (sFlt-1 non connu). Onze de ces femmes ont été perdues de vue (3 dans le 1er groupe et 8 dans le groupe contrôle). L'analyse statistique porte sur les 928 femmes qui ont pu donc être incluses, randomisées et non perdues de vue. Parmi les 928 femmes, 22 dans le groupe sFlt-1 connu et 17 dans le groupe contrôle avaient des dopplers utérins notés pathologiques.

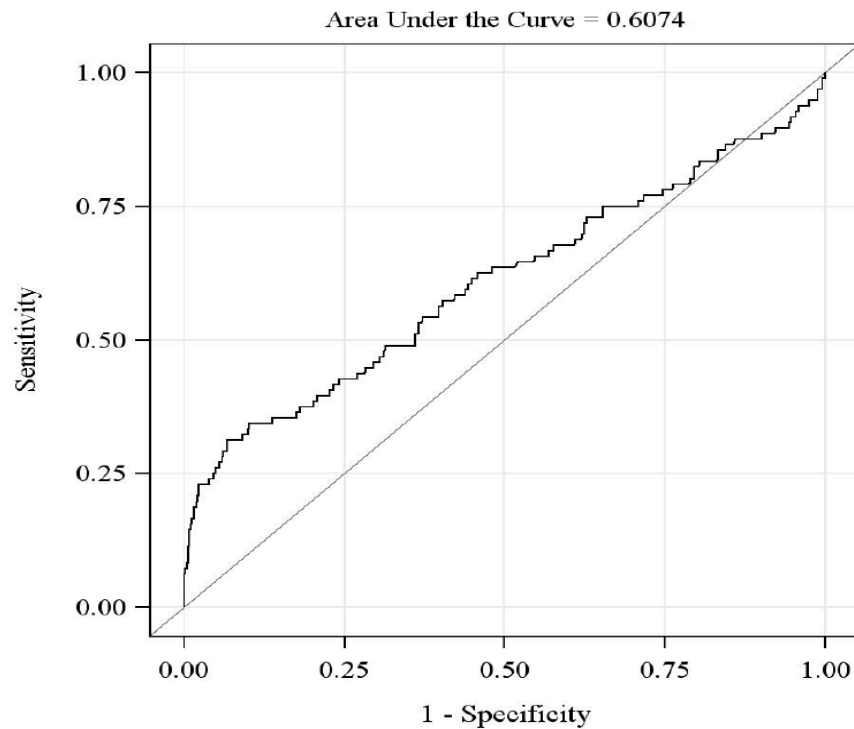
### **7.6. Principaux résultats**

- Le critère principal de jugement avait été évalué avant l'étude à 10%, avec 9,3% retrouvé dans le groupe contrôle, le calcul du nombre de sujets nécessaires pour une puissance suffisante de l'étude a été validé.
- Nous n'avons pas retrouvé de différence entre les 2 groupes pour le critère principal de jugement (issue compliquée en relation avec une HTA) 51 femmes (11%) dans le groupe sFlt-1 connu et 45 (9.7%) dans le groupe contrôle (ORajusté, 1,13; 95% CI, 0,73–1,73).
- Puisque 84,2% des femmes incluses dans le groupe sFlt-1 connu avaient une concentration de sFlt-1 supérieure au seuil choisi, nous avons souhaité vérifier que le seuil trop bas utilisé n'introduisait pas un biais. Pour cela, nous avons évalué la présence du critère principal de jugement chez les femme avec les concentrations les plus élevées de sFlt-1 (dernier quartile), et là encore nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre les 2 groupes.

- Les concentrations plasmatiques de sFlt-1 étaient plus élevées chez les femmes prééclamptiques (n=57) que chez les femmes sans prééclampsie (n = 871) avec des médianes respectivement de 2444.0 ng/L [IQR, 1549.0–5107.0] et 1653.0 ng/L [IQR, 1160.0–2380.0],  $p < 0.0001$ .
- De même les femmes ayant un critère principal de jugement présent avaient des taux de sFlt-1 plus élevés que celles n'ayant pas de complications en lien avec une HTA, les médianes étaient respectivement de 1987.5 ng/L [IQR, 1298.0–4483.5] et 1648.5 ng/L [IQR, 1163.0–2375.5],  $p = 0.0006$ .
- Sur les 39 femmes classées comme ayant un UAD pathologique, 4 avaient en fait un UAD normal. Après reclassement de ces 4 cas, le taux de prééclampsie dans le sous-groupe UAD pathologique (n=35) et dans le sous groupe Doppler normal (n=893) était de respectivement 34.3% (n=12) et 5.0% (n=45),  $p < 0.0001$ .
- L'analyse par courbes ROC des concentrations de sFlt-1 pour identifier les femmes qui présenteront une prééclampsie (**figure 35**), ou un critère principal de jugement présent (**figure 36**) rapporte un seuil optimal de 3910 ng/L.



**Figure 35.** Courbe ROC : sFlt-1 pour prédire une grossesse avec prééclampsie. Sensibilité de 36,8% (95% CI, 24,3–49,4%) et spécificité de 92,5% (95% CI, 90,8–94,3%).



**Figure 36.** Courbe ROC : sFlt-1 pour prédire une grossesse avec complication (critère composite présent).  
Sensibilité de 31,2% (95% CI, 22,0–40,5%) et spécificity de 93,2% (95% CI, 91,6–95,0%).

### 7.7. Conclusions de l'étude

- Nous ne retrouvons pas de valeur ajoutée à une mesure en routine du sFlt-1 entre < 24 et 29 SA > chez des femmes nullipares tout venant suivies en centre spécialisé d'obstétrique.
- Le seuil choisi trop bas apporte un éclairage particulier à notre résultat négatif en suggérant que l'absence d'effet n'est pas tant un problème de dépistage qu'un problème d'intervention insuffisante.
- Le dosage du sFlt-1 reste cependant prometteur puisqu'il a identifié plus d'un tiers des patientes qui allaient présenter une prééclampsie.
- Enfin notre travail souligne l'association entre la présence de Dopplers utérins pathologiques et la survenue d'une prééclampsie.

### **7.8. Les points forts de cette étude**

Le nombre de sujets inclus est important et il est très proche du nombre nécessaire pour permettre une puissance correcte de l'essai, par ailleurs le nombre de perdue de vues est bas. La parité identique et la même période de prélèvement ont permis de ne pas introduire de biais dans les résultats qui pourraient être liés à ces points précis. Enfin le "design" de l'étude en 2 étapes a permis de répondre à 2 questions l'évaluation du pouvoir de prédiction du sFlt-1 dans cette tranche d'âge gestationnel mais aussi l'apport propre de l'intervention proposée.

### **7.9. Les limites de l'étude**

Une des limites de l'étude a été le seuil choisi pour classer un résultat de sFlt-1 normal ou anormal. Ce seuil s'est révélé trop bas faisant appliquer le suivi rapproché à 84,2% des femmes incluses dans le groupe sFlt-1 connu. Cela a accru la charge de travail mais il ne semble pas avoir eu d'impact sur les conclusions de l'étude. En effet nous n'avons pas retrouvé de différence significative pour le critère principal de jugement entre le sous-groupe de femmes avec les concentrations les plus élevées de sFlt-1 (dernier quartile) du groupe intervention comparée au même sous-groupe du groupe contrôle (aOR, 0.65; 95% CI, 0.31–1.39). Nous avons aussi voulu vérifier que cette "sur" médicalisation n'avait pas induit de complications, en particulier une mesurable, le taux de prématurité. Nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre le groupe intervention et le groupe contrôle (prématuré, n=52 vs n=37, p=0.09).

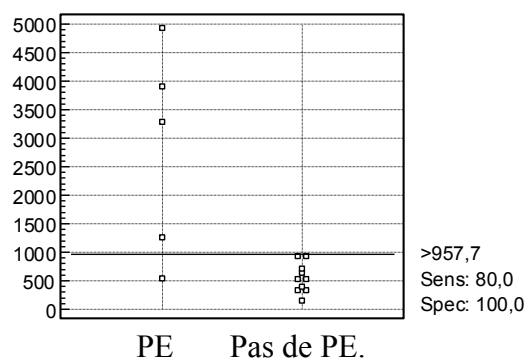
Ce seuil "trop bas" qui a induit de facto une application du suivi rapproché sur une grande partie du groupe contrôle a permis de souligner les rôles respectifs de l'insuffisance de prédiction et de l'inefficacité de l'intervention. Même si l'observance du protocole interventionnel a été globalement excellente, une autre limite de l'étude est que celle-ci



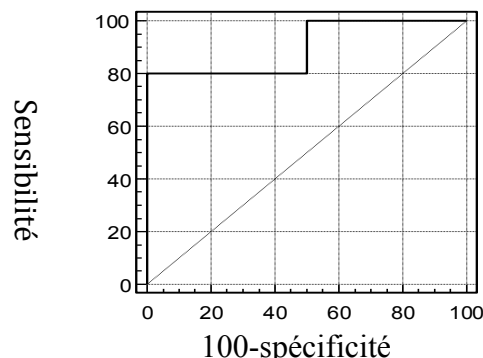
n'était pas reportée dans les cahiers d'observation (pour le suivi des auto-mesures de pressions artérielles et du dépistage de la protéinurie).

### 7.10. Rationnel du choix du seuil et problématique

Le seuil choisi du sFlt-1 s'est révélé être bas. Au moment de la construction de l'essai MOMA, les publications sur le sFlt-1, le PlGF et le VEGF mettaient en évidence, une facilité technique de mesure du PlGF et du sFlt-1, la possibilité d'évaluer le PlGF dans le sang mais aussi dans les urines et la pertinence d'un ratio sFlt-1/PlGF. Néanmoins aucun seuil du sFlt-1 n'était clairement défini. Pour notre part, nous avons établi sur un très petit échantillon (**figure 37**) que dans la période 25/28 SA il existait déjà une différence significative entre nos groupes « grossesse normale » et « PE » (Hertig et al., 2004).



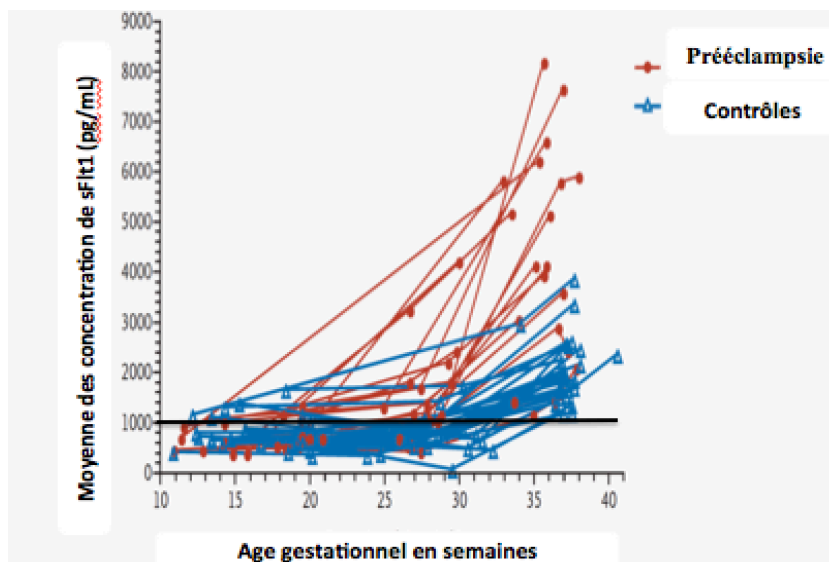
**Figure 37.** Population ayant servi au calcul du seuil de sFlt-1  
Concentrations du sFlt-1 en ng/L entre 25 et 28 SA; PE : n= 5; Pas de PE (grossesse normale ou HTA gravidique) : n= 10.



**Figure 38.** Courbe ROC de la mesure du sFlt-1 plasmatique dans le diagnostic de prééclampsie.  
Aire sous la courbe = 0,900 ; Erreur standard = 0,101 ; 95% CI = 0,636 to 0,987 Seuil >957,7 ng/mL Sens : 80,0% Spec : 100,0%.

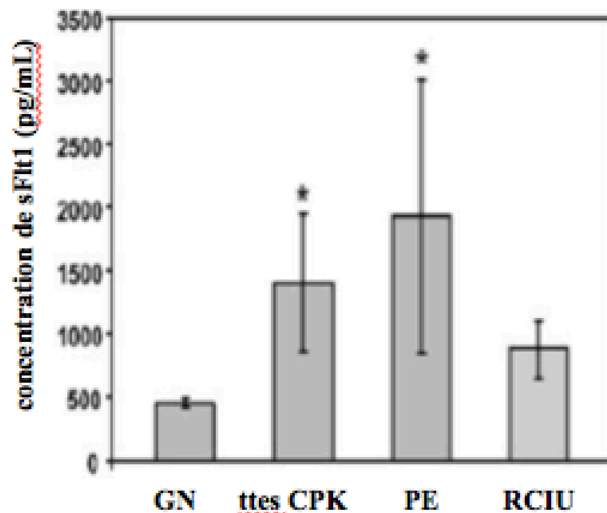
Nous avons déterminé par la réalisation d'une courbe ROC qu'un seuil de 957 ng/L (**figure 38**) permettait d'identifier les patientes qui présenteront une PE pour une sensibilité de 80% et une spécificité de 100% (Hertig et al., 2004). Pour cette raison nous avons choisi pour l'essai MOMA le seuil de 957 ng/L. Il faut souligner que dans la période de mise en place du protocole ainsi que dans la période de l'étude les résultats rapportés

par les autres équipes ne venaient pas contredire le seuil choisi. De l'article publié par Levine et al en 2004 (Levine et al., 2004) on pouvait déduire de la **figure 39** que dans la population prélevée entre 24 SA et 29 SA, la très grande majorité des femmes avec grossesse normale avaient comme dans notre travail (Hertig et al., 2004) des concentrations du sFlt-1 inférieures à 1000 pg/mL.



**Figure 39.** Résultat du suivi longitudinal des concentrations du sFlt-1 dans un groupe de population contrôle ou avec prééclampsie.  
*Adapté de* (Levine et al, NEJM, 2004).

Un autre auteur rapportait aussi des concentrations du même ordre (Stepan et al., 2007). La **figure 40** adapté de l'article de Stepan et al (Stepan et al., 2007) souligne des taux bas de sFlt-1 lors de grossesses normales, bien en dessous du seuil que nous suggérons. Une étude publiée après la fin des inclusions (en 2014) par Verlhoren et al (Verlohren et al., 2014) a décrit à partir d'une cohorte de 915 grossesses uniques normales dans la période 25-28 SA, une médiane du sFlt-1 et un 90<sup>ème</sup> percentile (sur serum) à respectivement, 1355 pg/mL et 2557 pg/mL. Le seuil optimal du sFlt-1 pour prédire la PE établi par courbe ROC dans l'essai MOMA correspond au 97.5<sup>ème</sup> percentile des courbes proposées par Verlhoren et al (Verlohren et al., 2014).



**Figure 40 .** Concentrations maternelles plasmatiques des concentrations lors de grossesse avec dopplers utérins anormaux.

Grossesses normales vs grossesses compliquées ultérieurement de prééclampsie, RCIU ou toutes complications (PE +RCIU), moyenne de l'âge gestationnel 21 SA et lors du prélèvement moyenne de l'âge gestationnel 21 SA ; GN : grossesses normales n= 38 ; PE n=12, RCIU n=13. *Adapté de Stepan al, (Stepan et al., 2007).*

Les kits différents, l'utilisation de serum ou de plasma, l'expression des résultats en moyenne ou médiane ainsi que les caractéristiques des femmes incluses (parité, origine ethnique, utilisation du tabac, et délai avant la survenue d'une prééclampsie ...) ont peut être une grande part dans la variabilité des taux observés et des seuils décrits. Le « bon » seuil reste encore à confirmer.

### 7.11. Autres problèmes rencontrés lors de ce travail

- 1 - Le calendrier d'inclusion qui a été plus long que prévu (durée initiale 18 mois).
- 2 - Lors de l'établissement du budget, l'achat des kits de dosage avaient été pensé dans l'idée que tous les points seraient utilisés, or afin de respecter le protocole et le rendu des résultats dans les 15 jours post-dosages, de nombreux kits n'ont été utilisés que partiellement, générant une dépense supplémentaire importante non prévue. Celle-ci a nécessité une augmentation du budget initialement alloué par l'APHP, qui a été acceptée au vu de l'avancement du protocole. Les dépenses liées aux kits de sFlt-1 ne nous ont pas

permis de réaliser les dosages de PIGF urinaire pour évaluer son caractère prédictif, ce qui était un des objectifs secondaires de ce travail.

3 - Le résultat du suivi à 3 mois des enfants faisait partie du score composite initial d'issues sévères. Malheureusement nous avons dû supprimer cet item car nous n'avons pu recueillir que 47% des fiches de suivi des enfants. Ces fiches devaient être remplies par les pédiatres, majoritairement en extra hospitalier.

4 - Le calendrier de remplissage des cahiers de recherche a été envisagé de manière (trop ?) optimiste et même si j'ai pu bénéficier au cours et à la fin du protocole d'une aide certaine de l'URCEST (Unité de Recherche Clinique de l'Est Parisien, APHP) et d'une aide des co-investigateurs, j'ai dû remplir 2/3 des 1022 dossiers et les vérifier tous. A ce point s'est ajouté mon départ à l'étranger, le tout a été source de délai pour l'analyse de l'étude et la rédaction de l'article.

1 **Close maternal and foetal monitoring guided by sFlt-1 and uterine artery Doppler to**  
2 **reduce hypertension-related complications: A randomised trial**

3 Nadia Berkane, MD<sup>1,2</sup>, Alexandre Hertig, PHD<sup>3</sup>, Michel Boulvain, PHD<sup>2</sup>, Jeremy Seror, MD<sup>1</sup>,  
4 Anne Oppenheimer, MD<sup>1</sup>, Tabassome Simon, PHD<sup>4</sup>, Lise Selleret, MD<sup>1</sup>, Emmanuelle  
5 Mathieu, MD<sup>1</sup>, Lieve Verstraete, MD<sup>1</sup>, Karine Toumi, MD<sup>5</sup>, Nathalie Chabbert-Buffet, PHD<sup>1</sup>,  
6 Guillaume Lefèvre, PHD<sup>5</sup>.

7

8 <sup>1</sup>Department of Gynecology and Obstetrics and Reproductive Medicine, Assistance Publique  
9 des Hôpitaux de Paris (APHP), Sorbonne University, Tenon Hospital, Paris, France

10 <sup>2</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, University of Geneva Hospitals (HUG) Geneva,  
11 Switzerland

12 <sup>3</sup>Department of Nephrology, Sorbonne University, Tenon Hospital, Paris, France

13 <sup>4</sup>Department of Clinical Research Center-Est (URCEST), St Antoine Hospital, Paris, France

14 <sup>5</sup>Department of Biochemistry and Hormonology, Sorbonne University GRC-14 BIOSFAST  
15 Tenon Hospital, Paris, France.

16 *Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:* Dr. Nadia  
17 Berkane, Department of Gynecology and Obstetrics, Geneva University Hospitals (HUG),  
18 Boulevard de la Cluse, 30, 1205 Geneva, Switzerland; Tel: +41 79 55 32 343; +33 6 50 25 89  
19 54

20 E-mail: [nadia.berkane@hcuge.ch](mailto:nadia.berkane@hcuge.ch)

21 **Running title:** Plasma sFlt-1-based antenatal close monitoring

22

23

24 **Word counts:** main text, **3248**; Abstract, **250**.

25 **Abstract:**

26 **Objective:** To evaluate whether close antenatal monitoring guided by soluble fms-like  
27 tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and uterine artery Doppler (UAD) screening in primiparous women  
28 reduces hypertension-related complications.

29 **Design:** A randomised controlled clinical trial.

30 **Setting:** A single-centre, specialist-led hospital in Paris, France,

31 **Population:** A total of 939 primiparous women with a single pregnancy were randomised at  
32 24–28 6/7 weeks' gestation into a disclosed maternal blood sFlt-1 concentration (D-sFlt-1  
33 group, n=466) or non-disclosed (ND-control group, n=473).

34 **Methods:** Allocation was performed by the laboratory, based on a computer-generated list.  
35 The participants were stratified according to UAD results and randomly assigned (1:1) either  
36 to the intervention or control group. A close monitoring program was provided for women  
37 with abnormal sFlt-1 results ( $\geq 957$  ng/L) in the D-sFlt-1 group or with abnormal UAD  
38 findings in both groups. Logistic regression was used to calculate odds ratios (OR), adjusted  
39 for UAD results, and their 95%CI. Receiver-operating characteristics (ROC) curve analysis  
40 was performed to determine the optimal sFlt-1 cut-off values.

41 **Main Outcome Measures:** The composite criterion included hypertension-related maternal  
42 and neonatal complications.

43 **Results:** Preeclampsia (PE) occurred in 57 (6.1%) women. Hypertension-related  
44 complications occurred in 51 (11%) and 45 (9.7%) women in the D-sFlt-1 and ND-control  
45 groups, respectively (adjusted OR, 1.13; 95% CI: 0.73–1.73). The sFlt-1 optimal cut-off value

46 to predict the composite endpoint was 3910 ng/L (area under the curve 0.61; 95% CI: 0.54-  
47 0.68).

48 **Conclusions:** A close monitoring program applied to primiparous women with increased sFlt-  
49 1 concentrations at 24–28 6/7 weeks does not reduce hypertension-related complications.  
50 (ClinicalTrials.gov (NCT00763672))

51

52 **Funding:** The MOMA trial was supported by grants from the Contrat de Recherche Clinique,  
53 French Ministry of Health (CRC05143-P051060).

54 **Key words:** sFlt-1, hypertension, preeclampsia, primiparous, small for gestational age,  
55 uterine artery Doppler.

56 **Tweetable abstract:** Monitoring primiparae with high sFlt-1 levels does not reduce  
57 hypertension-related complications.

58

59

## 60 **Introduction**

61 Preeclampsia (PE), defined by new-onset hypertension and signs of systemic damage, is a  
62 leading cause of maternal and foetal morbidity worldwide.<sup>1</sup> Several studies have suggested  
63 that most maternal and foetal complications related to hypertensive disorders could  
64 potentially be avoided with appropriate care.<sup>2-6</sup> National expert bodies have published  
65 guidelines recommending the identification of women at risk of PE.<sup>7-15</sup> However, one study<sup>16</sup>  
66 assessing the effectiveness of some of these screening approaches reported their limited  
67 positive predictive values.<sup>8-10</sup> Notably, this study suggested that the most relevant risk factor  
68 for PE in early pregnancy was a previous history of PE,<sup>16</sup> while PE is more commonly  
69 observed during the first pregnancy.<sup>2</sup>

70 Several studies showed the association between PE and high levels of circulating soluble fms-  
71 like tyrosine kinase 1 (sFlt-1), an anti-angiogenic factor overexpressed by the placenta in the  
72 setting of PE.<sup>17-22</sup> sFlt-1 contributes to maternal endothelial dysfunctions especially in the  
73 kidney.<sup>19</sup> Maternal sFlt-1 increases significantly 6 to 11 weeks before the clinical onset of PE,  
74 which suggests its potential as a biomarker for screening high-risk women.<sup>20-24</sup>

75 Except for preventive low-dose aspirin initiated in early pregnancy, no treatment is useful for  
76 at-risk women in early pregnancy;<sup>25</sup> delivery remains the only curative option currently  
77 available. Regarding the first trimester, recent studies have shown promising results by  
78 combining screening of PE in guiding aspirin prescription.<sup>26</sup> However, in the second part of  
79 pregnancy, the main goal for PE screening is to provide at-risk women with an antenatal  
80 close-monitoring program and timely interventions.<sup>11,13,15,17</sup> Although such a program may be  
81 beneficial for both the mother and the foetus,<sup>1,4,5</sup> its effectiveness remains to be ascertained.

82 We hypothesized that maternal anti-angiogenic factor sFlt-1 screening in primiparous women  
83 might provide an opportunity to adjust antenatal care, and to improve maternal and foetal



84 outcomes. We conducted the MorbiMortality Amelioration in preeclamptic primiparas  
85 [MOMA] study, a randomised clinical trial including primiparous women to determine  
86 whether sFlt-1-guided close monitoring at 24–28 6/7 weeks of gestation could reduce the rate  
87 of maternal and foetal adverse outcomes related to hypertension in pregnancy. The secondary  
88 objective was to evaluate the predictive values for PE and hypertension-related complications  
89 of plasma sFlt-1 testing and uterine artery Doppler (UAD) screening.

90

## 91 **Materials and Methods**

### 92 **Trial design**

93 The MOMA study was a single-centre randomised controlled trial. Primiparous women were  
94 screened for sFlt-1 concentrations at 24–28 6/7 weeks of gestation and randomly assigned (in  
95 a 1:1 ratio) either to disclosure of their sFlt-1 result to the physician (D-sFlt-1 group) or non-  
96 disclosure (ND-control group). Randomisation was performed by an independent statistician  
97 using a computer-generated block randomisation (block size of four). Allocation concealment  
98 was ensured by the laboratory team who were blinded to all clinical data, except the UAD  
99 results. The randomisation was stratified based on the UAD result (normal or abnormal).  
100 Abnormal UAD results were defined as persistent bilateral notches and/or bilateral resistance  
101 indices above 0.65 after 25 weeks of gestation. This stratification was performed because  
102 local routine practices recommend intensive monitoring for persistently abnormal UAD  
103 results. Clinicians were made aware of the qualitative sFlt-1 results for the D-sFlt-1 group  
104 (normal values: below 957 ng/L; abnormal: equal to or above 957 ng/L) and were blinded to  
105 the sFlt-1 levels for the control group. The sFlt-1 cut-off was derived from preliminary studies  
106 in preeclamptic women.<sup>20,21</sup>

107 The patients were not involved in the study design. No core outcome sets (COS) was  
108 available. There was no Data Safety Monitoring Committee (DSMC), since induced maternal  
109 or foetal safety risk were not expected in our program. The MOMA trial was supported by  
110 grants from the Contrat de Recherche Clinique, French Ministry of Health (CRC05143-  
111 P051060). The study sponsors were not involved in the study design, had no role in the  
112 collection, analysis, or interpretation of the data, and were not involved in the decision to  
113 publish the findings. The study protocol was registered with ClinicalTrials.gov  
114 (NCT00763672). All study-related procedures and protocols were approved by the Ile de  
115 France Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes), Paris, France.

116 The inclusion criteria were:  $\geq 18$  years of age, primiparous (i.e., no previous delivery  $\geq 22$   
117 weeks of gestation) with singleton pregnancies and who received care in our department (a  
118 specialist-led care setting) before 28 6/7 weeks of gestation. Gestational ages were calculated  
119 using the last menstrual period, or first trimester sonography results in case of a discrepancy  
120 of more than 5 days. All patients gave informed consent prior to participation. The only  
121 exclusion criterion was the absence of medical insurance.

122 The primary outcome was a composite of maternal and foetal mortality and/or severe  
123 morbidity related to hypertension, including any item listed in Supplemental Table 1. Because  
124 of the low percentage (52.5%) of 3-month follow-up questionnaires received, the item “infant  
125 sequelae” was later removed from the primary outcome.

126

## 127 **Procedures**

128 Between 24 and 28 6/7 weeks of gestation, a 10-mL blood sample was collected in an  
129 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tube and sent with the UAD result to the laboratory.

130 After centrifugation, plasma EDTA samples were stored at  $-40^{\circ}\text{C}$  before being analysed.

131 Analyses occurred within 2 weeks after blood retrieval. Plasma was chosen instead of serum  
132 because clotting could artificially increase sFlt-1 levels via platelet activation.<sup>27</sup> sFlt-1 was

133 assayed in duplicate using a solid-phase quantitative sandwich immunoassay (Human  
134 VEGFR1/Flt1 Quantikine ELISA Kit; Quantikine R&D Systems Inc, Minneapolis, MN,

135 USA). The minimum detectable concentration in the assay was 5 ng/L with inter-assay and  
136 intra-assay coefficients of variation of 13% and 5% at 330 and 940 ng/L, respectively. Group

137 allocation and qualitative sFlt-1 results for the D-sFlt-1 group were sent back to the clinicians.

138 The sFlt-1 result was reported as “normal” or “abnormal” using a threshold of 957 ng/L, and  
139 close monitoring was prescribed for women with abnormal sFlt-1 results. This monitoring

140 program (detailed in Supplemental Table 2) was applied until delivery and the care was

141 adjusted according to French guidelines if necessary<sup>28</sup> Women with persistently abnormal  
142 UAD results after 25 weeks of gestation in either group were closely monitored as described.  
143 All other women were monitored according to local practice guidelines and based on any  
144 complications that arose.

145 Hypertension was defined as a systolic blood pressure (SBP) of  $\geq 140$  mmHg or diastolic BP  
146 (DBP) of  $\geq 90$  mmHg measured on two occasions, at an interval of 2 hours to 2 days.

147 Proteinuria was defined as a urinary concentration above or equal to 300 mg/L on two  
148 successive occasions. PE was defined as the onset of hypertension and proteinuria after 20

149 weeks of gestation or before hospital discharge in the postpartum period. Chronic

150 hypertension was defined as hypertension diagnosed before pregnancy or before 20 weeks of

151 gestation, while superimposed PE was defined as PE occurring in women with a previous

152 diagnosis of chronic hypertension. Small for gestational age (SGA) was defined as a birth

153 weight  $< 10^{\text{th}}$  percentile according to a French reference curve.<sup>29</sup> Eclampsia was defined based

154 on the presence of convulsions and/or unexplained coma during pregnancy or in the

155 postpartum period in women with signs and symptoms of PE. Placental abruption was defined

156 as premature separation from the uterine wall of a normally located placenta occurring before

157 delivery of the foetus. Postpartum haemorrhage (PPH) was defined as blood loss of  $\geq 500$  mL

158 after a vaginal delivery or  $\geq 1000$  mL after caesarean section and within 24 h after delivery.

159 All women and neonates were followed up after delivery until hospital discharge, and a

160 questionnaire was made available for the paediatrician to complete during the 3-month visit.

161

## 162 **Statistical analyses**

163 The frequency of the composite outcome was estimated at 10% in the control group in the

164 previous 2 years before the study. To detect a 50% decrease in the D-sFlt-1 group (from 10%

165 to 5%) with a power of 85% and a two-sided type 1 error of 5%, 994 women were needed for  
166 this study.

167 Our analyses followed the intention-to-treat principle (all randomised patients excluding those  
168 who were lost to follow-up (n=11)).

169 Baseline characteristics of the study population were displayed as mean and standard  
170 deviation (SD) or median and interquartile range (IQR) for continuous variables and as  
171 frequency and percentage for qualitative variables. Differences between groups in continuous  
172 variables were tested using Student's *t*-test or a Wilcoxon rank-sum test, and differences in  
173 categorical variables were tested using the Pearson's Chi-square or Fisher's exact tests. In the  
174 case of missing data in a component item of the primary composite adverse outcome, the item  
175 was considered absent. Logistic regression analysis was performed to evaluate the association  
176 between groups and the primary outcome, adjusted for UAD results (normal or abnormal).  
177 The results are expressed as adjusted odds ratios (aOR) and their 95% confidence intervals  
178 (95%CI). The receiver operating characteristic (ROC) curves were used to calculate the  
179 optimal sFlt-1 cut-off values for the primary outcome and for PE. All tests were two-sided  
180 and p values of <0.05 were considered statistically significant. SAS<sup>®</sup> software (version 9.3)  
181 was used for the statistical analyses.

182

183

## 184 **RESULTS**

### 185 **Characteristics of study population**

186 A total of 1022 women were recruited from April 6, 2008 to April 20, 2011 and follow-up  
187 was completed on November 7, 2011. Among them, 939 were randomised between 24 0/7  
188 and 28 6/7 weeks of gestation and 928 (463 in the D-sFlt-1 group and 465 in the control  
189 group) were included in the statistical analyses (Figure 1, trial profile). Twenty-two women in  
190 the D-sFlt-1 group and 17 in the ND-control group had abnormal UAD results. Four of these  
191 women were initially misclassified as having abnormal UAD results. After randomisation, 40  
192 women delivered in another department. Pregnancy outcomes were collected for all these  
193 women.

194 The baseline characteristics were similar between the groups (Table 1). The median interval  
195 between blood sampling for sFlt-1 concentration assessment and delivery was 92.0 days  
196 (IQR, 83.0–99.0). Level of sFlt-1 were not different between the D-sFlt-1 and ND-control  
197 groups (1629 ng/L [IQR, 1126–2375] and 1730 ng/L [IQR, 1227–2560], respectively). Rates  
198 of sFlt-1 concentrations above the cut-off (i.e.,  $\geq 957$  ng/L) were similar between groups: 390  
199 (84.2%) in women from the D-sFlt-1 group, and 405 (87.1%) in the ND-control group.

200

### 201 **Composite primary adverse outcome**

202 The composite primary adverse outcome was recorded in 96 (10.3%) women: 51 (11%) and  
203 45 (9.7%) in the intervention and control groups, respectively (aOR, 1.13; 95% CI, 0.73–1.73;  
204 Table 2). After exclusion of the 39 women closely monitored for abnormal UAD, results were  
205 similar, the primary outcome was recorded in 83 (9.3%) women: 44 (9.9%) and 39 (8.7%) in  
206 the intervention and control groups, respectively (aOR, 1.16; 95% CI, 0.74–1.83; Table 2).  
207 Since more than 80% of the women in both groups had a sFlt-1 concentration above the cut-  
208 off (957 ng/L), a subgroup analysis was performed for women with sFlt-1 concentrations in

209 the upper quartile (i.e.;  $\geq 2447.5$  ng/L). No significant benefit from close supervision was  
210 observed in this subgroup (aOR, 0.65; 95% CI, 0.31–1.39).

211 No significant difference in obstetrical complications or in neonatal outcomes were observed  
212 between the groups including any item of the composite outcome (Table 3).

213 Women with the primary outcome had a significantly elevated sFlt-1 concentration than those  
214 without the primary outcome, (1987 ng/L [IQR 1298–4483] and 1648 ng/L [IQR, 1163–  
215 2375], respectively,  $p=0.0006$ ). The area under the ROC curve using sFlt-1 to predict an  
216 adverse outcome was 0.61 (95% CI: 0.54-0.68). Based on the ROC analysis, the optimal sFlt-  
217 1 cut-off value was 3910 ng/L, with a sensitivity of 31.2% (95% CI, 22.0–40.5%) and a  
218 specificity of 93.2% (95% CI, 91.6–95.0%).

219 Overall, PE occurred in 57 (6%) women, including 34 (7.3%) in the D-sFlt-1 group and 23  
220 (4.9%) in the ND-control group ( $p = 0.13$ ). The median sFlt-1 concentration was significantly  
221 higher in the subgroup of women with PE ( $n = 57$ ) than in the subgroup without PE ( $n = 871$ ;  
222 2444 ng/L [IQR, 1549 –5107] and 1653 ng/L [IQR, 1160 –2380], respectively;  $p<0.0001$ ).  
223 The area under the ROC curve using sFlt-1 to predict PE was 0.68 (95% CI: 0.59-0.76), while  
224 the optimal cut-off for sFlt-1 to predict PE according to the ROC analysis was 3910 ng/L. The  
225 corresponding sensitivity and specificity were 36.8% (95% CI, 24.3–49.4%) and 92.5% (95%  
226 CI, 90.8–94.3%), respectively.

227 Despite the low sFlt-1 threshold value chosen in this trial, 13 (13.54%) women with adverse  
228 outcomes would not have been prospectively identified as being at risk. One women delivered  
229 an SGA new born prematurely (day 188). All others ( $n = 12$ ), delivered at term (from 38 6/7  
230 to 41 2/7 weeks of gestation) with a very late onset of complications, at the end of pregnancy  
231 ( $n = 10$ ) or in the postpartum period ( $n = 2$ ).

232

233

**234 Uterine artery Doppler**

235 The primary composite outcome was recorded in 37.1% (13/35) of the women with abnormal  
236 UAD results, and in 9.3% (83/893) of women with normal UAD results ( $p < 0.0001$ ). PE  
237 diagnosis was made in 34.3% (12/35) and 5.0% (45/893) of women with abnormal and  
238 normal UAD result, respectively ( $p < 0.0001$ ).

239

240



## 241 **DISCUSSION**

### 242 **Main Findings**

243 The results of this trial suggest that maternal and foetal close monitoring based on sFlt-1  
244 screening performed between 24 and 28 6/7 weeks of gestation does not improve maternal  
245 and perinatal morbidity and mortality, even in the subgroup with the highest concentration of  
246 sFlt-1. In this cohort, however, there was an association between higher sFlt-1 levels with  
247 both PE and morbidity associated with PE. Abnormal UAD results were also found associated  
248 with those complications.

249

### 250 **Strengths and Limitations**

251 The present study is, to our knowledge, the only one to date that analyses the effect of an  
252 intervention guided by sFlt-1 concentration measurements in the middle of pregnancy. The  
253 strengths of the present study are the randomised design, including a large unselected  
254 population of primiparous women, with a usual prevalence of PE of 6%,<sup>30,31</sup> and a low  
255 percentage of women who were lost to follow-up.

256 The main limitation of this study is the chosen low cut-off for sFlt-1 (i.e. 957 ng/L). As a  
257 result, a large number of women underwent close monitoring.

258 Due to the substantial number of missing 3-month neonatal questionnaires, the criterion “3-  
259 month sequelae” was deleted from the composite outcome. This remains a limitation of this  
260 study.

261 Another limitation is that 40 women were transferred or delivered in other units. However,  
262 when a pregnancy complication was diagnosed, including PE, they underwent antenatal  
263 management similar to that specified in the trial protocol.

264 Lastly, we evaluated the benefit of sFlt-1 level as a screening tool, and, since that time, other  
265 predictive markers were developed and may be more accurate, e.g. the sFlt-1/placental growth  
266 factor (PIGF) ratio.

267

## 268 **Interpretations**

269 The MOMA study was based on a two-step approach. The first step was to identify women at  
270 higher risk of PE by screening based on increased plasma sFlt-1 concentrations, while the  
271 second was to provide a specific antenatal care program (close monitoring) for these women.

272 The rationale for choosing the cut off for sFlt-1 at 957 ng/L was that, during the study design  
273 process, the results of two studies were available.<sup>20-21</sup> In a small population of women (n=15),  
274 none of the women without PE had a sFlt-1 concentration above 957 ng/L, and four out of  
275 five women with PE had a sFlt-1 value above this threshold.<sup>21</sup> These results were in  
276 agreement with that of a larger study, where most sFlt-1 concentrations were below 1000  
277 ng/L in women without PE.<sup>20</sup> Other studies reported mean sFlt-1 concentrations below 1000  
278 ng/L in healthy controls.<sup>22,32-34</sup>

279 Since the MoMA trial was conducted, other studies have reported different sFlt-1 values in  
280 normal pregnancy and preeclampsia.<sup>35,36</sup> These differences in sFlt-1 concentrations could be  
281 due to: i) analytical differences among the different sFlt-1 assays,<sup>37</sup> ii) use of mean to express  
282 sFlt-1 concentrations instead of median in non-symmetric distributions, or iii) different time  
283 intervals between the blood sampling and onset of PE. These studies<sup>35,36</sup> included women  
284 irrespective of parity, which was shown to affect sFlt-1 level.<sup>38</sup>

285 In the MOMA cohort there was an association between high sFlt-1 levels and the occurrence  
286 of PE and morbidity. The cut-off value of 3910 ng/L, determined using ROC curve analysis in  
287 the participants of the MOMA trial, corresponds to the 97.5<sup>th</sup> percentile of the values in  
288 another population of 877 normal pregnancies.<sup>37</sup> A recent study did not show sFlt-1

289 concentration as an independent predictor of PE, after adjustment for clinical factors and  
290 uterine and umbilical Doppler results.<sup>39</sup> This may explain why the addition of sFlt-1 screening  
291 at 24 to 28 6/7 weeks of gestation in primiparous women did not improve maternal and  
292 neonatal outcomes.

293 Another cause of failure to demonstrate a benefit from screening could be that the  
294 intervention undertaken in women screened positive is ineffective. Because of the low cut-off  
295 for sFlt-1 (i.e. 957 ng/L), a large proportion of women had close monitoring in the  
296 intervention group, compared to a low percentage in the control group. The results of this trial  
297 suggest that close monitoring is not effective to prevent complications related to  
298 preeclampsia. On the other hand, close monitoring did not increase preterm delivery, a  
299 potential complication caused by decision of elective delivery due to overdiagnosis.

300 Despite our negative results during the second trimester, growing evidence suggests that the  
301 anti-angiogenic and angiogenic biomarkers seem useful to rule out the disease in women with  
302 suspected PE<sup>40</sup> or to identify women at risk of intra uterine growth retardation<sup>41</sup> or developing  
303 PE during the first trimester.<sup>26</sup>

304

## 305 **CONCLUSION**

306 Our findings showed that, in a specialist-led care setting, close antenatal monitoring between  
307 24 and 28 6/7 weeks of gestation of primiparous women with sFlt-1 and UAD screening did  
308 not improve maternal or foetal outcomes. However, sFlt-1 measurement for predicting PE  
309 could be helpful if an effective intervention was available.

310

311

**312 ACKNOWLEDGMENTS:**

313 We thank the following contributors for their assistance in this study: APHP for providing the  
314 grant; the “Unite de Recherche Clinique de l’Est Parisien” (Assistance Publique–Hôpitaux de  
315 Paris and UPMC Paris 06) team and the “Centre de Recherche Clinique de l’Est Parisien”  
316 (Assistance Publique–Hôpitaux de Paris and UPMC Paris 06) medical clinical research team  
317 for their assistance in designing the study and the case report form, data collection, study  
318 monitoring, data management, review of medical records, and statistical analyses; Amel  
319 Touati, Marine Cachanado, Abdel Ilah Benamar, and Alexandra Rousseau; and Gisèle Jollivet  
320 (Biochemistry and Hormonology, Tenon Hospital), who performed the sFlt-1 assays.

321

**322 Disclosure of interests**

323 There are no conflicts of interest.

**324 Contribution to authorship**

325 NB, GL, and AH designed the clinical trial. NB, JS, AO, LS, and LV selected the patients. All  
326 authors contributed to the writing and editing of the manuscript particularly NB, MB, GL, TS  
327 and NCB. Alexandra Rousseau and Marine Cachanado were responsible for the statistical  
328 section. TS had full access to all data and NB and GL had final responsibility for the decision  
329 to submit this paper for publication.

**330 Details of ethics approval**

331 The MOMA trial was approved by the Ile de France Ethics Committee (Comité de Protection  
332 des Personnes), Paris, France on 7<sup>th</sup> May 2008 (n° 0611327).

**333 Funding:**

334 The MOMA trial was supported by grants from the Contrat de Recherche Clinique, French  
335 Ministry of Health (CRC05143-P051060); the sponsor was Assistance Publique des Hôpitaux  
336 de Paris (APHP), (Département de la Recherche Clinique et du Développement). Alexandre

337 Hertig is the recipient of an Interface contract with the French National Institute of Health and  
338 Medical Research (INSERM). The study sponsors were not involved in the study design, had  
339 no role in the collection, analysis, or interpretation of the data, and were not involved in the  
340 decision to publish the findings.

341 **Supporting Information**

342 Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

343 **Table S1.** Primary composite outcome.

344 **Table S2.** Monitoring Program in case of abnormal sFlt-1 or UAD results.

345

346

347 **References**

- 348 1. Barbosa IRC, Silva WBM, Cerqueira GSG, Novo NF, Almeida FA, Novo JLVG.  
349 Maternal and fetal outcome in women with hypertensive disorders of pregnancy: the  
350 impact of prenatal care. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2015;9:140–6.
- 351 2. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PFA. WHO analysis of  
352 causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006;367:1066–74.
- 353 3. Savitz DA, Danilack VA, Engel SM, Elston B, Lipkind HS. Descriptive Epidemiology  
354 of Chronic Hypertension, Gestational Hypertension, and Preeclampsia in New York  
355 State, 1995–2004. *Maternal and Child Health Journal* 2014 May;18:829–38.
- 356 4. Schutte JM, Schuitemaker NWE, van Roosmalen J, Steegers E a. P, Dutch Maternal  
357 Mortality Committee. Substandard care in maternal mortality due to hypertensive  
358 disease in pregnancy in the Netherlands. *BJOG* 2008;115:732–6.
- 359 5. Andersgaard AB, Herbst A, Johansen M, Ivarsson A, Ingemarsson I, Langhoff-Roos J,  
360 et al. Eclampsia in Scandinavia: incidence, substandard care, and potentially  
361 preventable cases. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85:929–36.
- 362 6. Ghulmiyyah L, Sibai B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin*  
363 *Perinatol* 2012;36:56–9.
- 364 7. Giguère Y, Charland M, Bujold E, Bernard N, Grenier S, Rousseau F et al. Combining  
365 biochemical and ultrasonographic markers in predicting preeclampsia: a systematic  
366 review. *Clin Chem* 2010;56:361–75.
- 367 8. Milne F, Redman C, Walker J, Baker P, Bradley J, Cooper C et al. The pre-eclampsia  
368 community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia  
369 in the community. *BMJ* 2005;330:576–80.

- 370 9. Visintin C, Mugglestone MA, Almerie MQ, Nherera LM, James D, Walkinshaw S et  
371 al. Management of hypertensive disorders during pregnancy: summary of NICE  
372 guidance. *BMJ* 2010;341:c2207.
- 373 10. Redman CWG. Hypertension in pregnancy: the NICE guidelines. *Heart*  
374 2011;97:1967–9.
- 375 11. Gillon TER, Pels A, von Dadelszen P, MacDonell K, Magee LA. Hypertensive  
376 disorders of pregnancy: a systematic review of international clinical practice  
377 guidelines. *PLoS ONE* 2014;9:e113715.
- 378 12. American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in  
379 Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of  
380 Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet*  
381 *Gynecol* 2013;122:1122–31.
- 382 13. Magee LA, Pels A, Helewa M, Rey E, von Dadelszen P, Canadian Hypertensive  
383 Disorders of Pregnancy Working Group. Diagnosis, evaluation, and management of  
384 the hypertensive disorders of pregnancy: executive summary. *J Obstet Gynaecol Can*  
385 2014;36:416–41.
- 386 14. Bartsch E, Medcalf KE, Park AL, Ray JG, High Risk of Pre-eclampsia Identification  
387 Group. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy:  
388 systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *BMJ* 2016;353:i1753.
- 389 15. WHO Recommendations for Prevention and Treatment of Pre-Eclampsia and  
390 Eclampsia. Geneva: World Health Organization; 2011.
- 391 16. Vergheze L, Alam S, Beski S, Thuraisingham R, Barnes I, MacCallum P. Antenatal  
392 screening for pre-eclampsia: evaluation of the NICE and pre-eclampsia community  
393 guidelines. *J Obstet Gynaecol* 2012;32:128–31.

- 394 17. Karumanchi SA. Angiogenic Factors in Preeclampsia: From Diagnosis to  
395 Therapy. *Hypertension* 2016; 67: 1072–9.
- 396 18. Ehrlich L, Hoeller A, Golic M, Herse F, Perschel FH, Henrich W et al. Increased  
397 placental sFlt-1 but unchanged PlGF expression in late-onset preeclampsia. *Hypertens*  
398 *Pregnancy* 2017; 36: 175–85.
- 399 19. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S et al. Excess placental  
400 soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1) may contribute to endothelial dysfunction,  
401 hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111:649–58.
- 402 20. Levine RJ, Maynard SE, Qian C et al. Circulating angiogenic factors and the risk of  
403 preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350:672–83.
- 404 21. Hertig A, Berkane N, Lefevre G et al. Maternal serum sFlt-1 concentration is an early  
405 and reliable predictive marker of preeclampsia. *Clin Chem* 2004;50:1702–3.
- 406 22. Stepan H, Unversucht A, Wessel N, Faber R. Predictive value of maternal angiogenic  
407 factors in second trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion. *Hypertension*  
408 2007;49:818–24.
- 409 23. Raia-Barjat T, Prioux C, Gris J-C, Chapelle C, Laporte S, Chauleur C. Angiogenic  
410 factors for prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction onset in high-  
411 risk women: AngioPred study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017; : 1–10.
- 412 24. Cerdeira AS, Agrawal S, Staff AC, Redman CW, Vatish M. Angiogenic factors:  
413 potential to change clinical practice in pre-eclampsia? *BJOG* 2017; published online  
414 Nov 29. DOI:10.1111/1471-0528.15042.
- 415 25. Rolnik DL, Wright D, Poon LC, O’Gorman N, Syngelaki A, de Paco Matallana C et  
416 al. Aspirin versus Placebo in Pregnancies at High Risk for Preterm Preeclampsia. *N*  
417 *Engl J Med* 2017;377:613–22.



- 418 26. Poon LCY, Kametas NA, Maiz N, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester  
419 prediction of hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertension* 2009 ;53:812–8.
- 420 27. Tsatsaris V, Goffin F, Foidart JM. Circulating angiogenic factors and preeclampsia. *N*  
421 *Engl J Med* 2004;350:2003-4.
- 422 28. Pottecher T, Luton D, Collège national des gynécologues et obstétriciens français  
423 (CNGOF), Société française de médecine périnatale (SFMP), Société française de  
424 néonatalogie (SFN), Société française d’anesthésie et de réanimation (Sfar). Prise en  
425 charge multidisciplinaire de la prééclampsie. Issy-les-Moulineaux, France: Elsevier  
426 Masson; 2009.
- 427 29. Salomon L-J, Bernard J-P, de Stavola B, Kenward M, Ville Y. [Birth weight and size:  
428 charts and equations]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.* 2007;36:50–6.
- 429 30. Ros HS, Chattingius S, Lipworth L. Comparison of risk factors for preeclampsia and  
430 gestational hypertension in a population-based cohort study. *Am J Epidemiol*  
431 1998;147:1062–70.
- 432 31. North RA, McCowan LME, Dekker GA, Poston L, Chan EH, Stewart AW et al.  
433 Clinical risk prediction for pre-eclampsia in nulliparous women: development of  
434 model in international prospective cohort. *BMJ* 2011;342:d1875.
- 435 32. Moore Simas TA, Crawford SL, Solitro MJ, Frost SC, Meyer BA, Maynard SE.  
436 Angiogenic factors for the prediction of preeclampsia in high-risk women. *Am J*  
437 *Obstet Gynecol* 2007;197:244.e1-8.
- 438 33. Wikström A-K, Larsson A, Eriksson UJ, Nash P, Nordén-Lindeberg S, Olovsson M.  
439 Placental growth factor and soluble FMS-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-  
440 onset preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2007;109:1368–74.
- 441 34. Crispi F, Llurba E, Domínguez C, Martín-Gallán P, Cabero L, Gratacós E. Predictive  
442 value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset pre-

- 443 eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*  
444 2008;31:303–9.
- 445 35. McElrath TF, Lim K-H, Pare E, Rich-Edwards J, Pucci D, Troisi R et al. Longitudinal  
446 evaluation of predictive value for preeclampsia of circulating angiogenic factors  
447 through pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:407.e1-7.
- 448 36. Perni U, Sison C, Sharma V, Helseth G, Hawfield A, Suthanthiran et al. Angiogenic  
449 factors in superimposed preeclampsia: a longitudinal study of women with chronic  
450 hypertension during pregnancy. *Hypertension* 2012;59:740–6.
- 451 37. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Zeisler H, Calda P et al. New  
452 gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine  
453 kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia.  
454 *Hypertension* 2014;63:346–52.
- 455 38. Bdolah Y, Elchalal U, Natanson-Yaron S, Yechiam H, Bdolah-Abram T, Greenfield C  
456 et al. Relationship between nulliparity and preeclampsia may be explained by altered  
457 circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1. *Hypertens Pregnancy* 2014;33:250–9.
- 458 39. Chaiworapongsa T, Romero R, Kim YM, Kim GJ, Kim MR, Espinoza J et al. Plasma  
459 soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to  
460 the clinical diagnosis of pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005;17:3–18.
- 461 40. Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, Verlohren S, Brennecke S, Chantraine F et al.  
462 Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia  
463 in singleton pregnancy: implications for clinical practice. *Ultrasound Obstet Gynecol*  
464 2015;45:241–6.
- 465 41. Gaccioli, F., Sovio, U., Cook, E., Hund, M., Charnock-Jones, D.S., and Smith, G.C.S.  
466 Screening for fetal growth restriction using ultrasound and the sFlt-1/PlGF ratio

467 in nulliparous women: a prospective cohort study. *Lancet Child Adolesc Health*  
468 2018; 2:569–581.  
469

## **Introduction de l'article 3**

**Titre de l'article :** « *Abnormal steroidogenesis and aromatase activity in preeclampsia* ».

Accepté (Juin 2018) pour publication dans la revue Placenta (Berkane et al., 2018).

### **8.1. Rationnel**

Ce travail est à notre connaissance le premier à établir un profil stéroïdien maternel plasmatique large avant la survenue des signes cliniques de prééclampsie et d'approcher via le calcul de ratio hormonaux l'expression/activité des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse. Nous avons aussi voulu évaluer l'expression de l'aromatase par le tissu placentaire.

### **8.2. Mise en place des collaborations**

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité de recherche U1195 INSERM rattachée à l'Université Paris Sud pour la réalisation du profil stéroïdien plasmatique. Nous avons aussi établi une collaboration avec l'unité U1036 (INSERM et Institut de Biosciences et de Biotechnologie de Grenoble) pour les techniques de Western Blot et RT-qPCR.

### **8.3. Cohortes incluses**

#### **8.3.1. Profil stéroïdien**

Trois groupes de femmes ont été constitués pour cette étude : un groupe de femme avec PE, un groupe avec RCIU vasculaire sans PE et un groupe contrôle. Ces femmes étaient incluses dans la cohorte MOMA. Elles étaient les 90 premières patientes qui répondaient aux critères d'inclusion et d'exclusion. Les profils stéroïdiens étaient réalisés à partir des prélèvements plasmatiques réalisés entre < 24 SA et 29 SA >, en moyenne 26 SA dans les

3 groupes soit avant les signes cliniques de prééclampsie (délai moyen entre le prélèvement et la survenue d'une prééclampsie :  $67,2 \pm 30,5$  jours).

Nos 3 groupes avaient des caractéristiques de base comparables sauf pour l'usage du tabac. En effet, il y avait moins de patientes fumeuses dans le groupe PE. Le tabac est connu pour diminuer le risque de PE (Conde-Agudelo et al., 1999). A l'inverse les patientes avec RCIU sont celles avec la prévalence du tabac la plus élevée, ce qui va dans le sens de la littérature. En effet, il a été montré que le fait de fumer augmente le risque de RCIU (Cnattingius and Nordström, 1996).

### **8.3.2 Expression de l'aromatase**

Les patientes incluses pour l'évaluation de l'expression de l'aromatase sont issues pour partie d'une petite cohorte créée à cet effet par nos soins (protocole aromatase). Après signature d'un consentement éclairé par les patientes, des échantillons placentaires issus de grossesse avec PE ou de grossesse normale étaient prélevés à l'accouchement et conservés avant analyse. Pour renforcer le nombre de cas pathologiques et normaux y ont été adjoints des échantillons en banque issus de la collection de Mme N. Alfaidy (un consentement autorisait l'utilisation de ces prélèvements).

### **8.4. Calcul d'effectif et population incluse**

*Pour l'étude Profil stéroïdien* : pour mettre en évidence une différence d'une déviation standard dans les groupes pathologiques avec une puissance de 90% et un risque  $\alpha$  de 5%.

25 femmes dans les groupes pathologiques et 40 dans le groupe contrôle étaient nécessaires. Nous avons donc inclus 90 grossesses.

*Pour l'expression placentaire de l'aromatase* : nous avons pu inclure 16 grossesses (6 PE et 10 contrôles) dans le protocole aromatase. Des problèmes de décongélation ont limité

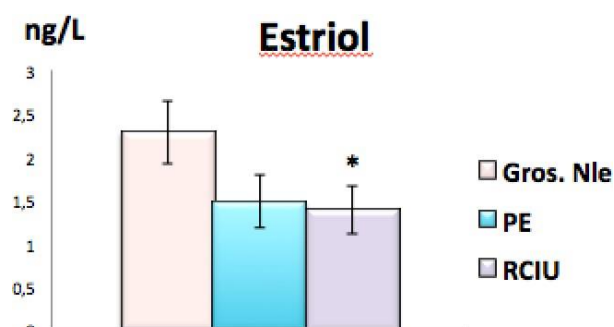
les échantillons utilisables, aussi l'adjonction des échantillons issus de la banque de Mme Alfaidy a permis d'atteindre le nombre de 18 contrôles et 12 PE pour l'analyse de l'ARNm et 8 contrôles et 6 PE pour le WB.

## 8.5. Principaux résultats

### 8.5.1. Anomalies des oestrogènes

Le délai moyen entre le prélèvement et le diagnostic de PE était de  $67.2 \pm 30.5$  jours. Nous avons retrouvé un ratio E1/ $\Delta$ 4-Dione significativement diminué dans le groupe des patientes qui ont secondairement présenté une PE comparé au groupe contrôle ainsi qu'une diminution des taux de E2 et de E1 qui s'approche de la significativité. Il existe une grande corrélation des concentrations de E2 et de E1 ( $r_s$  0,73 ;  $p < 0,0001$ ). Par contre les profils stéroïdiens des patientes qui ont présenter un RCIU sans signes de PE ne présentent pas ces anomalies.

L'ensemble de ces résultats suggère la présence d'un défaut précoce d'aromatation précédant l'apparition des signes cliniques et biologiques de prééclampsie et ce défaut semble spécifique à la prééclampsie et non juste associé à un placenta hypoxique. Le défaut d'expression de l'aromatase est aussi mis en évidence à l'accouchement sur les échantillons placentaires dans le groupe PE de notre 2<sup>ème</sup> population comparé au groupe contrôle ( $p = 0.009$ ).



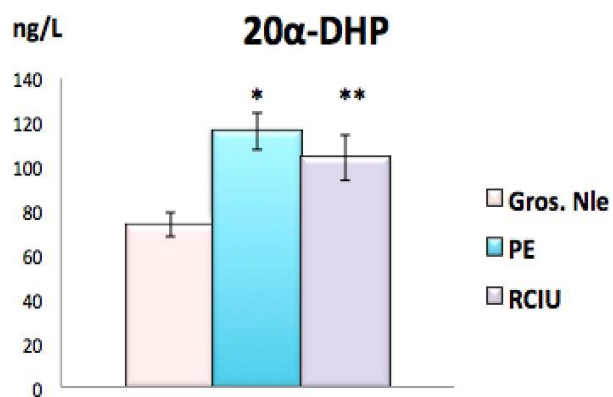
**Figure 41.** Concentrations plasmatiques de l'estriol.

Trois groupes : contrôles (n=40), PE (n=25), RCIU (n=25). \*groupe RCIU vs groupe contrôle  $p=0.014$ .

Des taux significativement abaissés d'estriol ont été mis en évidence dans le groupe RCIU comparé au groupe contrôle et une tendance à la baisse dans le groupe PE (**figure 41**). La synthèse de l'estriol nécessite une  $16\alpha$ -hydroxylation au niveau du foie fœtal aussi peut on imaginer qu'en cas de RCIU le foie fœtal puisse être dysfonctionnel.

### 8.5.2 Anomalies de la progestérone et de ses métabolites

Des anomalies du métabolisme de la progestérone ont aussi été mises en évidence. Les 2 groupes pathologiques (PE et RCIU) sont marqués d'une part par des taux élevés de la  $20\alpha$ -DHP et d'autre part par une augmentation du ratio  $20\alpha$ -DHP/Prog suggérant un excès de conversion de la progestérone par l'enzyme  $20\alpha$ -hydroxylase (**figure 42**). Par contre les taux plasmatiques de progestérone ne sont pas différents entre les 3 groupes (RCIU, PE et contrôle). La  $20\alpha$ -DHP est le métabolite de la progestérone le plus abondant. Il ne se fixe pas au récepteur de la progestérone ainsi il est probable que la  $20\alpha$ -hydroxylase joue un rôle de régulateur négatif de la progestérone.



**Figure 42.** Concentrations plasmatiques de la  $20\alpha$ -DHP. Trois groupes : contrôles (n=40), PE (n=25), RCIU (n=25). \*groupe PE vs groupe contrôle  $p < 0.0001$  et \*\*groupe RCIU vs groupe contrôle  $p = 0.016$ .

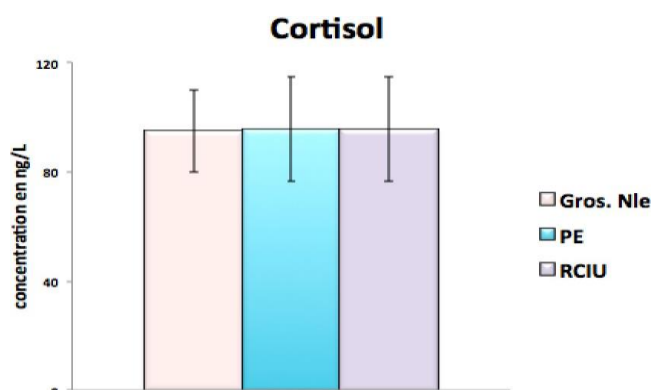
Enfin dans ce travail d'autres métabolites de la progestérone ( $3\alpha,5\alpha,20\alpha$ -HHP et  $3\beta,5\alpha,20\alpha$ -HHP) ont été retrouvés avec des concentrations modifiées en cas de PE ou RCIU sans que nous puissions formuler pour l'instant d'explications univoques.

### 853. Anomalies des précurseurs

Nous avons observé des concentrations significativement plus basses de sulfate de prégnénolone dans le groupe PE comparativement au groupe RCIU et au groupe contrôle (respectivement  $p < 0.0001$  et  $p = 0.0034$ ). Ce stéroïde est la forme circulante de la prégnénolone qui est un précurseur de la progestérone et du DHEA. Notre travail antérieur (Hertig et al., 2010) avec évaluation des profils stéroïdiens à l'accouchement avait déjà montré cette baisse de sulfate de prégnénolone, ce qui renforce la validité de nos résultats actuels. Ceci pourrait être la conséquence d'un défaut de sulfatation ou d'une conversion accrue.

### 854. Cortisol

Nous n'avons pas mis en évidence de concentrations anormales du cortisol contrairement au précédent travail à l'accouchement (Hertig et al., 2010) où dans le groupe PE sévère ( $n=10$ ) des taux significativement bas de cortisol avaient été retrouvés.



**Figure 43.** Concentrations plasmatiques du cortisol.

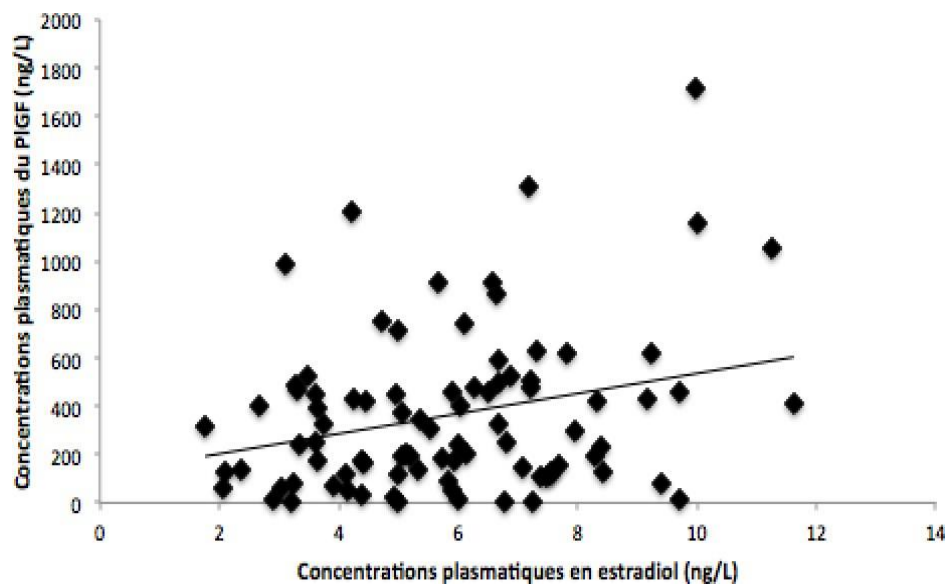
Trois groupes : contrôles ( $n=40$ ), PE ( $n=25$ ), RCIU ( $n=25$ ). Pas de différence significative entre les groupes.



Dans notre travail présenté ici, aucune patiente n'avait reçu de corticothérapie pour maturation pulmonaire fœtale. Dans la précédente étude, le prélèvement était fait à l'accouchement et l'âge gestationnel à l'accouchement des femmes avec PE sévère était de 30 SA en moyenne, elles avaient donc pour leur grande majorité bénéficié d'une corticothérapie à visée de maturation pulmonaire fœtale dans les jours ou semaines qui précédaient le prélèvement.

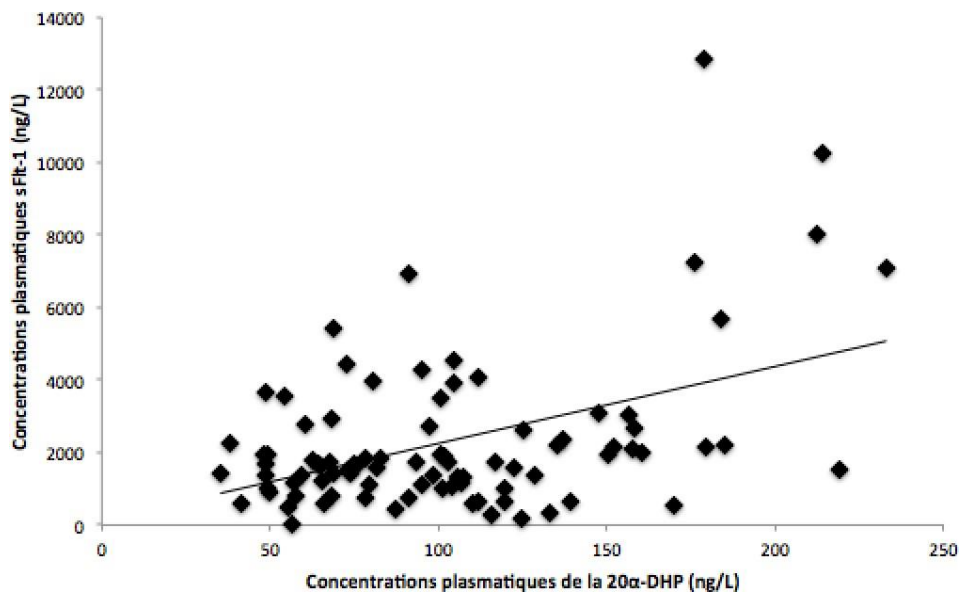
### 8.6. Relation entre stéroïdes et facteurs angio/antiangiogéniques

Nous avons retrouvé des corrélations très modérées entre les concentrations plasmatiques du PlGF, du sFlt-1 et celles de l'E2 et de la 20 $\alpha$ -DHP.

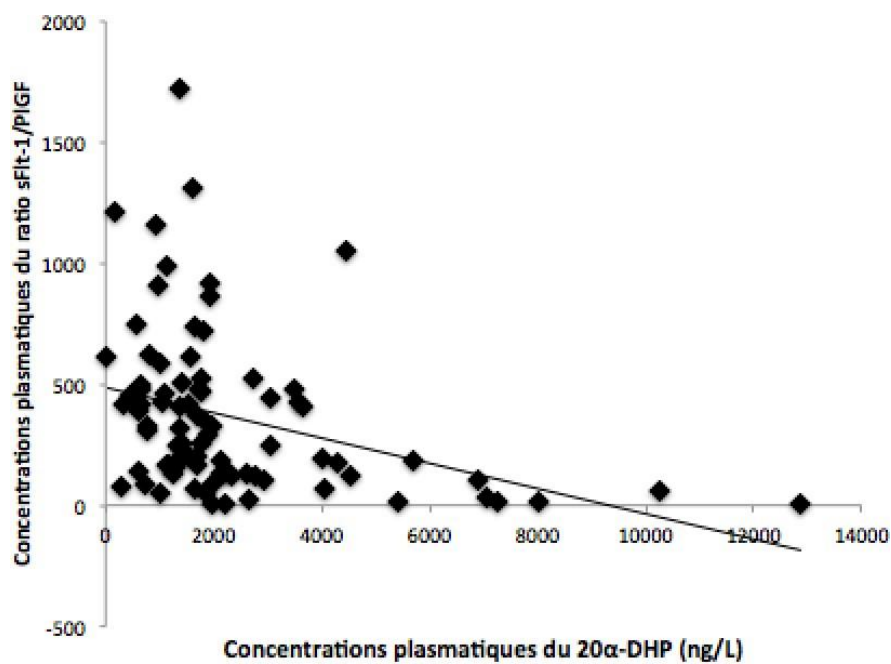


**Figure 44.** Corrélation entre les concentrations plasmatiques de l'estradiol et du PlGF.

Les **figures 44, 45 et 46** montrent une faible corrélation positive entre la 20 $\alpha$ -DHP et sFlt-1 ( $r_s$  0,25,  $p = 0,017$ ) et 20 $\alpha$ -DHP et le ratio sFlt-1/PlGF ( $r_s$  0,327,  $p=0,002$ ) ainsi qu'une tendance entre E2 et PlGF ( $r_s$  0,02,  $p = 0,063$ ). Ces corrélations sont faiblement significatives et on notera de plus un certain degré de dispersion des valeurs limitant la portée de ces résultats.



**Figure 45.** Corrélation entre les concentrations plasmatiques de la 20 $\alpha$ -DHP et le sFlt-1.



**Figure 46.** Corrélation entre les concentrations plasmatiques de la 20 $\alpha$ -DHP et le ratio sFlt-1/PIGF.

### 8.7. Forces et limites de ce travail

La force de cet article réside à la fois dans i) la fiabilité de la technique de mesures des concentrations hormonales, ii) la réalisation d'un large profil stéroïdien sur un même échantillon, iii) la période des prélèvements qui est antérieure aux symptômes de

prééclampsie, et enfin iv) la comparaison à un autre groupe pathologique : le RCIU vasculaire. Cependant des limites doivent aussi être soulignées. Le nombre de femmes incluses reste faible même s'il répond à un calcul d'effectif. Le design de l'étude prenant en compte un seul prélèvement non horodaté rend compte d'une photographie à un instant « t ». Cependant les taux de certaines hormones comme l'estradiol, la progestérone ou la  $20\alpha$ -DHP sont tellement élevés que l'on ne s'attend pas une variation brutale d'un jour sur l'autre.

Un suivi longitudinal pendant la grossesse aurait été intéressant tant pour une confirmation des mesures que pour évaluer le moment de la survenue des anomalies mais le coût élevé de la technique de GC/MS limite les mesures. Enfin l'approche de l'expression/activité des enzymes par le profil stéroïdien est indirecte mais il est impossible de faire différemment car le placenta humain n'est pas accessible en suivi longitudinal et le modèle animal est inadapté puisque la stéroïdogénèse y est différente.

L'étude de l'expression de l'aromatase par le tissu placentaire pose le problème de l'âge gestationnel des femmes incluses. En effet les grossesses avec prééclampsie et en particulier les plus sévères ont des accouchements induits tôt dans la grossesse, or l'expression de l'aromatase augmente sur la fin de la grossesse et il serait idéal en théorie de comparer des groupes avec et sans prééclampsie d'âge gestationnel identique. Cependant les estrogènes et la progestérone étant impliqués dans la parturition un groupe contrôle composé de patientes accouchant prématurément de manière spontanée poserait question car ces femmes pourraient présenter des troubles de la stéroïdogénèse et ne doivent pas être considérées stricto sensu comme des contrôles servant de référence. Dans notre série d'analyse de l'expression de l'aromatase placentaire, les moyennes d'âge gestationnel diffèrent ( $208.83 \pm 9.08$  jours vs  $238.06 \pm 7.91$  jours);  $P = 0.019$ .

### **8.8. Conclusions de l'article**

Nos résultats suggèrent en utilisant des techniques fiables et sur 2 populations distinctes un défaut d'aromatisation chez les femmes qui vont présenter une prééclampsie. Ils soulignent le caractère précoce, - antérieurs aux signes cliniques -, ainsi que la spécificité de cette anomalie qui n'est pas mise en évidence dans le groupe RCIU. Le métabolisme de la progestérone est modifié avec une augmentation de la  $20\alpha$ -DHP dans les groupes PE et RCIU. Enfin comme précédemment à l'accouchement nous observons une baisse importante de la sulfate de prégnénolone dans le groupe PE que nous ne savons pas encore expliquer. Ce travail préliminaire nécessite des études futures sur d'autres populations afin de corroborer les résultats obtenus et des études avec suivi longitudinal afin d'évaluer à quel moment de la grossesse les anomalies de la stéroïdogénèse apparaissent.



## Abnormal steroidogenesis and aromatase activity in preeclampsia

Nadia Berkane<sup>a, d, 1, 2</sup>, Philippe Liere<sup>e, 1</sup>, Guillaume Lefevre<sup>b</sup>, Nadia Alfaidy<sup>f</sup>, Roland Abi Nahed<sup>f</sup>, Jessica Vincent<sup>d</sup>, Jean-Paul Oudinet<sup>e</sup>, Antoine Pianos<sup>e</sup>, Annie Cambourg<sup>e</sup>, Patrick Rozenberg<sup>g</sup>, Pierre Galichon<sup>c</sup>, Alexandra Rousseau<sup>h</sup>, Tabassome Simon<sup>h</sup>, Michael Schumacher<sup>e</sup>, Nathalie Chabbert-Buffet<sup>a</sup>, Alexandre Hertig<sup>c, \*</sup>

<sup>a</sup> Department of Gynecology and Obstetrics and Reproductive Medicine, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP), Sorbonne University, Paris, France

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Hormonology, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP), Sorbonne University, Paris, France

<sup>c</sup> Department of Nephrology, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP), Sorbonne University, Tenon Hospital, Paris, France

<sup>d</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, University of Geneva Hospitals (HUG), Geneva, Switzerland

<sup>e</sup> U1195 INSERM and University Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France

<sup>f</sup> U1036 INSERM, Biosciences and Biotechnology Institute, Grenoble, France

<sup>g</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Poissy-Saint Germain Hospital, Poissy, France

<sup>h</sup> Department of Clinical Research Center-Est (URCEST), St. Antoine Hospital, Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Angiogenesis  
Aromatase  
Estrogen  
Preeclampsia

### ABSTRACT

**Introduction:** Estrogens and progesterone play critical roles in angiogenesis and vasodilation. Moreover, placental aromatase deficiency is detected in women with preeclampsia (PE) at delivery. We hypothesized that abnormal steroidogenesis occurs much earlier than typical PE diagnosis. Thus, we investigated whether the circulating steroid profile was already disturbed at 24–29 weeks of gestation in women with subsequent PE, and compared the profile with that of women with “placental” small gestational age (SGA) without PE.

**Methods:** We selected nulliparous women (n = 90) from the MOMA trial, including women with PE (n = 25), SGA (n = 25), and controls (NP; n = 40), for plasma steroid profiling by gas chromatography/mass spectrometry and to measure placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1. Placental aromatase expression was evaluated in a new set of women.

**Results:** Compared with that of controls, the women with PE had a significantly lower estrone/androstenedione ratio, and exhibited a decreasing trend for estradiol and estrone levels. Lower estrone levels were observed in the SGA group compared to the NP group. Compared with that of controls, the women with PE and SGA had significantly higher levels of 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone (20 $\alpha$ -DHP) and 20 $\alpha$ -DHP/progesterone ratios. Pregnenolone sulfate levels were lower in the PE group than in the NP and SGA groups. Decreased expression of aromatase was observed in the PE group compared to the control group.

**Discussion:** Preeclampsia appears to be characterized by specific steroidogenesis dysregulation long before PE diagnosis, highlighting potential new biomarkers of PE.

### 1. Introduction

Preeclampsia (PE) is a placental disorder that causes maternal and fetal mortality worldwide [1,2]. Preeclampsia is mainly characterized by an imbalance between angiogenic and anti-angiogenic factors [3].

Although the contribution of these factors, such as placental growth factor (PlGF) and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1, also known as soluble fms-like tyrosine kinase-1 [sFlt1]), to the initial placental defect is debatable, their measurement in maternal blood has a potential for routine use in PE diagnosis [4–7].

**Abbreviations:**  $\Delta$ 4-ADIONE, androstenedione; 20 $\alpha$ -DHP, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; E2, estradiol; GC/MS, gas chromatography/mass spectrometry; hMR, human mineralocorticoid receptor; HPP, hydroprogesterone; HSD17B1, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; P4, progesterone; PE, preeclampsia; PlGF, placental growth factor; PregS, pregnenolone sulfate; SGA, small for gestational age; sFlt1, soluble fms-like tyrosine kinase-1; VEGFR1, vascular endothelial growth factor receptor 1.

\* Corresponding author. UNTR, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020, Paris, France.

Email address: alexandre.hertig@aphp.fr (A. Hertig)

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Present address: Department of Gynecology and Obstetrics, University of Geneva Hospitals (HUG), Geneva, Switzerland.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.07.004>

Received 5 February 2018; Received in revised form 3 July 2018; Accepted 6 July 2018

Available online xxx  
0143-4004/ © 2018.

Abnormal placental steroidogenesis has also been reported in women with PE [8–10]. In human and some non-human primate pregnancies, steroidogenesis takes place in the placenta and is characterized by a luteo-placental shift, which is complete before 9 weeks of gestation [11]. However, the human placenta lacks 17,20 lyase, which converts progesterone (P4) and pregnenolone into the estrogen precursors androstenedione ( $\Delta 4$ -ADIONE) and dehydroepiandrosterone (DHEA), respectively [12,13]. Therefore, estrogen synthesis relies on DHEA sulfate (DHEAS) produced in the fetal and maternal adrenal glands (Supplemental Figure 1) [12,13]. At the end of pregnancy, maternal blood concentrations of the most active estrogen, estradiol (E2), are 100-fold higher compared with those of non-pregnant women, reaching 30 nmol/L [14,15], whereas P4 levels are almost 100-fold higher than those during the luteal phase, reaching approximately 300 nmol/L at delivery [10,16].

Estrogens and P4 reduce systemic and uterine maternal blood pressure and increase uterine blood flow [17–19]. E2 also stimulates trophoblast proliferation and the differentiation of cytotrophoblasts into syncytiotrophoblasts [10,20,21]. Moreover, E2 and most of its metabolites, along with P4, promote uterine angiogenesis and endothelial cell migration and proliferation [10,19,22,23]. Interestingly, both E2 and P4 have pathways in common with VEGF and PlGF and directly or indirectly up-regulate VEGF, PlGF, and VEGFR-1 syntheses [10,18,24]. Some authors have postulated that E2 and P4 act through these angiogenic factors [25]. Aromatase (CYP19A) is a rate-limiting enzyme for estrogen biosynthesis, which converts  $\Delta 4$ -ADIONE into E1 in the placenta. Early blockade of estrogen synthesis by letrozole, a specific aromatase inhibitor, impairs new endometrial blood vessel growth in mice and represses numerous angiogenesis-related genes [26].

By gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), we previously identified impaired placental aromatization of androgens in women with PE at delivery, and a 50–70% decrease in serum E2, which correlated with disease severity [8]. These findings were independently confirmed by Jobe et al. [(9)] by liquid chromatography/mass spectrometry [8,9]. Recently, reduced placental aromatase expression and functionality were also detected in pregnancy with PE [27].

This background suggests that aromatase deficiency, leading to low estrogen levels, might modify both the angiogenic/anti-angiogenic balance and the uterine vasculature properties, thereby promoting the clinical features of PE. Accordingly, we hypothesized that PE is associated with specific steroidogenesis dysregulation, including an aromatase defect that could occur long before typical clinical signs leading to diagnosis. To test this hypothesis, in this study, we investigated (1) whether the maternal circulating steroid profile was already disturbed at 24–29 weeks of gestation in women with subsequent PE and (2) if this profile was specific to PE by comparing with that of a group with “placental” small for gestational age (SGA) without PE. Indeed, these conditions share common histopathologic placental findings but different clinical features [28]. For this purpose, we performed GC/MS-based steroid profiling in the plasma of three groups of women at 24–29 weeks of gestation classified by diagnosis at delivery: normal pregnancy (NP), PE, and SGA. The archived plasma from women included in the MORbiMortality Amelioration in preeclamptic nulliparas (MOMA) trial (NCT00763672, unpublished data) was used. The blood sampling period, i.e., 24–29 weeks of gestation, was chosen for the MOMA trial to allow the identification of both early (<34 weeks of gestation) [29] and late PE, while still early enough to propose interventions as necessary. In addition, protein and RNA levels of aromatase in the placenta were analyzed in a distinct set of two groups of women with or without PE.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study population

The study population consisted of the first 90 consecutive women included in the MOMA trial with completed files and final diagnoses (postpartum) of PE, SGA, or NP. No women presented with signs of PE during plasma sampling.

The MOMA trial was a randomized, controlled trial (NCT00763672) conducted from April 6, 2008 to April 20, 2011 to evaluate the effects of close monitoring of women identified to be at high risk of PE for maternal and fetal mortality and/or severe morbidity related to hypertension. In this single-center trial, 939 nulliparous women (no history of pregnancy > 22 weeks of gestation) with singleton pregnancy, aged  $\geq 18$  years, who were followed in our department before 29 weeks of gestation were enrolled. Furthermore, the women in the control group had normal pregnancy with at-term delivery and no maternal pathology and women with SGA did not present subsequent PE. Written informed consent for inclusion in the MOMA study was obtained from all participants, which included archiving plasma samples for future ancillary studies to assess non-genetic biomarkers for PE or SGA. The study protocol was approved by the ethics committee of protection of persons (Comité de Protection des Personnes (CPP)) Ile de France 1, Paris, France on May 7, 2008. The plasma specimens were requested prospectively from women before randomization at 24–29 weeks of gestation.

Preeclampsia was defined according to French definitions [30] as the onset of hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation; however, for the purpose of this study, we restricted the definition to the postpartum period for those presenting the signs of PE before hospital discharge. Hypertension was defined as a systolic or diastolic blood pressure of  $\geq 140$  or  $\geq 90$  mmHg, respectively, measured on two occasions at an interval of 4 h. Proteinuria was defined as  $\geq 300$  mg/L or  $\geq 300$  mg/day on two successive occasions [30].

“Placental” SGA was defined as a birth weight less than the 10th percentile, according to our reference curve, without fetal etiology of SGA (e.g., genetic, viral, and malformation) and in the context of suspected placental dysfunction, i.e., stunted fetal growth, decreased amniotic fluid volume, and/or abnormal uterine or umbilical Doppler, but no maternal signs of PE.

As the MOMA study design did not include placenta collection, we conducted a complementary study on women with PE and controls. This study was approved by the ethics committee in December 2013. All women included in the study provided written informed consent. We also randomly included archived samples from a collection of PE and control placentas to evaluate the placental expression of aromatase. The placental mRNA levels were assessed in 12 PE and 18 control samples, and the content of proteins was assessed in six PE and eight control samples.

### 2.2. Blood samples

Blood samples (10 mL) were collected at 24–29 weeks gestation, and plasma-ethylenediaminetetraacetic acid samples were stored at  $-40$  °C before analysis; sFlt1 analysis was performed at < 2 weeks from collection.

### 2.3. Analysis of angiogenic factors, GC/MS profiling, RNA isolation, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and western blotting

sFlt1 and PlGF assays, GC/MS steroid profiling, and gene and protein expression analyses were conducted according to the detailed protocols provided in the supplemental online methods. The GC/MS methods for steroid plasma levels were validated as previously described [8].

### 2.4. Statistical analyses

To detect a difference of one standard deviation (SD) in the PE or SGA group with a power of more than 90% and a two-sided type 1 error of 5%, 25 women in the PE and SGA groups and 40 in the control group were determined to be needed for this study.

Baseline study population characteristics are reported as frequencies and percentages for qualitative variables and as means (with SD) for continuous variables. PlGF, sFlt1, and steroid concentrations are presented as medians (with interquartile range). The normality of data distribution was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test; the majority of plasma steroid concentrations were not normally distributed. Therefore, statistical analysis was performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test for steroids, and comparisons of demographic characteristics generating  $P$  values  $< 0.05$  were considered significant. For pairwise comparisons, the data were analyzed using Mann-Whitney test for continuous variables or Fisher's exact test for categorical variables. *Post-hoc* Bonferroni adjustment was used as a correction for multiple

comparisons, in which  $P < 0.017$  was judged as significant. Spearman's test was used to analyze correlations between hormones, angiogenic/anti-angiogenic factors, and gestational age at sampling or delivery. The sFlt1/PlGF and E1/ $\Delta$ 4-ADIONE ratios were log transformed to achieve normality distribution. Receiver operating characteristic (ROC) plots were generated, and areas under the curve (AUC) were calculated to determine the predictive accuracy of markers for PE. The statistical significance of pairwise comparison between two AUCs was evaluated by the method of DeLong et al. Western blot data were evaluated by the one-way analysis of variance, followed by Holm-Šidák correction. For mRNA analysis, a multiple comparison versus control group test was used (Dunn's test). The data were checked for normality and equal variance (SigmaPlot, SigmaStat, Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1. Population study

Ninety women—40 NP, 25 with PE, and 25 with SGA—were included in this study. Baseline characteristics of the population and infant outcomes are presented in Tables 1 and 2. None of the pregnant women received corticosteroids before blood sampling, which occurred at a mean of 186 days of gestation in all three groups. Per the inclusion criteria, birth weight differed among the three groups. Diabetes and abnormal uterine artery Doppler were more frequent in the PE group, and tobacco use was more common in the SGA group. There was no significant difference in fetal sex among the three groups. Gestational age at delivery was significantly lower in the PE group.

**Table 1**  
Demographic and clinical characteristics.

	NP (n = 40)	PE (n = 25)	SGA (n = 25)	Kruskal Wallis $P$ value	Pairwise comparisons $P$ value
Maternal age (years)	27.9 $\pm$ 5.0	29.7 $\pm$ 4.9	28.0 $\pm$ 5.2	0.35	
Gravidity	1.25 $\pm$ 0.5	1.36 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.8	0.34	
Pre-gestational BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.9 $\pm$ 2.6	23.6 $\pm$ 4.0	21.6 $\pm$ 3.5	0.10	
Pre-gestational smoking	6 (15)	1 (4) <sup>a</sup>	10 (40)	0.0038	0.0046 <sup>a</sup>
Smoking during pregnancy	1 (2.5)	0 (0)	5 (20)	0.0086	NS
Gestational diabetes	0 (0)	5 (20) <sup>b</sup>	4 (16)	0.017	0.006 <sup>b</sup>
Gestational age at sampling (days)	186.2 $\pm$ 6.7	186.0 $\pm$ 7.7	186.6 $\pm$ 7.3	0.97	
Delay from blood sampling to PE (days)	NA	67.2 $\pm$ 30.5	NA		
Abnormal UAD	1 (2.5)	7 (28) <sup>b</sup>	5 (20)	0.012	0.004 <sup>b</sup>

NP, normal pregnancy; PE, preeclampsia; SGA, small for gestational age; UAD, uterine artery Doppler; NS, not significant; NA, not applicable. Values are expressed as means  $\pm$  SD. Categorical variables are reported as N (%). Continuous variables were compared among the three groups using the Kruskal-Wallis test. Fisher's exact tests were used to compare categorical variables between pairs of groups; pairwise comparisons were corrected using Bonferroni adjustment.

Statistical significance;  $P < 0.05$  for Kruskal Wallis test and  $P < 0.017$  after Bonferroni correction for pairwise comparisons.

<sup>a</sup> PE vs. SGA.

<sup>b</sup> PE vs. NP.

**Table 2**  
Infant outcomes for study participants.

	NP (n = 40)	PE (n = 25)	SGA (n = 25)	Kruskal Wallis $P$ value	Pairwise comparisons $P$ value
Mean Gestational age at delivery (days)	279.3 $\pm$ 7.2	256.6 $\pm$ 23.9 <sup>a</sup>	266.3 $\pm$ 15.6 <sup>b</sup>	$< 0.0001$	$< 0.0001$ <sup>a,b</sup>
Male	22 (55)	8 (33.3)	11 (45.8)	0.25	
Neonatal birthweight (g)	3324.8 $\pm$ 242.2	2531 $\pm$ 889.4 <sup>a</sup>	2406.8 $\pm$ 381.7 <sup>b</sup>	$< 0.0001$	$< 0.0001$ <sup>a,b</sup>
Low birthweight ( $< 2500$ g)	0	1 <sup>c</sup>	12 <sup>b</sup>	$< 0.0001$	$< 0.0001$ <sup>b</sup> 0.0008 <sup>c</sup>
Mean percentile birthweight	48.3 $\pm$ 17.7	25.6 $\pm$ 31.4 <sup>a,c</sup>	5.5 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>	$< 0.0001$	0.0002 <sup>a</sup> $< 0.0001$ <sup>b</sup> 0.0037 <sup>c</sup>
Birthweight $< 10$ th Percentile	0	16 <sup>a,c</sup>	25 <sup>b</sup>	$< 0.0001$	$< 0.0001$ <sup>a,b</sup> 0.0016 <sup>c</sup>

NP, normal pregnancy; PE, preeclampsia; SGA, small for gestational age. Values are expressed as means  $\pm$  SD. Categorical variables are reported as N (%). Comparisons of continuous and categorical variables among the three groups were performed using the Kruskal Wallis test. The Mann-Whitney test was used to compare continuous variables between pairs of groups. The Fisher's exact test was used to compare categorical variables between pairs of groups; pairwise comparisons were adjusted using Bonferroni adjustment.

Statistical significance;  $P < 0.05$  for Kruskal Wallis test and  $P < 0.017$  after Bonferroni correction for pairwise comparisons.

<sup>a</sup> PE vs. NP.

<sup>b</sup> SGA vs. NP.

<sup>c</sup> PE vs. SGA.

### 3.2. Angiogenic factors

Compared with those of the controls, the concentration of sFlt1 was significantly high in the PE and SGA groups ( $P < 0.002$  and  $P < 0.007$ , respectively), whereas the concentration of PlGF was low ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.005$ , respectively). The values in the PE and SGA groups were not significantly different (Supplemental Figure 2).

### 3.3. Estrogens

The maternal concentrations of E1 and E2 tended to be lower in the PE group than in the controls ( $P = 0.025$  and  $0.026$ , respectively). Moreover, E2 was significantly lower in the PE group than in the SGA group (Table 3 and Supplemental Figure 3). The 2-ME2 levels did not differ among groups. Further, the SGA group was characterized by significantly lower estriol (E3) level ( $-42\%$ ) compared with that of the NP group ( $P = 0.013$ ) (Table 3). There was a positive correlation be-

tween the percentile of birth weight and E3 level ( $r_s = 0.27$ ,  $P = 0.011$ ).

The E1/ $\Delta 4$ -ADIONE ratio was lower in the PE group than in the controls ( $P = 0.008$ ), suggesting low aromatase activity (Table 4). E2/testosterone level did not differ among the three groups ( $P = 0.058$ ). The E2/E1 ratio, reflecting 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (HS-D17B1) activity, did not differ among groups (Table 4). There was a strong positive correlation ( $r_s = 0.73$ ,  $P < 0.0001$ ) between E1 and E2 levels, underlining the strong dependence of E2 concentration on E1 concentration, its direct substrate (Fig. 2A).

### 3.4. Progestogens

There was no difference in P4 level among groups ( $P = 0.795$ ), whereas the concentrations of three 20 $\alpha$ -reduced metabolites of P4, 20 $\alpha$ -DHP, 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ 20 $\alpha$ -hexahydroprogesterone (HHP), and 3 $\beta$ 5 $\alpha$ 20 $\alpha$ -HHP, were higher in the PE group than in the controls ( $P < 0.0001$ ,  $0.0009$ , and  $0.014$ , respectively; (Table 3). The levels of 20 $\alpha$ -DHP and 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ 20 $\alpha$ -HHP were also higher in the SGA group compared with the

**Table 3**  
Plasma steroid profiling in groups with normal and complicated pregnancies.

Steroids	NP (n = 40)	PE (n = 25)	SGA (n = 25)	Kruskal Wallis P value	Mann Whitney P value
Median [IQR] ng/ml					
<b>C21</b>					
Pregnenolone	1.82 [1.49–2.29]	1.57 [1.16–1.91]	1.73 [1.18–2.07]	0.12	
Progesterone	51.70 [42.98–66.24]	57.88 [42.99–76.30]	53.77 [46.51–69.50]	0.79	
5 $\alpha$ -DHP	16.31 [12.66–21.08]	18.68 [10.72–30.85]	15.18 [8.82–20.91]	0.27	
20 $\alpha$ -DHP	73.62 [56.83–100.97]	115.76 [95.12–152.03] <sup>a</sup>	104.10 [68.4–136.87] <sup>b</sup>	0.0003	<0.0001 <sup>a</sup> 0.016 <sup>b</sup>
3 $\alpha$ -DHP	4.54 [3.20–6.44]	0.24 2.32–6.90]	4.38 [3.16–6.69]	0.93	
3 $\alpha$ 5-THP	4.61 [3.11–8.51]	4.94 [3.47–7.07]	5.12 [4.21–7.41]	0.69	
3 $\beta$ 5 $\alpha$ -THP	0.08 [0.05–0.15]	0.10 [0.07–0.17]	0.11 [0.06–0.14]	0.86	
3 $\alpha$ 5 $\beta$ -THP	7.45 [5.68–11.77]	6.66 [3.96–9.02]	7.12 [5.6–10.64]	0.66	
5 $\alpha$ 20 $\alpha$ -THP	2.1 [1.07–3.60]	2.39 [1.88–5.36]	2.57 [1.74–3.64]	0.42	
3 $\alpha$ 5 $\alpha$ 20 $\alpha$ -HHP	2.67 [1.79–4.16]	4.63 [3.43–7.62] <sup>a</sup>	3.60 [3.21–5.04] <sup>b</sup>	0.001	0.0009 <sup>a</sup> 0.0079 <sup>b</sup>
3 $\beta$ 5 $\alpha$ 20 $\alpha$ -HHP	0.36 [0.25–0.58]	0.55 [0.43–0.89] <sup>a</sup>	0.45 [0.37–0.77]	0.027	0.014 <sup>a</sup>
3 $\alpha$ 5 $\beta$ $\alpha$ 20 $\alpha$ -HHP	1.62 [1.03–2.59]	1.40 [1.06–2.37]	1.40 [0.96–1.90]	0.35	
16 $\alpha$ -OHP	0.96 [0.53–1.10]	0.73 [0.55–1.06]	0.93 [0.65–1.31]	0.61	
17 $\alpha$ -OHP	3.48 [2.58–4.59]	4.15 [2.60–6.08]	4.00 [2.41–5.80]	0.58	
20 $\alpha$ -DH-Preg	0.17 [0.12–0.24]	0.16 [0.12–0.24]	0.14 [0.9–0.22]	0.37	
17 $\alpha$ -OH-Preg	2.05 [1.20–3.23]	2.20 [1.35–3.83]	1.59 [1.34–2.50]	0.61	
DOC	0.07 [0.05–0.10]	0.05 [0.04–0.09]	0.07 [0.04–0.12]	0.41	
3 $\alpha$ 5 $\alpha$ THDOC	0.68 [0.56–0.90]	0.77 [0.65–1.23]	0.70 [0.59–1.04]	0.49	
Corticosterone	3.13 [2.44–4.17]	2.99 [1.97–5.35]	3.75 [2.50–5.83]	0.54	
Cortisone	15.07 [9.65–19.23]	16.63 [8.05–20.34]	15.05 [11.37–17.04]	0.88	
11-deoxycortisol	0.50 [0.26–0.93]	0.33 [0.12–0.86]	0.43 [0.15–0.64]	0.23	
Cortisol	94.78 [80.42–113.94]	95.61 [76.51–124.28]	95.45 [79.51–114.37]	0.96	
<b>Steroid sulfates</b>					
PregS	50.37 [38.61–76.97]	24.02 [18.5–41.92] <sup>a</sup>	47.04 [33.89–66.35] <sup>c</sup>	<0.0001	<0.0001 <sup>a</sup> 0.0034 <sup>c</sup>
DHEAS	1633.30 [1142.1–2222.0]	1139.80 [503.80–1943.10]	1433 [1057.8–1957.4]	0.13	
<b>C19</b>					
Testosterone	0.32 [0.16–0.44]	0.42 [0.22–0.83]	0.24 [0.18–0.35]	0.26	
Androstenedione	0.49 [0.36–0.80]	0.86 [0.39–1.12]	0.60 [0.44–1.07]	0.21	
Androstenediol	0.10 [0.08–0.17]	0.15 [0.06–0.18]	0.11 [0.08–0.27]	0.98	
DHEA	1.32 [0.96–1.61]	1.00 [0.81–2.19]	1.35 [1.07–1.84]	0.64	
5 $\alpha$ -DHT	0.05 [0.01–0.12]	0.02 [0.01–0.09]	0.02 [0.01–0.09]	0.47	
Etioc lanolone	0.03 [0.02–0.05]	0.03 [0.01–0.05]	0.04 [0.02–0.05]	0.89	
<b>C18</b>					
Estrone	5.16 [3.00–7.15]	3.41 [1.67–4.54] <sup>a</sup>	5.68 [3.46–7.16]	0.045	0.025 <sup>a</sup>
Estradiol	6.08 [4.37–7.75]	4.97 [3.34–5.95] <sup>a,c</sup>	6.56 [5.00–7.39]	0.029	0.026 <sup>a</sup> 0.014 <sup>c</sup>
Estriol	2.28 [1.36–3.43]	1.48 [0.69–2.19]	1.39 [0.86–2.20] <sup>b</sup>	0.020	0.014 <sup>b</sup>
Estetrol	0.24 [0.05–0.87]	0.07 [0.04–0.27]	0.10 [0.03–0.15]	0.076	
2-ME2	0.68 [0.38–1.34]	0.76 [0.45–1.01]	0.94 [0.59–1.26]	0.42	

NP, normal pregnancy; PE, preeclampsia; SGA, small for gestational age; DHP, dihydroprogesterone; THP, tetrahydroprogesterone; HHP, hexahydroprogesterone; DHT, dihydrotestosterone; Preg, pregnenolone; DOC, Deoxycorticosterone; PregS, pregnenolone sulfate; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -THDOC, 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ -tetrahydrodeoxycorticosterone; 2-ME2, 2-methoxyestradiol; IQR, interquartile range. Results are presented as medians [IQR]. Comparisons of continuous variables among groups were performed using the Kruskal-Wallis test. Pairwise comparisons were performed using the Mann-Whitney test with Bonferroni adjustment.

Statistical significance:  $P < 0.05$  for Kruskal-Wallis test and  $P < 0.017$  after Bonferroni correction for pairwise comparisons. Values in italics indicate a trend toward significance.

<sup>a</sup> PE vs. NP.

<sup>b</sup> SGA vs. NP.

<sup>c</sup> PE vs. SGA.



**Table 4**  
Activity of the main placental enzymes involved in steroidogenesis in the NP, PE, and SGA groups.

Enzyme activity	NP (n = 40)	PE (n = 25)	SGA (n = 25)	Kruskal-Wallis P value	Mann-Whitney P value
Sulfatase	0.0009	0.001	0.0009	0.901	
DHEA/DHEAS	(0.0006–0.001)	(0.0007–0.002)	(0.0005–0.001)		
HSD3B1	0.36	0.53	0.38	0.314	
$\Delta 4$ -ADIONE/DHEA	(0.25–0.63)	(0.27–1.10)	(0.30–0.68)		
Aromatase	1.30	0.99 <sup>a</sup>	1.45	0.021	0.008 <sup>a</sup>
E1/ $\Delta 4$ -ADIONE	(0.93–1.77)	(0.77–1.75)	(0.98–2.05)		
HSD17B1	1.18	1.18	1.07	0.418	
E2/E1	(0.90–1.62)	(0.90–1.62)	(0.88–1.77)		
20 $\alpha$ -HSD	1.40	2.22 <sup>a</sup>	1.85 <sup>b</sup> (1.47–2.49)	< 0.0005	< 0.0003 <sup>a</sup> 0.0065 <sup>b</sup>
20 $\alpha$ -DHP/P4	(1.15–1.86)	(1.55–2.67)			

NP, normal pregnancy; PE, preeclampsia; SGA, small for gestational age; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; HSD, hydroxysteroid dehydrogenase;  $\Delta 4$ -ADIONE, androstenedione, E2, estradiol; E1, estrone; DHP, dihydroprogesterone; P4, progesterone. Comparisons of continuous variables among groups were performed using the Kruskal-Wallis test. Pairwise comparisons were performed using the Mann-Whitney test with Bonferroni adjustment.

Statistical significance:  $P < 0.05$  for Kruskal-Wallis test and  $P < 0.017$  after Bonferroni correction for pairwise comparisons.

<sup>a</sup> PE vs. NP.

<sup>b</sup> SGA vs. NP.

control values ( $P = 0.016$  and  $0.008$ , respectively; Table 3). The activity of 20 $\alpha$ -HSD, reflected in the 20 $\alpha$ -DHP/P4 ratio, increased in the PE and SGA groups compared with the control values ( $P < 0.0003$  and  $< 0.0065$ , respectively; Table 4).

### 3.5. Ratio of estrogens to progestogens

Compared with that in the control group, the (E1 + E2 + E3)/20 $\alpha$ -DHP ratio was substantially decreased in women with PE ( $P < 0.0001$ ). The ROC curves of (E1 + E2 + E3)/20 $\alpha$ -DHP, sFlt1/PlGF, E1/ $\Delta 4$ -ADIONE and 20 $\alpha$ -DHP/PROG for the prediction of PE are presented in Fig. 1 A; pairwise comparisons of AUCs were performed, and no significant differences were identified except for (E1 + E2 + E3)/20 $\alpha$ -DHP and sFlt1/PlGF ratios.

### 3.6. Adrenal products and androgens

A comparison of the levels of all corticosteroids among groups indicated no significant differences. The concentration of pregnenolone sulfate (PregS) was lower in the PE group than that in the control and SGA groups ( $P < 0.0001$  and  $0.003$ , respectively). The concentration of androgen was comparable between groups, including  $\Delta 4$ -ADIONE, the precursor of E1 (Table 3 and Supplemental Figure 3).

The activities of sulfatase and  $\beta$ 3-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes, reflected in the DHEA/DHEAS and  $\Delta 4$ -ADIONE/DHEA ratios, respectively, were comparable among groups (Table 4).

### 3.7. Correlations between angiogenic and anti-angiogenic factors and steroids

We found a negative weak correlation between the sFlt1/PlGF ratio and aromatase activity expressed by the E1/ $\Delta 4$ -ADIONE ratio ( $r_s = -0.270$ ,  $p = 0.0126$ ) (Fig. 1 B) and between the sFlt1/PlGF ratio and PregS, DHEAS, E1, and E2 (data not shown). We also observed moderate or weak positive correlations between sFlt1 or sFlt1/PlGF and 20 $\alpha$ -DHP and P4 metabolites, and between PlGF and PregS, E2, E1, E1/ $\Delta 4$ -ADIONE ratio, and DHEAS. Weak negative correlations were observed between PlGF and P4 metabolites and between sFlt1 and PregS, DHEAS, E1/ $\Delta 4$ -ADIONE ratio, E1, and E2 (data not shown).

### 3.8. Correlations between main steroids and gestational age at delivery

We found no correlation between  $\Delta 4$ -ADIONE or E1 levels and gestational age at delivery; however, E2 level positively correlated with

gestational age at delivery ( $r_s = 0.22$ ,  $p = 0.037$ ) and 20 $\alpha$ -DHP level negatively correlated with gestational age at delivery ( $r_s = -0.357$ ,  $p = 0.0005$ ) (Fig. 2B and C).

### 3.9. Early and late PE

Comparison of early (<34 weeks of gestation;  $n = 6$ ) and late ( $n = 19$ ) PE groups indicated no significant differences in the concentrations of E1, E2, E3, 2-ME2,  $\Delta 4$ -ADIONE, E1/ $\Delta 4$ -ADIONE, P4, 20 $\alpha$ -DHP, 20 $\alpha$ -DHP/P4, 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ 20 $\alpha$ -HHP, 3 $\beta$ 5 $\alpha$ 20 $\alpha$ -HHP, or PregS.

### 3.10. Fetal sex and maternal steroid profile

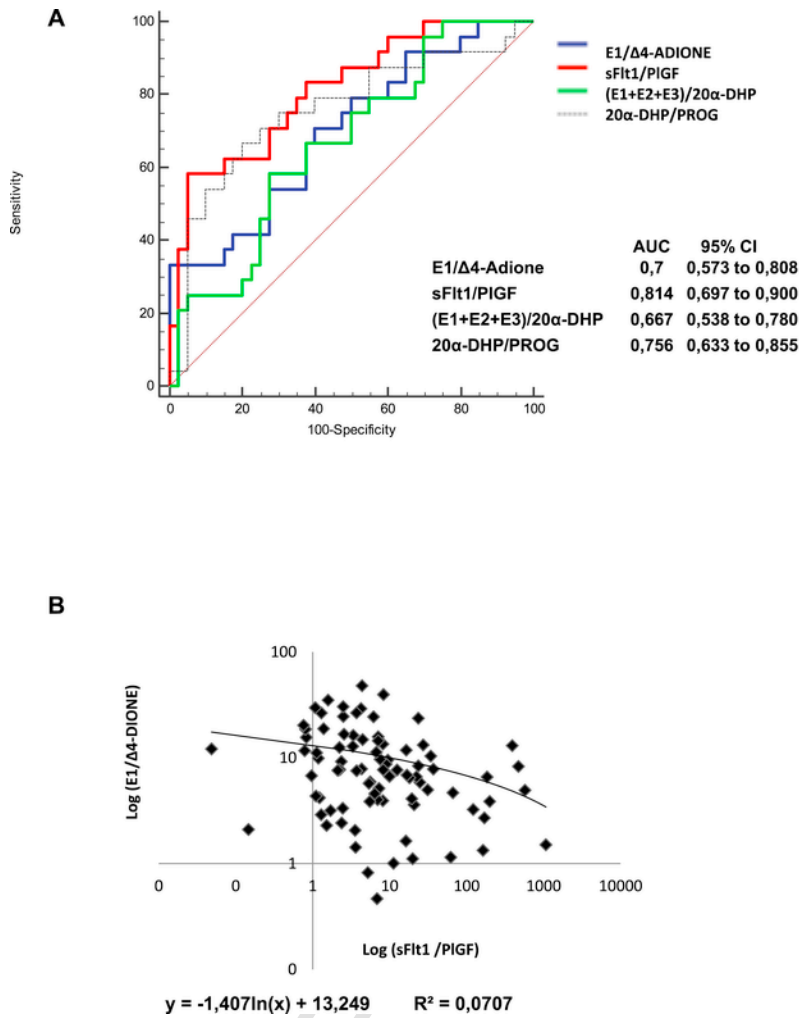
No significant differences in the concentrations of E1, E2, E3, estradiol (E4), 2-ME2, P4, 20 $\alpha$ -DHP, testosterone,  $\Delta 4$ -ADIONE, PregS, 3 $\alpha$ 5 $\alpha$ 20 $\alpha$ -HHP, or 3 $\beta$ 5 $\alpha$ 20 $\alpha$ -HHP were observed between pregnancies bearing female ( $n = 47$ ) and male ( $n = 41$ ) fetuses. Although there was no difference between controls and pregnancies bearing male fetuses in the PE group, the E1/ $\Delta 4$ -ADIONE ratio was lower in the PE group than in the NP group in pregnancies bearing female fetuses (4.89 [1.54–10.34] and 10.33 [4.52–19.03], respectively;  $P = 0.032$ ).

### 3.11. Reduced expression of CYP19A1 in preeclamptic placentas

To investigate the mechanism underlying the decreased aromatization of androgens in PE, we assessed aromatase (CYP19A) protein and transcript expression in placental samples from a new set cohort of women with PE ( $n = 12$ ) and controls ( $n = 18$ ). RT-qPCR analysis demonstrated significantly lower CYP19A1 transcript levels in PE placentas compared with those of normal pregnancies ( $P = 0.009$ ). RPL13a (Fig. 3A) were used to standardize the expression of CYP19A1. In our cohort, RPL13a was more stable than 18S rRNA and GAPDH (data not shown). The western blot analysis showed a significant decrease in CYP19A protein expression in women with PE compared with that in the controls (Fig. 3B and C;  $P = 0.001$ ). Ponceau S staining was used to standardize the loading for western blots.

## 4. Discussion

Our data suggest a specific decrease in aromatase activity at 24–29 weeks gestation in women who subsequently presented with PE. Conversely, low E3 levels were found in the group of women who presented with SGA without PE. Moreover, both the PE and SGA groups were characterized by abnormal P4 metabolism with excess of 20 $\alpha$ -reduced metabolites. We also found that the PlGF and sFlt1 levels corre-



**Fig. 1.** (A) Receiver operating characteristic (ROC) curves to predict preeclampsia. The ROC curves comparing the sFlt1/PIGF ratio (red line), the (E1 + E2 + E3)/20α-DHP ratio (green line), the E1/Δ4-ADIONE ratio (blue line) and the 20α-DHP/Progesterone (PROG) to accurately predict pregnancy complication by preeclampsia. AUC, area under the curve. Pairwise comparisons of ROC curves showed no statistical differences between curves (data not shown) except for (E1 + E2 + E3)/20α-DHP and sFlt1/PIGF ratios (AUC mean difference 0.147 (0.075), p = 0.05). (B) Correlation between sFlt1/PIGF ratio and E1/Δ4-ADIONE (after log transformation). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

lated with steroid concentrations. Perez-Sepulveda et al. [27] demonstrated that a low E1/Δ4-ADIONE ratio detected a few weeks before delivery is associated with PE. However, to the best of our knowledge, our study is the first to report impaired aromatase activity and progesterone metabolism long before the clinical signs of PE.

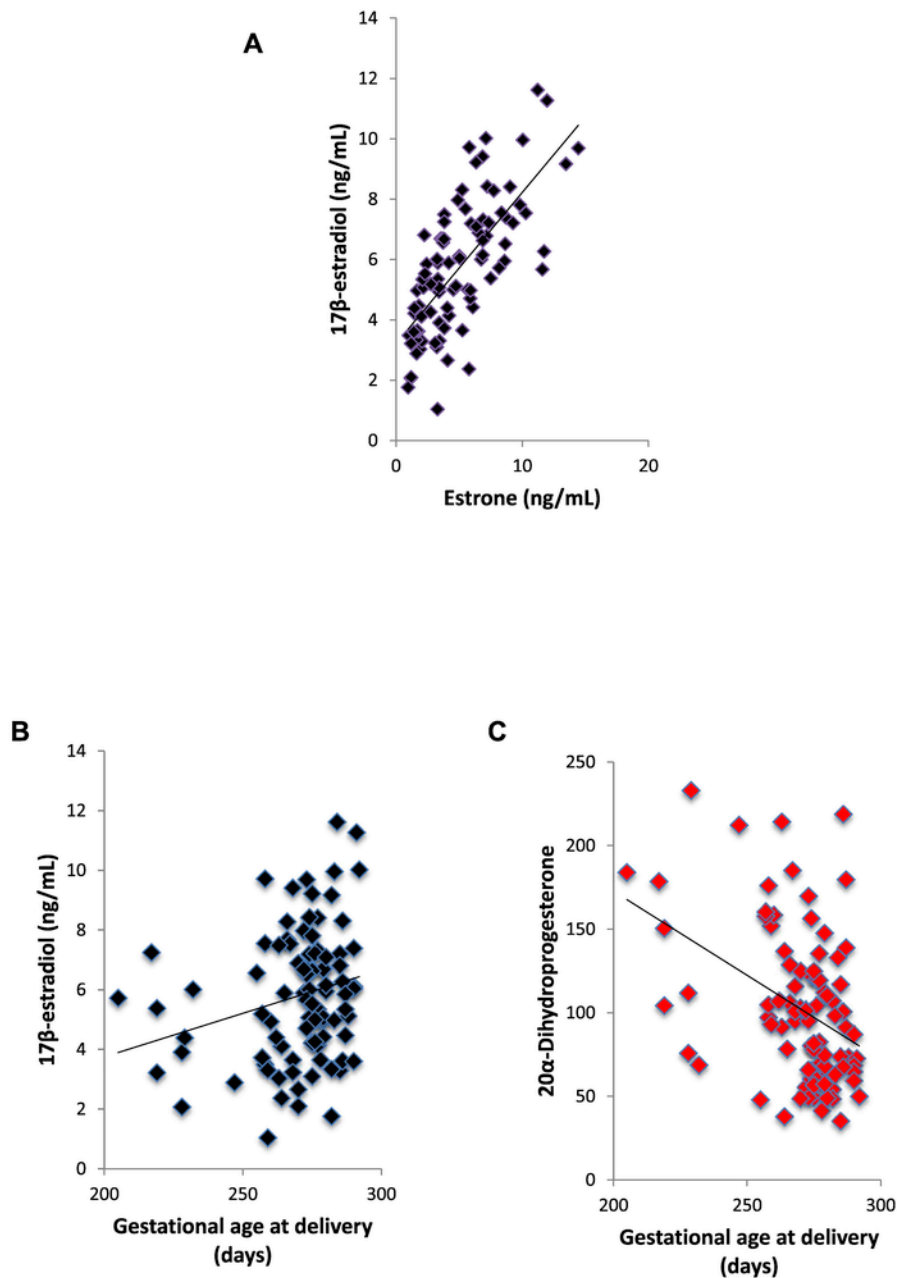
The specific decrease in the E1/Δ4-ADIONE ratio is the hallmark of aromatase activity impairment in PE. Thus, the E1/Δ4-ADIONE ratio is currently the most reliable marker to evaluate aromatase activity during pregnancy, as testosterone has a lower affinity for aromatase than for Δ4-ADIONE [31]. Moreover, the placenta does not express HSD17B3 [32]; thus, testosterone synthesis is not markedly increased during pregnancy. In the present study, similar E1/Δ4-ADIONE ratios were observed in early and late PE. This could be due to the limited size of the subgroups, but can also reflect the consequence of the early onset of aromatase dysfunction. Interestingly, we observed a low E1/Δ4-ADIONE ratio in the PE group only in pregnancies bearing female fetuses, suggesting that this ratio may be influenced by fetal sex. However, these findings conflict with those of a small study on placenta aromatase levels [33], and therefore require further evaluation in larger samples.

Although E1 and E2 levels tend to be reduced in PE at delivery [8,9,34–37], and low E2 levels are a marker of early delivery, we only

found a trend toward lower E1 and E2 levels in the present study based on the Bonferroni-corrected significance level. This lack of significance can also be due to the small sample size, as well as the large variation in estrogen levels and the early timing of estrogen measurements.

Only one research group has reported low HSD17B1 expression level in the placentas of women with PE (n = 8) along with reduced plasma HSD17B1 protein levels [38,39]. Conversely, the E2/E1 ratio did not differ among groups in our study, suggesting that HSD17B1 activity is not impaired in PE. Preeclampsia is a heterogeneous disorder; thus, such discrepancies can be due to the small sample sizes in both studies. Moreover, it has not been conclusively demonstrated that circulating enzyme levels accurately reflect enzyme activity. The strong correlation of E1 and E2 levels shown in our study suggests that lower levels of E2 are due to the decrease in its direct substrate E1 in PE.

Consistent with that of prior reports [27,40], we showed a decrease in placental aromatase expression at the RNA and protein levels at delivery in a small additional set of women with PE. Placental hypoxia may explain this lower aromatase expression via disruption of the cytotrophoblast to syncytiotrophoblast differentiation [41] and direct repression of aromatase expression [27]. However, as the women included in our SGA group had no aromatase activity defect, the aromatase deficiency cannot simply be reduced to the effects of placental



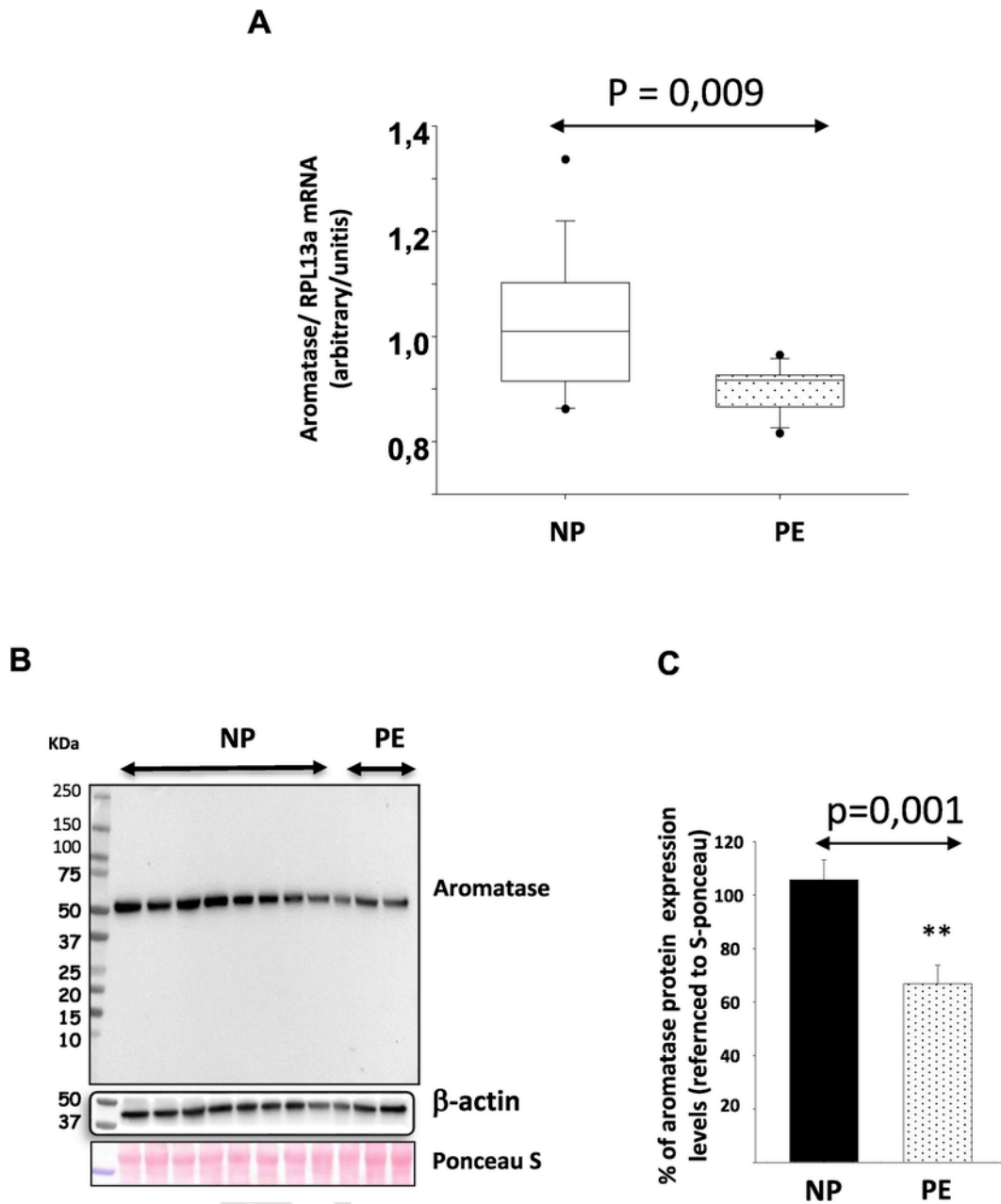
**Fig. 2.** (A) Correlation between estradiol and estrone levels. (B) Correlation between estradiol (24–29 weeks of gestation) and gestational age at delivery ( $r_s = 0.22$ ,  $p = 0.0037$ ). (C) Correlation between 20α-dihydroprogesterone (24–29 weeks of gestation) and gestational age at delivery ( $r_s = -0.3574$ ,  $p = 0.0005$ ).

hypoxia; thus, other potential research paths must be explored to elucidate this mechanism. An association between aromatase polymorphisms leading to low aromatase activity and PE has been reported [42]. Early downregulation of E2 in PE could be a factor leading to anti-angiogenic and vasoconstriction effects explaining specific clinical features of PE.

The SGA group showed reduced E3 levels. E3 is a marker of fetal adrenal and liver function, as 90% of E3 is produced from fetal adrenal-derived DHEAS through fetal liver-derived 16αOH-DHEAS [43]. Chronic fetal hypoxia may induce fetal liver and/or adrenal

glands dysfunction, leading to reduced production of fetal E3 precursors.

We did not find low 2-ME2 levels in the PE group, which is contrary with some previous reports [9,44–47]. However, to the best of our knowledge, only one study has showed a low 2-ME2 level during the first trimester [44], whereas the others have reported low 2-ME2 levels later in pregnancy, but only in cases of severe PE or with very early onset of PE [45–47]. Furthermore, two studies have showed low 2-ME2 levels at delivery in cases of mild and severe PE [9,46]. Given the low amounts of this E2 metabolite, future studies including well-



**Fig. 3.** Aromatase (CYP19A1) gene and protein expression in the placental samples from women with preeclampsia or normal pregnancy, assessed by the quantitative real-time PCR and western blotting, respectively. (A) The expression of aromatase mRNA between the controls and PE groups using RPL13a as the standardizing gene ( $p = 0.0009$ ). In this cohort, gestational age (GA) at delivery was lower in the women with PE ( $n = 12$ ) than in controls ( $n = 18$ ), ( $208.83 \pm 9.08$  days and  $238.06 \pm 7.91$  days respectively;  $P = 0.019$ ). (B) Representative western blot of controls vs. PE patients. In this cohort, gestational age (GA) at delivery was lower in the women with PE ( $n = 6$ ) than in controls ( $n = 8$ ) ( $235.5 \pm 7.39$  days and  $261.75 \pm 1.85$  days, respectively;  $P = 0.012$ ). The blot was standardized using both beta-actin and Ponceau S reagent. (C) Quantification of aromatase protein expression in controls and women with PE using Ponceau S for standardization ( $p = 0.001$ ).

validated techniques (GC or liquid chromatography-tandem mass spectrometry) with larger cohorts are necessary to clarify these results.

In our study, P4 levels did not differ among groups. Contradictory data on changes in P4 level in PE have been reported [37,49,50]. These discrepancies may be linked to methodological issues, as enzyme-linked immunoassay and radioimmunoassay are not completely reliable in separating P4 from its reduced metabolites, which are present at high levels during pregnancy.

Higher levels of 20 $\alpha$ -reduced metabolites of P4, particularly 20 $\alpha$ -DHP (the most abundant), were observed in the PE and SGA groups compared with those of the controls, and also appeared to be associated with early delivery. Conversion of P4 into 20 $\alpha$ -DHP by 20 $\alpha$ -HSD

occurs in the placenta, as well as in the kidney [51], and may regulate the local P4 levels, as 20 $\alpha$ -DHP has no affinity for P4 receptors [52]. The upregulation of 20 $\alpha$ -HSD observed in the present study is expected to be deleterious for the development and function of trophoblasts and vascular endothelial cells. P4 is antagonistic to the human mineralocorticoid receptor (hMR), leading to low blood pressure, while binding of 20 $\alpha$ -DHP to hMR results in partial agonistic activity [53]. Moreover, 20 $\alpha$ -DHP-mediated anti-aromatase effects in a breast cancer cell line and reduction of estrogen receptors in another cell line have also been described [53].

We further investigated whether the (E1 + E2 + E3)/20 $\alpha$ -DHP ratio can be a biomarker of PE using ROC curve analysis. Given the antago-

nistic effects of estrogens and 20 $\alpha$ -DHP, especially toward placental angiogenesis and vasodilation, this ratio was chosen to obtain the highest sensitivity as a potential biomarker of PE. The results demonstrated that the predictive properties of this ratio are lower to those of sFlt1/PlGF.

We observed significantly lower PregS levels and a moderate trend toward lower DHEAS levels in women with PE compared with those of the control and SGA groups, consistent with previous observations at delivery [8]. However, we currently do not have a clear explanation to account for the changes in this specific adrenal pathway, i.e., sulfotransferase downregulation, and its significance in PE, which require further investigations.

The use of extensive steroid profiling by a reliable, precise, and sensitive GC/MS [54] procedure to specifically distinguish all targeted stereoisomers is a strength of this study; however, our study has certain limitations that should be mentioned. First, as an observational study, a limited number of women were included, and PE is a well-known heterogeneous disorder with different pathogenic mechanisms, as shown in our study, with high variability of the angiogenic/anti-angiogenic results. Thus, our results must be confirmed in different and larger populations. Second, the groups were not fully comparable. In particular, tobacco use before pregnancy was high in the SGA group; however, this did not affect our conclusions, as the available data demonstrate that tobacco decreases aromatase activity [55]. In our evaluation of aromatase expression in the placenta, gestational age at delivery was high in the control group compared with that of the PE group, and aromatase expression increased during the third trimester [56]. Third, similar to other researchers [37], we collected the placenta samples from the central region, although recent recommendations [57] suggest performing multisite sampling to reduce bias due to the heterogeneous repartitioning of gene expression. Finally, our study relied on single blood sampling, which may have affected the results.

In conclusion, our data support a specific defect in the placental aromatization of androgens weeks before the onset of clinical symptoms of PE. Steroid profiling also revealed the upregulation of 20 $\alpha$ -HSD expression and reduced PregS levels. These preliminary findings suggest an urgent need for characterization of the schedule and magnitude of steroidogenesis dysregulation in women with PE by identifying candidate steroids and enzymes in larger cohorts, including longitudinal follow-up analysis. This is a key requirement to gain a better understanding of the pathophysiology of PE, and to propose a potential biomarker and provide new insights to develop new therapeutic strategies.

#### Conflicts of interest

None.

#### Disclosure

The authors report no conflict of interest.

#### Acknowledgments

The MOMA trial was supported by grants from the Contrat de Recherche Clinique, French Ministry of Health (CRC05143-P051060); the sponsor was Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP). The GC/MS analysis was supported by a 2012 grant from the Conseil Régional d'Île-de-France (CORDDIM, grant #cod120162). Alexandre Hertig is the recipient of an Interface contract with the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM). The study sponsors were not involved in the study design; had no role in the collection, analysis, or interpretation of the data; and were not involved in the decision to publish the findings.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.07.004>.

#### Uncited reference

[48].

#### References

- [1] K.S. Khan, D. Wojdyla, L. Say, A.M. Gülmezoglu, P.F.A. Van Look, WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review, *Lancet* 367 (9516) (2006) 1066–1074.
- [2] E.V. Kuklina, C. Ayala, W.M. Callaghan, Hypertensive disorders and severe obstetric morbidity in the United States, *Obstet. Gynecol.* 113 (6) (2009) 1299–1306.
- [3] S.A. Karumanchi, Angiogenic factors in preeclampsia: from diagnosis to therapy, *Hypertension* 67 (6) (2016) 1072–1079.
- [4] H. Stepan, I. Herraiz, D. Schlembach, S. Verlohren, S. Brennecke, F. Chantraine, E. Klein, O. Lapaire, E. Llubra, A. Ramoni, M. Vatish, D. Wertaschnigg, A. Galindo, Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice, *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 45 (3) (2015) 241–246.
- [5] S. Verlohren, I. Herraiz, O. Lapaire, D. Schlembach, H. Zeisler, P. Calda, J. Sabria, F. Markfeld-Erol, A. Galindo, K. Schoofs, B. Denk, H. Stepan, New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia, *Hypertension* 63 (2) (2014) 346–352.
- [6] H. Zeisler, M.O. Sator, E.A. Joura, Serum levels of progesterone in patients with preeclampsia, *Wien Klin. Wochenschr.* 112 (8) (2000) 362–364.
- [7] S. Rana, S.A. Karumanchi, M.D. Lindheimer, Angiogenic factors in diagnosis, management, and research in preeclampsia, *Hypertension* 63 (2) (2014) 198–202.
- [8] A. Hertig, P. Liere, N. Chabbert-Buffet, J. Fort, A. Pianos, B. Eychenne, A. Cambourg, M. Schumacher, N. Berkane, G. Lefevre, S. Uzan, E. Rondeau, P. Rozenberg, M.-E. Rafestin-Oblin, Steroid profiling in preeclamptic women: evidence for aromatase deficiency, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 203 (5) (2010) 477, e1–9.
- [9] S.O. Jobe, C.T. Tyler, R.R. Magness, Aberrant synthesis, metabolism, and plasma accumulation of circulating estrogens and estrogen metabolites in preeclampsia implications for vascular dysfunction, *Hypertension* 61 (2) (2013) 480–487.
- [10] N. Berkane, P. Liere, J.-P. Oudinet, A. Hertig, G. Lefevre, N. Pluchino, M. Schumacher, N. Chabbert-Buffet, From pregnancy to preeclampsia: a key role for estrogens, *Endocr. Rev.* 38 (2) (2017) 123–144.
- [11] P. Devroey, M. Camus, G. Palermo, J. Smits, L. Van Waesberghe, A. Wisanto, I. Wjbo, A.C. Van Steirteghem, Placental production of estradiol and progesterone after oocyte donation in patients with primary ovarian failure, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162 (1) (1990) 66–70.
- [12] R. Pion, R. Jaffe, G. Eriksson, N. Wiquist, E. Diczfalussy, Studies on the metabolism of C-21 steroids in the human fetoplacental unit. I. Formation of a beta-unsaturated 3-ketones in midterm placentas perfused in situ with pregnenolone and 17-alpha-hydroxyprogrenolone, *Acta Endocrinol.* 48 (1965) 234–248.
- [13] P.K. Siiteri, P.C. MacDonald, Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 26 (7) (1966) 751–761.
- [14] M. Levitz, B.K. Young, Estrogens in pregnancy, *Vitam. Horm.* 35 (1977) 109–147.
- [15] M. Abbassi-Ghanavati, L.G. Greer, F.G. Cunningham, Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians, *Obstet. Gynecol.* 114 (6) (2009) 1326–1331.
- [16] D. Tulchinsky, D.M. Okada, Hormones in human pregnancy. IV. Plasma progesterone, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121 (3) (1975) 293–299.
- [17] J. Shan, L.M. Resnick, Q.Y. Liu, X.C. Wu, M. Barbagallo, P.K. Pang, Vascular effects of 17 beta-estradiol in male Sprague-Dawley rats, *Am. J. Physiol.* 266 (3 Pt 2) (1994) H967–H973.
- [18] M.D. Mueller, J.L. Vigne, E.A. Pritts, V. Chao, E. Dreher, R.N. Taylor, Progesterins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells, *Fertil. Steril.* 79 (2) (2003) 386–392.
- [19] M. Maliqueo, B. Echiburú, N. Crisosto, Sex steroids modulate uterine-placental vasculature: implications for Obstetrics and neonatal outcomes, *Front. Physiol.* 7 (2016) 152.
- [20] A. Bukovsky, M.R. Caudle, M. Cekanova, R.I. Fernando, J. Wimalasena, J.S. Foster, D.C. Henley, R.F. Elder, Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant—comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cells, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1 (2003) 36.
- [21] A. Bukovsky, M. Cekanova, M.R. Caudle, J. Wimalasena, J.S. Foster, D.C. Henley, R.F. Elder, Expression and localization of estrogen receptor-alpha protein in normal and abnormal term placentae and stimulation of trophoblast differentiation by estradiol, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1 (2003) 13.
- [22] D.E. Morales, K.A. McGowan, D.S. Grant, S. Maheshwari, D. Bhartiya, M.C. Cid, H.K. Kleinman, H.W. Schnaper, Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model, *Circulation* 91 (3) (1995) 755–763.
- [23] D.W. Losordo, J.M. Isner, Estrogen and angiogenesis: a review, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (1) (2001) 6–12.

- [24] M.J. Cudmore, P.W. Hewett, S. Ahmad, K.-Q. Wang, M. Cai, B. Al-Ani, T. Fujisawa, B. Ma, S. Sissaoui, W. Ramma, M.R. Miller, D.E. Newby, Y. Gu, B. Barleon, H. Weich, A. Ahmed, The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis, *Nat. Commun.* 3 (2012) 972.
- [25] J.M. Stormont, M. Meyer, G. Osol, Estrogen augments the vasodilatory effects of vascular endothelial growth factor in the uterine circulation of the rat, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183 (2) (2000) 449–453.
- [26] A. Das, S.R. Mantena, A. Kannan, D.B. Evans, M.K. Bagchi, I.C. Bagchi, De novo synthesis of estrogen in pregnant uterus is critical for stromal decidualization and angiogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (30) (2009) 12542–12547.
- [27] A. Perez-Sepulveda, L.J. Monteiro, A. Dobierzewska, P.P. España-Perrot, P. Venegas-Araneda, A.M. Guzmán-Rojas, M.I. González, M. Palominos-Rivera, C.E. Irarrazabal, H. Figueroa-Diesel, M. Varas-Godoy, S.E. Illanes, Placental aromatase is deficient in placental ischemia and preeclampsia, *PLoS One* 10 (10) (2015), e0139682.
- [28] D.J. Roberts, M.D. Post, The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction, *J. Clin. Pathol.* 61 (12) (2008) 1254–1260.
- [29] P. von Dadelszen, L.A. Magee, J.M. Roberts, Subclassification of preeclampsia, *Hypertens. Pregnancy* 22 (2) (2003) 143–148.
- [30] N. Berkane, Définitions et conséquences des hypertension artérielles de la grossesse, *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 29 (3) (2010) e1–e6.
- [31] N. Yoshida, Y. Osawa, Purification of human placental aromatase cytochrome P-450 with monoclonal antibody and its characterization, *Biochemistry* 30 (12) (1991) 3003–3010.
- [32] H. Peltoketo, V. Luu-The, J. Simard, J. Adamski, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family: nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes, *J. Mol. Endocrinol.* 23 (1) (1999) 1–11.
- [33] K. Sathishkumar, M. Balakrishnan, V. Chinnathambi, M. Chauhan, G.D.V. Hankins, C. Yallampalli, Fetal sex-related dysregulation in testosterone production and their receptor expression in the human placenta with preeclampsia, *J. Perinatol.* 32 (5) (2012) 328–335.
- [34] G. Yin, X. Zhu, C. Guo, Y. Yang, T. Han, L. Chen, W. Yin, P. Gao, H. Zhang, J. Geng, J. Wang, L. Liang, Differential expression of estradiol and estrogen receptor  $\alpha$  in severe preeclamptic pregnancies compared with normal pregnancies, *Mol. Med. Rep.* 7 (3) (2013) 981–985.
- [35] S. Bussen, D. Bussen, Influence of the vascular endothelial growth factor on the development of severe pre-eclampsia or HELLP syndrome, *Arch. Gynecol. Obstet.* 284 (3) (2011) 551–557.
- [36] S.P. Salas, G. Marshall, B.L. Gutiérrez, P. Rosso, Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction, *Hypertension* 47 (2) (2006) 203–208.
- [37] S. Açıkgöz, U.O. Bayar, M. Can, B. Güven, G. Mungan, S. Doğan, V. Sümbüloğlu, Levels of oxidized LDL, estrogens, and progesterone in placenta tissues and serum paraoxonase activity in preeclampsia, *Mediat. Inflamm.* 2013 (2013) 862982.
- [38] O. Ishibashi, A. Ohkuchi, M.M. Ali, R. Kurashina, S.-S. Luo, T. Ishikawa, T. Takizawa, C. Hirashima, K. Takahashi, M. Migita, G. Ishikawa, K. Yoneyama, H. Asakura, A. Izumi, S. Matsubara, T. Takeshita, T. Takizawa, 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 (2) (2012) 265–273.
- [39] A. Ohkuchi, O. Ishibashi, C. Hirashima, K. Takahashi, S. Matsubara, T. Takizawa, M. Suzuki, Plasma level of hydroxysteroid (17- $\beta$ ) dehydrogenase 1 in the second trimester is an independent risk factor for predicting preeclampsia after adjusting for the effects of mean blood pressure, bilateral notching and plasma level of soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio, *Hypertens. Res.* 35 (12) (2012) 1152–1158.
- [40] X. Shao, Y. Liu, M. Liu, Y. Wang, L. Yan, H. Wang, L. Ma, Y.-X. Li, Y. Zhao, Y.-L. Wang, Testosterone represses estrogen signaling by upregulating miR-22: a mechanism for imbalanced steroid hormone production in preeclampsia, *Hypertension* 69 (4) (2017) 721–730.
- [41] B. Jiang, C.R. Mendelson, USF1 and USF2 mediate inhibition of human trophoblast differentiation and CYP19 gene expression by Mash-2 and hypoxia, *Mol. Cell Biol.* 23 (17) (2003) 6117–6128.
- [42] M. Shimodaira, T. Nakayama, I. Sato, N. Sato, N. Izawa, Y. Mizutani, K. Furuya, T. Yamamoto, Estrogen synthesis genes CYP19A1, HSD3B1, and HSD3B2 in hypertensive disorders of pregnancy, *Endocrine* 42 (3) (2012) 700–707.
- [43] R. Hampl, L. Starka, Minireview: 16 $\alpha$ -hydroxylated metabolites of dehydroepiandrosterone and their biological significance, *Endocr. Regul.* 34 (3) (2000) 161–163.
- [44] A. Pérez-Sepúlveda, M.J. Torres, F.J. Valenzuela, R. Larraín, H. Figueroa-Diesel, J. Galaz, J.K. Nien, R. Serra, L. Michea, S.E. Illanes, Low 2-methoxyestradiol levels at the first trimester of pregnancy are associated with the development of pre-eclampsia, *Prenat. Diagn.* 32 (11) (2012) 1053–1058.
- [45] K. Kanasaki, K. Palmsten, H. Sugimoto, S. Ahmad, Y. Hamano, L. Xie, S. Parry, H.G. Augustin, V.H. Gattone, J. Folkman, J.F. Strauss, R. Kalluri, Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyestradiol is associated with pre-eclampsia, *Nature* 453 (7198) (2008) 1117–1121.
- [46] M. Pertegal, F.J. Fenoy, M. Hernández, J. Mendiola, J.L. Delgado, B. Bonacasa, A. Corno, B. López, V. Bosch, I. Hernández, Fetal Val108/158Met catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and placental COMT activity are associated with the development of preeclampsia, *Fertil. Steril.* 105 (1) (2016) 134–143, e3.
- [47] Y. Zhang, T. Wang, Y. Shen, X. Wang, P.N. Baker, A. Zhao, 2-Methoxyestradiol deficiency is strongly related to hypertension in early onset severe pre-eclampsia, *Pregnancy Hypertens* 4 (3) (2014) 215–219.
- [48] Z. Shen, Y. Wu, X. Chen, X. Chang, Q. Zhou, J. Zhou, H. Ying, J. Zheng, T. Duan, K. Wang, Decreased maternal serum 2-methoxyestradiol levels are associated with the development of preeclampsia, *Cell. Physiol. Biochem.* 34 (6) (2014) 2189–2199.
- [49] S.W. Walsh, Progesterone and estradiol production by normal and preeclamptic placentas, *Obstet. Gynecol.* 71 (2) (1988) 222–226.
- [50] S. Luisi, F. Petraglia, C. Benedetto, R.E. Nappi, F. Bernardi, M. Fadalti, F.M. Reis, M. Luisi, A.R. Genazzani, Serum allopregnanolone levels in pregnant women: changes during pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (7) (2000) 2429–2433.
- [51] M. Quinkler, S. Johansen, C. Bumke-Vogt, W. Oelkers, V. Bähr, S. Diederich, Enzyme-mediated protection of the mineralocorticoid receptor against progesterone in the human kidney, *Mol. Cell. Endocrinol.* 171 (1–2) (2001) 21–24.
- [52] R.P. Piekorz, S. Gingras, A. Hoffmeyer, J.N. Ihle, Y. Weinstein, Regulation of progesterone levels during pregnancy and parturition by signal transducer and activator of transcription 5 and 20 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase, *Mol. Endocrinol.* 19 (2) (2005) 431–440.
- [53] M. Quinkler, B. Meyer, C. Bumke-Vogt, C. Grossmann, U. Gruber, W. Oelkers, S. Diederich, V. Bähr, Agonistic and antagonistic properties of progesterone metabolites at the human mineralocorticoid receptor, *Eur. J. Endocrinol.* 146 (6) (2002) 789–799.
- [54] D.J. Handelsman, L. Wartofsky, Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (10) (2013) 3971–3973.
- [55] Y. Osawa, B. Tochigi, M. Tochigi, S. Ohnishi, Y. Watanabe, K. Bullion, G. Osawa, Y. Nakabayashi, C. Yarborough, Aromatase inhibitors in cigarette smoke, tobacco leaves and other plants, *J. Enzym. Inhib.* 4 (2) (1990) 187–200.
- [56] T. Ishida, F. Seo, K. Hirato, T. Fukuda, T. Yanaihara, H. Araki, T. Nakayama, Changes in placental enzymatic activities in relation to estrogen production during pregnancy, *Nippon. Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 37 (4) (1985) 547–554.
- [57] G.J. Burton, H.-W. Yung, T. Cindrova-Davies, D.S. Charnock-Jones, Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia, *Placenta* 30 (Suppl A) (2009) S43–S48.

## **Discussion Globale**

# Discussion globale

## 9.1. Préambule

La prééclampsie est une pathologie qui survient spontanément au cours de la grossesse humaine mais aussi chez celles de quelques primates. D'autres mammifères dans le cadre de modèles animaux particuliers peuvent aussi présenter des syndromes « prééclampsie-like » (Podjarny et al., 2004; Fushima et al., 2016; Kanasaki et al., 2008). Cette maladie est l'objet de beaucoup d'attention car elle est une des premières causes de mortalité et de morbidité des mères et des nouveau-nés, alors même que sa/ses étiologie(s) et son traitement sont toujours inconnus. Le seul traitement curatif à la disposition des cliniciens est l'accouchement.

Les patientes identifiées comme à risque de prééclampsie bénéficient généralement d'un suivi rapproché et spécialisé avec une surveillance des pressions artérielles maternelles et des biométries fœtales, plus fréquente que lors d'un suivi de routine. Parmi les facteurs qui vont souligner le caractère à risque de la grossesse et rendre attentifs les cliniciens, l'antécédent de prééclampsie est un facteur primordial. Néanmoins la majorité des patientes qui présentent une prééclampsie sont nullipares (Khan et al., 2006) et à l'inverse la majorité des nullipares ayant une grossesse normale, on ne peut pas proposer un suivi rapproché à toutes les nullipares.

## 9.2. La balance des facteurs angiogéniques/antiangiogéniques

Des avancées prometteuses dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques ont souligné la présence d'une balance facteurs angiogéniques/antiangiogéniques perturbée et en particulier une surexpression du sFlt-1 et une diminution du PlGF (Maynard et al., 2003; Tsatsaris et al., 2004; Levine et al., 2004; Hertig et al., 2004; Stepan et al., 2015). Le



sFlt-1, en captant le VEGF et le PlGF, va promouvoir l'apparition des signes cliniques et rénaux de la prééclampsie (Maynard et al., 2003). Nous avons participé à cette avancée en mettant en évidence que la mesure du sFlt-1 pouvait être un biomarqueur de la prééclampsie car les taux s'élèvent de manière significative plusieurs semaines avant les signes cliniques (Hertig et al., 2004). La mise sur le marché de dosages automatisés, permettant un dosage rapide et fiable du sFlt-1 et du PlGF seul ou combiné, avec un rendu de résultat en moins de 30 minutes, est à l'origine d'une utilisation de plus en plus importante en routine. Les cliniciens commencent à les utiliser pour infirmer une prééclampsie devant un tableau suspect de prééclampsie (Stepan et al., 2015; Verlohren et al., 2014; Zeisler et al., 2016), mais aussi pour prédire un risque de prééclampsie à venir (Moore Simas et al., 2014). Nous avons voulu évaluer l'apport en pratique clinique de la mesure du sFlt-1 en milieu de grossesse (avant la survenue des signes cliniques de prééclampsie) sur l'issue des grossesses. Aucune étude interventionnelle de ce type n'a encore été publiée. Dans l'essai clinique réalisé, nous avons choisi la population spécifique des patientes nullipares. L'essai clinique MOMA était basé sur la connaissance ou non du résultat du dosage du sFlt-1 (qualitatif) effectué vers 26 SA chez les patientes incluses.

Un seul prélèvement était fait au cours de la grossesse. Le choix du moment du prélèvement a tenu compte des observations des études longitudinales antérieures qui avaient mis en évidence des concentrations significativement plus élevées dans le groupe prééclampsie comparé au groupe contrôle, dès 6 à 11 semaines avant les signes cliniques (Levine et al., 2004; Hertig et al., 2004). Nous avons donc choisi la période 24 - 29 SA qui permet à la fois de dépister la majorité des cas de prééclampsie précoce et tardive. L'intervention proposée aux femmes identifiées comme « à haut risque de prééclampsie » était un suivi rapproché. Celui-ci s'inscrit dans le sens des recommandations des sociétés

savantes (Milne et al., 2005; Redman, 2011b; American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013a), même si celles-ci ne sont pas uniformes.

**Tableau 7.** Rappel des Principaux résultats de l'essai MOMA.

<b>Rappel des Principaux résultats de l'essai MOMA</b>	
<b>Score composite présent</b>	<b>Groupe Intervention :</b> 51 (11%) <b>Groupe Contrôle :</b> 45 (9,7%) (ORajusté, 1,13; 95% CI: 0,73–1,73)
<b>Score composite présent (sous- groupe sFlt-1 4ème quartile, sFlt-1 : <math>\geq 2447,5</math> ng/L)</b>	(ORajusté, 0,65; 95% CI, 0,31–1,39)
<b>Pourcentage de femmes ayant un taux de sFlt-1 pathologique –au dessus du seuil choisi –</b>	<b>Groupe Intervention :</b> 84,2% <b>Groupe Contrôle :</b> 87,1%
<b>Seuil optimal plasmatiques du sFlt-1 plasmatique obtenu à partir des courbes ROC Pour distinguer les grossesses qui se compliqueront :</b>	<b>De PE : 3910 ng/L</b> sens. 36,8% (95% CI, 24,3–49,4%) et spéc. 92,5% (95% CI, 90,8–94,3%)  <b>D'un score composite présent : 3910 ng/L</b> sens. 31,2% (95% CI, 22,0–40,5%) et spéc. 93,2% (95% CI, 91,6–95,0%)
<b>Dopplers aux artères utérines (UAD)</b>	<b>Score composite présent</b> p<0,0001 <b>DU Anormaux :</b> 37,1% (13/35) <b>DU normaux :</b> 9,3% (83/893)  <b>L'issue de grossesse était une PE</b> p<0,0001 <b>DU Anormaux :</b> 34,3% (12/35) <b>DU Normaux :</b> 5,0% (45/893)

Il incluait un dépistage de l'hypertension artérielle et de la protéinurie et une échographie mensuelle d'évaluation de la croissance fœtale. Le suivi des pressions artérielles et de la protéinurie étaient basés sur des auto-mesures permettant une meilleure compliance et un

coût économique faible. Un score composite incluant des complications sévères maternelles et fœtales liées à l'hypertension gestationnelle nous permettait d'évaluer l'issue des grossesses. Nos résultats montrent que la connaissance par le clinicien d'un résultat anormalement augmenté de sFlt-1 en vue d'appliquer un suivi rapproché ne modifie pas l'issue des grossesses. Le pourcentage de complications dans le groupe contrôle au niveau attendu, la puissance suffisante de notre étude randomisée et le nombre faible de perdues de vue en rendent les conclusions pertinentes. Un point particulier de l'étude, suspecté pendant son déroulement et vérifié après la levée d'aveugle, était que bien que découlant de 2 séries précédentes, le seuil choisi de sFlt-1 (987 ng/L) était très bas. Afin de vérifier l'absence de biais induit par ce taux bas, nous avons calculé l'impact de la mesure du sFlt-1 dans le sous-groupe de femmes qui se situaient dans le dernier quartile de sFlt-1 (taux les plus élevés) et là encore, les issues de grossesse n'étaient pas significativement différentes entre le groupe contrôle et le groupe intervention.

Ce seuil bas a conduit plus de 80% des patientes à bénéficier d'un suivi rapproché dans le groupe intervention et de ce fait suggère que l'inefficacité de l'intervention proposée est la source la plus probable de l'absence d'amélioration des issues de grossesse.

Le seuil optimal du sFlt-1 discriminant le mieux les femmes qui vont faire ou ne pas faire une prééclampsie a été évalué à 3910 ng/L avec une sensibilité de 36,8% (95% CI 24,3 – 49,4%) et une spécificité de 92,5% (95% CI 90,8 – 94,3%). Le seuil optimal de sFlt-1 issue de l'étude MOMA semble corroboré par une autre étude, car il se situe au percentile 97.5 des références établies par Verlhoren et al (Verlhoren et al., 2014) à partir de 977 femmes présentant une grossesse normale et prélevée dans la période 24 SA – 29 SA .

Notre travail suggère l'absence d'intérêt du dosage du sFlt-1 à visée de prédiction de la prééclampsie car nous n'avons pas retrouvé de diminution significative des complications sévères maternelles et fœtales liées à une pathologie vasculaire de la grossesse. Cependant

nous n'avons pas dosé le PIGF plasmatique et nous sommes actuellement entrain d'évaluer si le ratio sFlt-1/PIGF n'a pas un apport très significativement supérieur pour l'identification des patientes. Néanmoins nos conclusions doivent s'entendre pour un suivi de patientes fait par des spécialistes en structure hospitalière. La même étude menée sur une population de femmes suivies par des soignants non spécialistes comme par exemple la première ligne de soignants prenant en charge les femmes enceintes au Royaume Uni, pourrait peut-être amener des résultats différents. Dans cette situation il n'est pas exclu que l'identification des femmes à risque pour proposer une prise en charge de la grossesse plus spécialisée pourrait améliorer le pronostic de ces grossesses. On se doit de rappeler que la mortalité maternelle liée aux pathologies hypertensives de la grossesse semble associée à des soins sub-optimaux (Schutte et al., 2008; Ghulmiyyah and Sibai, 2012).

Plus d'un tiers des cas de prééclampsie a été dépisté dans la période choisie avec le seuil optimal calculé. Le sFlt-1 pourrait être un biomarqueur intéressant pour prédire la prééclampsie. Le fait que les patientes avec issues sévères non dépistées dans notre étude par le sFlt-1 présentaient pour la très grande majorité d'entre elles (12/13) des tableaux d'hypertension et/ou de RCIU survenant tardivement dans la grossesse voire dans le postpartum, souligne l'intérêt de la répétition des tests pour dépister les prééclampsies les plus tardives comme déjà suggéré par d'autres auteurs (Stepan et al., 2015).

Le PIGF étant diminué au cours de la prééclampsie par captation par le sFlt-1 mais aussi par diminution de synthèse en situation d'hypoxie placentaire (Chen et al., 2004; Chiang et al., 2009), le ratio sFlt-1/PIGF pourrait être un meilleur biomarqueur (Verlohren et al., 2014). Il existe aussi la possibilité de ne doser que le PIGF (kit Triage PIGF (Alere)) avec obtention d'un résultat rapide (< 20 minutes), néanmoins la baisse physiologique du PIGF en fin de grossesse ne rend le test intéressant qu'avant 35 SA (Chappell et al., 2012).

En conclusion : nos résultats soutiennent l'idée d'une poursuite d'études longitudinales pour déterminer et confirmer les seuils prédictifs de sFlt-1, de PlGF, de ratio sFlt-1/PlGF, ainsi que la recherche d'autres biomarqueurs et de tester la fréquence nécessaire de répétition des tests (mensuels, bi-hebdomadaires ?). Par contre nous ne préconisons pas d'utilisation en routine de la mesure du sFlt-1 pour les patientes déjà suivies en milieu spécialisé, avant qu'une intervention efficace soit à disposition.

### **9.3. Les anomalies de la stéroïdogénèse**

La fonction des taux extrêmement élevés de stéroïdes au cours de la grossesse dans la régulation homéostatique est encore imparfaitement connue. Comme décrit plus haut (§ introduction, stéroïdogénèse), les oestrogènes et la progestérone favorisent la prolifération cellulaire, la néoangiogénèse et la vasorelaxation. Faire l'hypothèse qu'un défaut de stéroïdogénèse puisse intervenir dans la physiopathologie de la prééclampsie est donc une hypothèse de travail cohérente, déjà explorée il y a plusieurs décennies (Rahman et al., 1975; Thompson et al., 1977; Notation et al., 1977; Rosing et al., 1984; Zamudio et al., 1994). Cependant les anciens travaux sur l'évaluation des taux des stéroïdes au cours de la prééclampsie ont rapporté des résultats contradictoires et ont mis provisoirement de côté ce pan de la recherche. Il nous semble qu'une grande partie des difficultés d'interprétation rencontrées par nos prédécesseurs étaient liées aux techniques de mesures des stéroïdes RIA et ELISA qui ne sont pas spécifiques et posent le problème de réactions croisées. Ces techniques différencient mal la progestérone de la  $20\alpha$ -DHP par exemple (data du laboratoire) ou l'estradiol de ses métabolites. Les techniques de mesures fiables par GC/MS et LC/MS précédées d'une HPLC permettent une identification et une quantification de façon fiable et sur un même échantillon et devraient d'ailleurs à l'avenir être les seules techniques utilisées pour doser les stéroïdes dans le cadre publieur comme

recommandé (Handelsman and Wartofsky, 2013). Néanmoins le temps nécessaire aux dosages et leurs coûts sont de réels facteurs limitants. C'est en utilisant une technique de MS/MS précédée d'une HPLC que l'équipe de Kalluri (Kanasaki et al., 2008) a remis à l'ordre du jour la question de la place des oestrogènes dans la prééclampsie. La parution de cet article et la possibilité d'une collaboration avec le laboratoire de M. Schumacher (U1195, INSERM) spécialisé dans la mesure des stéroïdes par GC/MS ont conduit au travail de recherche que je présente ici. Dans le travail collaboratif initial qui précède cette thèse, un profil stéroïdien à l'accouchement chez des patientes avec grossesse normale ou compliquée de prééclampsie avait été réalisé. Nous avons dans un premier temps montré qu'à l'accouchement les concentrations d'estradiol étaient diminuées et nous avons suspecté que cela soit dû à un défaut d'aromatation (Hertig et al., 2010). Nous avons aussi retrouvé des taux bas de sulfate de prénénolone et de DHEA (Hertig et al., 2010). Des travaux publiés ultérieurement par d'autres équipes ont aussi rapporté des taux bas circulants d'estradiol et d'estrone à l'accouchement, mais également des taux bas au niveau du tissu placentaire. Un défaut d'aromatation était supposé.

J'ai donc voulu vérifier à partir de patientes issues de la cohorte MOMA, si on pouvait observer des anomalies de la stéroïdogénèse avant la survenue des signes cliniques de la prééclampsie. Aussi la deuxième partie de ce travail a porté sur l'étude de la stéroïdogénèse au cours de la prééclampsie. Dans un premier temps nous avons comparé les différents stéroïdes et nous avons retrouvé que i) l'estradiol et l'estrone avaient une tendance à la baisse dans le groupe PE versus le groupe contrôle, ii) la  $20\alpha$ -DHP était augmentée dans le groupe PE ainsi que dans le groupe RCIU versus le groupe contrôle iii) le sulfate de prénénolone était très significativement diminué chez les patientes qui allaient faire une PE et enfin iiiii) 2 autres métabolites de la progestérone ( $3\alpha,5\alpha,20\alpha$ -HHP et  $3\beta,5\alpha,20\alpha$ -HHP) avaient des concentrations plus élevées dans le groupe PE versus le groupe

contrôle. Le  $3\alpha5\alpha20\alpha$ -HHP présentait aussi des taux plus élevés dans le groupe RCIU versus le groupe contrôle.

**Tableau 8.** Rappel des Principaux résultats de l'étude du profil stéroïdien à 24-29 SA.

<b>Rappel des Principaux résultats de l'étude du profil stéroïdien à 24-29 SA</b>	
3 groupes de femmes (Grossesses normales, PE, RCIU ans PE)	
Statistique : correction de Bonferroni car 3 groupes comparés Signification $P < 0,017$	
<b>Oestrogènes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ <b>Ratio E1/<math>\Delta</math>4-Dione PE vs contrôles</b> <math>P = 0,008</math></li> <li>↓ <b>Tendance E1 et E2 PE vs contrôles</b> <math>P = 0,026</math></li> <li>↓ <b>Estriol RCIU vs contrôles</b> <math>P = 0,013</math></li> <li><b>Corrélation positive</b> entre E1 et E2 <math>r_s = 0.73</math>, <math>P &lt; 0,0001</math></li> </ul>
<b>Expression aromatase</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ <b>Expression de l'aromatase PE vs contrôles</b> ARNm <math>P = 0.009</math> Protéine <math>P = 0.001</math></li> </ul>
<b>Progestagènes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ <b>20alpha-DHP PE vs contrôles</b> <math>P &lt; 0,0001</math> <b>RCIU vs contrôles</b> <math>P = 0,016</math></li> <li>→ <b>Progestérone</b></li> <li>↑ <b><math>3\alpha5\alpha20\alpha</math>- HHP PE vs contrôles</b> <math>P = 0,0009</math> <b>RCIU vs contrôles</b> <math>P = 0,008</math></li> <li>↑ <b><math>3\beta5\alpha20\alpha</math>-HHP PE vs contrôles</b> <math>P = 0,014</math></li> <li>↑ <b>20<math>\alpha</math>-DHP/P4 ratio PE vs contrôles</b> <math>P &lt; 0,0003</math> <b>RCIU vs contrôles</b> <math>P = 0,0065</math></li> </ul>
<b>Précurseurs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ <b>Sulfate de Prégnénolone PE vs contrôles</b> <math>P &lt; 0,0001</math> <b>RCIU vs contrôles</b> <math>P = 0,003</math></li> </ul>

Si nous avons uniquement fait porter notre travail sur des mesures de stéroïdes spécifiques comme l'estradiol et l'estrone et quelques métabolites, nous aurions pu seulement décrire une grande dispersion des concentrations avec un rapport de 1 à 10, des tendances à la baisse mais nous n'aurions pas pu conclure à un défaut d'aromatase. D'autres équipes ont rapporté à l'accouchement des taux significativement bas d'estradiol et d'estrone (Salas et al., 2006; Bussen and Bussen, 2011; Jobe et al., 2013; Yin et al., 2013). Ces

auteurs ont attribué ces modifications hormonales à un défaut d'aromatation sans toutefois que le substrat ( $\Delta 4$ -Dione) soit doser pour infirmer un défaut de substrat.

La réalisation d'un profil stéroïdien large nous a permis, à la fois l'analyse des concentrations de nombreux stéroïdes sur un même échantillon, mais aussi, l'établissement de ratio produit/substrat qui donne une approche intéressante de l'expression/activité des enzymes impliquées. Le calcul du ratio E1/ $\Delta 4$ -Dione (aromatase) nous a permis de retrouver une baisse significative du ratio E1/ $\Delta 4$ -Dione dans le groupe prééclampsie comparé au groupe contrôle, suggérant un défaut d'aromatation chez les femmes qui présenteront une prééclampsie. Ces résultats sont confortés par ceux que nous avons déjà observés à l'accouchement (Hertig et al., 2010). Etonnamment alors qu'on souligne la présence d'un déficit en aromatase dans les grossesses avec prééclampsie, lors d'un déficit congénital en aromatase placentaire (pathologie rare de l'œuf, la transmission est autosomique récessive avec une prévalence  $< 1/1000\ 000$ ), où le placenta perd sa capacité d'aromatation, il est habituellement décrit un excès de virilisation maternelle et fœtale mais pas de prééclampsie (Hauri-Hohl et al., 2011; Bulun et al., 2014). Cette situation surprenante pourrait être expliquée par le fait que les androgènes retrouvent des capacités angiogéniques et de vasorelaxation lorsqu'il n'y a pas d'oestrogènes (Sieveking et al., 2010) et remplaceraient ainsi les oestrogènes pour ces fonctions.

Afin d'explorer le mécanisme de cette diminution d'aromatation une cohorte de patientes avec PE et avec grossesse normale a pu être mis en place et nous y avons adjoint des échantillons issus d'une autre banque de tissu placentaire. L'expression de l'aromatase placentaire, a été analysée par RT-qPCR et Western Blot. A partir d'échantillons placentaires issus de 30 grossesses (18 contrôles, 12 prééclampsies) nous avons observé une baisse de l'expression de l'aromatase placentaire corroborant d'autres travaux (Perez-Sepulveda et al., 2015). Ces auteurs ont montré que ce défaut d'expression serait la



conséquence de l'hypoxie placentaire (Perez-Sepulveda et al., 2015). Si l'expression placentaire avait été normale nous aurions étudié l'activité de l'aromatase. En effet, il a été décrit des diminutions possibles d'activité d'origine posttranscriptionnelle. Par contre comme il n'a pas été décrit de facteurs ou situations induisant une augmentation d'activité dans cette première approche nous n'avons pas testé l'activité de l'aromatase. Dans un second travail nous pourrions vérifier si le défaut d'expression ne s'associe pas aussi à un défaut d'activité. Deux publications d'une même équipe avaient souligné un défaut d'expression d'HSD17B1 dans les placentas de prééclampsie et une baisse de l'expression protéique en mesurant directement l'enzyme circulante (Ohkuchi et al., 2012; Ishibashi et al., 2012). Cette baisse d'expression pourrait être liée à une régulation négative du gène de la 17HSDB1 par miR-210 et miR-518c (Ohkuchi et al., 2012; Ishibashi et al., 2012), cependant que ce soit à l'accouchement (Hertig et al., 2010) ou vers 26 SA nous n'avons pas retrouvé de défaut d'expression de la HSD17B1 car le ratio E2/E1 n'était pas modifié. Nos résultats retrouvent par contre une corrélation entre les taux circulants d'estradiol et d'estrone suggérant que les taux d'estradiol sont à mettre en lien avec une baisse de l'aromatisation de l'androstènedione plutôt qu'à un défaut de l'HSD17B1. L'explication du défaut d'aromatisation observé dès 26 SA alors qu'il n'est pas montré de baisse significative d'estrone et d'estradiol, pourrait être la conséquence d'un défaut de puissance de notre étude, et/ou du fait que l'aromatisation est dépendante de l'âge gestationnel. Les taux d'estradiol augmentent tout au long d'une grossesse normale et particulièrement au 3<sup>ème</sup> trimestre, suivant ainsi l'activité de l'aromatase qui augmente elle aussi au 3<sup>ème</sup> trimestre (Ishida et al., 1985). De ce fait, il est probable que les conséquences d'un défaut d'aromatisation soient plus visibles en fin de grossesse.

Dans notre travail des taux d'estriol significativement bas ont été mis en évidence dans le groupe RCIU versus le groupe contrôle. L'estriol étant très majoritairement d'origine

fœtale via son précurseur fœtal le 16OH-SDHEA (le SDHEA est produit par les surrénales fœtales puis une 16 $\alpha$ -hydroxylation réalisée dans le foie fœtal) (**figure 15**), une baisse de l'estriol lors d'une pathologie fœtale de type RCIU paraît plausible. Il est à noter que nous n'avons pas observé de baisse de l'estriol dans le groupe prééclampsie. La littérature est quant à elle contradictoire avec une baisse (Jobe et al., 2013; Açıkğöz et al., 2013) ou une absence de modifications des taux d'estriol dans les groupes de patientes avec PE comparés aux groupes contrôles (Bussen and Bussen, 2011). Les poids et percentiles de poids fœtaux ne sont pas donnés dans les groupes PE rapportés par ces auteurs, il n'est pas impossible qu'une prévalence particulièrement élevée de RCIU dans certains groupes de patientes avec PE ait pu biaiser les résultats.

Dans notre population nous ne retrouvons pas de diminution du 2-ME<sub>2</sub>, que décrivent d'autres auteurs à l'accouchement (Kanasaki et al., 2008; Jobe et al., 2013) ou au 1<sup>er</sup> trimestre (Pérez-Sepúlveda et al., 2012). Les études dont la nôtre inclus un faible échantillon et nos résultats peuvent être la conséquence d'un problème de puissance. On remarquera que Jobe et al (Jobe et al., 2013) rapporte des concentrations diminuées du précurseur direct du 2-ME<sub>2</sub>, le 2OH-E<sub>2</sub> et que Perez et al. (Pérez-Sepúlveda et al., 2012) n'ont mesuré que le 2-ME<sub>2</sub>. Dans le travail de Kanasaki, le modèle murin utilisé se heurte au fait qu'il s'agit d'une anomalie génétique, censée induire des prééclampsies répétées, or dans la majorité des cas, la prééclampsie ne survient que lors de la première grossesse évolutive. Ces mêmes auteurs qui ont aussi mesuré le 2-ME<sub>2</sub> sur une petite population de femmes enceintes ont retrouvé des taux abaissés, concluant à un défaut de COMT sans avoir évalué les concentrations des précurseurs : estradiol et des catécholoestrogènes. Ils mettent en évidence une diminution d'expression de la COMT à partir de l'analyse des placentas sur un petit échantillon de patientes dont peu de données sont connues, en particulier l'âge gestationnel à l'accouchement (Kanasaki et al., 2008).

Dans notre étude nous n'avons pas observé de différences dans les concentrations de progestérone entre les différents groupes (PE, RCIU et contrôles). La littérature rapporte elle, des conclusions contradictoires (Salas et al., 2006; Walsh, 1988; Zamudio et al., 1994; Zeisler et al., 2000; Luisi et al., 2000). Ces données discordantes sont probablement la conséquence de l'utilisation de techniques utilisées non ou peu spécifiques. Un article plus récent utilisant la technique de GC/MS retrouve des taux abaissés de progestérone dans le groupe RCIU, mais comme nous, des taux inchangés dans le groupe PE (Pecks et al., 2016). Les concentrations de la 20 $\alpha$ -DHP au cours de la pré-éclampsie et l'augmentation de l'expression/activité de la 20 $\alpha$ -HSD n'ont jamais été évaluées précédemment, hormis dans notre précédente étude de profil stéroïdien à l'accouchement (Hertig et al., 2010), qui rapportait des taux de 20 $\alpha$ -DHP non significativement différents. La 20 $\alpha$ -DHP est le métabolite principal de la progestérone, elle peut se lier au récepteur de la progestérone, avec une affinité beaucoup plus faible que la progestérone (Ogle and Beyer, 1982) mais aussi au récepteur des minéralo-corticoïdes (Quinkler et al., 2002). La progestérone a une affinité plus importante que l'aldostérone pour le récepteur des minéralo-corticoïdes, et exerce une action antagoniste (Quinkler et al., 2002). La 20 $\alpha$ -DHP qui a une affinité pour le récepteur des minéralo-corticoïdes évaluée à 30% de celle de l'aldostérone, a un effet agoniste partiel favorisant ainsi la survenue d'une hypertension artérielle (Quinkler et al., 2002). Elle aurait de plus, des effets antiprolifératifs sur des lignées cellulaires de cancer du sein (Pasqualini and Chetrite, 2008; Wiebe et al., 2000). On peut donc considérer la 20 $\alpha$ -DHP, comme un métabolite progestatif ayant des effets totalement ou partiellement opposés à ceux de la progestérone et de l'estradiol. Ce métabolite pourrait ainsi participer à la survenue des signes cliniques de prééclampsie. Néanmoins d'autres travaux devront confirmer les modifications de concentration observées dans notre travail.

Nous avons dans ce travail également mis en évidence une baisse importante du sulfate de prégnénone renforçant les résultats déjà observés dans notre étude précédente menée à l'accouchement. Le placenta possède des sulfatases mais n'a pas de sulfotransférases, aussi le sulfate de prégnénone est d'origine surrénalienne maternelle. Cette baisse du sulfate de prégnénone pourrait être la conséquence d'un excès de conversion en SDHEA et/ou en progestérone. En effet, l'enzyme qui convertit le sulfate de prégnénone en SDHEA est la CYP450C17, dont l'expression peut être stimulée par le CRH (Smith et al., 1998), qui est lui-même augmenté au cours des grossesses compliquées de prééclampsie (Florio et al., 2004; Petsas et al., 2012; Helmo et al., 2016). Cet excès de conversion en SDHEA pourrait participer au maintien d'un taux suffisant d'oestrogènes. Le sulfate de prégnénone maternel étant également un précurseur de la progestérone (Hill et al., 2010b; Kaludjerovic and Ward, 2012), il existe possiblement une augmentation de la conversion en progestérone afin de maintenir les taux plasmatiques de progestérone malgré une conversion en  $20\alpha$ -DHP. La littérature est inexistante sur ce sujet, et l'étude du suivi longitudinal des profils stéroïdiens au cours de la grossesse pourrait être intéressante pour confirmer ces hypothèses et évaluer dans quel ordre se font les modifications.

La force de notre travail est d'avoir à la fois des résultats fiables liés à la technique de mesure utilisée, mais également d'avoir réalisé un profil large qui permet une approche de l'activité des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, en calculant les ratios produit/substrat de l'ensemble des étapes de la cascade de biosynthèse stéroïdienne. La connaissance de ces ratios est une aide à la compréhension de ce qui revient à un défaut de conversion ou à un défaut de substrat. Enfin, l'originalité de l'étude est la réalisation du profil stéroïdien avant les signes cliniques et sur une population de même parité. Toutefois, cette évaluation des taux d'hormones circulantes devrait idéalement s'interpréter avec une évaluation des voies de signalisation génomique et non génomique des stéroïdes. Les

données de la littérature sont très limitées dans ce champ d'investigation et il me paraît intéressant d'intégrer l'évaluation de l'expression des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone dans mes travaux à venir.

#### **9.4. Oestrogènes, progestagènes et physiopathologie de la prééclampsie**

##### **9.4.1. Oestrogènes et facteurs pro et anti-angiogéniques**

Une partie des effets de l'estradiol semble commune à celles du VEGF et du PlGF et emprunte des voies de signalisation identiques. Comme rapporté en introduction de ce manuscrit, l'estradiol favorise l'angiogenèse, la prolifération et la vasorelaxation ainsi que la synthèse de NO et la production de prostacycline. De la même manière, le VEGF et le PlGF induisent une synthèse de NO et une angiogenèse via la voie de signalisation du PI3K/Akt ainsi que via l'activation de c-fos et c-jun (Holmes and Zachary, 2004; Hou et al., 2013). Une boucle positive se crée car le NO produit va stimuler la synthèse de VEGF par les cellules endothéliales vasculaires (Kimura and Esumi, 2003). Le VEGF favorise la production de prostacycline (He et al., 1999), par contre le PlGF n'est que peu voire pas impliqué dans la synthèse de prostacycline (Holmes and Zachary, 2004; Cudmore et al., 2012). L'hypothèse est que la synthèse du NO et celle de la prostacycline liées à l'estradiol le soient partiellement via la stimulation du VEGF (Storment et al., 2000). D'ailleurs le gène du VEGF contient un variant ERE (Mueller et al., 2000) et peut donc être régulé par la fixation du couple estrogène/ER. De même le gène du VEGFR1 contient un ERE-LS et est donc sous influence des oestrogènes (Menendez et al., 2007). Les oestrogènes, notamment l'estradiol peuvent aussi réguler directement ou indirectement le PlGF et les récepteurs du VEGF et du PlGF (Johnson et al., 2006; Gargett et al., 2002). En effet une fois l'augmentation de l'expression du VEGF réalisée sous l'effet des oestrogènes (Shifren et al., 1996; Mueller et al., 2000; Bausero et al., 2000), celui-ci va à son tour induire

l'expression du PlGF et du VEGFR1 (Zhang et al., 2010). L'effet du VEGF sur l'expression du VEGFR2 est encore discutée, augmentée pour les uns (Hervé et al., 2006) et diminuée pour les autres (Zhang et al., 2010). Cependant l'estradiol semble augmenter l'expression de VEGFR2 dans les cellules endothéliales via son récepteur par un mécanisme dit de téthering (E $\alpha$ /Sp1) (Gargett et al., 2002).

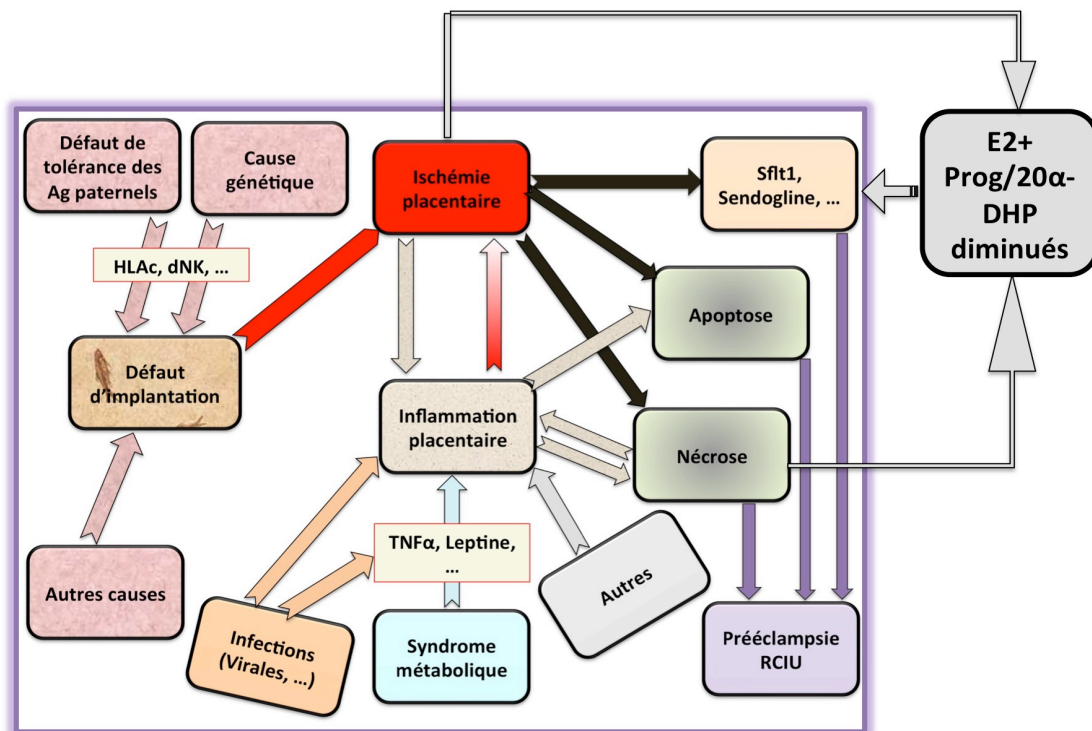
#### **9.4.2. Progestatifs et facteurs pro et anti-angiogéniques**

Tout comme l'estradiol, la progestérone a les mêmes effets de relaxation vasculaire et d'angiogenèse (Maliqueo et al., 2016). Une partie des effets de l'estradiol se fait via le VEGF et ses récepteurs et même si cela a été moins étudié, il semble en être de même pour la progestérone. Le gène du VEGF possède au moins 3 séquences PRE et il semble que la présence des 3 soit nécessaire pour que la progestérone, ou autres ligands agonistes, permettent une expression de VEGF optimale (Mueller et al., 2003). Cependant, l'absence de ces PRE ne bloque pas complètement l'expression de VEGF induite par la progestérone, faisant supposer la possibilité d'autres voies de régulation via des facteurs de transcription comme Sp1 ou AP-1, car le promoteur du gène du VEGF contient des sites Sp1 et AP-1 (Mueller et al., 2003). L'étude de l'endomètre de souris en tout début de gestation semble montrer que l'angiogenèse endométriale est sous la dépendance de la progestérone (Walter et al., 2005) via le VEGF et sa liaison au VEGFR2 (Boroujeni et al., 2016).

#### **9.4.3. Intégration de la « théorie » des oestrogènes et des progestatifs dans la physiopathologie de la prééclampsie**

La « théorie » des stéroïdes est d'autant plus séduisante qu'elle pourrait expliquer pourquoi la prééclampsie ne touche que les humains et quelques primates qui, contrairement aux autres mammifères, ont une stéroïdogénèse localisée dans le placenta et dépendante des

surrénales maternelles et fœtales pour la synthèse des oestrogènes. De plus cette « théorie » vient s'imbriquer dans le schéma des connaissances antérieures sans les contredire. Une proposition de séquence des événements au cours des prééclampsies précoces et tardives est proposée dans les figures 47 et 48. Dans la perspective illustrée par la figure 47, les anomalies de la synthèse des oestrogènes et du métabolisme de la progestérone auraient un rôle intermédiaire dans les mécanismes physiopathologiques de la prééclampsie. Elles seraient la conséquence entre autre de l'ischémie placentaire et du nombre réduit de STs lié à la nécrose cellulaire.



**Figure 47.** Physiopathologie incluant l'hypothèse du défaut d'aromatisation comme conséquence de l'ischémie et la nécrose placentaire.

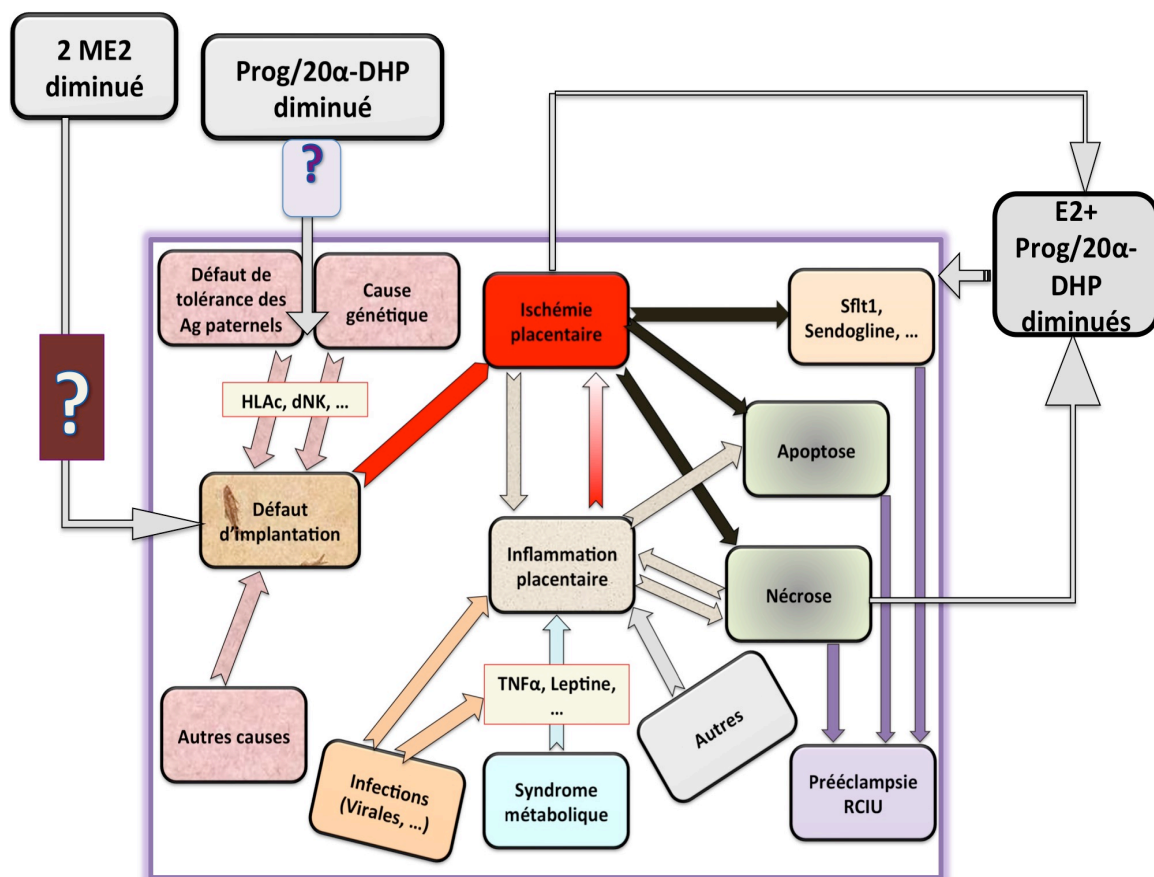
Prog : Progestérone.

Néanmoins, ce schéma ne répond pas complètement à la démonstration du travail de l'équipe de Kalluri, qui montre qu'un défaut de 2-ME2 initial peut induire la persistance de HIF-1 $\alpha$ , conduisant à une dysfonction de l'angiogenèse, qui conduira alors très précocément à une invasion superficielle (Kanasaki et al., 2008a; Perez-Sepulveda et al.,

2013). Une autre place est proposée aux anomalies de la synthèse et du métabolisme des oestrogènes, cette fois-ci plus causales que conséquences.

La progestérone, qui joue un rôle au cours de la grossesse normale dans la modulation de l'immunos tolérance maternelle nécessaire à une implantation de qualité, pourrait aussi jouer un rôle négatif en cas de synthèse insuffisante ou de métabolisme modifié (Robinson and Klein, 2012)(Druckmann and Druckmann, 2005) soulignant encore une potentielle place essentielle de l'ensemble des stéroïdes sexuels dans la physiopathologie de la PE.

Aussi la question d'une altération initiale de la stéroïdogénèse, à la base de toute la cascade qui va conduire à la prééclampsie peut être posée (**figure 48**).



**Figure 48.** Physiopathologie de la prééclampsie impliquant des anomalies précoces de la stéroïdogénèse.

Prog : Progestérone.

La réponse ne va pas être facile à obtenir, il faudrait prélever du plasma de femmes dès la conception et pendant les premières semaines de leur grossesse c'est à dire les prélever à



un moment où les femmes ne se savent pas encore enceintes. Les seules femmes dont on connaît le moment de conception sont les patientes bénéficiant d'une procréation médicalement assistée, mais elles, ne peuvent être incluses car leur taux hormonaux peuvent être artificiellement anormaux. Utiliser un modèle animal et déréguler la stéroïdogénèse très tôt dans la grossesse pourrait être l'approche la moins mauvaise. Cependant, seuls quelques primates possèdent les particularités de la stéroïdogénèse propre aux humains, soulignant l'inadaptation des modèles animaux murins classiques, mais le modèle de primate (heussner et al, 2016), possède d'importantes limites : maniabilité, coût et espèce protégée.

## Perspectives

J'envisage plusieurs axes de recherche dans la poursuite de ce travail:

### **10.1. MOMA**

La plasmathèque va être utilisée pour évaluer divers biomarqueurs de prééclampsie, seuls ou de manière combinée (collaboration en cours) avec l'équipe de Mme Nadia Alfaidy U1036 laboratoire de Biologie du Cancer et de l'Infection de Grenoble, pour le dosage de l'EG-VEGF et avec des partenaires de l'industrie (collaboration en cours).

### **10.2. Stéroïdes**

Les travaux futurs suivent 6 axes. En collaboration avec la Pr Marie Cohen responsable du laboratoire de biologie des tumeurs gynécologiques et du développement de l'Université de Genève, des demandes de fond ont été déposées afin de financer ce travail à venir (étude PreSter: Prééclampsie et Stéroïdes). Le protocole envisagé est le suivant, immédiatement après l'accouchement des placentas issus de grossesses normales ou compliquées de prééclampsie seront collectés. Un prélèvement sanguin afin d'obtenir un profil stéroïdien plasmatique sera aussi réalisé chez ces patientes lors de l'accouchement.

#### **10.2.1. Profil stéroïdien placentaire avec ou sans prééclampsie**

La littérature ne rapporte pas de travail identique déjà publié. Seuls, quelques stéroïdes ont été évalué dans ces conditions (Laatikainen et al., 1982; Açıkgoz et al., 2013). L'étude « aromatase » qui est un travail préliminaire a permis de tester la faisabilité technique en utilisant quelques échantillons placentaires. Ce travail a été interrompu par mon départ à l'étranger. Nous n'avions pas rencontré de difficultés particulières à

l'obtention d'un profil stéroïdien. Les prélèvements placentaires avaient été récupérés lors de cette étude en suivant une technique antérieurement décrite (Açıkgöz et al., 2013). Cependant pour réduire le risque d'hétérogénéité locale d'expression des gènes des prélèvements multisites sont vivement recommandés (Burton et al., 2009). C'est cette dernière technique que nous appliquerons pour les travaux ultérieurs.

### **10.2.2. Analyse de l'expression des enzymes impliquées**

Les expressions placentaires des ARN messagers de : l'aromatase, la CYP450scc, la HSD17B1, la HSD17B2, la HSD17B3, la HSD3B1, les 2- et 4- hydroxylases (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), la COMT, la stéroïde sulfatase et la 20 $\alpha$ -HSD seront déterminées par RT-qPCR. La quantification des protéines enzymatiques sera réalisée par technique de Western Blot. L'intérêt de ce travail est triple. Il pourrait permettre de i) confirmer les anomalies de la stéroïdogénèse décrites dans nos travaux antérieurs (Hertig et al., 2010) et l'article 3 de cette thèse (Berkane et al., 2018) ii) distinguer au niveau tissulaire les modifications d'expression ou d'activité des enzymes impliquées et enfin iii) pour ce qui concerne les précurseurs, faire la part entre des anomalies de synthèse/métabolisme d'origine placentaire et des anomalies en amont (surrénales par exemple).

### **10.2.3. Suivi longitudinal depuis le 1er trimestre jusqu'à l'accouchement**

Une récupération des tubes (de sérologie prélevés tout au long de la grossesse et de dépistage de la trisomie 21) qui sont légalement conservés au moins un an, sera réalisée pour les patientes incluses dans la cohorte PreSter. Cela permettra de décrire la séquence des modifications de la stéroïdogénèse et d'identifier une période d'apparition des anomalies. Lors de l'étude aromatase, j'ai été confronté à un problème de récupération des tubes sanguins lors du suivi longitudinal. Les patientes de la maternité de Poissy Saint

Germain en Laye réalisaient leur bilan biologique sur une large région (nombreux laboratoires) et il a été impossible de collecter les tubes des sérologies prélevés. La récupération des tubes de la cohorte genevoise sera plus aisée, car il y a peu de laboratoires d'analyse et les responsables des laboratoires déjà contactés sont favorables à une collaboration.

#### **10.2.4. Couplage profil stéroïdien placentaire et expression des ERs et PRs**

Une grande partie de l'action des stéroïdes passe par leur fixation à leurs récepteurs, aussi la connaissance i) de la présence localement et du type de récepteur, est nécessaire pour limiter le risque d'interprétation erronée des variations des concentrations en stéroïdes. Une quantification de l'expression de l'ARN messager placentaire des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone sera donc réalisée en parallèle du profil stéroïdien placentaire.

#### **10.2.5. Stéroïdes, sFlt-1 et PlGF : Synthèse in vitro en milieu hypoxique**

Après isolement de cytotrophoblastes issus de placentas avec prééclampsie ou grossesse normale (n = 10 dans chaque groupe) selon une technique précédemment publiée (Epiney et al., 2012), les cellules seront incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 96 h pour promouvoir la fusion et la différenciation en syncytiotrophoblastes. Le milieu de culture sera alors changé et les cellules seront incubées en présence de SDHEA dans un environnement normoxique (20% O<sub>2</sub>) ou hypoxique (6% O<sub>2</sub>) pendant 48 h. A la fin de la période d'incubation, le surnageant sera récupéré et centrifugé, i) les ARN messagers et les protéines seront extraits et conservés à -80°C jusqu'aux analyses (RT-qPCR et western blot), ii) le reste du surnageant sera congelé à -80°C jusqu'à l'analyse des profils stéroïdiens.

Les expressions placentaires des ARN messagers de : l'aromatase, la CYP450sc, la HSD17B1, la HSD17B2, la HSD17B3, la HSD3B1, les 2- and 4- hydroxylases (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), la COMT, la stéroïde sulfatase, et la 20 $\alpha$ -HSD seront déterminées par RT-qPCR. La quantification des protéines enzymatiques sera réalisée par technique de Western Blot.

#### **10.2.6. Essais thérapeutiques in vitro (estradiol, progestérone, 2-ME2).**

Les résultats de nos précédents travaux suggèrent que les taux d'estradiol sont abaissés au cours de la prééclampsie. Comme les estrogènes régulent en partie les facteurs angiogéniques/antiangiogéniques, nous faisons l'hypothèse qu'une diminution des concentrations d'estradiol modifie la balance sFlt-1/PlGF. Cette balance semble participer à la survenue des signes cliniques de la prééclampsie. Pour tester cette hypothèse nous allons doser le sFlt-1 et le PlGF dans le surnageant de culture de trophoblastes en situation de normoxie et d'hypoxie. Dans les cultures de CTs (§ 10.2.5), nous allons vérifier si l'adjonction d'estradiol ou de 2-ME2 dans le milieu de culture modifie les concentrations de sFlt-1 et PlGF dans le surnageant.

## Conclusion

La prééclampsie est une pathologie fréquente et potentiellement sévère pour la mère et le ou les enfant à naître. Son origine est placentaire, et pourtant l'ensemble des mammifères semble épargné et, cette pathologie sous sa forme spontanée est propre à l'espèce humaine. Elle complique le plus fréquemment la première grossesse évolutive. Sa physiopathologie est encore mal connue mais elle semble inclure un déséquilibre des facteurs angiogéniques et antiangiogéniques. Il n'existe pas de traitements curatifs hormis l'accouchement, mais il reste recommandé d'identifier précocement les femmes enceintes à risque de prééclampsie en vue d'améliorer leur issue de grossesse.

Nous avons voulu dans ce travail de recherche :

**1 - Tester l'impact sur l'issue de grossesse d'un dépistage de femmes à risque de PE par la mesure du sFlt-1 vers 26 SA.**

Notre essai interventionnel (MOMA) montre que plus d'un tiers des patientes nullipares qui vont faire une prééclampsie sont identifiées par un dosage unique de sFlt-1 à 26 SA. Cependant ce dépistage n'a pas diminué les complications sévères liées à l'hypertension dans notre population de femmes. Il semble que ce résultat négatif ne découle pas des limites du dépistage mais soit plutôt une conséquence du seul type d'intervention que l'on peut proposer, en l'occurrence, un suivi rapproché.

**2 - Décrire un profil stéroïdien réalisé vers 26 SA sur un échantillon de la population MOMA par technique de GC/MS dans un groupe de grossesses qui se compliqueront de prééclampsie comparé à un groupe avec RCIU sans prééclampsie et un groupe contrôle.**

Les résultats obtenus suggèrent que les prééclampsies sont marquées par un trouble de la stéroïdogénèse à type de défaut d'aromatisation, d'excès de 20 $\alpha$ -DHP et d'une diminution

du sulfate de prégnénone. Le défaut d'aromatation et la diminution du sulfate de prégnénone semblent spécifiques de la PE.

***3 – Souligner dans le cadre d'une revue de la littérature les liens étroits entre les stéroïdes sexuels et les facteurs angiogéniques/anti-angiogéniques.***

Nous suggérons que via les voies de signalisation des stéroïdes sexuels qui font intervenir les facteurs angiogéniques en particulier le VEGF, la dérégulation de la synthèse des stéroïdes pourrait participer à la survenue des signes cliniques de la prééclampsie.

Ces avancées, si elles sont confirmées, ouvrent de nouveaux champs thérapeutiques.

## Présentations à des congrès

### Société d'étude pour l'hypertension au cours de la grossesse (SEHTAG)

#### **Lyon, 23 Octobre 2014 :**

*Résultats des essais français: essai MOMA. N. Berkane, A. Hertig, G. Lefèvre.*

#### **Brest, 22 Octobre 2015 :**

*Estradiol et ses métabolites : Un biomarqueur de Prééclampsie. Dr N. Berkane, P. Lière.*

### Rencontres du Groupe de la Francophonie Placentaire.

#### **Genève, 19 Juin 2015 (4ème rencontre) :**

*Place du placenta dans la perturbation de la balance facteurs angiogéniques /antiangiogéniques au cours de la prééclampsie.*

#### **Grenoble, 7 Septembre 2017 (6ème rencontre) :**

*Anomalies de la stéroïdogénèse au cours de la prééclampsie. N. Berkane, P. Lière, A. Hertig, N. Chabbert-Buffet.*

### Société Française d'Endocrinologie

#### **Bordeaux, 5-8 Septembre 2016 :**

*Anomalies de la stéroïdogénèse au cours de la prééclampsie. A. Hertig, N. Berkane, P. Lière, N. Chabbert-Buffet.*



# Bibliographie

*Les références en italique précédées de \* sont : des revues, mises au point, opinion, ou recommandations,*

*les autres références sont des articles originaux.*

\*Abbassi-Ghanavati, M., Greer, L.G., and Cunningham, F.G. (2009). *Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. Obstet Gynecol 114, 1326–1331.*

\*Acconcia, F., Bocedi, A., Ascenzi, P., and Marino, M. (2003). *Does palmitoylation target estrogen receptors to plasma membrane caveolae? IUBMB Life 55, 33–35.*

Açıkgöz, S., Bayar, U.O., Can, M., Güven, B., Mungan, G., Doğan, S., and Sümbüloğlu, V. (2013). Levels of oxidized LDL, estrogens, and progesterone in placenta tissues and serum paraoxonase activity in preeclampsia. *Mediators Inflamm. 2013, 862982.*

\*ACOG (1996). *ACOG technical bulletin. Hypertension in pregnancy. Number 219--January 1996 (replaces no. 91, February 1986). Committee on Technical Bulletins of the American College of Obstetricians and Gynecologists. Int J Gynaecol Obstet 53, 175–183.*

Acosta-Sison, H. (1956). The relationship of hydatidiform mole to pre-eclampsia and eclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology 71, 1279–1282.*

\*Aitio, A. (1974). *UDPglucuronosyltransferase of the human placenta. Biochem. Pharmacol. 23, 2203–2205.*

\*Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P., and Shaw, J. (2006). *Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. Diabet. Med. 23, 469–480.*

Albiñana, V., Zafra, M.P., Colau, J., Zarrabeitia, R., Recio-Poveda, L., Olavarrieta, L., Pérez-Pérez, J., and Botella, L.M. (2017). Mutation affecting the proximal promoter of Endoglin as the origin of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *BMC Med. Genet. 18, 20.*

\*Albrecht, E.D., and Pepe, G.J. (1990). *Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. Endocr. Rev. 11, 124–150.*

Altomonte, M., Montagner, R., Fonsatti, E., Colizzi, F., Cattarossi, I., Brasoveanu, L.I., Nicotra, M.R., Cattelan, A., Natali, P.G., and Maio, M. (1996). Expression and structural features of endoglin (CD105), a transforming growth factor beta1 and beta3 binding protein, in human melanoma. *Br. J. Cancer 74, 1586–1591.*

Alvarez, A., Hermenegildo, C., Issekutz, A.C., Esplugues, J.V., and Sanz, M.-J. (2002). Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation. *Circ. Res. 91, 1142–1150.*

Amarasekara, R., Jayasekara, R.W., Senanayake, H., and Dissanayake, V.H.W. (2015). Microbiome of the placenta in pre-eclampsia supports the role of bacteria in the multifactorial cause of pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res. 41, 662–669.*

\*American College of Obstetricians and Gynecologists (2013a). *Hypertension in pregnancy (Washington, DC: American College of Obstetricians and Gynecologists).*

\**American College of Obstetricians and Gynecologists (2013b). Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. Obstet Gynecol 122, 1122–1131.*

\**American Diabetes Association (2004). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 27 Suppl 1, S5–S10.*

Arthur, H.M., Ure, J., Smith, A.J., Renforth, G., Wilson, D.I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D.V., Jowett, T., Marchuk, D.A., et al. (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev. Biol.* 217, 42–53.

Arts, J., Kuiper, G.G., Janssen, J.M., Gustafsson, J.A., Löwik, C.W., Pols, H.A., and van Leeuwen, J.P. (1997). Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology* 138, 5067–5070.

\**Askie, L.M., Duley, L., Henderson-Smart, D.J., Stewart, L.A., and PARIS Collaborative Group (2007). Antiplatelet agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data. Lancet 369, 1791–1798.*

Avallet, O., Vigier, M., Leduque, P., Dubois, P.M., and Saez, J.M. (1994). Expression and regulation of transforming growth factor-beta 1 messenger ribonucleic acid and protein in cultured porcine Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology* 134, 2079–2087.

Badran, Z., Struillou, X., Verner, C., Clee, T., Rakic, M., Martinez, M.C., and Soueidan, A. (2015). Periodontitis as a risk factor for systemic disease: Are microparticles the missing link? *Med. Hypotheses* 84, 555–556.

Barbara, N.P., Wrana, J.L., and Letarte, M. (1999). Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J. Biol. Chem.* 274, 584–594.

Barnea, E.R., MacLusky, N.J., and Naftolin, F. (1983). Kinetics of catechol estrogen-estrogen receptor dissociation: a possible factor underlying differences in catechol estrogen biological activity. *Steroids* 41, 643–656.

Barr, M.P., Byrne, A.M., Duffy, A.M., Condrón, C.M., Devocelle, M., Harriott, P., Bouchier-Hayes, D.J., and Harmey, J.H. (2005). A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *Br. J. Cancer* 92, 328–333.

Bausero, P., Ben-Mahdi, M., Mazucatelli, J., Bloy, C., and Perrot-Appianat, M. (2000). Vascular endothelial growth factor is modulated in vascular muscle cells by estradiol, tamoxifen, and hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, H2033-2042.

Bdolah, Y., Lam, C., Rajakumar, A., Shivalingappa, V., Mutter, W., Sachs, B.P., Lim, K.H., Bdolah-Abram, T., Epstein, F.H., and Karumanchi, S.A. (2008). Twin pregnancy and the risk of preeclampsia: bigger placenta or relative ischemia? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 198, 428.e1-428.e6.

Bdolah, Y., Elchalal, U., Natanson-Yaron, S., Yechiam, H., Bdolah-Abram, T., Greenfield, C., Goldman-Wohl, D., Milwidsky, A., Rana, S., Karumanchi, S.A., et al. (2014). Relationship between nulliparity and preeclampsia may be explained by altered circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1. *Hypertens Pregnancy* 33, 250–259.

\*Beato, M., and Klug, J. (2000). *Steroid hormone receptors: an update. Hum. Reprod. Update* 6, 225–236.

\*Beaufils, M. (2011). *Pré-éclampsie et risque cardiovasculaire ultérieur. La Revue de Médecine Interne* 32, S36–S40.

Beaufils, M., Uzan, S., Donsimoni, R., and Colau, J.C. (1985). Prevention of pre-eclampsia by early antiplatelet therapy. *Lancet* 1, 840–842.

Bellón, T., Corbí, A., Lastres, P., Calés, C., Cebrián, M., Vera, S., Cheifetz, S., Massague, J., Letarte, M., and Bernabéu, C. (1993). Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur. J. Immunol.* 23, 2340–2345.

\*Berg, A.H., and Scherer, P.E. (2005). *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. Circ. Res.* 96, 939–949.

\*Berkane, N. (2010). *Définitions et conséquences des hypertensions artérielles de la grossesse. Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 29, e1–e6.

\*Berkane, N., Liere, P., Oudinet, J.-P., Hertig, A., Lefèvre, G., Pluchino, N., Schumacher, M., and Chabbert-Buffet, N. (2017). *From pregnancy pregnancy to preeclampsia : a key role for estrogens. Endocr Rev.* 3, 123–144.

Berkane, N., Liere, P., Lefevre, G., Alfaidy, N., Nahed, R.A., Vincent, J., Oudinet, J.-P., Pianos, A., Cambourg, A., Rozenberg, P., et al. (2018). Abnormal steroidogenesis and aromatase activity in preeclampsia. *Placenta* 69, 40–49.

Berkane N, Liere P, Lefevre G, Alfaidy N, Nahed RA, Vincent J, Oudinet JP, Pianos A, Cambourg A, Rozenberg P, Galichon P, Rousseau A, Simon T, Schumacher M, Chabbert-Buffet N, Hertig A. (2018). Abnormal steroidogenesis and aromatse activity in preeclampsia. *Placenta*, 69, 40-49.

Berndt, S., Blacher, S., Munaut, C., Detilleux, J., Perrier d'Hauterive, S., Huhtaniemi, I., Evain-Brion, D., Noël, A., Fournier, T., and Foidart, J.-M. (2013). Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin stimulates angiogenesis through TGF- $\beta$  receptor activation. *The FASEB Journal* 27, 1309–1321.

Bharadwaj, S., Vishnu Bhat, B., V, V., Adhisivam, B., Bobby, Z., and S, H. (2017). Oxidative stress in preeclamptic mother - newborn dyads and its correlation with early neonatal outcome - a case control study. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 1–16.

Bhaskaran, R.S., and Ascoli, M. (2005). The post-endocytotic fate of the gonadotropin receptors is an important determinant of the desensitization of gonadotropin responses. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 447–457.

\*Blomquist, C.H. (1995). *Kinetic analysis of enzymic activities: prediction of multiple forms of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55, 515–524.

Boocock, C.A., Charnock-Jones, D.S., Sharkey, A.M., McLaren, J., Barker, P.J., Wright, K.A., Twentyman, P.R., and Smith, S.K. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 506–516.

Boroujeni, M.B., Boroujeni, N.B., and Gholami, M. (2016). The effect of progesterone treatment after ovarian induction on endometrial VEGF gene expression and its receptors in mice at pre-implantation time. *Iran J Basic Med Sci* 19, 252–257.

Brittain, P.C., and Bayliss, P. (1995). Partial hydatidiform molar pregnancy presenting with severe preeclampsia prior to twenty weeks gestation: a case report and review of the literature. *Mil Med* 160, 42–44.

Brouillet, S., Murthi, P., Hoffmann, P., Salomon, A., Sergent, F., De Mazancourt, P., Dakouane-Giudicelli, M., Dieudonné, M.N., Rozenberg, P., Vaiman, D., et al. (2013). EG-VEGF controls placental growth and survival in normal and pathological pregnancies: case of fetal growth restriction (FGR). *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 511–525.

Brownfoot, F.C., Tong, S., Hannan, N.J., Binder, N.K., Walker, S.P., Cannon, P., Hastie, R., Onda, K., and Kaitu'u-Lino, T.J. (2015). Effects of Pravastatin on Human Placenta, Endothelium, and Women With Severe Preeclampsia. *Hypertension* 66, 687–697; discussion 445.

\*Bulun, S.E. (2014). *Aromatase and estrogen receptor  $\alpha$  deficiency*. *Fertil. Steril.* 101, 323–329.

Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 15, 2174–2183.

\*Burton, G.J., Yung, H.-W., Cindrova-Davies, T., and Charnock-Jones, D.S. (2009). *Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia*. *Placenta* 30 Suppl A, S43-48.

Bussen, S., and Bussen, D. (2011). Influence of the vascular endothelial growth factor on the development of severe pre-eclampsia or HELLP syndrome. *Arch. Gynecol. Obstet.* 284, 551–557.

\*de Caestecker, M. (2004). *The transforming growth factor-beta superfamily of receptors*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 1–11.

Caniggia, I., Taylor, C.V., Ritchie, J.W., Lye, S.J., and Letarte, M. (1997). Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants. *Endocrinology* 138, 4977–4988.

Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., et al. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* 7, 575–583.

\*Carter, A.M. (2011). *Comparative studies of placentation and immunology in non-human primates suggest a scenario for the evolution of deep trophoblast invasion and an explanation for human pregnancy disorders*. *Reproduction* 141, 391–396.

\*Carter, A.M., Enders, A.C., and Pijnenborg, R. (2015). *The role of invasive trophoblast in implantation and placentation of primates*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 370, 20140070.

Castracane, V.D., and Goldzieher, J.W. (1986). Timing of the luteal-placental shift in the baboon (*Papio cynocephalus*). *Endocrinology* 118, 506–512.

Caulin-Glaser, T., García-Cardena, G., Sarrel, P., Sessa, W.C., and Bender, J.R. (1997). 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ. Res.* 81, 885–892.

Chakraborty, S., Willett, H., and Biswas, P.K. (2012). Insight into estrogen receptor beta-beta and alpha-beta homo- and heterodimerization: A combined molecular dynamics and sequence analysis study. *Biophys. Chem.* 170, 42–50.

\*Challier, J.-C., and Uzan, S. (2003). *[The human placenta and its pathologies: focus on oxygen]*. *Med Sci (Paris)* 19, 1111–1120.

\*Chambliss, K.L., and Shaul, P.W. (2002). *Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase*. *Endocr. Rev.* 23, 665–686.

Chandra, S., Scott, H., Dodds, L., Watts, C., Blight, C., and Van Den Hof, M. (2003). Unexplained elevated maternal serum alpha-fetoprotein and/or human chorionic gonadotropin and the risk of adverse outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189, 775–781.

\*Chauhan, S.P., Gupta, L.M., Hendrix, N.W., and Berghella, V. (2009). *Intrauterine growth restriction: comparison of American College of Obstetricians and Gynecologists practice bulletin with other national guidelines*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 200, 409.e1-409.e6.

Cheifetz, S., and Massagué, J. (1991). Isoform-specific transforming growth factor-beta binding proteins with membrane attachments sensitive to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 266, 20767–20772.

Cheifetz, S., Bellón, T., Calés, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massagué, J., and Letarte, M. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 19027–19030.

Chen, C.-P., Chen, C.-Y., Yang, Y.-C., Su, T.-H., and Chen, H. (2004). Decreased placental GCM1 (glial cells missing) gene expression in pre-eclampsia. *Placenta* 25, 413–421.

Chen, G., R Wilson, null, Wang, S.H., Zheng, H.Z., Walker, J.J., and McKillop, J.H. (1996). Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia. *Clin. Exp. Immunol.* 104, 154–159.

Chiang, M.-H., Liang, F.-Y., Chen, C.-P., Chang, C.-W., Cheong, M.-L., Wang, L.-J., Liang, C.-Y., Lin, F.-Y., Chou, C.-C., and Chen, H. (2009). Mechanism of hypoxia-induced GCM1

degradation: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *J. Biol. Chem.* 284, 17411–17419.

\*Choi, J., and Smitz, J. (2014). *Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference. Molecular and Cellular Endocrinology* 383, 203–213.

Choi, I., Ko, C., Park-Sarge, O.K., Nie, R., Hess, R.A., Graves, C., and Katzenellenbogen, B.S. (2001). Human estrogen receptor beta-specific monoclonal antibodies: characterization and use in studies of estrogen receptor beta protein expression in reproductive tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 181, 139–150.

Christinger, H.W., Fuh, G., de Vos, A.M., and Wiesmann, C. (2004). The Crystal Structure of Placental Growth Factor in Complex with Domain 2 of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1. *Journal of Biological Chemistry* 279, 10382–10388.

Clark, D.E., Smith, S.K., Sharkey, A.M., and Charnock-Jones, D.S. (1996). Localization of VEGF and expression of its receptors flt and KDR in human placenta throughout pregnancy. *Hum. Reprod.* 11, 1090–1098.

Clark, D.E., Smith, S.K., He, Y., Day, K.A., Licence, D.R., Corps, A.N., Lammoglia, R., and Charnock-Jones, D.S. (1998). A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol. Reprod.* 59, 1540–1548.

CLASP collaborative Group (1994). CLASP: a randomised trial of low-dose aspirin for the prevention and treatment of pre-eclampsia among 9364 pregnant women. CLASP (Collaborative Low-dose Aspirin Study in Pregnancy) Collaborative Group. *Lancet* 343, 619–629.

Clewell, W.H., Carson, B.A., and Meschia, G. (1977). Comparison of uterotrophic and vascular effects of estradiol-17beta and estriol in the mature organism. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 129, 384–388.

\*Cnattingius, S., and Nordström, M.L. (1996). *Maternal smoking and feto-infant mortality: biological pathways and public health significance. Acta Paediatr.* 85, 1400–1402.

\*Conde-Agudelo, A., Althabe, F., Belizán, J.M., and Kafury-Goeta, A.C. (1999). *Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. Am. J. Obstet. Gynecol.* 181, 1026–1035.

Condon, J.C., Hardy, D.B., Kovaric, K., and Mendelson, C.R. (2006). Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol. Endocrinol.* 20, 764–775.

Coolman, M., Timmermans, S., de Groot, C.J.M., Russcher, H., Lindemans, J., Hofman, A., Geurts-Moespot, A.J., Sweep, F.C.G.J., Jaddoe, V.V.W., and Steegers, E.A.P. (2012). Angiogenic and fibrinolytic factors in blood during the first half of pregnancy and adverse pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol* 119, 1190–1200.

Corcoran, J.J., Nicholson, C., Sweeney, M., Charnock, J.C., Robson, S.C., Westwood, M., and Taggart, M.J. (2014). Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute

responses to 17 $\beta$ -estradiol and estrogen-receptor-specific agonists. *Mol. Hum. Reprod.* 20, 433–441.

\*Cornelius, D.C. (2018). *Preeclampsia: From Inflammation to Immunoregulation. Clin Med Insights Blood Disord* 11, 1179545X17752325.

Coya, R., Martul, P., Algorta, J., Aniel-Quiroga, M.A., Busturia, M.A., and Señarís, R. (2006). Effect of leptin on the regulation of placental hormone secretion in cultured human placental cells. *Gynecol. Endocrinol.* 22, 620–626.

Craici, I.M., Wagner, S.J., Bailey, K.R., Fitz-Gibbon, P.D., Wood-Wentz, C.M., Turner, S.T., Hayman, S.R., White, W.M., Brost, B.C., Rose, C.H., et al. (2013). Podocyturia Predates Proteinuria and Clinical Features of Preeclampsia: Longitudinal Prospective Study. *Hypertension* 61, 1289–1296.

\*Cuckle, H.S. (2011). *Screening for pre-eclampsia--lessons from aneuploidy screening. Placenta* 32 Suppl, S42-48.

Cudmore, M.J., Hewett, P.W., Ahmad, S., Wang, K.-Q., Cai, M., Al-Ani, B., Fujisawa, T., Ma, B., Sissaoui, S., Ramma, W., et al. (2012). The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat Commun* 3, 972.

er, A.L. (2012). Statin Use and Risk of Diabetes Mellitus in Postmenopausal Women in the Women's Health Initiative. *Archives of Internal Medicine* 172, 144.

Cunningham, G.R., Tindall, D.J., Lobl, T.J., Campbell, J.A., and Means, A.R. (1981). Steroid structural requirements for high affinity binding to human sex steroid binding protein (SBP). *Steroids* 38, 243–262.

Curtis, S.W., Washburn, T., Sewall, C., DiAugustine, R., Lindzey, J., Couse, J.F., and Korach, K.S. (1996). Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12626–12630.

Darkow, D.J., Lu, L., and White, R.E. (1997). Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *Am. J. Physiol.* 272, H2765-2773.

Das, S.K., Tan, J., Johnson, D.C., and Dey, S.K. (1998). Differential spatiotemporal regulation of lactoferrin and progesterone receptor genes in the mouse uterus by primary estrogen, catechol estrogen, and xenoestrogen. *Endocrinology* 139, 2905–2915.

\*Davison, J.M., Homuth, V., Jeyabalan, A., Conrad, K.P., Karumanchi, S.A., Quaggin, S., Dechend, R., and Luft, F.C. (2004). *New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2440–2448.

\*Desoye, G., and Hauguel-de Mouzon, S. (2007). *The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. Diabetes Care* 30 Suppl 2, S120-126.

Devroey, P., Camus, M., Palermo, G., Smits, J., Van Waesberghe, L., Wisanto, A., Wijbo, I., and Van Steirteghem, A.C. (1990). Placental production of estradiol and progesterone after oocyte donation in patients with primary ovarian failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162, 66–70.



Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601–605.

Drolet, R., Simard, M., Plante, J., Laberge, P., and Tremblay, Y. (2007). Human type 2 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA and protein distribution in placental villi at mid and term pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 5, 30.

*\*Dressing, G.E., Goldberg, J.E., Charles, N.J., Schwertfeger, K.L., and Lange, C.A. (2011). Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: A review of regulation and physiological implications. Steroids 76, 11–17.*

*\*Druckmann, R., and Druckmann, M.-A. (2005). Progesterone and the immunology of pregnancy. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 97, 389–396.*

Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Zacharia, L.C., Barchiesi, F., Imthurn, B., and Jackson, E.K. (2003). CYP450- and COMT-derived estradiol metabolites inhibit activity of human coronary artery SMCs. *Hypertension* 41, 807–813.

*\*DuBroff, R. (2015). Cholesterol confusion and statin controversy. World Journal of Cardiology 7, 404.*

Elliott, S.E., Parchim, N.F., Kellems, R.E., Xia, Y., Soffici, A.R., and Daugherty, P.S. (2016). A pre-eclampsia-associated Epstein-Barr virus antibody cross-reacts with placental GPR50. *Clin. Immunol.* 168, 64–71.

*\*English, F.A., Kenny, L.C., and McCarthy, F.P. (2015). Risk factors and effective management of preeclampsia. Integr Blood Press Control 8, 7–12.*

Epiney, M., Ribaux, P., Arboit, P., Irion, O., and Cohen, M. (2012). Comparative analysis of secreted proteins from normal and preeclamptic trophoblastic cells using proteomic approaches. *J Proteomics* 75, 1771–1777.

*\*Evans, J. (2016). Hyperglycosylated hCG: a Unique Human Implantation and Invasion Factor. American Journal of Reproductive Immunology 75, 333–340.*

Evans, J.J., Sin, I.L., Duff, G.B., and Frampton, C.M. (1987). Estrogen-induced transcortin increase and progesterone and cortisol interactions: implications from pregnancy studies. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 17, 101–105.

*\*Fain, J.N. (2006). Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. Vitam. Horm. 74, 443–477.*

Falany, C.N., Wheeler, J., Oh, T.S., and Falany, J.L. (1994). Steroid sulfation by expressed human cytosolic sulfotransferases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 48, 369–375.

Fernandes, M.S. (2005). Regulated expression of putative membrane progesterin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *Journal of Endocrinology* 187, 89–101.

Fernández-Ruiz, E., St-Jacques, S., Bellón, T., Letarte, M., and Bernabéu, C. (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet. Cell Genet.* *64*, 204–207.

Filardo, E., Quinn, J., Pang, Y., Graeber, C., Shaw, S., Dong, J., and Thomas, P. (2007). Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* *148*, 3236–3245.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., and Frackelton, A.R. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* *14*, 1649–1660.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton, A.R., and Bland, K.I. (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol. Endocrinol.* *16*, 70–84.

*\*Fischer, M., and Schmutzhard, E. (2017). Posterior reversible encephalopathy syndrome. J. Neurol.* *264*, 1608–1616.

*\*Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B., and Carmeliet, P. (2008). FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? Nat. Rev. Cancer* *8*, 942–956.

*\*Flegal, K.M., Carroll, M.D., Ogden, C.L., and Curtin, L.R. (2010). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2008. JAMA* *303*, 235–241.

Florio, P., Imperatore, A., Sanseverino, F., Torricelli, M., Reis, F.M., Lowry, P.J., and Petraglia, F. (2004). The measurement of maternal plasma corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein improves the early prediction of preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 4673–4677.

Flötotto, T., Niederacher, D., Hohmann, D., Heimerzheim, T., Dall, P., Djahansouzi, S., Bender, H.G., and Hanstein, B. (2004). Molecular mechanism of estrogen receptor (ER)alpha-specific, estradiol-dependent expression of the progesterone receptor (PR) B-isoform. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *88*, 131–142.

*\*Foidart, J.M., Hustin, J., Dubois, M., and Schaaps, J.P. (1992). The human placenta becomes haemochorial at the 13th week of pregnancy. Int. J. Dev. Biol.* *36*, 451–453.

Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* *376*, 66–70.

Förster, C., Mäkela, S., Wärrri, A., Kietz, S., Becker, D., Hultenby, K., Warner, M., and Gustafsson, J.-A. (2002). Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 15578–15583.

Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4604–4613.

Fournet-Dulguerov, N., MacLusky, N.J., Leranath, C.Z., Todd, R., Mendelson, C.R., Simpson, E.R., and Naftolin, F. (1987). Immunohistochemical localization of aromatase cytochrome P-450 and estradiol dehydrogenase in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *65*, 757–764.

\*Frampton, G.K., Jones, J., Rose, M., and Payne, L. (2016). *Placental growth factor (alone or in combination with soluble fms-like tyrosine kinase 1) as an aid to the assessment of women with suspected pre-eclampsia: systematic review and economic analysis. Health Technology Assessment* *20*, 1–160.

Furcron, A.-E., Romero, R., Mial, T.N., Balancio, A., Panaitescu, B., Hassan, S.S., Sahi, A., Nord, C., and Gomez-Lopez, N. (2016). Human Chorionic Gonadotropin Has Anti-Inflammatory Effects at the Maternal-Fetal Interface and Prevents Endotoxin-Induced Preterm Birth, but Causes Dystocia and Fetal Compromise in Mice. *Biology of Reproduction* *94*.

Fushima, T., Sekimoto, A., Minato, T., Ito, T., Oe, Y., Kisu, K., Sato, E., Funamoto, K., Hayase, T., Kimura, Y., et al. (2016). Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) Model of Preeclampsia in Mice. *PLOS ONE* *11*, e0155426.

\*Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R.G., Windmill, K.F., Martin, J.L., and McManus, M.E. (2006). *Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. Toxicol. Sci.* *90*, 5–22.

Garcia-Lloret, M.I., Winkler-Lowen, B., and Guilbert, L.J. (2000). Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF-alpha. A model for hematogenous initiation of placental inflammations. *J. Leukoc. Biol.* *68*, 903–908.

Gargett, C.E., Zaitseva, M., Bucak, K., Chu, S., Fuller, P.J., and Rogers, P.A.W. (2002). 17Beta-estradiol up-regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in human myometrial microvascular endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha and -beta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 4341–4349.

\*Ghulmiyyah, L., and Sibai, B. (2012). *Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. Semin. Perinatol.* *36*, 56–59.

Giangrande, P.H., and McDonnell, D.P. (1999). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog. Horm. Res.* *54*, 291–313; discussion 313-314.

Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T.F., Pelletier, N., and Ferrara, N. (2001). Analysis of Biological Effects and Signaling Properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2): A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factormutants. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 3222–3230.

\*Ginsberg, G., and Rice, D.C. (2009). *Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A? Environ. Health Perspect.* *117*, 1639–1643.

\*Giordano, R., Cacciatore, A., Romano, M., La Rosa, B., Fonti, I., and Vigna, R. (2010). *Uterine artery Doppler flow studies in obstetric practice. J Prenat Med* *4*, 59–62.

\*Girdler, F., and Brotherick, I. (2000). *The oestrogen receptors (ER alpha and ER beta) and their role in breast cancer: a review. Breast 9, 194–200.*

Goffinet, F., Aboulker, D., Paris-Llado, J., Bucourt, M., Uzan, M., Papiernik, E., and Bréart, G. (2001). Screening with a uterine Doppler in low risk pregnant women followed by low dose aspirin in women with abnormal results: a multicenter randomised controlled trial. *BJOG 108, 510–518.*

Goldman, S., and Shalev, E. (2007). Progesterone receptor isoforms profile, modulate matrix metalloproteinase 2 expression in the decidua. *Am. J. Obstet. Gynecol. 197, 604.e1-8.*

\*Goldman-Wohl, D., and Yagel, S. (2002). *Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. Mol. Cell. Endocrinol. 187, 233–238.*

Gougos, A., and Letarte, M. (1988). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J. Immunol. 141, 1925–1933.*

Gougos, A., St Jacques, S., Greaves, A., O’Connell, P.J., d’Apice, A.J., Bühring, H.J., Bernabeu, C., van Mourik, J.A., and Letarte, M. (1992). Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int. Immunol. 4, 83–92.*

Green, C.J., Lichtlen, P., Huynh, N.T., Yanovsky, M., Laderoute, K.R., Schaffner, W., and Murphy, B.J. (2001). Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor-1. *Cancer Res. 61, 2696–2703.*

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature 320, 134–139.*

Groom, K.M., Ganzevoort, W., Alfirevic, Z., Lim, K., Papageorgiou, A.T., and the STRIDER Consortium (2018). Clinicians should stop prescribing sildenafil for fetal growth restriction (FGR): comment from the STRIDER Consortium: Physician Alert. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology.*

\*Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J.C. (2002). *Production and actions of estrogens. N. Engl. J. Med. 346, 340–352.*

Grzesik, P., Kreuchwig, A., Rutz, C., Furkert, J., Wiesner, B., Schuelein, R., Kleinau, G., Gromoll, J., and Krause, G. (2015). Differences in Signal Activation by LH and hCG are Mediated by the LH/CG Receptor’s Extracellular Hinge Region. *Frontiers in Endocrinology 6.*

Guibourdenche, J., Handschuh, K., Tsatsaris, V., Gerbaud, P., Leguy, M.C., Muller, F., Evain Brion, D., and Fournier, T. (2010). Hyperglycosylated hCG Is a Marker of Early Human Trophoblast Invasion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 95, E240–E244.*

\*Guldberg, H.C., and Marsden, C.A. (1975). *Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. Pharmacol. Rev. 27, 135–206.*

Gupta, M., McDougal, A., and Safe, S. (1998). Estrogenic and antiestrogenic activities of 16alpha- and 2-hydroxy metabolites of 17beta-estradiol in MCF-7 and T47D human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 67, 413–419.

Gurpide, E., Marks, C., de Ziegler, D., Berk, P.D., and Brandes, J.M. (1982). Asymmetric release of estrone and estradiol derived from labeled precursors in perfused human placentas. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 144, 551–555.

*\*Gustafsson, J.A. (1999). Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. J. Endocrinol. 163, 379–383.*

*\*Gustafsson, J.A., and Warner, M. (2000). Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 74, 245–248.*

Haddad, B., Winer, N., Chitrit, Y., Houfflin-Debarge, V., Chauleur, C., Bages, K., Tsatsaris, V., Benachi, A., Bretelle, F., Gris, J.-C., et al. (2016). Enoxaparin and Aspirin Compared With Aspirin Alone to Prevent Placenta-Mediated Pregnancy Complications: A Randomized Controlled Trial. *Obstet Gynecol* 128, 1053–1063.

Haggerty, C.L., Panum, I., Uldum, S.A., Bass, D.C., Olsen, J., Darville, T., Eastman, J.M., Simhan, H.N., Roberts, J.M., and Ness, R.B. (2013). Chlamydia trachomatis infection may increase the risk of preeclampsia. *Pregnancy Hypertens* 3, 28–33.

*\*Haider, S., and Knöfler, M. (2009). Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and Endometrium. Placenta 30, 111–123.*

*\*Hammond, G.L. (2016). Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. Journal of Endocrinology 230, R13–R25.*

Hammond, G.L., Hogeveen, K.N., Visser, M., and Coelingh Bennink, H.J.T. (2008). Estetrol does not bind sex hormone binding globulin or increase its production by human HepG2 cells. *Climacteric* 11, 41–46.

*\*Handelsman, D.J., and Wartofsky, L. (2013). Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. J. Clin. Endocrinol. Metab. 98, 3971–3973.*

Handschuh, K., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., and Fournier, T. (2007). Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 28, 175–184.

*\*Hanukoglu, I. (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 43, 779–804.*

Harada, N., Utsumi, T., and Takagi, Y. (1993). Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11312–11316.

\*Harris, M. (2004). *Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. Lancet Oncol.* 5, 292–302.

Hauri-Hohl, A., Meyer-Böni, M., Lang-Muritano, M., Hauri-Hohl, M., Schoenle, E.J., and Biason-Lauber, A. (2011). Aromatase deficiency owing to a functional variant in the placenta promoter and a novel missense mutation in the CYP19A1 gene. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 75, 39–43.

Haynes, M.P., Sinha, D., Russell, K.S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W.C., and Bender, J.R. (2000). Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ. Res.* 87, 677–682.

He, Y., Smith, S.K., Day, K.A., Clark, D.E., Licence, D.R., and Charnock-Jones, D.S. (1999). Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol. Endocrinol.* 13, 537–545.

Helguero, L.A., Faulds, M.H., Gustafsson, J.-A., and Haldosén, L.-A. (2005). Estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 24, 6605–6616.

Helmo, F.R., de Castro, F.L., Etchebehere, R.M., Dos Reis, M. antônia, Machado, J.R., and Miranda Corrêa, R.R. (2016). 12 Expression of corticotropin-releasing hormone in the placentas of pregnant women with hypertensive disorders. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health* 6, 183–184.

Hennessy, A., Gillin, A.G., Painter, D.M., Kirwan, P.J., Thompson, J.F., and Horvath, J.S. (1997). Evidence for Preeclampsia in a Baboon Pregnancy with Twins. *Hypertension in Pregnancy* 16, 223–228.

Hertig, A., Berkane, N., Lefevre, G., Toumi, K., Marti, H.-P., Capeau, J., Uzan, S., and Rondeau, E. (2004). Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia. *Clin. Chem.* 50, 1702–1703.

Hertig, A., Lefevre, G., Toumi, K., Rondeau, E., Capeau, J., Uzan, S., and Berkane, N. (2008). Soluble endoglin levels during normotensive and hypertensive pregnancies. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 140, 138–140.

Hertig, A., Liere, P., Chabbert-Buffet, N., Fort, J., Pianos, A., Eychenne, B., Cambourg, A., Schumacher, M., Berkane, N., Lefevre, G., et al. (2010). Steroid profiling in preeclamptic women: evidence for aromatase deficiency. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 203, 477.e1-9.

Hervé, M. a. J., Meduri, G., Petit, F.G., Domet, T.S., Lazennec, G., Mourah, S., and Perrot-Appanat, M. (2006). Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. *J. Endocrinol.* 188, 91–99.

Heussner, K., Ruebner, M., Huebner, H., Rascher, W., Menendez-Castro, C., Hartner, A., Fahlbusch, F.B., and Rauh, M. (2016). Species differences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 function in human and rat term placenta determined via LC-MS/MS. *Placenta* 37, 79–84.

Hidden, U., Maier, A., Bilban, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Wadsack, C., Lang, I., Dohr, G., and Desoye, G. (2006). Insulin control of placental gene expression shifts from mother to foetus over the course of pregnancy. *Diabetologia* 49, 123–131.

Higgins, L., Mills, T.A., Greenwood, S.L., Cowley, E.J., Sibley, C.P., and Jones, R.L. (2013). Maternal obesity and its effect on placental cell turnover. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 26, 783–788.

\*Hill, M., Pařízek, A., Cibula, D., Kancheva, R., Jirásek, J.E., Jirkovská, M., Veliková, M., Kubátová, J., Klímková, M., Pašková, A., et al. (2010a). Steroid metabolome in fetal and maternal body fluids in human late pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122, 114–132.

Hill, M., Pařízek, A., Jirásek, J.E., Jirkovská, M., Veliková, M., Dusková, M., Klímková, M., Pašková, A., Zizka, Z., Germanová, A., et al. (2010b). Is maternal progesterone actually independent of the fetal steroids? *Physiol Res* 59, 211–224.

Hiratsuka, S., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Maru, Y., and Shibuya, M. (2005). Membrane Fixation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Ligand-Binding Domain Is Important for Vasculogenesis and Angiogenesis in Mice. *Molecular and Cellular Biology* 25, 346–354.

Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Hayakawa, J., Kanda, Y., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Miyoshi, E., Fujiwara, N., et al. (2001). Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 3459–3467.

Ho, J.T., Lewis, J.G., O’Loughlin, P., Bagley, C.J., Romero, R., Dekker, G.A., and Torpy, D.J. (2007). Reduced maternal corticosteroid-binding globulin and cortisol levels in pre-eclampsia and gamete recipient pregnancies. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 66, 869–877.

\*Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., and De Bruijn, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* 56, 549–580.

Hogg, K., Blair, J.D., McFadden, D.E., von Dadelszen, P., and Robinson, W.P. (2013). Early onset pre-eclampsia is associated with altered DNA methylation of cortisol-signalling and steroidogenic genes in the placenta. *PLoS ONE* 8, e62969.

\*Holinka, C.F., Diczfalusy, E., and Coelingh Bennink, H.J.T. (2008). Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 110, 138–143.

Holmes, D.I.R., and Zachary, I. (2004). Placental growth factor induces FosB and c-Fos gene expression via Flt-1 receptors. *FEBS Lett.* 557, 93–98.

Hou, H.H., Cheng, S.L., Liu, H.T., Yang, F.Z., Wang, H.C., and Yu, C.J. (2013). Elastase induced lung epithelial cell apoptosis and emphysema through placenta growth factor. *Cell Death Dis* 4, e793.

Hung, T.-H., Skepper, J.N., Charnock-Jones, D.S., and Burton, G.J. (2002). Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ. Res.* 90, 1274–1281.

\*Hutcheon, J.A., Lisonkova, S., and Joseph, K.S. (2011). *Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 25, 391–403.

Ishibashi, O., Ohkuchi, A., Ali, M.M., Kurashina, R., Luo, S.-S., Ishikawa, T., Takizawa, T., Hirashima, C., Takahashi, K., Migita, M., et al. (2012). 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.

Ishida, T., Seo, F., Hirato, K., Fukuda, T., Yanaihara, T., Araki, H., and Nakayama, T. (1985). [Changes in placental enzymatic activities in relation to estrogen production during pregnancy]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 37, 547–554.

Islami, D., Bischof, P., and Chardonnens, D. (2003). Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 395–398.

Jauniaux, E., Zaidi, J., Jurkovic, D., Campbell, S., and Hustin, J. (1994). Comparison of colour Doppler features and pathological findings in complicated early pregnancy. *Hum. Reprod.* 9, 2432–2437.

\* Jelkmann, W. (2001). *Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. Clin. Chem.* 47, 617–623.

Jeyabalan, A., Powers, R.W., Durica, A.R., Harger, G.F., Roberts, J.M., and Ness, R.B. (2008). Cigarette Smoke Exposure and Angiogenic Factors in Pregnancy and Preeclampsia. *American Journal of Hypertension* 21, 943–947.

Jiang, B., and Mendelson, C.R. (2003). USF1 and USF2 mediate inhibition of human trophoblast differentiation and CYP19 gene expression by Mash-2 and hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6117–6128.

Jobe, S.O., Tyler, C.T., and Magness, R.R. (2013). Aberrant synthesis, metabolism, and plasma accumulation of circulating estrogens and estrogen metabolites in preeclampsia implications for vascular dysfunction. *Hypertension* 61, 480–487.

Johnson, D.W., Berg, J.N., Baldwin, M.A., Gallione, C.J., Marondel, I., Yoon, S.J., Stenzel, T.T., Speer, M., Pericak-Vance, M.A., Diamond, A., et al. (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat. Genet.* 13, 189–195.

Johnson, M.L., Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A., and Reynolds, L.P. (2006). Effects of estradiol-17beta on expression of mRNA for seven angiogenic factors and their receptors in the endometrium of ovariectomized (OVX) ewes. *Endocrine* 30, 333–342.

Jung, C., Ho, J.T., Torpy, D.J., Rogers, A., Doogue, M., Lewis, J.G., Czajko, R.J., and Inder, W.J. (2011). A Longitudinal Study of Plasma and Urinary Cortisol in Pregnancy and Postpartum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96, 1533–1540.

Kaitu'u-Lino, T.J., Palmer, K.R., Whitehead, C.L., Williams, E., Lappas, M., and Tong, S. (2012). MMP-14 Is Expressed in Preeclamptic Placentas and Mediates Release of Soluble Endoglin. *The American Journal of Pathology* 180, 888–894.



\*Kallen, C.B. (2004). *Steroid hormone synthesis in pregnancy. Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 31, 795–816, x.

\*Kaludjerovic, J., and Ward, W.E. (2012). *The Interplay between Estrogen and Fetal Adrenal Cortex. J Nutr Metab* 2012, 837901.

Kamat, A., Alcorn, J.L., Kunczt, C., and Mendelson, C.R. (1998). Characterization of the regulatory regions of the human aromatase (P450arom) gene involved in placenta-specific expression. *Mol. Endocrinol.* 12, 1764–1777.

Kanasaki, K., Palmsten, K., Sugimoto, H., Ahmad, S., Hamano, Y., Xie, L., Parry, S., Augustin, H.G., Gattone, V.H., Folkman, J., et al. (2008). Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* 453, 1117–1121.

\*Kaul, K., Apostolopoulou, M., and Roden, M. (2015). *Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. Metab. Clin. Exp.* 64, 1629–1639.

Kendall, R.L., and Thomas, K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10705–10709.

Kendall, R.L., Wang, G., and Thomas, K.A. (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 324–328.

Kern, P.A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., and Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E745-751.

\*Khan, K.S., Wojdyla, D., Say, L., Gülmezoglu, A.M., and Van Look, P.F.A. (2006). *WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. Lancet* 367, 1066–1074.

\*Kim, J., and Chapman-Davis, E. (2010). *Role of Progesterone in Endometrial Cancer. Seminars in Reproductive Medicine* 28, 081–090.

Kim, J.J., Lee, S.B., Park, J.K., and Yoo, Y.D. (2010). TNF-alpha-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-X(L). *Cell Death Differ.* 17, 1420–1434.

Kim, M., Park, H.J., Seol, J.W., Jang, J.Y., Cho, Y.-S., Kim, K.R., Choi, Y., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Shibuya, M., et al. (2013). VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy: Uterine angiogenesis and vascular remodelling. *EMBO Molecular Medicine* 5, 1415–1430.

\*Kimura, H., and Esumi, H. (2003). *Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. Acta Biochim. Pol.* 50, 49–59.

Klieber, M.A., Underhill, C., Hammond, G.L., and Muller, Y.A. (2007). Corticosteroid-binding Globulin, a Structural Basis for Steroid Transport and Proteinase-triggered Release. *Journal of Biological Chemistry* 282, 29594–29603.

Knight, M., Redman, C.W., Linton, E.A., and Sargent, I.L. (1998). Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 105, 632–640.

Koga, K., Osuga, Y., Yoshino, O., Hirota, Y., Ruimeng, X., Hirata, T., Takeda, S., Yano, T., Tsutsumi, O., and Taketani, Y. (2003). Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2348–2351.

Koganti, S., Snyder, R., Gumaste, U., Karamyan, V.T., and Thekkumkara, T. (2014). 2-methoxyestradiol binding of GPR30 down-regulates angiotensin AT(1) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 723, 131–140.

Kotch, L.E., Iyer, N.V., Laughner, E., and Semenza, G.L. (1999). Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev. Biol.* 209, 254–267.

\*Kragie, L. (2002). *Aromatase in primate pregnancy: a review. Endocr. Res.* 28, 121–128.

\*Krasowski, M.D., Drees, D., Morris, C.S., Maakestad, J., Blau, J.L., and Ekins, S. (2014). *Cross-reactivity of steroid hormone immunoassays: clinical significance and two-dimensional molecular similarity prediction. BMC Clinical Pathology* 14.

Krugner-Higby, L., Luck, M., Hartley, D., Crispin, H.M., Lubach, G.R., and Coe, C.L. (2009). High-risk pregnancy in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a case of ectopic, abdominal pregnancy with birth of a live, term infant, and a case of gestational diabetes complicated by pre-eclampsia. *Journal of Medical Primatology* 38, 252–256.

Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863–870.

\*Kuklina, E.V., Ayala, C., and Callaghan, W.M. (2009). *Hypertensive disorders and severe obstetric morbidity in the United States. Obstet Gynecol* 113, 1299–1306.

Kumar, P., Luo, Y., Tudela, C., Alexander, J.M., and Mendelson, C.R. (2013). The c-Myc-regulated microRNA-17~92 (miR-17~92) and miR-106a~363 clusters target hCYP19A1 and hGCM1 to inhibit human trophoblast differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1782–1796.

\*Kumar, R., Zakharov, M.N., Khan, S.H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S., and Jasuja, R. (2011). *The dynamic structure of the estrogen receptor. J Amino Acids* 2011, 812540.

Laatikainen, T.J., Pelkonen, J.M., and Pesonen, A.K. (1982). Steroid concentrations in placenta and fetal membranes at elective caesarean section and after spontaneous labour. *Placenta* 3, 319–324.

Lambert-Messerlian, G.M., Silver, H.M., Petraglia, F., Luisi, S., Pezzani, I., Maybruck, W.M., Hogge, W.A., Hanley-Yanez, K., Roberts, J.M., Neveux, L.M., et al. (2000). Second-trimester levels of maternal serum human chorionic gonadotropin and inhibin a as predictors of preeclampsia in the third trimester of pregnancy. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 7, 170–174.

Lanoix, D., St-Pierre, J., Lacasse, A.A., Viau, M., Lafond, J., and Vaillancourt, C. (2012a). Stability of reference proteins in human placenta: general protein stains are the benchmark. *Placenta* 33, 151–156.

Lanoix, D., Lacasse, A.-A., St-Pierre, J., Taylor, S.C., Ethier-Chiasson, M., Lafond, J., and Vaillancourt, C. (2012b). Quantitative PCR pitfalls: the case of the human placenta. *Mol. Biotechnol.* 52, 234–243.

Lastres, P., Bellon, T., Cabañas, C., Sanchez-Madrid, F., Acevedo, A., Gougos, A., Letarte, M., and Bernabeu, C. (1992). Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur. J. Immunol.* 22, 393–397.

\*Lau, S.Y., Guild, S.-J., Barrett, C.J., Chen, Q., McCowan, L., Jordan, V., and Chamley, L.W. (2013). Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 70, 412–427.

\*Lausman, A., Kingdom, J., and maternal fetal medicine committee (2013). Intrauterine growth restriction: screening, diagnosis, and management. *J Obstet Gynaecol Can* 35, 741–748.

Lecarpentier, E., Atallah, A., Guibourdenche, J., Hebert-Schuster, M., Vieillefosse, S., Chissey, A., Haddad, B., Pidoux, G., Evain-Brion, D., Barakat, A., et al. (2016). Fluid Shear Stress Promotes Placental Growth Factor Upregulation in Human Syncytiotrophoblast Through the cAMP-PKA Signaling Pathway. *Hypertension* 68, 1438–1446.

Leung, Y.-K., Mak, P., Hassan, S., and Ho, S.-M. (2006). Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13162–13167.

Levine, R.J., Hauth, J.C., Curet, L.B., Sibai, B.M., Catalano, P.M., Morris, C.D., DerSimonian, R., Esterlitz, J.R., Raymond, E.G., Bild, D.E., et al. (1997). Trial of Calcium to Prevent Preeclampsia. *New England Journal of Medicine* 337, 69–77.

Levine, R.J., Maynard, S.E., Qian, C., Lim, K.-H., England, L.J., Yu, K.F., Schisterman, E.F., Thadhani, R., Sachs, B.P., Epstein, F.H., et al. (2004). Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 350, 672–683.

Levine, R.J., Lam, C., Qian, C., Yu, K.F., Maynard, S.E., Sachs, B.P., Sibai, B.M., Epstein, F.H., Romero, R., Thadhani, R., et al. (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 355, 992–1005.

\*Levitz, M., and Young, B.K. (1977). Estrogens in pregnancy. *Vitam. Horm.* 35, 109–147.

Li, B., Sharpe, E.E., Maupin, A.B., Teleron, A.A., Pyle, A.L., Carmeliet, P., and Young, P.P. (2006). VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J.* 20, 1495–1497.

Li, C., Raikwar, N.S., Santillan, M.K., Santillan, D.A., and Thomas, C.P. (2015). Aspirin inhibits expression of sFLT1 from human cytotrophoblasts induced by hypoxia, via cyclooxygenase 1. *Placenta* 36, 446–453.

Li, D.Y., Sorensen, L.K., Brooke, B.S., Urness, L.D., Davis, E.C., Taylor, D.G., Boak, B.B., and Wendel, D.P. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534–1537.

Li, H., Gu, B., Zhang, Y., Lewis, D.F., and Wang, Y. (2005a). Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta* 26, 210–217.

Li, Y., Isomaa, V., Pulkka, A., Herva, R., Peltoketo, H., and Vihko, P. (2005b). Expression of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, P450 aromatase, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 2, 5 and 7 mRNAs in human early and mid-gestation placentas. *Placenta* 26, 387–392.

Liang, S., Liu, X., Fan, P., Liu, R., Zhang, J., He, G., Liu, Y., and Bai, H. (2012). Association between Val158Met functional polymorphism in the COMT gene and risk of preeclampsia in a Chinese population. *Arch. Med. Res.* 43, 154–158.

Licht, P., Fluhr, H., Neuwinger, J., Wallwiener, D., and Wildt, L. (2007). Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol. Cell. Endocrinol.* 269, 85–92.

Liere, P., Akwa, Y., Weill-Engerer, S., Eychenne, B., Pianos, A., Robel, P., Sjövall, J., Schumacher, M., and Baulieu, E.E. (2000). Validation of an analytical procedure to measure trace amounts of neurosteroids in brain tissue by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 739, 301–312.

Liere, P., Pianos, A., Eychenne, B., Cambourg, A., Liu, S., Griffiths, W., Schumacher, M., Sjövall, J., and Baulieu, E.-E. (2004). Novel lipoidal derivatives of pregnenolone and dehydroepiandrosterone and absence of their sulfated counterparts in rodent brain. *J. Lipid Res.* 45, 2287–2302.

Liu, L.X., Lu, H., Luo, Y., Date, T., Belanger, A.J., Vincent, K.A., Akita, G.Y., Goldberg, M., Cheng, S.H., Gregory, R.J., et al. (2002). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 908–914.

Lundström, K., Salminen, M., Jalanko, A., Savolainen, R., and Ulmanen, I. (1991). Cloning and characterization of human placental catechol-O-methyltransferase cDNA. *DNA Cell Biol.* 10, 181–189.

Luisi, S., Petraglia, F., Benedetto, C., Nappi, R.E., Bernardi, F., Fadalti, M., Reis, F.M., Luisi, M., and Genazzani, A.R. (2000). Serum allopregnanolone levels in pregnant women: changes during pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2429–2433.

*\*Lunghi, L., Ferretti, M.E., Medici, S., Biondi, C., and Vesce, F. (2007). Control of human trophoblast function. Reprod. Biol. Endocrinol. 5, 6.*

Ma, C.X., Adjei, A.A., Salavaggione, O.E., Coronel, J., Pelleymounter, L., Wang, L., Eckloff, B.W., Schaid, D., Wieben, E.D., Adjei, A.A., et al. (2005). Human aromatase: gene resequencing and functional genomics. *Cancer Res.* 65, 11071–11082.

Ma, Q., Xiong, F., and Zhang, L. (2014). Gestational hypoxia and epigenetic programming of brain development disorders. *Drug Discovery Today* 19, 1883–1896.

Maged, M., Wageh, A., Shams, M., and Elmetwally, A. (2018). Use of sildenafil citrate in cases of intrauterine growth restriction (IUGR); a prospective trial. *Taiwan J Obstet Gynecol* 57, 483–486.

\*Magee, L.A., Pels, A., Helewa, M., Rey, E., von Dadelszen, P., and Canadian Hypertensive Disorders of Pregnancy Working Group (2014). *Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy: executive summary. J Obstet Gynaecol Can* 36, 416–441.

Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M.G. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 9267–9271.

Maher, M.A., Sayyed, T.M., and Elkhoully, N. (2017). Sildenafil Citrate Therapy for Oligohydramnios: A Randomized Controlled Trial. *Obstet Gynecol* 129, 615–620.

\*Makki, K., Froguel, P., and Wolowczuk, I. (2013). *Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. ISRN Inflammation* 2013, 1–12.

\*Makrigiannakis, A., Vrekoussis, T., Zoumakis, E., Kalantaridou, S., and Jeschke, U. (2017). *The Role of HCG in Implantation: A Mini-Review of Molecular and Clinical Evidence. International Journal of Molecular Sciences* 18, 1305.

\*Maliqueo, M., Echiburú, B., and Crisosto, N. (2016). *Sex Steroids Modulate Uterine-Placental Vasculature: Implications for Obstetrics and Neonatal Outcomes. Front Physiol* 7, 152.

Maness, S.C., McDonnell, D.P., and Gaido, K.W. (1998). Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 135–142.

\*Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). *The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell* 83, 835–839.

Marino, M., and Ascenzi, P. (2008). Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73, 853–858.

\*Marrs, C.C., and Costantine, M.M. (2017). *Should We Add Pravastatin to Aspirin for Preeclampsia Prevention in High-risk Women? Clin Obstet Gynecol* 60, 161–168.

Martucci, C.P., and Fishman, J. (1979). Impact of continuously administered catechol estrogens on uterine growth and luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 105, 1288–1292.

Masuyama, H., Nakatsukasa, H., Takamoto, N., and Hiramatsu, Y. (2007). Correlation between Soluble Endoglin, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1, and

Adipocytokines in Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92, 2672–2679.

Maynard, S.E., Min, J.-Y., Merchan, J., Lim, K.-H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T.A., Morgan, J.P., Sellke, F.W., Stillman, I.E., 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.

McAllister, K.A., Grogg, K.M., Johnson, D.W., Gallione, C.J., Baldwin, M.A., Jackson, C.E., Helmbold, E.A., Markel, D.S., McKinnon, W.C., and Murrell, J. (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.* 8, 345–351.

\*Meher, S., and Duley, L. (2006). *Progesterone for preventing pre-eclampsia and its complications. Cochrane Database Syst Rev CD006175.*

Meher, S., Duley, L., Hunter, K., and Askie, L. (2017). Antiplatelet therapy before or after 16 weeks' gestation for preventing preeclampsia: an individual participant data meta-analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 216, 121-128.e2.

Menendez, D., Inga, A., Snipe, J., Krysiak, O., Schönfelder, G., and Resnick, M.A. (2007). A single-nucleotide polymorphism in a half-binding site creates p53 and estrogen receptor control of vascular endothelial growth factor receptor 1. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2590–2600.

\*Miehle, K., Stepan, H., and Fasshauer, M. (2012). *Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. Clin. Endocrinol. (Oxf)* 76, 2–11.

\*Merviel, P., Challier, J.C., Carbillon, L., Foidart, J.M., and Uzan, S. (2001). *The role of integrins in human embryo implantation. Fetal. Diagn. Ther.* 16, 364–371.

Miki, Y., Nakata, T., Suzuki, T., Darnel, A.D., Moriya, T., Kaneko, C., Hidaka, K., Shiotsu, Y., Kusaka, H., and Sasano, H. (2002). Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5760–5768.

Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnürch, H., Martinez, R., Møller, N.P., Risau, W., and Ullrich, A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72, 835–846.

\*Miller, V.M., and Duckles, S.P. (2008). *Vascular actions of estrogens: functional implications. Pharmacol. Rev.* 60, 210–241.

\*Miller, W.L., and Auchus, R.J. (2011). *The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. Endocrine Reviews* 32, 81–151.

\*Milne, F., Redman, C., Walker, J., Baker, P., Bradley, J., Cooper, C., de Swiet, M., Fletcher, G., Jokinen, M., Murphy, D., et al. (2005). *The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community. BMJ* 330, 576–580.

Misrahi, M., Beau, I., Ghinea, N., Vannier, B., Loosfelt, H., Meduri, G., Vu Hai, M.T., and Milgrom, E. (1996). The LH/CG and FSH receptors: different molecular forms and intracellular traffic. *Mol. Cell. Endocrinol.* 125, 161–167.

\*Modugno, F., Laskey, R., Smith, A.L., Andersen, C.L., Haluska, P., and Oesterreich, S. (2012). *Hormone response in ovarian cancer: time to reconsider as a clinical target? Endocrine Related Cancer* 19, R255–R279.

Moghrabi, N., Head, J.R., and Andersson, S. (1997). Cell type-specific expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human placenta and fetal liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3872–3878.

Montgomery, S., Shaw, L., Pantelides, N., Taggart, M., and Austin, C. (2003). Acute effects of oestrogen receptor subtype-specific agonists on vascular contractility. *Br. J. Pharmacol.* 139, 1249–1253.

Moore Simas, T.A., Crawford, S.L., Bathgate, S., Yan, J., Robidoux, L., Moore, M., and Maynard, S.E. (2014). Angiogenic biomarkers for prediction of early preeclampsia onset in high-risk women. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 27, 1038–1048.

Mor, G., Yue, W., Santen, R.J., Gutierrez, L., Eliza, M., Berstein, L.M., Harada, N., Wang, J., Lysiak, J., Diano, S., et al. (1998). Macrophages, estrogen and the microenvironment of breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 67, 403–411.

\*Morel, Y., Roucher, F., Plotton, I., Goursaud, C., Tardy, V., and Mallet, D. (2016). *Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis. Annales d'Endocrinologie* 77, 82–89.

Morisset, A.-S., Dubé, M.-C., Drolet, R., Pelletier, M., Labrie, F., Luu-The, V., Tremblay, Y., Robitaille, J., John Weisnagel, S., and Tchernof, A. (2013). Androgens in the maternal and fetal circulation: association with insulin resistance. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 26, 513–519.

Mosbah, A., and Nabel, Y. (2016). *Helicobacter pylori, Chlamydiae pneumoniae and trachomatis as probable etiological agents of preeclampsia. J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 29, 1607–1612.

\*Moussatche, P., and Lyons, T.J. (2012). *Non-genomic progesterone signalling and its non-canonical receptor. Biochemical Society Transactions* 40, 200–204.

Moutsatsou, V., and Oakey, R.E. (1988). Oestriol binding to plasma proteins. *J. Steroid Biochem.* 29, 319–323.

\*Mueller, J.W., Gilligan, L.C., Idkowiak, J., Arlt, W., and Foster, P.A. (2015). *The Regulation of Steroid Action by Sulfation and Desulfation. Endocr. Rev.* 36, 526–563.

Mueller, M.D., Vigne, J.L., Minchenko, A., Lebovic, D.I., Leitman, D.C., and Taylor, R.N. (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10972–10977.

Mueller, M.D., Vigne, J.L., Pritts, E.A., Chao, V., Dreher, E., and Taylor, R.N. (2003). Progesterins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells. *Fertil. Steril.* 79, 386–392.

Muraoka-Cook, R.S., Kurokawa, H., Koh, Y., Forbes, J.T., Roebuck, L.R., Barcellos-Hoff, M.H., Moody, S.E., Chodosh, L.A., and Arteaga, C.L. (2004). Conditional overexpression of active transforming growth factor beta1 in vivo accelerates metastases of transgenic mammary tumors. *Cancer Res.* 64, 9002–9011.

Nagamatsu, T., Fujii, T., Kusumi, M., Zou, L., Yamashita, T., Osuga, Y., Momoeda, M., Kozuma, S., and Taketani, Y. (2004). Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology* 145, 4838–4845.

\*Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., et al. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1–42.

Nestler, J.E. (1987). Modulation of aromatase and P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme activities of human placental cytotrophoblasts by insulin and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 121, 1845–1852.

Nevo, O., Lee, D.K., and Caniggia, I. (2013). Attenuation of VEGFR-2 expression by sFlt-1 and low oxygen in human placenta. *PLoS ONE* 8, e81176.

\*Nguyen, T.D.T., Dolomie-Fagour, L., Georges, A., and Corcuff, J.-B. (2008). [What about bioavailable estradiol?]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 66, 493–497.

\*Nomura, Y., John, R.M., Janssen, A.B., Davey, C., Finik, J., Buthmann, J., Glover, V., and Lambertini, L. (2017). Neurodevelopmental consequences in offspring of mothers with preeclampsia during pregnancy: underlying biological mechanism via imprinting genes. *Archives of Gynecology and Obstetrics*.

\*Norris, W., Nevers, T., Sharma, S., and Kalkunte, S. (2011). Review: hCG, preeclampsia and regulatory T cells. *Placenta* 32, S182–S185.

Norwitz, E.R., Stern, H.M., Grier, H., and Lee-Parritz, A. (2001). Placenta percreta and uterine rupture associated with prior whole body radiation therapy. *Obstet Gynecol* 98, 929–931.

Notation, A.D., and Tagatz, G.E. (1977). Unconjugated estriol and 15alpha-hydroxyestriol in complicated pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 128, 747–756.

Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. (1998). The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 122–126.

Ogle, T.F., and Beyer, B.K. (1982). Steroid-binding specificity of the progesterone receptor from rat placenta. *J. Steroid Biochem.* 16, 147–150.



Ohkuchi, A., Ishibashi, O., Hirashima, C., Takahashi, K., Matsubara, S., Takizawa, T., and Suzuki, M. (2012). Plasma level of hydroxysteroid (17- $\beta$ ) dehydrogenase 1 in the second trimester is an independent risk factor for predicting preeclampsia after adjusting for the effects of mean blood pressure, bilateral notching and plasma level of soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio. *Hypertens. Res.* 35, 1152–1158.

Olsen, R.N., Woelkers, D., Dunsmoor-Su, R., and LaCoursiere, D.Y. (2012). Abnormal second-trimester serum analytes are more predictive of preterm preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 207, 228.e1-228.e7.

\*Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 359–371.

Opdahl, S., Romundstad, P.R., Alsaker, M.D.K., and Vatten, L.J. (2012). Hypertensive diseases in pregnancy and breast cancer risk. *Br. J. Cancer* 107, 176–182.

\*Orshal, J.M., and Khalil, R.A. (2004). Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R233-249.

Paakki, P., Stockmann, H., Kantola, M., Wagner, P., Lauper, U., Huch, R., Elovaara, E., Kirkinen, P., and Pasanen, M. (2000). Maternal drug abuse and human term placental xenobiotic and steroid metabolizing enzymes in vitro. *Environ. Health Perspect.* 108, 141–145.

Palei, A.C., Spradley, F.T., and Granger, J.P. (2015). Chronic hyperleptinemia results in the development of hypertension in pregnant rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 308, R855-861.

Palm, M., Basu, S., Larsson, A., Wernroth, L., Åkerud, H., and Axelsson, O. (2011). A longitudinal study of plasma levels of soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1), placental growth factor (PlGF), sFlt1: PlGF ratio and vascular endothelial growth factor (VEGF-A) in normal pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 90, 1244–1251.

Palmer, A.E., London, W.T., Sly, D.L., and Rice, J.M. (1979). Spontaneous preeclamptic toxemia of pregnancy in the patas monkey (*Erythrocebus patas*). *Lab. Anim. Sci.* 29, 102–106.

Pan, P., Fu, H., Zhang, L., Huang, H., Luo, F., Wu, W., Guo, Y., and Liu, X. (2010). Angiotensin II upregulates the expression of placental growth factor in human vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *BMC Cell Biol.* 11, 36.

Pang, Y., Dong, J., and Thomas, P. (2015). Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor- $\alpha$ . *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308, E899-911.

Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., and Ferrara, N. (1994). Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* 269, 25646–25654.

Pasqualini, J.R., and Chetrite, G. (2008). The anti-aromatase effect of progesterone and of its natural metabolites 20alpha- and 5alpha-dihydroprogesterone in the MCF-7aro breast cancer cell line. *Anticancer Res.* 28, 2129–2133.

\*Pastore, M.B., Jobe, S.O., Ramadoss, J., and Magness, R.R. (2012). *Estrogen receptor- $\alpha$  and estrogen receptor- $\beta$  in the uterine vascular endothelium during pregnancy: functional implications for regulating uterine blood flow.* *Semin. Reprod. Med.* 30, 46–61.

\*Pavenstädt, H., Kriz, W., and Kretzler, M. (2003). *Cell biology of the glomerular podocyte.* *Physiol. Rev.* 83, 253–307.

Pecks, U., Rath, W., Kleine-Eggebrecht, N., Maass, N., Voigt, F., Goecke, T.W., Mohaupt, M.G., and Escher, G. (2016). Maternal Serum Lipid, Estradiol, and Progesterone Levels in Pregnancy, and the Impact of Placental and Hepatic Pathologies. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 76, 799–808.

\*Peleg, D., Kennedy, C.M., and Hunter, S.K. (1998). *Intrauterine growth restriction: identification and management.* *Am Fam Physician* 58, 453–460, 466–467.

\*Peltoketo, H., Luu-The, V., Simard, J., and Adamski, J. (1999). *17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes.* *J. Mol. Endocrinol.* 23, 1–11.

Penning, M.E., Bloemenkamp, K.W.M., van der Zon, T., Zandbergen, M., Schutte, J.M., Bruijn, J.A., Bajema, I.M., and Baelde, H.J. (2014). Association of Preeclampsia with Podocyte Turnover. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 9, 1377–1385.

Pérez-Sepúlveda, A., Torres, M.J., Valenzuela, F.J., Larrain, R., Figueroa-Diesel, H., Galaz, J., Nien, J.K., Serra, R., Michea, L., and Illanes, S.E. (2012). Low 2-methoxyestradiol levels at the first trimester of pregnancy are associated with the development of pre-eclampsia. *Prenat. Diagn.* 32, 1053–1058.

\*Perez-Sepulveda, A., España-Perrot, P.P., Norwitz, E.R., and Illanes, S.E. (2013). *Metabolic pathways involved in 2-methoxyestradiol synthesis and their role in preeclampsia.* *Reprod Sci* 20, 1020–1029.

Perez-Sepulveda, A., Monteiro, L.J., Dobierzewska, A., España-Perrot, P.P., Venegas-Araneda, P., Guzmán-Rojas, A.M., González, M.I., Palominos-Rivera, M., Irarrazabal, C.E., Figueroa-Diesel, H., et al. (2015). Placental Aromatase Is Deficient in Placental Ischemia and Preeclampsia. *PLoS ONE* 10, e0139682.

Perrot-Applanat, M., Deng, M., Fernandez, H., Lelaidier, C., Meduri, G., and Bouchard, P. (1994). Immunohistochemical localization of estradiol and progesterone receptors in human uterus throughout pregnancy: expression in endometrial blood vessels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78, 216–224.

Perucci, L.O., Gomes, K.B., Freitas, L.G., Godoi, L.C., Alpoim, P.N., Pinheiro, M.B., Miranda, A.S., Teixeira, A.L., Dusse, L.M., and Sousa, L.P. (2014). Soluble Endoglin, Transforming Growth Factor-Beta 1 and Soluble Tumor Necrosis Factor Alpha Receptors in Different Clinical Manifestations of Preeclampsia. *PLoS ONE* 9, e97632.

Petsas, G., Jeschke, U., Richter, D.U., Minas, V., Hammer, A., Kalantaridou, S., Toth, B., Tsatsanis, C., Friese, K., and Makrigiannakis, A. (2012). Aberrant expression of corticotropin-releasing hormone in pre-eclampsia induces expression of FasL in maternal macrophages and extravillous trophoblast apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.* 18, 535–545.

Pijnenborg, R., Bland, J.M., Robertson, W.B., and Brosens, I. (1983). Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta* 4, 397–413.

*\*Pijnenborg, R., Vercruyse, L., and Hanssens, M. (2006). The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. Placenta 27, 939–958.*

Pion, R., Jaffe, R., Eriksson, G., Wiqvist, N., and Diczfalusy, E. (1965). Studies on the metabolism of C-21steroids in the human foeto-placental unit. I. Formation of a beta-unsaturated 3-ketones in midterm placentas perfused in situ with pregnenolone and 17-alpha-hydroxypregnenolone. *Acta Endocrinol.* 48, 234–248.

*\*Podjarny, E., Losonczy, G., and Baylis, C. (2004). Animal models of preeclampsia. Semin. Nephrol.* 24, 596–606.

Policastro, P.F., Daniels-McQueen, S., Carle, G., and Boime, I. (1986). A map of the hCG beta-LH beta gene cluster. *J. Biol. Chem.* 261, 5907–5916.

*\*Poon, L.C., and Nicolaides, K.H. (2014). Early Prediction of Preeclampsia. Obstetrics and Gynecology International 2014, 1–11.*

Poon, L.C., Wright, D., Rolnik, D.L., Syngelaki, A., Delgado, J.L., Tsokaki, T., Leipold, G., Akolekar, R., Shearing, S., De Stefani, L., et al. (2017). Aspirin for Evidence-Based Preeclampsia Prevention trial: effect of aspirin in prevention of preterm preeclampsia in subgroups of women according to their characteristics and medical and obstetrical history. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 217, 585.e1-585.e5.

Preziosi, P., Barrett-Connor, E., Papoz, L., Roger, M., Saint-Paul, M., Nahoul, K., and Simon, D. (1993). Interrelation between plasma sex hormone-binding globulin and plasma insulin in healthy adult women: the telecom study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 76, 283–287.

*\*Pringle, K.G., Kind, K.L., Sferruzzi-Perri, A.N., Thompson, J.G., and Roberts, C.T. (2010). Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. Human Reproduction Update 16, 415–431.*

*\*Prossnitz, E.R., Sklar, L.A., Oprea, T.I., and Arterburn, J.B. (2008). GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. Trends Pharmacol. Sci.* 29, 116–123.

Quinkler, M., Meyer, B., Bumke-Vogt, C., Grossmann, C., Gruber, U., Oelkers, W., Diederich, S., and Bahr, V. (2002). Agonistic and antagonistic properties of progesterone metabolites at the human mineralocorticoid receptor. *Eur. J. Endocrinol.* 146, 789–799.

Raam, S., Richardson, G.S., Bradley, F., MacLaughlin, D., Sun, L., Frankel, F., and Cohen, J.L. (1983). Translocation of cytoplasmic estrogen receptors to the nucleus: immunohistochemical demonstration utilizing rabbit antibodies to estrogen receptors of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* 3, 179–199.

Rahman, S.A., Hingorani, V., and Laumas, K.R. (1975). Biosynthesis of oestrogens and their inter-conversion in human placentae from normal and toxæmic pregnancies. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 4, 333–341.

Rana, S., Cerdeira, A.S., Wenger, J., Salahuddin, S., Lim, K.-H., Ralston, S.J., Thadhani, R.I., and Karumanchi, S.A. (2012). Plasma concentrations of soluble endoglin versus standard evaluation in patients with suspected preeclampsia. *PLoS ONE* 7, e48259.

Ranta, J.K., Raatikainen, K., Romppanen, J., Pulkki, K., and Heinonen, S. (2011). Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 157, 48–52.

\*Redman, C.W. (2011a). *Pre-eclampsia: Definitions, paternal contributions and a four stage model. Pregnancy Hypertens* 1, 2–5.

\*Redman, C.W.G. (2011b). *Hypertension in pregnancy: the NICE guidelines. Heart* 97, 1967–1969.

\*Redman, C.W., and Sargent, I.L. (2005). *Latest advances in understanding preeclampsia. Science* 308, 1592–1594.

\*Redman, C.W.G., and Sargent, I.L. (2009). *Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. Placenta* 30 Suppl A, S38-42.

Reed, M.J., Cheng, R.W., Simmonds, M., Richmond, W., and James, V.H. (1987). Dietary lipids: an additional regulator of plasma levels of sex hormone binding globulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 1083–1085.

\*Reisinger, K., Baal, N., McKinnon, T., Münstedt, K., and Zygmunt, M. (2007). *The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? Mol. Cell. Endocrinol.* 269, 65–80.

Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., and Prossnitz, E.R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625–1630.

\*Roberge, S., Nicolaidis, K., Demers, S., Hyett, J., Chaillet, N., and Bujold, E. (2017). *The role of aspirin dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis. Am. J. Obstet. Gynecol.* 216, 110-120.e6.

\*Robinson, C.J., and Stringer, S.E. (2001). *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. J. Cell. Sci.* 114, 853–865.

\*Robinson, D.P., and Klein, S.L. (2012). *Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. Hormones and Behavior* 62, 263–271.

Rodger, M.A., Gris, J.-C., de Vries, J.I.P., Martinelli, I., Rey, É., Schleussner, E., Middeldorp, S., Kaaja, R., Langlois, N.J., Ramsay, T., et al. (2016). Low-molecular-weight heparin and recurrent placenta-mediated pregnancy complications: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *Lancet* 388, 2629–2641.

Roess, D.A., Jewell, M.A., Philpott, C.J., and Barisas, B.G. (1997). The rotational diffusion of LH receptors differs when receptors are occupied by hCG versus LH and is increased by cytochalasin D. *Biochim. Biophys. Acta* 1357, 98–106.

Rolnik, D.L., Wright, D., Poon, L.C., O’Gorman, N., Syngelaki, A., de Paco Matallana, C., Akolekar, R., Cicero, S., Janga, D., Singh, M., et al. (2017). Aspirin versus Placebo in Pregnancies at High Risk for Preterm Preeclampsia. *New England Journal of Medicine* 377, 613–622.

Romero, R., Conde-Agudelo, A., Da Fonseca, E., O’Brien, J.M., Cetingoz, E., Creasy, G.W., Hassan, S.S., and Nicolaides, K.H. (2018). Vaginal progesterone for preventing preterm birth and adverse perinatal outcomes in singleton gestations with a short cervix: a meta-analysis of individual patient data. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 218, 161–180.

Rosen, L.S., Hurwitz, H.I., Wong, M.K., Goldman, J., Mendelson, D.S., Figg, W.D., Spencer, S., Adams, B.J., Alvarez, D., Seon, B.K., et al. (2012). A Phase I First-in-Human Study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research* 18, 4820–4829.

Rosing, U., and Carlström, K. (1984). Serum levels of unconjugated and total oestrogens and dehydroepiandrosterone, progesterone and urinary oestriol excretion in pre-eclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 18, 199–205.

\*Rosner, W. (1990). *The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances.* *Endocr. Rev.* 11, 80–91.

Round, P., Das, S., Wahala, K., Van, P.F., and Hammond, G. (2018). Characterization of sex hormone binding globulin ligands with potential to enhance sex steroid action. *Endocrine Abstracts* 58, 680.

Salafia, C.M., Pezzullo, J.C., López-Zeno, J., Simmens, S., Minior, V.K., and Vintzileos, A.M. (1995). Placental pathologic features of preterm preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 173, 1097–1105.

Salas, S.P., Marshall, G., Gutiérrez, B.L., and Rosso, P. (2006). Time course of maternal plasma volume and hormonal changes in women with preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension* 47, 203–208.

Salom, J.B., Burguete, M.C., Pérez-Asensio, F.J., Torregrosa, G., and Alborch, E. (2001). Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entry inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 422–429.

Salomon, L.-J., Bernard, J.-P., de Stavola, B., Kenward, M., and Ville, Y. (2007). [Birth weight and size: charts and equations]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 36, 50–56.

\*Savitz, D.A., Danilack, V.A., Engel, S.M., Elston, B., and Lipkind, H.S. (2014). *Descriptive Epidemiology of Chronic Hypertension, Gestational Hypertension, and Preeclampsia in New York State, 1995–2004.* *Maternal and Child Health Journal* 18, 829–838.

Schneider, J., Huh, M.M., Bradlow, H.L., and Fishman, J. (1984). Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 259, 4840–4845.

Schultz, J.R., Petz, L.N., and Nardulli, A.M. (2005). Cell- and ligand-specific regulation of promoters containing activator protein-1 and Sp1 sites by estrogen receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* *280*, 347–354.

Schumacher, A., Brachwitz, N., Sohr, S., Engeland, K., Langwisch, S., Dolaptchieva, M., Alexander, T., Taran, A., Malfertheiner, S.F., Costa, S.-D., et al. (2009). Human Chorionic Gonadotropin Attracts Regulatory T Cells into the Fetal-Maternal Interface during Early Human Pregnancy. *The Journal of Immunology* *182*, 5488–5497.

Schutte, J.M., Schuitemaker, N.W.E., van Roosmalen, J., Steegers, E. a. P., and Dutch Maternal Mortality Committee (2008). Substandard care in maternal mortality due to hypertensive disease in pregnancy in the Netherlands. *BJOG* *115*, 732–736.

Schütze, N., Vollmer, G., and Knuppen, R. (1994). Catecholestrogens are agonists of estrogen receptor dependent gene expression in MCF-7 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *48*, 453–461.

Schwers, J., Eriksson, G., and Diczfalusy, E. (1965). 15alpha-hydroxylation : a new pathway of estrogen metabolism in the human fetus and newborn. *Biochim. Biophys. Acta* *100*, 313–316.

\*Seely, E.W., and Ecker, J. (2014). *Chronic Hypertension in Pregnancy. Circulation* *129*, 1254–1261.

Senger, D.R., Connolly, D.T., Van de Water, L., Feder, J., and Dvorak, H.F. (1990). Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res.* *50*, 1774–1778.

\*Sethi, J.K., and Hotamisligil, G.S. (1999). *The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. Semin. Cell Dev. Biol.* *10*, 19–29.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* *376*, 62–66.

Shanker, Y.G., and Rao, A.J. (1999). Progesterone receptor expression in the human placenta. *Mol. Hum. Reprod.* *5*, 481–486.

Sherman, T.S., Chambliss, K.L., Gibson, L.L., Pace, M.C., Mendelsohn, M.E., Pfister, S.L., and Shaul, P.W. (2002). Estrogen acutely activates prostacyclin synthesis in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *26*, 610–616.

\*Shibuya, M. (2011). *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. Genes & Cancer* *2*, 1097–1105.

Shifren, J.L., Tseng, J.F., Zaloudek, C.J., Ryan, I.P., Meng, Y.G., Ferrara, N., Jaffe, R.B., and Taylor, R.N. (1996). Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *81*, 3112–3118.

Shimodaira, M., Nakayama, T., Sato, I., Sato, N., Izawa, N., Mizutani, Y., Furuya, K., and Yamamoto, T. (2012). Estrogen synthesis genes CYP19A1, HSD3B1, and HSD3B2 in hypertensive disorders of pregnancy. *Endocrine* 42, 700–707.

\*Shoelson, S.E., Lee, J., and Goldfine, A.B. (2006). *Inflammation and insulin resistance. J. Clin. Invest.* 116, 1793–1801.

Shore, V.H., Wang, T.H., Wang, C.L., Torry, R.J., Caudle, M.R., and Torry, D.S. (1997). Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 18, 657–665.

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

Sibai, B.M., Mercer, B., and Sarinoglu, C. (1991). Severe preeclampsia in the second trimester: recurrence risk and long-term prognosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165, 1408–1412.

Sibiude, J., Guibourdenche, J., Dionne, M.-D., Le Ray, C., Anselem, O., Serreau, R., Goffinet, F., and Tsatsaris, V. (2012). Placental growth factor for the prediction of adverse outcomes in patients with suspected preeclampsia or intrauterine growth restriction. *PLoS ONE* 7, e50208.

Sieveking, D.P., Lim, P., Chow, R.W.Y., Dunn, L.L., Bao, S., McGrath, K.C.Y., Heather, A.K., Handelsman, D.J., Celermajer, D.S., and Ng, M.K.C. (2010). A sex-specific role for androgens in angiogenesis. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 345–352.

\*Siiteri, P.K. (2005). *The continuing saga of dehydroepiandrosterone (DHEA). J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 3795–3796.

Siiteri, P.K., and MacDonald, P.C. (1966). Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 751–761.

Simoncini, T., Genazzani, A.R., and Liao, J.K. (2002). Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation* 105, 1368–1373.

Smith, R., Mesiano, S., Chan, E.C., Brown, S., and Jaffe, R.B. (1998). Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2916–2920.

Snegovskikh, V., Hodgson, E., Wehrum, M., Luo, G., Funai, E., Ma, Y., Rahman, M., and Norwitz, E. (2007). 400: Human chorionic gonadotrophin (hCG) is produced by both syncytiotrophoblast and cytotrophoblast cells: A paradigm shift. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 197, S120.

Sobrino, A., Mata, M., Laguna-Fernandez, A., Novella, S., Oviedo, P.J., García-Pérez, M.A., Tarín, J.J., Cano, A., and Hermenegildo, C. (2009). Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells. *PLoS ONE* 4, e8242.

\*Solak, Y., Afsar, B., Vaziri, N.D., Aslan, G., Yalcin, C.E., Covic, A., and Kanbay, M. (2016). *Hypertension as an autoimmune and inflammatory disease. Hypertension Research.*

Soucy-Giguère, L., Tétu, A., Gauthier, S., Morand, M., Chandad, F., Giguère, Y., and Bujold, E. (2016). Periodontal Disease and Adverse Pregnancy Outcomes: A Prospective Study in a Low-Risk Population. *J Obstet Gynaecol Can* 38, 346–350.

Souders, C., Maynard, S., Yan, J., Wang, Y., Boatright, N., Sedan, J., Balyozian, D., Cheslock, P., Molrine, D., and Simas, T. (2015). Circulating Levels of sFlt1 Splice Variants as Predictive Markers for the Development of Preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 12436–12453.

Soydinc, H.E., Kan, I., Dal, T., Evsen, M.S., Sak, M.E., Ozler, A., Turgut, A., and Yildiz, I. (2013). Evaluation of the relationship between preeclampsia and seropositivity of infectious disease in maternal plasma. *Clin Ter* 164, e199-202.

Spencer, K., Yu, C.K.H., Rembouskos, G., Bindra, R., and Nicolaides, K.H. (2005). First trimester sex hormone-binding globulin and subsequent development of preeclampsia or other adverse pregnancy outcomes. *Hypertens Pregnancy* 24, 303–311.

*\*Stanczyk, F.Z. (2003). All progestins are not created equal. Steroids* 68, 879–890.

*\*Staun-Ram, E., and Shalev, E. (2005). Human trophoblast function during the implantation process. Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 56.

Stefano, G.B., Prevot, V., Beauvillain, J.C., Cadet, P., Fimiani, C., Welters, I., Fricchione, G.L., Breton, C., Lassalle, P., Salzet, M., et al. (2000). Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation* 101, 1594–1597.

Stepan, H., Unversucht, A., Wessel, N., and Faber, R. (2007). Predictive value of maternal angiogenic factors in second trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion. *Hypertension* 49, 818–824.

*\*Stepan, H., Herraiz, I., Schlembach, D., Verlohren, S., Brennecke, S., Chantraine, F., Klein, E., Lapaire, O., Llurba, E., Ramoni, A., et al. (2015). Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice. Ultrasound Obstet Gynecol* 45, 241–246.

Stepan, H., Hund, M., Gencay, M., Denk, B., Dinkel, C., Kaminski, W.E., Wieloch, P., Semus, B., Meloth, T., Dröge, L.-A., et al. (2016). A comparison of the diagnostic utility of the sFlt-1/PlGF ratio versus PlGF alone for the detection of preeclampsia/HELLP syndrome. *Hypertension in Pregnancy* 35, 295–305.

Stice, S.L., Ford, S.P., Rosazza, J.P., and Van Orden, D.E. (1987). Interaction of 4-hydroxylated estradiol and potential-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels in altering uterine blood flow during the estrous cycle and early pregnancy in gilts. *Biol. Reprod.* 36, 369–375.

*\*Stillman, I.E., and Karumanchi, S.A. (2007). The glomerular injury of preeclampsia. J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2281–2284.

St-Jacques, S., Forte, M., Lye, S.J., and Letarte, M. (1994). Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol. Reprod.* 51, 405–413.



Storment, J.M., Meyer, M., and Osol, G. (2000). Estrogen augments the vasodilatory effects of vascular endothelial growth factor in the uterine circulation of the rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183, 449–453.

\*Stormshak, F., and Bishop, C.V. (2008). Board-invited review: Estrogen and progesterone signaling: genomic and nongenomic actions in domestic ruminants. *J. Anim. Sci.* 86, 299–315.

\*Strauss, J.F., Christenson, L.K., Devoto, L., and Martinez, F. (2000). Providing progesterone for pregnancy: control of cholesterol flux to the side-chain cleavage system. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 55, 3–12.

Strevens, H., Wide-Swensson, D., Hansen, A., Horn, T., Ingemarsson, I., Larsen, S., Willner, J., and Olsen, S. (2003). Glomerular endotheliosis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG* 110, 831–836.

Subtil, D., Goeusse, P., Puech, F., Lequien, P., Biaisque, S., Breart, G., Uzan, S., Marquis, P., Parmentier, D., Churlet, A., 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* 110, 475–484.

\*Suhag, A., and Berghella, V. (2013). Intrauterine Growth Restriction (IUGR): Etiology and Diagnosis. *Current Obstetrics and Gynecology Reports* 2, 102–111.

\*Sullivan, M. h, Elder, M. g, and de Swiet, M. (1999). Too little, too late. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 181, 508–509.

Sun, Y., Niu, W., Du, F., Du, C., Li, S., Wang, J., Li, L., Wang, F., Hao, Y., Li, C., et al. (2016). Safety, pharmacokinetics, and antitumor properties of anlotinib, an oral multi-target tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced refractory solid tumors. *Journal of Hematology & Oncology* 9.

\*Sutter-Dub, M.T. (2002). Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. *Steroids* 67, 77–93.

Tamimi, R., Lagiou, P., Vatten, L.J., Mucci, L., Trichopoulos, D., Hellerstein, S., Ekblom, A., Adami, H.-O., and Hsieh, C.-C. (2003). Pregnancy hormones, pre-eclampsia, and implications for breast cancer risk in the offspring. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 647–650.

\*Tannetta, D., and Sargent, I. (2013). Placental Disease and the Maternal Syndrome of Preeclampsia: Missing Links? *Current Hypertension Reports* 15, 590–599.

Tannetta, D.S., Dragovic, R.A., Gardiner, C., Redman, C.W., and Sargent, I.L. (2013). Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS ONE* 8, e56754.

Taylor, A.H., McParland, P.C., Taylor, D.J., and Bell, S.C. (2009). The cytoplasmic 60 kDa progesterone receptor isoform predominates in the human amniochorion and placenta at term. *Reproductive Biology and Endocrinology* 7, 22.

Thadhani, R., Kisner, T., Hagmann, H., Bossung, V., Noack, S., Schaarschmidt, W., Jank, A., Kribs, A., Cornely, O.A., Kreyssig, C., et al. (2011). Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation* 124, 940–950.

Thadhani, R., Hagmann, H., Schaarschmidt, W., Roth, B., Cingoz, T., Karumanchi, S.A., Wenger, J., Lucchesi, K.J., Tamez, H., Lindner, T., et al. (2016). Removal of Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 by Dextran Sulfate Apheresis in Preeclampsia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 903–913.

the international STRIDER Consortium, Pels, A., Kenny, L.C., Alfirevic, Z., Baker, P.N., von Dadelszen, P., Gluud, C., Kariya, C.T., Mol, B.W., Papageorgiou, A.T., et al. (2017). STRIDER (Sildenafil TheRapy in dismal prognosis early onset fetal growth restriction): an international consortium of randomised placebo-controlled trials. *BMC Pregnancy and Childbirth* 17.

*\*Thomas, P. (2008). Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. Front Neuroendocrinol 29, 292–312.*

*\*Thompson, J., and Haven, G. (1977). Evaluation of a radioimmunoassay for serum unconjugated estriol using commercial reagents. Am. J. Clin. Pathol. 68, 474–480.*

Toda, K., Simpson, E.R., Mendelson, C.R., Shizuta, Y., and Kilgore, M.W. (1994). Expression of the gene encoding aromatase cytochrome P450 (CYP19) in fetal tissues. *Mol. Endocrinol.* 8, 210–217.

Tong, M.H., Jiang, H., Liu, P., Lawson, J.A., Brass, L.F., and Song, W.-C. (2005). Spontaneous fetal loss caused by placental thrombosis in estrogen sulfotransferase-deficient mice. *Nat. Med.* 11, 153–159.

Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M.G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D.H., Husain, M., and Letarte, M. (2005). A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ. Res.* 96, 684–692.

Torsney, E., Charlton, R., Parums, D., Collis, M., and Arthur, H.M. (2002). Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm. Res.* 51, 464–470.

Toth, P., Li, X., Rao, C.V., Lincoln, S.R., Sanfilippo, J.S., Spinnato, J.A., and Yussman, M.A. (1994). Expression of functional human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptor gene in human uterine arteries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 307–315.

*\*Tranquilli, A.L., Dekker, G., Magee, L., Roberts, J., Sibai, B.M., Steyn, W., Zeeman, G.G., and Brown, M.A. (2014). The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. Pregnancy Hypertens 4, 97–104.*

Trapani, A., Gonçalves, L.F., Trapani, T.F., Vieira, S., Pires, M., and Pires, M.M. de S. (2016). Perinatal and Hemodynamic Evaluation of Sildenafil Citrate for Preeclampsia Treatment: A Randomized Controlled Trial. *Obstet Gynecol* 128, 253–259.

Trogstad, L.I., Eskild, A., Bruu, A.L., Jeansson, S., and Jenum, P.A. (2001). Is preeclampsia an infectious disease? *Acta Obstet Gynecol Scand* 80, 1036–1038.

\*Tsampalas, M., Grیدهlet, V., Berndt, S., Foidart, J.-M., Geenen, V., and Perrier d'Hauterive, S. (2010). Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J. Reprod. Immunol.* 85, 93–98.

Tsatsaris, V., Goffin, F., Munaut, C., Brichant, J.-F., Pignon, M.-R., Noel, A., Schaaps, J.-P., Cabrol, D., Frankenne, F., and Foidart, J.-M. (2003). Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 5555–5563.

\*Tsatsaris, V., Goffin, F., and Foidart, J.M. (2004). Circulating angiogenic factors and preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 350, 2003–2004; author reply 2003-2004.

Tse, C., Lefevre, G., Berkane, N., Flahault, A., Toumi, K., Brault, D., Capeau, J., and Uzan, S. (2004). Increased serum maternal levels of the HER2 oncoprotein p105 ectodomain in preeclampsia. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42, 142–146.

Tskitishvili, E., Nisolle, M., Munaut, C., Pequeux, C., Gerard, C., Noel, A., and Foidart, J.-M. (2014). Estetrol attenuates neonatal hypoxic–ischemic brain injury. *Experimental Neurology* 261, 298–307.

\*Tuckey, R.C. (2005). Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26, 273–281.

Turgut, A., Ozler, A., Goruk, N.Y., Tunç, S.Y., Sak, M.E., Evsen, M.S., Evliyaoglu, O., and Gul, T. (2015). Serum levels of the adipokines, free fatty acids, and oxidative stress markers in obese and non-obese preeclamptic patients. *Clin Exp Obstet Gynecol* 42, 473–479.

Ulmanen, I., Peränen, J., Tenhunen, J., Tilgmann, C., Karhunen, T., Panula, P., Bernasconi, L., Aubry, J.P., and Lundström, K. (1997). Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 243, 452–459.

Uzan, S., Beaufils, M., Breart, G., Bazin, B., Capitant, C., and Paris, J. (1991). Prevention of fetal growth retardation with low-dose aspirin: findings of the EPREDA trial. *Lancet* 337, 1427–1431.

Uzelac, P.S., Li, X., Lin, J., Neese, L.D., Lin, L., Nakajima, S.T., Bohler, H., and Lei, Z. (2010). Dysregulation of Leptin and Testosterone Production and Their Receptor Expression in the Human Placenta with Gestational Diabetes Mellitus. *Placenta* 31, 581–588.

Valensise, H., Vasapollo, B., Gagliardi, G., and Novelli, G.P. (2008). Early and Late Preeclampsia: Two Different Maternal Hemodynamic States in the Latent Phase of the Disease. *Hypertension* 52, 873–880.

Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y.M., Bdolah, Y., Lim, K.-H., Yuan, H.-T., Libermann, T.A., et al. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* 12, 642–649.

Verlohren, S., Herraiz, I., Lapaire, O., Schlembach, D., Zeisler, H., Calda, P., Sabria, J., Markfeld-Erol, F., Galindo, A., Schoofs, K., et al. (2014). New gestational phase-specific

cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. *Hypertension* 63, 346–352.

Viglierchio, M., García, M.G., Riesco, O., Williamson, D.M., Williams, S.I., Lacolla, D.V., Koncurat, M.A., and Yaful, G.N. (2015). Progesterone receptors and progesterone concentration in serum and porcine maternal placental extracts. *Placenta* 36, 499.

Visser, M., Holinka, C.F., and Coelingh Bennink, H.J.T. (2008). First human exposure to exogenous single-dose oral estetrol in early postmenopausal women. *Climacteric 11 Suppl 1*, 31–40.

*\*Wallace, A.E., Fraser, R., and Cartwright, J.E. (2012). Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. Hum. Reprod. Update 18, 458–471.*

Walsh, S.W. (1988). Progesterone and estradiol production by normal and preeclamptic placentas. *Obstet Gynecol* 71, 222–226.

Walter, L.M., Rogers, P.A.W., and Girling, J.E. (2005). The role of progesterone in endometrial angiogenesis in pregnant and ovariectomised mice. *Reproduction* 129, 765–777.

Wang, Y., Chen, Q., Zhao, M., Walton, K., Harrison, C., and Nie, G. (2017). Multiple Soluble TGF- $\beta$  Receptors in Addition to Soluble Endoglin Are Elevated in Preeclamptic Serum and They Synergistically Inhibit TGF- $\beta$  Signaling. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 102, 3065–3074.

Wei, L.L., Hawkins, P., Baker, C., Norris, B., Sheridan, P.L., and Quinn, P.G. (1996). An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.* 10, 1379–1387.

Weinstein, L. (1982). Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 142, 159–167.

Welsh, T., Johnson, M., Yi, L., Tan, H., Rahman, R., Merlino, A., Zakar, T., and Mesiano, S. (2012). Estrogen receptor (ER) expression and function in the pregnant human myometrium: estradiol via ER $\alpha$  activates ERK1/2 signaling in term myometrium. *J. Endocrinol.* 212, 227–238.

Westerlind, K.C., Gibson, K.J., Evans, G.L., and Turner, R.T. (2000). The catechol estrogen, 4-hydroxyestrone, has tissue-specific estrogen actions. *J. Endocrinol.* 167, 281–287.

*\*Westphal, U. (1986). Steroid-protein interactions II. Monogr Endocrinol 27, 1–603.*

*\*Wheeler, T., Elcock, C.L., and Anthony, F.W. (1995). Angiogenesis and the placental environment. Placenta 16, 289–296.*

*\*Whitley, G.S.J., and Cartwright, J.E. (2009). Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. J. Anat. 215, 21–26.*

*\*Wiebe, J.P. (2006). Progesterone metabolites in breast cancer. Endocr. Relat. Cancer 13, 717–738.*

Wiebe, J.P., Muzia, D., Hu, J., Szwajcer, D., Hill, S.A., and Seachrist, J.L. (2000). The 4-pregnene and 5 $\alpha$ -pregnane progesterone metabolites formed in nontumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Res.* 60, 936–943.

Wiebe, J.P., Zhang, G., Welch, I., and Cadieux-Pitre, H.-A.T. (2013). Progesterone metabolites regulate induction, growth, and suppression of estrogen- and progesterone receptor-negative human breast cell tumors. *Breast Cancer Research* 15.

\*Williams, D. (2011). *Long-Term Complications of Preeclampsia. Seminars in Nephrology* 31, 111–122.

Witkowska, H.E., Carlquist, M., Engström, O., Carlsson, B., Bonn, T., Gustafsson, J.A., and Shackleton, C.H. (1997). Characterization of bacterially expressed rat estrogen receptor beta ligand binding domain by mass spectrometry: structural comparison with estrogen receptor alpha. *Steroids* 62, 621–631.

Witlin, A.G., and Sibai, B.M. (2001). Perinatal and maternal outcome following abruptio placentae. *Hypertens Pregnancy* 20, 195–203.

\*Wollmann, H.A. (1998). *Intrauterine growth restriction: definition and etiology. Horm. Res.* 49 Suppl 2, 1–6.

Woolard, J., Wang, W.-Y., Bevan, H.S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R.O., Cui, T.-G., Sugiono, M., Waite, E., Perrin, R., et al. (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 64, 7822–7835.

Worda, C., Sator, M.O., Schneeberger, C., Jantschev, T., Ferlitsch, K., and Huber, J.C. (2003). Influence of the catechol-O-methyltransferase (COMT) codon 158 polymorphism on estrogen levels in women. *Hum. Reprod.* 18, 262–266.

\*Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy (2000). *Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol.* 183, S1–S22.

Wu, L., Einstein, M., Geissler, W.M., Chan, H.K., Elliston, K.O., and Andersson, S. (1993). Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* 268, 12964–12969.

\*Wu, S., Kim, C., Baer, L., and Zhu, X. (2010). *Bevacizumab Increases Risk for Severe Proteinuria in Cancer Patients. Journal of the American Society of Nephrology* 21, 1381–1389.

Xie, F., Hu, Y., Magee, L.A., Money, D.M., Patrick, D.M., Kraiden, M., Thomas, E., von Dadelszen, P., and Toxemia Study Group (2010). An association between cytomegalovirus infection and pre-eclampsia: a case-control study and data synthesis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 89, 1162–1167.

\*Yager, J.D., and Davidson, N.E. (2006). *Estrogen carcinogenesis in breast cancer. N. Engl. J. Med.* 354, 270–282.

Yamashita, H., Ichijo, H., Grimsby, S., Morén, A., ten Dijke, P., and Miyazono, K. (1994). Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 269, 1995–2001.

\*Yeh, C.-C., Chao, K.-C., and Huang, S.J. (2013). *Innate Immunity, Decidual Cells, and Preeclampsia. Reproductive Sciences* 20, 339–353.

Yin, G., Zhu, X., Guo, C., Yang, Y., Han, T., Chen, L., Yin, W., Gao, P., Zhang, H., Geng, J., et al. (2013). Differential expression of estradiol and estrogen receptor  $\alpha$  in severe preeclamptic pregnancies compared with normal pregnancies. *Mol Med Rep* 7, 981–985.

Yonekura, H., Sakurai, S., Liu, X., Migita, H., Wang, H., Yamagishi, S., Nomura, M., Abedin, M.J., Unoki, H., Yamamoto, Y., et al. (1999). Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 35172–35178.

Yoshida, N., and Osawa, Y. (1991). Purification of human placental aromatase cytochrome P-450 with monoclonal antibody and its characterization. *Biochemistry* 30, 3003–3010.

\*Young, S., and Lessey, B. (2010). *Progesterone Function in Human Endometrium: Clinical Perspectives. Seminars in Reproductive Medicine* 28, 005–016.

Younglai, E.V., Wu, Y.J., Kwan, T.K., and Kwan, C.-Y. (2005). Non-genomic action of estradiol and progesterone on cytosolic calcium concentrations in primary cultures of human granulosa-lutein cells. *Hum. Reprod.* 20, 2383–2390.

Yu, C., Papageorghiou, A., Bindra, R., Spencer, K., and Nicolaides, K. (2004). Second-trimester sex hormone-binding globulin and subsequent development of pre-eclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 16, 158–162.

Zachariades, E., Mparmpakas, D., Pang, Y., Rand-Weaver, M., Thomas, P., and Karteris, E. (2012). Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour. *Placenta* 33, 367–372.

Zamudio, S., Leslie, K.K., White, M., Hagerman, D.D., and Moore, L.G. (1994). Low serum estradiol and high serum progesterone concentrations characterize hypertensive pregnancies at high altitude. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 1, 197–205.

Zbella, E.A., Ilekis, J., Scommegna, A., and Benveniste, R. (1986). Competitive studies with dehydroepiandrosterone sulfate and 16 alpha-hydroxydehydroepiandrosterone sulfate in cultured human choriocarcinoma JEG-3 cells: effect on estrone, 17 beta-estradiol, and estriol secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63, 751–757.

Zeisler, H., Sator, M.O., and Joura, E.A. (2000). Serum levels of progesterone in patients with preeclampsia. *Wien. Klin. Wochenschr.* 112, 362–364.

Zeisler, H., Llurba, E., Chantraine, F., Vatish, M., Staff, A.C., Sennström, M., Olovsson, M., Brennecke, S.P., Stepan, H., Allegranza, D., et al. (2016). Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 374, 13–22.

Zhang, J., and Zhang, W. (2012). [Relationship of cytomegalovirus, Chlamydia pneumoniae and herpes simplex virus type 2 infections with preeclampsia]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 92, 1413–1415.

Zhang, Z., Neiva, K.G., Lingen, M.W., Ellis, L.M., and Nör, J.E. (2010). VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell Death Differ.* 17, 499–512.

Zhao, S., Gu, Y., Fan, R., Groome, L.J., Cooper, D., and Wang, Y. (2010). Proteases and sFlt-1 Release in the Human Placenta. *Placenta* 31, 512–518.

Zhou, Y., Fisher, S.J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., and Damsky, C.H. (1997). Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.* 99, 2139–2151.

Zhou, Y., McMaster, M., Woo, K., Janatpour, M., Perry, J., Karpanen, T., Alitalo, K., Damsky, C., and Fisher, S.J. (2002). Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am. J. Pathol.* 160, 1405–1423.

*\*Zhu, X., Wu, S., Dahut, W.L., and Parikh, C.R. (2007). Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. Am. J. Kidney Dis.* 49, 186–193.





**Titre : Stéroïdogénèse anormale et statut anti-angiogénique au cours de la prééclampsie : Utilisation potentielle comme biomarqueurs.**

**Mots clés :** Prééclampsie, sFlt1, oestrogènes, progestérone, retard de croissance intra utérin, aromatasase.

**Résumé :** Le sFlt1 semble être un bon marqueur de la prééclampsie (PE). Nous avons évalué dans le cadre d'un essai randomisé contrôlé (MOMA), l'impact sur l'issue de grossesse d'un suivi rapproché de femmes identifiées comme « à risque » par un taux élevé de sFlt1 plasmatique entre 24 et 29 SA. Dans cet essai 939 nullipares ont été incluses en 2 bras (sFlt1 connu ou non connu). Nos résultats ne montrent pas d'amélioration de l'issue de grossesse et suggèrent que l'inefficacité de l'intervention (suivi rapproché) en est la cause la plus probable. Aussi la mesure du sFlt1 pour prédire la survenue d'une PE ne semble pas utile tant qu'un traitement efficace n'est pas à disposition. Des anomalies de la stéroïdogénèse placentaire ont été retrouvées associées à la PE. 90 échantillons issus de la cohorte MOMA répartis en trois groupes (25 PE, 25 retard de croissance intra utérin (RCIU) sans PE et 40 contrôles) ont été utilisés pour évaluer le profil stéroïdien par la technique fiable de GC/MS

(entre 24 et 29 SA) - soit avant les signes cliniques -. Nous avons mis en évidence dans le groupe PE un défaut d'aromatation des androgènes par le calcul du ratio estradiol/ $\Delta$ 4-Dione (sang) et un défaut d'expression de l'aromatase (placenta). Tout comme les taux significativement bas de sulfate de prégnénolone retrouvés, ce défaut d'aromatation semble spécifique de la PE car ils n'ont pas été observés dans le groupe RCIU. Ces modifications s'inscrivent dans une dérégulation du profil stéroïdien global. Nous avons en effet observé dans les groupes PE et RCIU, un excès de 20 $\alpha$ -dihydro-progestérone (20 $\alpha$ -DHP) et un ratio 20 $\alpha$ -DHP/Progestérone significativement élevé. Les stéroïdes sexuels partagent des voies de signalisation communes avec les facteurs angiogéniques, faisant inscrire aisément l'hypothèse « anomalies de la stéroïdogénèse » dans les concepts actuels de la physiopathologie de la PE. Les liens entre perturbations de la stéroïdogénèse et la prééclampsie sont discutés.

**Title : Abnormal steroidogenesis and antiangiogenic status during preeclampsia: Potential use as biomarkers.**

**Keywords :** Preeclampsia, sFlt1, estrogens, progesterone, intrauterine growth retardation, aromatasase.

**Abstract :** sFlt1 appears to be a good biomarker of preeclampsia (PE). The impact on pregnancy outcomes of close monitoring of women identified as "at risk" at 24 and 29 weeks of gestation (weeks) by a high level of plasma sFlt1, was evaluated in a randomized controlled trial (MOMA). 939 nulliparous women were included in 2 arms (sFlt1 known or unknown). Our results do not show any improvement of pregnancy outcomes and suggest that the inefficiency of the intervention (close follow-up) is the most likely cause. Thus, routine sFlt1 screening to predict the occurrence of PE does not seem useful until effective treatment is available. Abnormalities of placental steroidogenesis have been associated with PE. 90 samples from the MOMA cohort divided into three groups (25 intra-uterine growth retardation (IUGR) without PE, 25 PE and 40 controls) were used to assess by the reliable GC / MS technique,

the steroid profile (between 24 and 29 weeks) before the development of clinical signs. In the PE group, we showed abnormal androgen aromatization, by calculating the estradiol/ $\Delta$ 4-Dione ratio (blood), and a lack of expression of placental aromatase. Similarly to the significantly low levels of pregnenolone sulfate found, this lack of aromatization seems specific to PE as they are not found in the IUGR group. These modifications are part of a deregulation of the overall steroid profile. In the PE and IUGR groups, we observed an excess of 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone (20 $\alpha$ -DHP) and a significantly high 20 $\alpha$ -DHP/Progesterone ratio. Sex steroids share common signaling pathways with angiogenic factors which easily integrates the "steroidogenesis abnormalities" hypothesis in the current concepts in the pathophysiology of PE. Links between disturbances of steroidogenesis and PE are discussed.



**Titre : Stéroïdogénèse anormale et statut anti-angiogénique au cours de la prééclampsie : Utilisation potentielle comme biomarqueurs.**

**Mots clés :** Prééclampsie, sFlt1, oestrogènes, progestérone, retard de croissance intra utérin, aromatasase.

**Résumé :** Le sFlt1 semble être un bon marqueur de la prééclampsie (PE). Nous avons évalué dans le cadre d'un essai randomisé contrôlé (MOMA), l'impact sur l'issue de grossesse d'un suivi rapproché de femmes identifiées comme « à risque » par un taux élevé de sFlt1 plasmatique entre 24 et 29 SA. Dans cet essai 939 nullipares ont été incluses en 2 bras (sFlt1 connu ou non connu). Nos résultats ne montrent pas d'amélioration de l'issue de grossesse et suggèrent que l'inefficacité de l'intervention (suivi rapproché) en est la cause la plus probable. Aussi la mesure du sFlt1 pour prédire la survenue d'une PE ne semble pas utile tant qu'un traitement efficace n'est pas à disposition. Des anomalies de la stéroïdogénèse placentaire ont été retrouvées associées à la PE. 90 échantillons issus de la cohorte MOMA répartis en trois groupes (25 PE, 25 retard de croissance intra utérin (RCIU) sans PE et 40 contrôles) ont été utilisés pour évaluer le profil stéroïdien par la technique fiable de GC/MS

(entre 24 et 29 SA) - soit avant les signes cliniques -. Nous avons mis en évidence dans le groupe PE un défaut d'aromatation des androgènes par le calcul du ratio estradiol/ $\Delta$ 4-Dione (sang) et un défaut d'expression de l'aromatase (placenta). Tout comme les taux significativement bas de sulfate de prégnénolone retrouvés, ce défaut d'aromatation semble spécifique de la PE car ils n'ont pas été observés dans le groupe RCIU. Ces modifications s'inscrivent dans une dérégulation du profil stéroïdien global. Nous avons en effet observé dans les groupes PE et RCIU, un excès de 20 $\alpha$ -dihydro-progestérone (20 $\alpha$ -DHP) et un ratio 20 $\alpha$ -DHP/Progestérone significativement élevé. Les stéroïdes sexuels partagent des voies de signalisation communes avec les facteurs angiogéniques, faisant inscrire aisément l'hypothèse « anomalies de la stéroïdogénèse » dans les concepts actuels de la physiopathologie de la PE. Les liens entre perturbations de la stéroïdogénèse et la prééclampsie sont discutés.

**Title : Abnormal steroidogenesis and antiangiogenic status during preeclampsia: Potential use as biomarkers.**

**Keywords :** Preeclampsia, sFlt1, estrogens, progesterone, intrauterine growth retardation, aromatasase.

**Abstract :** sFlt1 appears to be a good biomarker of preeclampsia (PE). The impact on pregnancy outcomes of close monitoring of women identified as "at risk" at 24 and 29 weeks of gestation (weeks) by a high level of plasma sFlt1, was evaluated in a randomized controlled trial (MOMA). 939 nulliparous women were included in 2 arms (sFlt1 known or unknown). Our results do not show any improvement of pregnancy outcomes and suggest that the inefficiency of the intervention (close follow-up) is the most likely cause. Thus, routine sFlt1 screening to predict the occurrence of PE does not seem useful until effective treatment is available. Abnormalities of placental steroidogenesis have been associated with PE. 90 samples from the MOMA cohort divided into three groups (25 intra-uterine growth retardation (IUGR) without PE, 25 PE and 40 controls) were used to assess by the reliable GC / MS technique,

the steroid profile (between 24 and 29 weeks) before the development of clinical signs. In the PE group, we showed abnormal androgen aromatization, by calculating the estradiol/ $\Delta$ 4-Dione ratio (blood), and a lack of expression of placental aromatase. Similarly to the significantly low levels of pregnenolone sulfate found, this lack of aromatization seems specific to PE as they are not found in the IUGR group. These modifications are part of a deregulation of the overall steroid profile. In the PE and IUGR groups, we observed an excess of 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone (20 $\alpha$ -DHP) and a significantly high 20 $\alpha$ -DHP/Progesterone ratio. Sex steroids share common signaling pathways with angiogenic factors which easily integrates the "steroidogenesis abnormalities" hypothesis in the current concepts in the pathophysiology of PE. Links between disturbances of steroidogenesis and PE are discussed.