

Université de Montréal

**Les prostanoides contrôlent la circulation placentaire ;
implication dans la prééclampsie**

par

Leslie Hausermann

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

Pharmacologie intégrative cardiovasculaire

juin, 2012

© Leslie Hausermann, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Les prostanoïdes contrôlent la circulation placentaire ; implication dans la
prééclampsie

Présentée par :
Leslie Hausermann

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Audrey Claing, président-rapporteur
Dr. Jean St-Louis, directeur de recherche
Dre Julie Lavoie, membre du jury
Dre Cathy Vaillancourt, examinateur externe
Dr. Réjean Couture, représentant du doyen

Résumé

Au cours de la grossesse, une perfusion placentaire adéquate est indispensable au bon développement du fœtus. Dans certaines maladies comme la prééclampsie, celle-ci est altérée, compromettant ainsi la vie du fœtus, mais aussi celle de sa mère. Le retrait du placenta mène à la disparition des symptômes de la prééclampsie, suggérant un rôle central de ce dernier dans la maladie. Le placenta étant dépourvu d'innervation autonome, le tonus vasculaire placentaire doit être sous le contrôle de facteurs humoraux et tissulaires. Les vaisseaux placentaires sont très réactifs aux prostanoides. Le rapport thromboxane A₂ (TXA₂)/prostacycline (PGI₂) est fortement augmenté dans les placentas de grossesses avec prééclampsie. De plus, le taux d'isoprostane, marqueur du stress oxydatif, est accru dans les placentas de femmes avec prééclampsie. Finalement, la prééclampsie s'accompagne d'un stress oxydatif placentaire marqué. Les espèces réactives de l'oxygène sont connues d'une part, pour oxyder l'acide arachidonique (AA), formant ainsi des isoprostanes et d'autre part, pour augmenter la production de TXA₂ dans différents tissus, suite à l'activation des cyclooxygénases (COXs). Nous proposons que :

1. les prostanoides sont parmi les molécules endogènes qui contrôlent le tonus vasculaire placentaire.
2. la maladie modifie la réponse aux isoprostanes dans les vaisseaux placentaires.
3. l'induction d'un stress oxydatif placentaire entraîne une réponse vasoactive par activation de la voie du métabolisme de l'AA.

Nous avons tout d'abord montré, dans des placentas obtenus de grossesses normotensives, que l'U-46619, un mimétique de la TXA₂, de même que l'isoprostane, 8-iso-prostaglandine E₂ (8-isoPGE₂), ont augmenté fortement la pression de perfusion dans les cotylédons perfusés *in vitro* et la tension dans les anneaux d'artères chorioniques suspendus dans des bains à organe isolé. En revanche, dans les artères chorioniques de placentas obtenus de grossesses avec prééclampsie, ces réponses étaient modifiées puisque la réponse maximale à l'U-46619 était augmentée et celle à la 8-isoPGE₂ diminuée. D'autre part, nous avons montré que les réponses maximales aux deux prostanoides étaient augmentées dans les vaisseaux placentaires de grossesse normale ou avec prééclampsie

issus d'une délivrance prématurée par rapport à ceux d'une délivrance à terme. Ceci suggère une évolution de la réactivité des artères placentaires au cours du 3^e trimestre de grossesse. En outre, les vaisseaux placentaires ont répondu aux prostanoïdes de façon semblable qu'ils aient été issus d'un accouchement vaginal ou d'une césarienne élective. Ceci indique que les prostanoïdes placentaires n'interviennent pas dans le processus de délivrance. D'un autre côté, l'utilisation de bloqueurs spécifiques des récepteurs TP à la TXA₂, le SQ29,548 et l'ICI192,605, et des récepteurs EP à la prostaglandine E₂, l'AH6809, nous ont permis de mettre en évidence le fait que l'U-46619 et la 8-isoPGE₂ pouvaient agir de façon non-sélective sur l'un ou l'autre des récepteurs. Ces résultats supportent donc nos 2 premières hypothèses : les prostanoïdes font partie des molécules endogènes qui peuvent contrôler le tonus vasculaire placentaire et la prééclampsie modifie la réponse aux isoprostanes dans les artères chorioniques d'une manière compatible avec l'augmentation de la production de ces substances qui elle, est probablement le résultat du stress oxydatif.

En revanche, en ce qui concerne les substances capables de jouer la contrepartie vasodilatatrice, l'utilisation d'un inhibiteur des synthèses de monoxyde d'azote, le L-NAME, et celle d'inhibiteurs des COXs, l'ibuprofène, l'indométacine et le N-2PIA, ne nous a pas permis de mettre en évidence un quelconque rôle du monoxyde d'azote ou des prostanoïdes vasodilatatrices à ce niveau.

Finalement, nous avons montré que l'induction d'un stress oxydatif dans les cotylédons perfusés *in vitro* et les artères chorioniques entraînait une vasoconstriction marquée. Celle-ci semble résulter de l'action des prostanoïdes puisqu'un blocage des récepteurs TP ou des COXs diminuait significativement la réponse maximale au peroxyde d'hydrogène. Les prostanoïdes impliquées dans la réponse au stress oxydatif proviendraient essentiellement d'une activation des COXs puisque l'étude ne nous permet pas de conclure à une quelconque implication des isoprostanes dans cette réponse. Ces observations confirment donc notre hypothèse que, dans le placenta, le stress oxydatif possède des propriétés vasoactives par activation du métabolisme de l'AA.

En résumé, les résultats obtenus dans les placentas de grossesses normotensives et avec prééclampsie suggèrent que les prostanoïdes sont des molécules d'importance dans la régulation du tonus vasculaire placentaire. Le fait que la prééclampsie modifie la réponse

aux prostanoïdes pourrait expliquer pourquoi la perfusion placentaire est altérée chez ces patientes. En outre, il apparaît évident qu'il existe un lien étroit entre le stress oxydatif et la voie de synthèse des prostanoïdes placentaires. Cependant d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre la nature de ce lien, qui pourrait, d'une certaine façon, jouer un rôle important dans le développement de la prééclampsie.

Mots-clés : Placenta, Thromboxane A₂, Monoxyde d'azote, Isoprostanes, Stress oxydatif, Cotylédons, Artères chorioniques, Peroxyde d'hydrogène.

Abstract

Throughout pregnancy, appropriate placental perfusion is essential for the foetus to grow properly. In disease such as preeclampsia, placental perfusion is impaired, compromising the foetus and mother's lives. Placenta delivery leads to a complete disappearance of the clinical symptoms of preeclampsia. This suggests that the placenta plays a central role in the disease. Placenta being devoid of autonomous innervation, placental vascular tone needs to be under the control of humoral and tissular factors; placental arteries are very reactive to prostanoids. The thromboxane A₂ (TXA₂)/prostacyclin (PGI₂) ratio is increased in placenta from preeclamptic women. Furthermore, in placenta from preeclamptic pregnancies, isoprostane rate is increased, which is a marker of oxidative stress. Finally, preeclampsia is characterised by an important oxidative stress. Reactive oxygen species are known to form isoprostane through the oxidation of arachidonic acid (AA) and to increase TXA₂ production in various tissues following an activation of the cyclooxygenases (COXs). We postulate that:

1. prostanoids are among the endogenous molecules that control placental vascular tone.
2. preeclampsia alters responses to isoprostanes in placental vessels.
3. induced placental oxidative stress leads to vasoactive responses through the activation of the AA metabolism.

We first showed in placentas from normotensive pregnancies that the TXA₂ mimetic U-46619 and the isoprostane 8-isoprostaglandin E₂ (8-isoPGE₂) markedly increased perfusion pressure in *in vitro* perfused cotyledons, as well as tension in isolated chorionic arteries. However, in placentas obtained from women with preeclampsia, those responses were altered in chorionic arteries. Indeed, maximal response to U-46619 was raised by preeclampsia, while the one to 8-isoPGE₂ was decreased. We then showed that preterm delivery increased maximal responses to both prostanoids compared to term delivery. This observation suggests that placental arteries reactivity evolves along the 3rd trimester of pregnancy. Nevertheless, it appeared that delivery mode had no effect on vascular responses to prostanoids, suggesting that placental prostanoids are not involved in the

delivery process. The use of specific blockers of the TXA₂ TP receptors, SQ29,548 and ICI192,605, and of the prostaglandin E₂ EP receptors, AH6809, revealed that U-46619 and 8-isoPGE₂ could mediate their effects by acting on both receptors in a non-selective manner. Therefore, these results support our two first postulates: prostanoids could be the endogenous substances controlling the placental vascular tone and preeclampsia alters responses to isoprostanes in chorionic artery rings in a way compatible with the increased production of these substances possibly through the associated oxidative stress.

Moreover, we were unable to identify any vasodilator substances capable of counteracting the effects of vasoconstrictors in the placental circulation. Indeed, blocker of nitric oxide synthases, L-NAME, as well as blockers of COXs, ibuprofen, indometacin and N-2PIA, did not reveal any effect of nitric oxide and vasodilator prostanoids at this level.

Finally, we showed that induction of oxidative stress in *in vitro* perfused cotyledons and in isolated chorionic artery rings led to marked vasoconstriction. This would result from the action of prostanoids since a blockade of TP receptors or COXs significantly decreased maximal response to hydrogen peroxide. Prostanoids involved in this response would essentially come from COX activation. Indeed, the present results did not show any concrete involvement of isoprostane substances in the response to oxidative stress. Consequently, these observations confirm our hypothesis that, in the placenta, oxidative stress presents some vasoactive properties through the activation of the AA metabolism.

In summary, results obtained in placentas from normotensive and preeclamptic pregnancies suggest that prostanoids are important in the regulation of the placental vascular tone. Furthermore, responses to prostanoids in chorionic arteries are altered by preeclampsia, which could explain why the placental perfusion is impaired in the disease. Moreover, it seems clear that there is a close relationship between oxidative stress and synthesis of placental prostanoids. However, more investigations are needed to better understand the nature of this relationship, which, in some way, could play an important role in the development of preeclampsia.

Keywords : Placenta, Thromboxane A₂, Nitric oxide, Isoprostane, Oxidative stress, Cotyledons, Chorionic arteries, Hydrogen peroxide.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des Abréviations.....	xii
Remerciements.....	xxii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1. Le placenta, un organe de premier plan.....	2
1.1. Implantation et développement placentaire.....	2
1.1.1. Le Blastocyste.....	2
1.1.2. Différenciation et invasion trophoblastique.....	4
1.1.3. Les lacunes trophoblastiques.....	7
1.2. Physiologie Placentaire.....	8
1.2.1. Face fœtale vs face maternelle.....	8
1.2.2. Les cotylédons, unités fonctionnelles du placenta.....	9
1.2.3. La vascularisation placentaire.....	11
1.2.3.1. Architecture vasculaire du placenta.....	11
1.2.3.2. Régulation du tonus vasculaire placentaire.....	12
1.3. Le rôle du placenta.....	14
1.3.1. Les transferts placentaires.....	14
1.3.2. Fonction nutritive.....	15
1.3.3. Fonction respiratoire.....	17
1.3.4. Fonction excrétoire.....	17
1.3.5. Fonction endocrinienne.....	18
2. La prééclampsie.....	19

2.1. Diagnostique et traitement de la prééclampsie.....	19
2.2. Les complications de la prééclampsie	21
2.3. Prééclampsie vs grossesse normotensive	23
2.3.1. Remodelage vasculaire utérin.....	23
2.3.2. Les changements hémodynamiques.....	25
2.3.3. Les facteurs de croissances	26
2.3.4. La fonction endothéliale	29
3. Les prostanoïdes	31
3.1. Synthèse des prostanoïdes.....	31
3.1.1. Prostaglandines et Thromboxane A ₂	31
3.1.2. Isoprostanes	33
3.2. Les récepteurs des prostanoïdes.....	33
3.3. Effets des prostanoïdes	36
3.3.1. Implication dans la réponse inflammatoire	36
3.3.2. Implication dans la coagulation	38
3.3.3. Effets vasoactifs des prostanoïdes	39
3.4. Prostanoïdes et grossesse	40
3.4.1. Prostanoïdes et réactivité des vaisseaux placentaires	40
3.4.2. Implications des prostanoïdes de l'implantation à l'accouchement	41
3.4.3. Les prostanoïdes et la prééclampsie	42
4. Le monoxyde d'azote	44
4.1. Synthèse du monoxyde d'azote	44
4.2. Le NO dans la régulation du tonus vasculaire	48
4.3. NO, grossesse et prééclampsie	50
5. Le stress oxydatif.....	51
5.1. Généralités.....	51
5.2. Stress oxydatif, grossesse et prééclampsie	54

6. Hypothèses et objectifs de l'étude	56
CHAPITRE 2 : Thromboxane and isoprostane share the same prostanoid receptors to increase human placental tone.....	60
CHAPITRE 3 : Responses to prostanoids in placental chorionic arteries from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm delivery.....	92
CHAPITRE 4 : L'induction d'un stress oxydatif dans un placenta humain génère une contraction des vaisseaux placentaires suite à l'activation des cyclooxygénases ...	114
CHAPITRE 5 : DISCUSSION	143
CHAPITRE 6 : CONCLUSION	155
CHAPITRE 7 : PERSPECTIVES DE CES TRAVAUX.....	158
Bibliographie	162

Liste des tableaux

- Tableau 1.1** Tableau récapitulatif des protéines G et seconds messagers associés aux différents récepteurs des prostanoïdes.
- Tableau 2.1** pD_2 values obtained for cotyledons and chorionic arteries of each group.
- Tableau 3.1** Baby weight and gestational age for the eight groups formed from the different placentas obtained.
- Tableau 3.2** Pooled means of baby weight and gestational age for the NT and PE groups after term or preterm delivery
- Tableau 3.3** pD_2 and E_{max} values obtained for the NT and PE term and preterm groups for both prostanoids.
- Tableau 4.1** Réponse maximale obtenue en réponse à H_2O_2 dans les artères chorioniques et les cotylédons placentaires perfusés.
- Tableau 4.2** Variation de la pression de perfusion moyenne engendrée par une dose de 10^{-1} mol/L de H_2O_2 dans les cotylédons placentaires perfusés.

Liste des figures

- Figure 1.1** Divisions cellulaires du zygote migrant dans la trompe de Fallope et formant le blastocyste.
- Figure 1.2** Développement placentaire précoce entre les jours 9 et 16 post-conception.
- Figure 1.3** Remodelage des artères spiralées maternelles.
- Figure 1.4** Coupe transversale d'un placenta mature.
- Figure 1.5** Invasion trophoblastique dans le cas d'une grossesse normotensive comparée à une grossesse avec prééclampsie.
- Figure 1.6** Synthèse des prostanoides.
- Figure 1.7** Structure des trois isoformes de NO synthase.
- Figure 1.8** NO synthase sous forme de dimère.
- Figure 1.9** Réaction catalysée par les NOS
- Figure 1.10** Formation des ROS et des RNS et élimination par les enzymes antioxydantes.
- Figure 2.1** Effects of prostanoids on perfusion pressure in placental cotyledons and tension in chorionic arteries.
- Figure 2.2** Effects of the TP blocker SQ29,548 on responses to prostanoids.

- Figure 2.3** Effects of the TP blocker ICI192,605 on responses to prostanoids.
- Figure 2.4** Effects of the EP blocker AH6809 on responses to prostanoids.
- Figure 2.5** Effects of the combined EP and TP blockers and of L-NAME (NOS inhibitor) on responses to U-46619.
- Figure 3.1** Effects of the mode of delivery on the response to the TXA₂ mimetic in human placental chorionic arteries.
- Figure 3.2** Effects of the mode of delivery on the response to the isoprostane in human placental chorionic arteries.
- Figure 3.3** Global effects of both prostanoids on tension in human placental chorionic arteries.
- Figure 4.1** Courbe débit-pression dans les cotylédons perfusés *in vitro*.
- Figure 4.2** Effets des inhibiteurs des COXs sur la pression de perfusion de base et sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons placentaires humains.
- Figure 4.3** Effets du stress oxydatif sur la réponse à l'U-46619.
- Figure 4.4** Effets du stress oxydatif sur la tension dans les artères chorioniques et sur la pression de perfusion dans les cotylédons.
- Figure 4.5** Effets du stress oxydatif sur la tension dans les artères chorioniques.
- Figure 4.6** Effets du stress oxydatif sur la pression de perfusion dans les cotylédons.

Liste des Abréviations

-0-9-

15désoxy$\Delta^{12,14}$PGJ₂	15-désoxy-delta-12,14-prostaglandine J ₂
5-HT	Sérotonine
6-ketoPGF_{1α}	Métabolite de la PGI ₂
8-épiPGF_{2α}	8-épi-prostaglandine F _{2α}
8-isoPGE₂	8-isoprostaglandine E ₂
8-isoPGF_{2α}	8-isoprostaglandine F _{2α}

-A-

AA	Acide arachidonique
ACTH	Adrénocorticotrophine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AH	AH6809
AH6809	Antagoniste des récepteurs EP
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ANP	Peptide natriurétique auriculaire (<i>Atrial Natriuretic Peptide</i>)
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASC	Alanine-Sérine-Cystéine : système de transport des acides amines
ATP	Adénosine triphosphate

-B-

BH₄	Tétrahydrobiopterine
-----------------------	----------------------

-C-

CGRP	Peptide relié au gène de la calcitonine (<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>)
Ca²⁺	Ion calcium
CaCl₂	Chlorure de calcium
CaM	Calmoduline
CAT	Catalase
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CO₂	Dioxyde de Carbone
COS-7	Cellules rénales immortalisées de singe (<i>African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblast cell line</i>)
COX	Cyclooxygénase
COX-1	Cyclooxygénase constitutive
COX-2	Cyclooxygénase inductible
cPLA₂	Phospholipase A ₂ cytosolique
CRTH2	Récepteur à la PGD ₂ exprimé sur les cellules Th2 (<i>Chemoattractant Receptor Molecule Expressed on Th2 cells</i>)
CT	Cytotrophoblaste
Cu,Zn-SOD	Superoxyde dismutase au cuivre et zinc

-D-

DAG	Diacylglycérol
DHA-S	Sulfate de déhydroépiandrostérone
dNK	Cellules Tueuses naturelles décimales (<i>decidual Natural Killer</i>)
DP	Récepteur à la PGD ₂

-E-

EC₅₀	Concentration de l'agent pharmacologique entraînant 50% de la réponse maximale
ED₅₀	Dose de l'agent pharmacologique entraînant 50% de la réponse maximale
EC-SOD	Superoxyde dismutase extracellulaire
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium (<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>)
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
EIV	Espace intervillitaire
ELISA	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
E_{max}	Réponse maximale
eNOS / NOS III	NOS endothéliale
EP₁₋₄	Récepteurs à la PGE ₂
ET-1	Endothéline
ET_A	Récepteur A à l'endothéline

-F-

FAD	Flavine adénine dinucléotide
Fe²⁺	Ion ferreux
Fe³⁺	Ion ferrique
FMN	Flavine mononucléotide
FP	Récepteur à la PGF _{2α}

-G-

G6PD	Glucose-6-phosphate déhydrogénase
GH	Hormone de croissance (<i>Growth Hormone</i>)
GLUT1	Transporteur 1 du glucose
GLUT3	Transporteur 3 du glucose
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPIIb/IIIa	Glucoprotéine IIb/IIIa
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
GSR	Glutathion réductase
GSSG	Glutathion oxydé

-H-

H₂O	Molécule d'eau
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
HB-EGF	Facteur de croissance semblable à l'EGF liant l'héparine (<i>Heparin-Binding EGF-like Growth Factor</i>)
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HEK293	Cellules rénales embryonnaires humaines 293 (<i>Human Embryonic Kidney 293</i>)
HELLP	Syndrome d'hémolyse associée à une thrombocytopénie et une augmentation des niveaux sériques des transaminases hépatiques (<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet syndrome</i>)
HIF-1α	Facteur 1 α induit par l'hypoxie (<i>Hypoxia-Inducible Factor-1α</i>)
HLA-E	Antigène leucocytaire humain E (<i>Human Leukocyte Antigen-E</i>)
HLA-G	Antigène leucocytaire humain G (<i>Human Leukocyte Antigen-G</i>)
HO[•]	Radical hydroxyle
HO⁻	Anion hydroxyde

hPL Hormone lactogène placentaire humaine (*human Placental Lactogen*)

-I-

Ibu Ibuprofène

ICDH Isocitrate déshydrogénase

ICI ICI192,605

ICI192,605 Antagoniste sélectif des récepteurs TP

IGF Facteur de croissance semblable à l'insuline (*Insulin-like Growth Factor*)

IGFBP-1 Protéine 1 liant l'IGF (*Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-1*)

IL-6 Interleukine 6

IL-11 Interleukine 11

iNOS / NOS II NOS inductible

IP Récepteur à la PGI₂

IP₃ Inositol triphosphate

-K-

KCl Chlorure de potassium

KDR/Fik1 Récepteur 2 au VEGF (*Kinase insert Domain Receptor/Fetal Liver Kinase 1*)

KH₂PO₄ Dihydrogénophosphate de potassium

KIR Récepteur semblable à l'immunoglobuline des cellules tueuses (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*)

-L-

LIF Facteur inhibiteur de leucémie (*Leukaemia Inhibitory Factor*)

L-NAME N^G-nitro-L-arginine méthyl ester

LPS Lipopolysaccharides

-M-

MAP Kinase Protéine kinase activée par un mitogène (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

M-CSF Facteur stimulateur des colonies de macrophages (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*)

MgSO₄ Sulfate de magnésium

MLCP Phosphatase des chaînes légères de myosine (*Myosin Light Chain Phosphatase*)

Mn-SOD Superoxyde dismutase au manganèse

-N-

N-2PIA N-(2-Phenylethyl)indométhacinamide

Na⁺ Ion sodium

NaCl Chlorure de sodium

NADPH Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NaHCO₃ Hydrogénocarbonate de sodium

NF-κB Facteur nucléaire kappa B (*Nuclear Factor-Kappa B*)

NLA N^G-nitro-L-arginine

NMMA N^G-monomethyl-L-arginine

nNOS / NOS I NOS neuronale

NO Monoxyde d'azote

NOS Synthase du NO

NT Normotensif/Normotensive

-O-

O₂	Oxygène
O₂^{•-}	Anion superoxyde
ONOO⁻	Peroxynitrite

-P-

p38MAPK	Protéine kinase p38 activée par un mitogène (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase p38</i>)
PAF	Facteur activant les plaquettes (<i>Platelet Activating Factor</i>)
pD₂	logarithme négatif d'EC ₅₀ ou ED ₅₀
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>)
PDZ	Domaine d'interaction des protéines (<i>PSD-95, Dics-large, ZO-1</i>)
PE	Prééclampsique
PGH	Hormone de croissance placentaire (<i>Placental Growth Hormone</i>)
PGD₂	Prostaglandine D ₂
PGE₂	Prostaglandine E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandine F _{2α}
PGG₂	Prostaglandine endoperoxyde G ₂
PGH₂	Prostaglandine endoperoxyde H ₂
PGI₂	Prostacycline
PI3K/ERK	Protéines kinases PI3K et ERK (<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>)
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLA₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PIGF	Facteur de croissance placentaire (<i>Placental Growth Factor</i>)

PSS Solution physiologique saline (*Physiological Salt Solution*)

-R-

RCIU (IUGR) Restriction de croissance intra-utérine (*Intra-Uterine Growth Restriction*)

RNS Espèce réactive de l'azote

ROS Espèce réactive de l'oxygène

RT-PCR Transcription inverse - Réaction en chaîne par polymérisation (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*)

-S-

SEM Erreur standard à la moyenne

sEng Endogline soluble

sFlt-1 Récepteur 1 au VEGF (*Soluble fms-like tyrosine kinase-1*)

SGA Petit pour l'âge gestationnel (*Small for Gestational Age*)

SHR Rats spontanément hypertendus (*Spontaneously Hypertensive Rats*)

SNP Nitroprussiate de Sodium

SOD Superoxyde dismutase

sPLA₂ Phospholipase A₂ sécrétoire

SQ SQ29,548

SQ29,548 Antagoniste sélectif des récepteurs TP

SRAA (RAAS) Système rénine-angiotensine-aldostérone (*Renin-Angiotensin-Aldosterone System*)

ST Syncytiotrophoblaste

-T-

TEV Trophoblaste extravilleux

XX

TGF-β	Facteur de croissance transformant β (<i>Transforming Growth Factor-β</i>)
TNF$_{\alpha}$	Facteur de nécrose tumorale (<i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
TP	Récepteurs à la TXA ₂
TP$_{\alpha}$	Récepteur α à la TXA ₂
TP$_{\beta}$	Récepteur β à la TXA ₂
tPA	Activateur du plasminogène tissulaire (<i>tissue Plasminogen Activator</i>)
TXA₂	Thromboxane A ₂

-U-

U-46619	mimétique de la TXA ₂
----------------	----------------------------------

-V-

VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEGFR-1	Récepteur 1 du VEGF
VEGFR-2	Récepteur 2 du VEGF
VEGFR-3	Récepteur 3 du VEGF
VIH	Virus d'immunodéficience humaine

-W-

WKY	Rat Wistar Kyoto
------------	------------------

-X-

XO	Xanthine Oxydase
-----------	------------------

*À ma famille, pour m'avoir toujours
soutenu peu importe les épreuves qui
m'attendaient.*

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma famille et en particulier mes parents Françoise et Gilles, sans qui rien n'aurait été possible. Ils ont toujours été là pour m'épauler, m'éclairer avec leurs bons conseils et m'appuyer lorsque j'avais des décisions importantes à prendre.

Je tiens également à remercier mon frère, Quentin, et sa femme, Koli, mes grands-parents, Michelle, Ernest et Geneviève, ainsi que ma tante, Christine, qui, malgré la distance qui nous sépare, ont toujours su être présents dans ma vie.

Ensuite, j'aimerais remercier sincèrement Jean St-Louis pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et donné l'opportunité de découvrir le Québec. Il a également su m'accompagner tout au long de mes études doctorales et me faire grandir en tant que chercheuse grâce à son expertise et ses conseils judicieux. Je tiens aussi à remercier Michelle Brochu pour son soutien constant et ses encouragements.

Je remercie également mes collègues et amis, en particulier Mylène, Véronique, Benoît et Cindy pour leur soutien moral et intellectuel.

Un gros merci à ma colocataire Geneviève, qui m'a supportée dès mon arrivée au Québec et m'a toujours apporté son soutien dans les moments faciles comme les difficiles. Finalement, un merci tout spécial à ma famille à quatre pattes, Bidule, Wong-Tong, Mittens et Sirrah.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1. Le placenta, un organe de premier plan

En latin, placenta signifie gâteau. Cette signification qui peut faire sourire au premier abord est en fait pleine de bon sens lorsque l'on s'attarde à étudier cet organe tout aussi temporaire qu'indispensable à la croissance du fœtus. En effet, sa forme discoïde aplatie rappelle, bien que de loin, celle d'une galette (ou gâteau). Cependant, en poussant plus loin, le parallélisme ne s'arrête pas là puisque le placenta, comme la galette, joue entre autres un rôle d'élément nutritif important en constituant le berceau de tous les échanges fœto-maternels. Grâce à lui, le fœtus va respirer, s'alimenter, excréter ses déchets et donc se développer durant ses 9 mois de vie intra-utérine. Il est le résultat d'une interaction bien contrôlée entre le blastocyste et l'endomètre utérin maternel. Par conséquent, une anomalie impliquant le placenta, que ce soit une mauvaise perfusion placentaire ou une mauvaise implantation, peut avoir de graves conséquences sur le développement du fœtus et donc compromettre l'issue favorable de la grossesse.

1.1. Implantation et développement placentaire

1.1.1. Le Blastocyste

Le zygote, issu de la fusion d'un spermatozoïde avec un ovule, migre dans la trompe de Fallope pour rejoindre la cavité utérine. Durant sa migration, il subit de nombreuses divisions cellulaires sans toutefois prendre plus d'ampleur. Au stade 16 cellules, les cellules se resserrent formant une masse ressemblant à une mûre, la morula. Cette dernière est l'objet d'une cavitation, le blastocœle, qui se remplit de liquide. Le zygote prend alors le nom de blastocyste, marquant le début de la différenciation cellulaire. À ce stade, le blastocyste est composé de 2 types cellulaires : les trophoblastes, en plus grand nombre, qui constituent la couche externe appelée trophoctoderme et une masse cellulaire interne appelée embryoblaste et composée des pluriblastes, en plus petit nombre, qui formeront l'embryon (fig.1) [1-3].

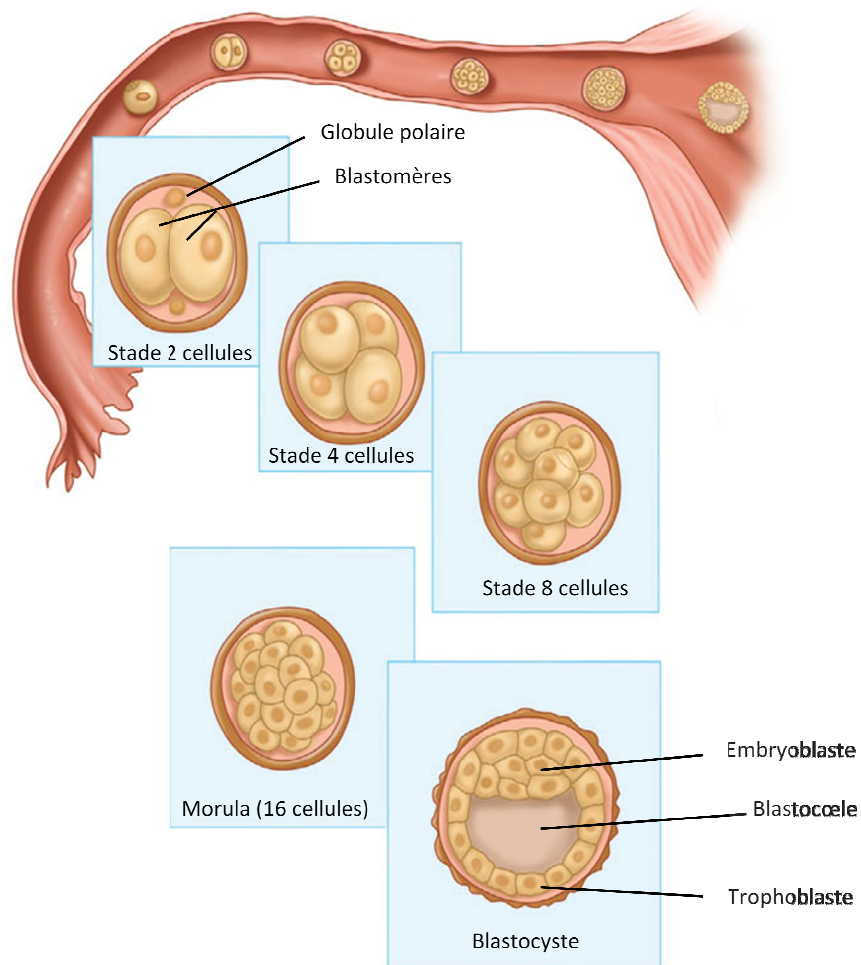


Figure 1 : Divisions cellulaires du zygote migrant dans la trompe de Fallope et formant le blastocyste (traduit de Cunningham et al. [2])

Dans l'utérus, un dialogue bien contrôlé s'installe entre le blastocyste et l'endomètre maternel. Cette communication, essentielle à l'implantation, s'effectue grâce à la libération, par l'endomètre (glandes et épithélium) et les trophoblastes, de différentes

substances telles que des hormones (œstrogènes, progestérone et gonadotrophine chorionique humaine (hCG)), des cytokines (IL-6, IL-11 et LIF), des prostaglandines, des facteurs de croissance (EGF, TGF- β , HB-EGF, VEGF, IGF, IGFBP-1), des intégrines et des facteurs de stimulation de colonies (M-CSF). Ces échanges permettent au blastocyste de s'orienter et d'adhérer à l'endomètre pour finalement y pénétrer. Cependant, l'hGC est sans doute le facteur le plus important de ce processus. En effet, en empêchant la disparition du soutien lutéal, elle prolonge la vie du corps jaune, ce qui permet à ce dernier de conserver son activité progestative. Ceci est indispensable au maintien de la grossesse puisque le système reproductif maternel doit passer d'un profil cyclique avec alternance d'œstrogènes et progestérone à un profil non-cyclique de gravidité à prédominance progestéronique. L'implantation du blastocyste ne peut alors s'effectuer que dans un laps de temps très court, soit entre le 20^{ème} et le 24^{ème} jour du cycle endométrial. Cette période est communément appelée *fenêtre d'implantation* et correspond à l'environnement endométrial le plus adéquat pour l'adhésion et l'invasion du blastocyste. L'endomètre sécrétoire se transforme alors en caduque suite à la réaction déciduale. L'attachement du blastocyste à l'endomètre peut avoir lieu quand la zone pellucide entourant le blastocyste est éliminée [2-6].

1.1.2. Différenciation et invasion trophoblastique

L'adhésion du blastocyste à l'endomètre entraîne la différenciation et l'invasion des trophoblastes dont il existe 3 types : les cytotrophoblastes (CT) et les syncytiotrophoblastes (ST), constituant tous deux le trophoblaste villeux, et les trophoblastes extravilleux (TEV). Les trophoblastes sont absolument indispensables à l'élaboration du placenta et leur structure, fonction et développement varient énormément en fonction des différents compartiments de celui-ci. La différenciation trophoblastique permet entre autres l'invasion du blastocyste dans l'endomètre et l'établissement de la circulation utéroplacentaire. Cependant, l'invasion ne peut se faire que si la réaction déciduale est déjà en place et continue de progresser. Cette dernière est contrôlée par les œstrogènes et la progestérone et commence aussitôt que la phase sécrétoire de l'endomètre. Au cours de la

décidualisation, l'endomètre devient plus vascularisé et on observe entre autres une augmentation de la perméabilité vasculaire, un œdème, des cellules stromales qui prolifèrent et se différencient en cellules déciduales et une invasion des leucocytes [2;7].

Suite à l'attachement du blastocyste à l'endomètre maternel, des prolongements trophoblastiques s'insèrent entre les cellules épithéliales utérines qui sont alors isolées, lysées puis digérées. Une partie des cellules trophoblastiques fusionne pour former le ST qui constitue un amas cellulaire multinucléé très invasif qui ne possède pas de membrane cellulaire distincte, alors que les autres cellules trophoblastiques gardent leur individualité et prennent le nom de CT qui constituent une source proliférative pour la production de tissu trophoblastique additionnel [3].

Le rôle premier du ST est de faire pénétrer le blastocyste dans l'endomètre en dégradant la matrice extracellulaire. De plus, il colonise les glandes endométriales et y endocyte les sécrétions glandulaires en plus d'acquérir des fonctions dans le transport de nutriments et d'ions de la mère vers son fœtus [8]. Une fois bien implanté dans l'endomètre, le blastocyste est alors entouré de CT, eux-mêmes entourés de ST (fig.2). Petit à petit, la croissance des lacunes trophoblastiques réduit la taille du ST jusqu'à ce qu'il ne représente plus que de minces couches semblables à des travées entre les lacunes. À ce stade, les CT prolifèrent et s'insinuent dans ces « travées », formant des colonnes de cellules cytotrophoblastiques. Les CT de chaque colonne continuent de proliférer jusqu'à entrer en contact avec ceux des colonnes avoisinantes, formant ainsi une enveloppe cytotrophoblastique et devenant des TEV (fig.2) [2;3;9].

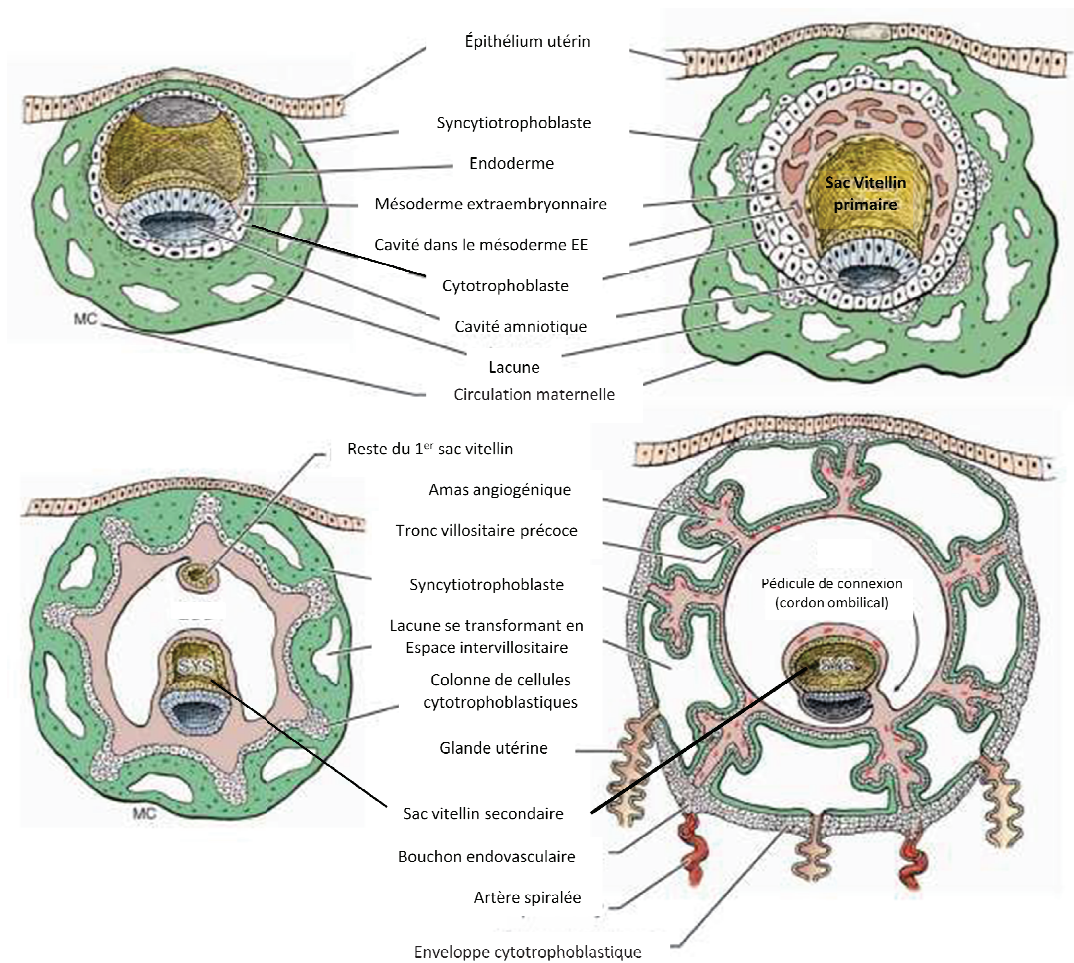


Figure 2 : Développement placentaire précoce entre les jours 9 et 16 post-conception
(traduit de Gabbe et al. [9])

La prolifération et l'invasion trophoblastiques sont essentielles à la mise en place de la circulation utéroplacentaire. En effet, en se développant, le trophoblaste villositaire permet la constitution des arbres villositaires, qui abritent les vaisseaux villositaires placentaires fœtaux, alors que les TEV migrent jusqu'aux artères spiralées maternelles. On croit que ces TEV remodelent les artères spiralées pour les faire passer de petites artères musculaires de

haute résistance à de plus gros vaisseaux fibreux de faible résistance (fig.3) [9]. Le remodelage vasculaire est en partie possible grâce au fait, qu'en se différenciant, les TEV acquièrent des propriétés semblables à celles des cellules endothéliales. En effet, l'expression des récepteurs caractéristiques des cellules épithéliales diminue dans les TEV pour laisser place à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion caractéristiques des cellules endothéliales [10]. Cependant, il semble que l'invasion et la différenciation des TEV et le remodelage vasculaire ne pourraient se faire sans l'intervention des cellules *Natural Killer* déciduales (dNK). En effet, les antigènes leucocytaires humains E et G (HLA-E et HLA-G) exprimés par les TEV interagissent avec les récepteurs *killer cell immunoglobulin-like* (KIR) exprimés sur les cellules dNK, inhibant ainsi la cytotoxicité de ces dernières et augmentant l'expression de cytokines pro-inflammatoires et pro-angiogéniques. L'expression de HLA-G par les TEV leur empêcherait d'être lysés par les cellules dNK. Aussi, en plus de jouer un rôle dans la réponse immune à l'interface foëto-maternelle, les cellules dNK, en libérant des cytokines, des facteurs de croissance et d'autres produits solubles, participent à la régulation de l'invasion trophoblastique [11-14].

1.1.3. Les lacunes trophoblastiques

À mesure que l'invasion progresse, des vacuoles extra-cytoplasmiques apparaissent et fusionnent pour donner naissance aux lacunes trophoblastiques. Ces lacunes sont dans un premier temps remplies de fluides tissulaires et de sécrétions utérines. Elles prennent alors de plus en plus d'ampleur pour devenir les précurseurs de l'espace intervillitaire (EIV). L'EIV n'est autre que l'espace dans lequel le sang maternel sera déversé à l'établissement de la placentation hémochoriale, soit lorsque le ST baigne dans le sang maternel. Cependant, durant le 1^{er} trimestre de la grossesse, l'EIV est essentiellement rempli de sécrétions utérines qui se composent de protéines maternelles, de gouttelettes lipidiques et de glucides complexes tels que le glycogène. Ce n'est que suite à l'invasion de la paroi des capillaires déciduaux superficiels que le sang maternel entrera dans l'EIV pour entrer en contact avec les vaisseaux villositaires placentaires, faisant ainsi passer l'embryon d'une nutrition histiotrophique à une nutrition hémotrophique [2;3;9;15].

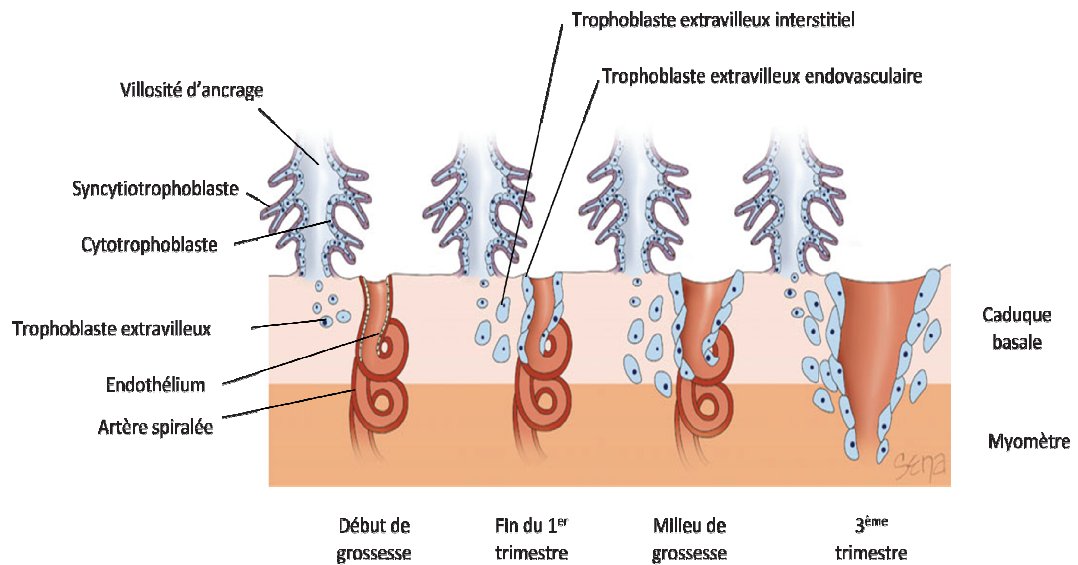


Figure 3 : Remodelage des artères spiralées maternelles (traduit de Cunningham et al. [2])

1.2. Physiologie Placentaire

1.2.1. Face foetale vs face maternelle

À terme, le placenta mesure environ 18,5 cm de diamètre pour une épaisseur d'environ 2,3 cm. Son volume est alors de presque 500 mL pour un poids avoisinant les 500 g, ce qui représente environ 1/6 du poids du fœtus. Concrètement, le placenta est divisé en deux côtés bien distincts : le côté maternel et le côté foetal. Le côté foetal, recouvert d'une

fine couche d'amnios, est constitué du plateau chorionique et des unités fonctionnelles du placenta, les cotylédons placentaires, ou lobes, séparés par des septa inter-cotylédonaire. Le plateau chorionique est dérivé des trophoblastes de la paroi originelle du blastocyste et constitue, entre autres, le site d'implantation du cordon ombilical qui relie le fœtus au placenta. Le cordon ombilical renferme une veine et deux artères qui se subdivisent alors en veines et artères chorioniques une fois embranchées dans le plateau chorionique. Chacun de ces vaisseaux se subdivise à son tour en plusieurs embranchements avant de pénétrer dans le parenchyme placentaire où ils donneront naissance aux vaisseaux villositaires. Les cotylédons placentaires correspondent au site des échanges fœto-maternels puisqu'ils sont en contact direct avec l'endomètre maternel. L'enveloppe cytotrophoblastique, décrite précédemment et bordant les cotylédons, sépare le côté fœtal du côté maternel. Le côté maternel, aussi appelé plateau basal, est représenté par la caduque et abrite les artères spiralées utérines qui viennent déverser leur contenu sanguin dans les EIV (fig.4) [2;9].

1.2.2. Les cotylédons, unités fonctionnelles du placenta

Les cotylédons sont d'une importance capitale dans la fonctionnalité du placenta et, par conséquent, l'issue favorable de la grossesse. En effet, c'est à leur niveau que l'on retrouve les capillaires villositaires placentaires, site des échanges fœto-maternels. Le nombre de cotylédons peut grandement varier d'un placenta à un autre, mais on en retrouve en général entre 15 et 28 par placenta. Les cotylédons apparaissent avec la circulation maternelle, c'est-à-dire à la fin du 1^{er} trimestre de grossesse (fig.4) [9;16].

Les cotylédons sont formés à partir de tissus villex dont il existe 5 types : le mésenchyme villex, le tronc villositaire, les villosités intermédiaires immatures et matures et les villosités terminales. Le mésenchyme villex permet la prolifération villexe en se différenciant en chacun des 4 autres types villex de façon directe ou indirecte. Vers la 5^{ème} semaine de grossesse, il se différencie en villosités intermédiaires immatures qui donnent naissance au tronc villositaire, qui connecte avec le plateau chorionique. Les villosités immatures sont essentiellement présentes au début de la grossesse et elles forment, avec le mésenchyme villex, une sorte de réserve de croissance peu différenciée au centre des

arbres villositaires. Le tronc villositaire quant à lui constitue l'unité structurelle la plus importante du cotylédon. Vers la 23^{ème} semaine de grossesse, le mésenchyme villos se différencie en villosités intermédiaires matures qui donnent naissance aux villosités terminales, qui représentent la réelle unité fonctionnelle du placenta puisqu'elles abritent les capillaires villositaires placentaires [9;16;17].

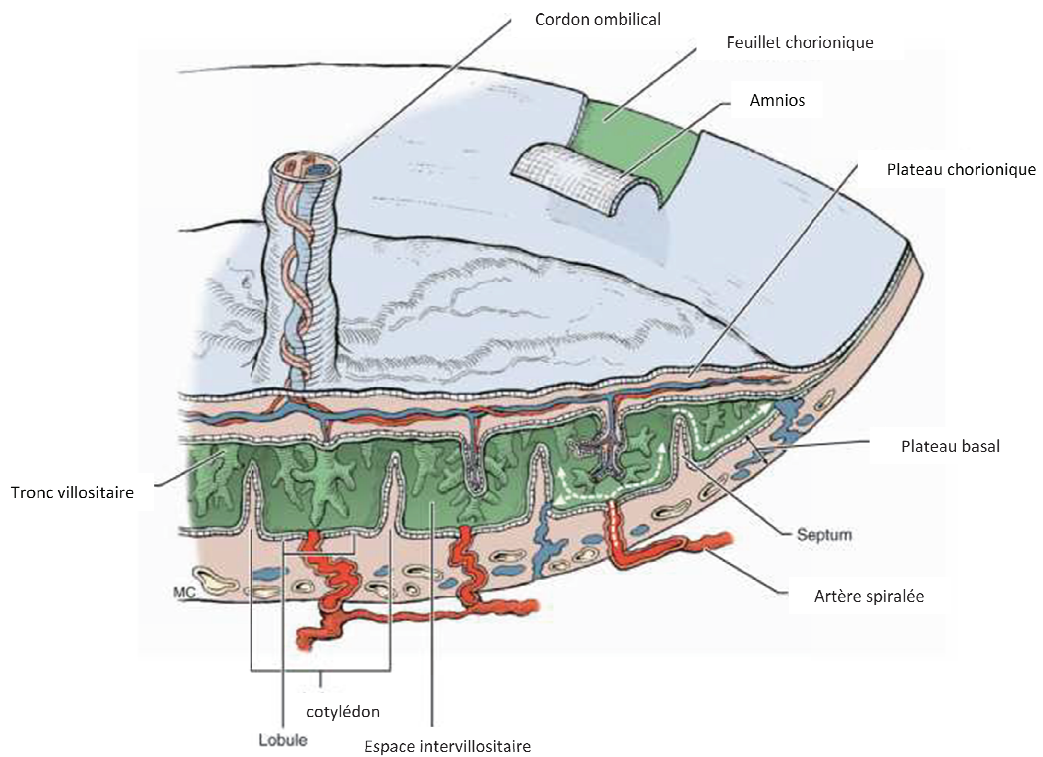


Figure 4 : Coupe transversale d'un placenta mature (traduit de Gabbe et al. [9]).

1.2.3. La vascularisation placentaire

1.2.3.1. Architecture vasculaire du placenta

Le placenta est un organe hautement vascularisé et, à terme, le réseau capillaire s'étend sur environ 550 km, représentant ainsi une surface de 15 m² [18]. Le développement d'un tel réseau permet d'optimiser les échanges de gaz et de nutriments entre la mère et son enfant, favorisant ainsi la croissance de ce dernier. Cependant, les capillaires ne sont pas les seuls vaisseaux présents dans le placenta. De fait, on retrouve 3 grands types de vaisseaux : les vaisseaux ombilicaux, les vaisseaux chorioniques et les vaisseaux villositaires dont font partie les capillaires placentaires.

Les vaisseaux ombilicaux sont au nombre de 3 : une veine et deux artères. De façon générale, la veine est d'un diamètre bien plus important que les artères et à l'inverse de la plupart des circulations sanguines, elle transporte du sang plus oxygéné que celui qui circule dans les deux artères. Ceci s'explique par le fait que le sang placentaire veineux est chargé d'oxygène récupéré par les échanges avec le sang maternel avant de repartir vers fœtus.

En général, le cordon ombilical s'insère dans la zone centrale du placenta. Cependant, il arrive qu'il s'insère en périphérie, ce qui est plutôt considéré comme anormal. À leur insertion dans le plateau chorionique, les vaisseaux ombilicaux se divisent pour donner naissance aux vaisseaux chorioniques. La veine ombilicale subit en général deux divisions successives sur une distance de moins de 0,5 cm, donnant ainsi naissance à 4 embranchements veineux qui parcourent le plateau chorionique pour subir d'autres divisions avant de s'insérer dans le parenchyme. Les artères ombilicales quant à elles peuvent subir entre 6 et 8 divisions avant de s'insérer dans le tissu villositaire. Il est à noter que les veines sont très facilement différenciables des artères chorioniques puisque les artères croisent toujours les veines en passant par-dessus celles-ci. Les vaisseaux chorioniques subissent 2 types de division : des divisions dichotomiques, pour lesquelles un vaisseau père donne naissance à 2 vaisseaux fils de même diamètre, et des divisions monopodiales, où des vaisseaux fils prennent naissance le long du vaisseau père sans aspect symétrique. Il semble que les divisions dichotomiques soient plus nombreuses lorsque le cordon est inséré au centre du placenta, alors que les monopodiales prédominent lors d'une insertion du cordon

en périphérie. Aux premiers embranchements, le diamètre des artères chorioniques peut être de plus de 5 mm, alors qu'il peut descendre jusqu'à moins de 0,05 mm avant que les artères ne s'insèrent dans le parenchyme, où elles donnent naissance aux artères villositaires troncales. Celles-ci subissent alors jusqu'à 14 divisions avant de former les capillaires villositaires au niveau des villosités terminales en contact avec le sang maternel [19;20].

1.2.3.2. Régulation du tonus vasculaire placentaire

À l'inverse de la circulation systémique, le placenta est entièrement dépourvu d'innervation autonome [21] impliquant que les vaisseaux placentaires soient sous le contrôle de facteurs humoraux et tissulaires. Parmi ces substances, on retrouve le système rénine-angiotensine, les prostanoïdes (prostaglandine et thromboxane A_2), l'endothéline (ET-1) et le monoxyde d'azote (NO) [16].

La thromboxane A_2 (TXA₂) et l'ET-1 sont deux des plus puissants vasoconstricteurs des vaisseaux placentaires. En effet, en plus de démontrer de puissants effets vasoconstricteurs dans les vaisseaux isolés, tels que ombilicaux, chorioniques et villositaires [22-26], elles sont très actives dans les cotylédons où elles augmentent considérablement la pression de perfusion [27-29]. Toutefois, dans les cotylédons, la TXA₂ est celle qui révèle l'effet le plus significatif puisqu'elle est en mesure d'élever la pression de perfusion de près de 200 mmHg contre un peu plus de 100 mmHg pour l'ET-1 [27]. Aussi, bien qu'elles soient moins puissantes que l'ET-1 et la TXA₂, d'autres prostaglandines comme la PGF_{2α} et la PGE₂ sont capables de contracter les vaisseaux placentaires [22;24;25]. La sérotonine, le KCl et l'angiotensine II font également partie des agents capables de contracter les vaisseaux placentaires [27;30] et ombilicaux [24;31]. Bien que la sérotonine possède un puissant effet vasoconstricteur dans les vaisseaux ombilicaux et chorioniques [24;31], son action dans les cotylédons perfusés est très limitée puisqu'elle augmente la pression de perfusion d'à peine 40 mmHg [25;27]. De son côté, l'angiotensine II semble posséder une faible activité dans les vaisseaux placentaires puisqu'elle augmente peu la pression de perfusion dans les cotylédons (≈ 50 mmHg) [32] et la tension dans les vaisseaux ombilicaux [24]. Parallèlement,

les agents tels que les catécholamines, l'ocytocine et la vasopressine (hormone antidiurétique), qui sont généralement de puissants vasoconstricteurs, possèdent un faible pouvoir constricteur dans les vaisseaux placentaires [22;24;25].

D'autre part, il est intéressant de noter que certaines substances présentent une double activité vasoactive. Ainsi, bien que l'histamine ait été rapportée pour avoir un puissant effet vasoconstricteur dans les vaisseaux ombilicaux et chorioniques [24;31], elle pourrait aussi agir comme une substance vasodilatatrice dans les vaisseaux de cotylédons placentaires pré-contractés en entraînant la libération de NO [33;34]. Amarnani et al. proposent que ces effets différentiels seraient dus au fait que dans les bains à organe isolé utilisés pour les vaisseaux ombilicaux et chorioniques, les muscles lisses et l'endothélium seraient simultanément exposés à l'histamine, ce qui n'est pas le cas dans les systèmes de perfusion utilisés pour les cotylédons, où seul l'endothélium est exposé à l'histamine [33]. Ainsi, en agissant sur les récepteurs H_1 du muscle lisse, celle-ci entraînerait la contraction des vaisseaux en contrecarrant les effets vasorelaxants du NO induits par l'activation des récepteurs H_2 de l'endothélium. En ce qui concerne la bradykinine, elle présente des effets constricteurs sur les vaisseaux placentaires isolés (cordon ombilical, plateau chorionique et tronc villositaire), mais elle est peu active dans les cotylédons où elle semble, de plus, avoir des effets opposés dépendamment de la concentration à laquelle elle est utilisée [24;25;33]. En effet, à faibles concentrations ($<10^{-16}M$), la bradykinine entraîne une diminution de la pression de perfusion dans les cotylédons suite à l'activation des récepteurs B_2 qui résulte en la libération de NO. En revanche, avec des concentrations plus fortes ($>10^{-14}M$), elle entraîne une vasoconstriction qui semble reliée à la libération de TXA_2 par le muscle lisse suite à sa diffusion à travers la barrière endothéliale. Dans un même ordre d'idée, bien qu'elles agissent sur les mêmes récepteurs, les purines, telles que l'UTP et l'ATP, contractent les vaisseaux ombilicaux et chorioniques en entraînant la libération d'un métabolite de l'acide arachidonique, alors que dans les cotylédons, l'activation des récepteurs mène à la libération de NO [35]. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que, dans les vaisseaux ombilicaux et/ou chorioniques superficiels, les récepteurs $P2Y_1R$ et $P2Y_2R$ aux purines, essentiellement exprimés sur le muscle lisse, seraient couplés à la synthèse des métabolites de l'acide arachidonique (AA), alors que dans les cotylédons, où ils sont

exprimés autant sur le muscle lisse que sur l'endothélium, ils seraient couplés à la voie du NO [35].

Finalement, on a rapporté que plusieurs substances telles que la prostacycline (PGI_2), la progestérone, l'ANP (peptide natriurétique auriculaire), l'adrénocorticotrophine (ACTH) et, comme démontré ici, le NO pouvaient agir comme des agents relaxants des vaisseaux placentaires [22;27;36]. Cependant, certains de ces agents vasodilatateurs agissent de façon indirecte puisque l'activation de leurs récepteurs mène à la libération d'une substance vasodilatatrice. Par exemple, le VEGF peut dilater les vaisseaux placentaires en véhiculant ses effets, au moins en partie, par la libération de NO [37]. De même, le CGRP (peptide relié au gène de la calcitonine) peut également dilater ces vaisseaux en libérant du NO, bien qu'il agisse essentiellement en activant les canaux potassiques dépendant de l'ATP et les protéines kinases A dépendantes de l'AMPc [38]. Fait intéressant, bien que le placenta soit dépourvu d'innervation autonome, la neurokinine B, normalement rencontrée dans le système nerveux, présente une activité vasorelaxante dans le placenta, où elle est produite par le ST [39;40].

En dépit de ces nombreuses observations, les études réalisées jusqu'à présent n'ont pas encore permis d'identifier clairement les agents vasoactifs réellement impliqués dans la gestion du tonus vasculaire placentaire. Néanmoins, les prostaglandines et la TXA_2 sont libérées dans le placenta [41] où les vaisseaux y sont très réactifs. De même, comme décrit ici, certaines substances génèrent leurs effets vasoconstricteurs via l'activation de la voie de synthèse des métabolites de l'AA. Toutes ces observations, associées au fait que la prééclampsie s'accompagne d'un déséquilibre entre la production de TXA_2 et PGI_2 placentaires [42], font des prostanoïdes de bonnes candidates pour assurer le contrôle du tonus vasculaire placentaire.

1.3. Le rôle du placenta

1.3.1. Les transferts placentaires

Le rôle fondamental du placenta est d'assurer toutes les fonctions vitales que le fœtus n'est pas en mesure d'assurer par lui-même, soit : les fonctions nutritives,

respiratoires, excrétoires et endocriniennes. Cela devient possible grâce aux transferts de gaz, nutriments, déchets, hormones, etc., qui s'effectuent entre le sang maternel et le sang fœtal à travers l'interface placentaire. Celle-ci est constituée d'une couche de ST, d'une couche de CT et d'une couche de cellules endothéliales des capillaires villositaires. Ces transferts s'effectuent par les mécanismes classiques de transport membranaire, soit : les diffusions passives et facilitées qui se font sans dépense d'énergie, le transport actif qui nécessite l'utilisation d'ATP et le transport vésiculaire essentiellement utilisé par les macromolécules [9].

Afin que le fœtus se développe normalement, les transferts placentaires doivent être hautement efficaces. Plusieurs variables sont capables de contrôler l'efficacité de ces transferts. Parmi les plus importantes, on retrouve : la concentration des substances dans le sang maternel et fœtal, la surface d'échange, le flot sanguin dans l'EIV et dans les capillaires villositaires, les propriétés physiologiques du tissu trophoblastique, la capacité du placenta à assurer le transport actif, la quantité de substances métabolisées par le placenta durant le transfert, les liaisons spécifiques et les protéines de transport dans la circulation fœtale et maternelle [2].

1.3.2. Fonction nutritive

Grâce au transfert des nutriments organiques et inorganiques, le placenta assure la nutrition du fœtus et donc sa croissance. Parmi ces nutriments, on retrouve l'eau, le glucose, les acides aminés, les vitamines et les ions.

Pendant la vie utérine, le fœtus n'est pas vraiment en mesure d'assurer la néoglucogenèse. Par conséquent, l'apport maternel en glucose est la principale source d'énergie pour le métabolisme et la croissance du fœtus. Le transfert du glucose se fait par diffusion facilitée grâce à la présence de deux transporteurs spécifiques insensibles à l'insuline : GLUT1 et GLUT3. Le transporteur ubiquitaire GLUT1 est très présent dans le ST alors que GLUT3 serait seulement présent dans les cellules endothéliales fœtales. De plus, le lactate, issu du métabolisme placentaire du glucose, contribuerait également au

métabolisme fœtal. Celui-ci utiliserait un co-transporteur lactate- H^+ caractéristique des dérivés monocarboxylés [43;44].

Le transport des acides aminés utilise des systèmes dépendant et indépendant du Na^+ faisant intervenir des protéines de transport. Pour les acides aminés neutres, il se fait essentiellement via l'utilisation de deux systèmes dépendant du Na^+ , les systèmes A (pour alanine) et ASC (pour alanine-sérine-cystéine) pour les acides aminés peu volumineux, et d'un système indépendant du Na^+ , le système L (pour leucine) pour les acides aminés volumineux. Les acides aminés cationiques utiliseraient 2 systèmes indépendants du Na^+ , alors que les acides aminés anioniques semblent synthétisés directement dans le placenta puisque leurs concentrations placentaires sont plus fortes que celles observées dans le sang fœtal et maternel [44].

Bien que le placenta soit assez imperméable aux lipides, les acides gras libres et les corps cétoniques sont quand même en mesure de traverser en utilisant des protéines membranaires. Le cholestérol provient des LDL et HDL de la circulation maternelle. Les trophoblastes expriment les récepteurs spécifiques à ces lipoprotéines. Après leur capture par le récepteur, les particules sont transportées par voie lysosomiale/endosomiale où le cholesteryl ester est hydrolysé. Le cholestérol libre permet la formation de progestérone dont les niveaux régissent le taux de captation du cholestérol maternel [45;46].

Les mécanismes qui régissent la consommation d'eau sont assez peu connus. Cependant, le transfert d'eau ferait intervenir les forces osmotiques, hydrostatiques et osmotiques colloïdales et s'effectuerait par les voies transcellulaires et paracellulaires. De plus, des canaux hydriques ont été identifiés dans le placenta [9].

Toutes les vitamines hydrosolubles, telles que la vitamine C, la riboflavine et les folates, peuvent traverser le placenta grâce à un transporteur [44]. Par contre, le transport des vitamines liposolubles est moins évident. En ce qui concerne la vitamine D, il apparaît qu'elle serait en mesure de traverser le placenta, mais aussi qu'elle pourrait y être synthétisée [44;47;48]. En revanche, il semble que la vitamine K traverse difficilement la barrière placentaire [44;49].

1.3.3. Fonction respiratoire

La fonction respiratoire, comme son nom l'indique, permet les échanges des gaz respiratoires soit le dioxyde de carbone (CO_2) et l'oxygène (O_2) entre la mère et son fœtus. Le placenta commence à remplir cette fonction à partir de la 10^{ème} semaine de gestation. À terme, le fœtus consomme environ 18 mL/min d' O_2 alors que ses réserves ne sont que de 36 mL. Par conséquent, la mère doit augmenter l'apport en O_2 à l'utérus pour combler les besoins fœtaux. Ceci est rendu possible grâce à des modifications cardio-pulmonaires qui se mettent en place dès le début de la grossesse. Entre autres, le débit cardiaque et la ventilation pulmonaire augmentent d'environ 40% durant la grossesse et la majorité de l'augmentation du débit cardiaque est dirigée vers l'utérus. De même, l'accroissement du taux d'érythrocytes et du volume plasmatique mène à une augmentation d'environ 50% du volume sanguin. Par ailleurs, la résistance systémique diminue considérablement pour empêcher l'augmentation de pression artérielle en réponse à l'augmentation du débit cardiaque [3;9].

Dans le sang fœtal, la tension d' O_2 est faible et la tension de CO_2 est élevée. Par contre, dans le sang maternel la tension d' O_2 est élevée alors que celle du CO_2 est faible. L'établissement de tels gradients permet aux gaz de traverser la barrière placentaire par simple diffusion. De plus, le fait que l'hémoglobine fœtale ait une plus forte affinité pour l' O_2 que l'hémoglobine adulte, permet au sang fœtal de favoriser la captation d' O_2 et ainsi d'augmenter son contenu d' O_2 et donc d'accroître les apports au fœtus. Cependant, la totalité d' O_2 entrant n'est pas entièrement destinée à l'enfant puisque le placenta en consomme une partie dans le but d'assurer ses propres processus métaboliques [3;46].

1.3.4. Fonction excrétoire

Afin d'éviter l'intoxication du fœtus par des composés tels que les acides biliaires et l'urée, le placenta doit assurer une fonction excrétoire en éliminant les déchets issus du métabolisme fœtal. Par conséquent, les acides biliaires et les pigments biliaires qui se retrouvent dans le sang fœtal vont soit passer dans le liquide amniotique via l'élimination

par le système rénal fœtal, soit être transférés à la mère via le placenta. Le transfert des acides biliaires au niveau du placenta peut se faire grâce à la présence de transporteurs, alors que les pigments biliaires pourront, en plus d'utiliser des transporteurs, passer par simple diffusion. La mère assurera alors leur élimination finale [50].

Par ailleurs, la mère pouvant être sous médication lors de sa grossesse, il est important que le placenta soit aussi en mesure d'éliminer les xénobiotiques qui pourraient arriver au fœtus. Dépendamment de leurs propriétés physico-chimiques, certains xénobiotiques sont capables de traverser le placenta par simple diffusion. Heureusement, l'existence d'enzymes de détoxification et de pompes d'exportation dans le placenta permet de protéger le fœtus contre l'intrusion de telles substances [50].

1.3.5. Fonction endocrinienne

En plus d'assurer les fonctions nutritives, respiratoires et excrétoires du fœtus, le placenta présente également un rôle de glande endocrinienne puisqu'il est capable de fabriquer et de sécréter des hormones. En effet, le placenta produit des hormones peptidiques, telles que la hCG, l'hormone de croissance placentaire (PGH) et le lactogène placentaire (hPL), et des hormones stéroïdiennes, telles que la progestérone et les œstrogènes [9].

Au début de la grossesse, l'hCG est synthétisée par les trophoblastes du blastocyste et libérée dans la circulation maternelle, permettant ainsi le maintien du corps jaune et donc la production de progestérone. Après la 9^{ème} semaine de gestation, le rôle du corps jaune se réduit considérablement car c'est la production de progestérone placentaire qui devient nécessaire au bon déroulement de la grossesse. Ainsi, la libération d'hPL dans la circulation maternelle permet l'augmentation de la lipolyse et donc la libération d'acides gras libres, comme le cholestérol nécessaire à la fabrication de progestérone. Le cholestérol est capté par le placenta qui le transforme en prégnénone ; celle-ci est à son tour transformée en progestérone et libérée des côtés maternel et fœtal [9;46].

Par ailleurs, le placenta doit s'associer au fœtus pour pouvoir produire des œstrogènes car ni l'un ni l'autre n'est capable d'en faire la synthèse complète. En effet, la

prégnénolone ou la progestérone placentaire doivent se rendre aux glandes surrénales fœtales où elles sont transformées en sulfate de déhydroépiandrostérone (DHA-S). Celui-ci retourne alors au placenta où il est hydrolysé en déhydroépiandrostérone puis converti en androstènedione. L'aromatase, un cytochrome P450, effectue la conversion finale pour produire de l'œstradiol et de l'œstrone. Cependant, le DHA-S peut aussi se rendre au foie fœtal où il est hydroxylé en sulfate de 16 α -hydroxy-déhydroépiandrostérone qui peut éventuellement être converti en sulfate de 16 α -hydroxy-androstènetriol. Ces deux composés se rendent alors au placenta où ils seront respectivement transformés en 16 α -hydroxy-androstènedione et 16 α -hydroxy-testostérone, qui, sous l'action de l'aromatase, seront à leur tour convertis en œstriol, principal œstrogène produit bien que moins actif que le 17 β -œstradiol. Les taux d'œstriol constituent néanmoins un bon indicatif du bien être fœtal [3;9].

La PGH, quant à elle, est essentiellement libérée par le ST. À l'inverse de l'hormone hypophysaire, elle est sécrétée de façon non pulsatile dans la circulation maternelle. Graduellement, elle remplace la GH hypophysaire qui devient alors indétectable jusqu'à la délivrance du fœtus. En favorisant la lipolyse et la glycogénèse, la PGH permet d'augmenter la disponibilité des nutriments [9].

Toutes les fonctions que remplit le placenta montrent à quel point il est probablement l'organe le plus important pendant cet état physiologique temporaire qu'est la grossesse. Ainsi, une mauvaise implantation placentaire ou encore un mauvais fonctionnement placentaire peuvent mener à des conditions pathologiques mettant en jeu la santé du fœtus, mais aussi de sa mère.

2. La prééclampsie

2.1. Diagnostique et traitement de la prééclampsie

La prééclampsie est une condition pathologique de la grossesse rencontrée chez 5 à 7% des femmes enceintes. Avec la restriction de croissance intra-utérine (RCIU), elle est une des causes les plus importantes de morbidité et mortalité fœto-maternelles. La

prééclampsie est caractérisée par l'apparition d'une hypertension gestationnelle qui se déclare en général après la 20^{ème} semaine de grossesse et qui est associée à une protéinurie. Le diagnostic de la prééclampsie est posé quand les patientes présentent une pression artérielle supérieure à 140/90 mmHg et ce lors de 2 mesures successives espacées de 4h. Avant la grossesse, les patientes atteintes de prééclampsie ont une pression artérielle normale et celle-ci retourne à des valeurs normales dans un délai inférieur à 42 jours post-partum. De plus, les femmes faisant de la prééclampsie présentent une excrétion urinaire de protéines supérieure à 300 mg/j lors d'une collecte d'urine de 24h [51].

D'autre part, il existe plusieurs types de prééclampsie définis soit par l'apparition clinique de la maladie (apparition des symptômes), soit par sa sévérité. Ainsi, on peut faire la distinction entre la prééclampsie dite précoce qui apparaît avant la 34^{ème} semaine de grossesse et la prééclampsie tardive apparaissant après la 34^{ème} semaine. La prééclampsie précoce semble être associée essentiellement à une mauvaise implantation placentaire, alors que la prééclampsie tardive serait plutôt due à des facteurs de la constitution maternelle. Bien que ces 2 types de prééclampsie se distinguent à la 34^{ème} semaine de grossesse, les différences entre les deux sont visibles dès la 24^{ème} semaine en étudiant par exemple l'index de pulsatilité de l'artère utérine (normal dans les cas tardifs et anormal dans les cas précoces) ou encore la résistance vasculaire totale (plus haute dans les cas précoces) [52]. En ce qui concerne la sévérité de la maladie, elle est classée en général en 2 groupes : non sévère qui regroupe les prééclampsies légères à modérées et qui sont caractérisées essentiellement par la haute pression et la protéinurie, et les prééclampsies sévères qui, en plus d'une hypertension gestationnelle et une protéinurie, peuvent être associées à des maux de tête, une mauvaise vision, des douleurs abdominales, une oligurie, une créatinine sérique élevée, une thrombocytopénie, une élévation marquée de la transaminase sérique, un œdème pulmonaire, un RCIU visible et des convulsions [2].

Fait particulier, les femmes atteintes de prééclampsie voient leur état revenir à la normal après l'accouchement, en particulier, après l'expulsion du placenta. Ceci porte à croire que ce dernier joue un rôle central dans la maladie. Bien que la délivrance du fœtus et du placenta restent pour l'instant le traitement le plus efficace chez les femmes enceintes avec prééclampsie, de nombreuses stratégies (contrôle de l'alimentation, utilisation

d'antihypertenseurs, d'antithrombotiques et d'antioxydants) ont été tentées pour prévenir ou diminuer la sévérité de la maladie. Malheureusement, même si certaines de ces stratégies ont montré une petite efficacité chez les patientes à faible risque, aucune d'entre elles ne s'est montrée efficace chez les patientes à haut risque de développer la prééclampsie. Par conséquent les patientes à risque ou celles chez qui la prééclampsie a été diagnostiquée doivent être suivies plus fréquemment que les autres. Malheureusement, en cas de complications, il est souvent nécessaire de procéder à la délivrance du bébé, ce qui entraîne parfois des naissances prématurées avec les complications qui y sont associées [2;53].

2.2. Les complications de la prééclampsie

Dans certains cas, l'état des patientes atteintes de prééclampsie peut se voir aggravé par d'autres complications menaçant la vie du fœtus mais aussi celle de sa mère. Parmi les complications les plus fréquentes, on retrouve l'éclampsie, le RCIU et le syndrome de HELLP.

L'éclampsie survient en général dans les cas sévères de prééclampsie avant ou après l'accouchement. Elle est caractérisée principalement par des troubles neurologiques tels que des convulsions et/ou des troubles de la conscience, qui apparaissent chez des patientes avec prééclampsie n'ayant jamais présenté de problème neurologique au préalable. Les troubles de la vision et les céphalées peuvent être considérés comme des symptômes de la maladie. L'éclampsie serait le résultat d'un œdème cérébral lié à une altération de la régulation de la circulation sanguine cérébrale en réponse à l'hypertension engendrée par la prééclampsie. Malheureusement, l'apparition des convulsions étant difficilement prédictible, la prévention reste de nos jours la meilleure solution. De cette façon, le magnésium de sulfate est à l'heure actuelle le traitement préventif le plus efficace car il permet une réduction de l'incidence des convulsions, de la mortalité, des complications maternelles et une amélioration de la condition du nouveau-né. Il agirait en dilatant les vaisseaux cérébraux, mais aussi les artérioles périphériques ce qui amènerait une chute de la pression artérielle. De plus, il modifierait la transmission neurovasculaire en

bloquant l'entrée de calcium dans la terminaison synaptique. Finalement, bien que l'éclampsie puisse apparaître en post-partum, la délivrance d'urgence est souvent indiquée chez ces patientes [54;55].

Le retard de croissance intra-utérine se définit par la naissance d'un enfant dont le poids se situe en dessous du 10^{ème} percentile pour son âge gestationnel. Bien que le RCIU soit une complication médicale de la grossesse à part entière, il arrive qu'il vienne compliquer certains cas de prééclampsie, augmentant ainsi les risques de mortalité fœtale. Il est clairement établi que les femmes présentant une prééclampsie sévère et/ou précoce sont plus à risque de donner naissance à un enfant petit pour son âge gestationnel [56;57]. De plus, la prééclampsie précoce et le RCIU partagent une caractéristique commune qu'est la mauvaise implantation placentaire avec une altération du remodelage vasculaire utérin se traduisant par une diminution du flot sanguin utéroplacentaire [58]. Cependant, comme la prééclampsie, le RCIU peut aussi être la conséquence d'autres facteurs tels que la génétique, une infection virale ou tout simplement la taille de la mère. En cas de détection d'un RCIU, les patientes sont suivies d'encore plus près et le choix d'une interruption de grossesse est déterminé par de nombreuses variables telles que la viabilité du fœtus, l'âge gestationnel, les risques fœto-maternels, etc. [2].

Par ailleurs, les cas de prééclampsie sévère peuvent aussi être compliqués par une hémolyse associée à une thrombocytopénie et une augmentation des niveaux sériques des transaminases hépatiques. Cette association de perturbations a été identifiée comme le syndrome de HELLP pour *hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet syndrome*. En général, il se déclare avant l'accouchement avec une prévalence entre la 27^{ème} et la 37^{ème} semaine de gestation. La présence du syndrome de HELLP augmente les taux de morbidité et mortalité fœto-maternels, impliquant encore une fois de suivre de près les patientes, d'autant plus que les traitements du syndrome de HELLP sont encore assez aléatoires. L'option de l'interruption immédiate de grossesse est essentiellement discutée en fonction de l'âge gestationnel du fœtus. De cette façon, le prolongement de la grossesse est recommandé si l'âge gestationnel est en dessous de 34 semaines et si les conditions maternelles et fœtales y sont favorables. Dans ce cas, les patientes seront traitées avec des corticostéroïdes qui favorisent la maturation pulmonaire du fœtus. Cependant, en cas de

complications, l'interruption de grossesse par césarienne devient le 1^{er} choix de traitement [2;59;60].

2.3. Prééclampsie vs grossesse normotensive

2.3.1. Remodelage vasculaire utérin

À l'état non gravide, la quantité de sang qui arrive à l'utérus ne représente que quelques millilitres par minute. Cependant, en cas de grossesse, le placenta doit recevoir une quantité suffisante de sang de façon à récupérer les nutriments et l'oxygène nécessaires pour assurer son métabolisme et celui du fœtus. Par conséquent, le système vasculaire utérin doit être remodelé afin d'apporter tout le sang nécessaire au placenta. Les artères spiralées utérines sont la cible du remodelage car elles doivent passer d'une structure de vaisseaux musculaires de petit calibre à une structure de vaisseaux de conductance de plus gros calibre, qui prendront alors le nom de vaisseaux utéroplacentaires (fig.5). Ce processus de remodelage implique 3 étapes clés, soit, la dilatation du lumen des artères, l'invasion trophoblastique de la paroi des vaisseaux et le remplacement des fibres élastiques et du tissu musculaire par du tissu fibreux. L'invasion trophoblastique se ferait en 2 phases distinctes impliquant une migration des trophoblastes endovasculaires. La 1^{ère} phase s'effectuerait au 1^{er} trimestre de gestation et consisterait en la transformation du segment décidual des artères spiralées. La 2^{ème} phase, quant à elle, s'effectuerait au 2^{ème} trimestre et serait à l'origine de la transformation du segment myométrial des artères spiralées [61;62]. Lors du remodelage, les TEV passent d'un phénotype de cellules épithéliales à un phénotype de cellules endothéliales et élargissent la paroi des artères spiralées tout en les raffermissant de façon à les transformer en vaisseaux de faible résistance. Aussi, au début du processus de remodelage, les trophoblastes endovasculaires forment des bouchons aux niveaux distaux des artères maternelles de façon à empêcher le sang d'arriver dans l'EIV. Vers la fin du 1^{er} trimestre de gestation, les bouchons deviennent plus perméables laissant le sang maternel pénétrer dans l'EIV [63].

En cas de prééclampsie précoce cependant, il apparaît que le remodelage vasculaire est inadéquat, entraînant une mauvaise perfusion du placenta (fig.5). Les artères spiralées

ne perdent pas leur tissu musculaire et par conséquent n'acquièrent pas la structure d'artère de conductance attendue. Ce défaut de remodelage serait dû à l'absence de la 2^{ème} étape de l'invasion trophoblastique survenant autour de la 16^{ème} semaine. En effet, la partie myométriale des artères spiralées ne perdrait pas sa structure musculaire, continuant ainsi de répondre aux stimuli vasoactifs [61]. De plus, lors de la grossesse, la paroi des artères spiralées s'amincit à mesure que la grossesse avance, ce qui n'est pas observé en cas de prééclampsie où la paroi reste plus épaisse et les artères peinent à se dilater. À 31 semaines de gestation, les fibres élastiques des artères spiralées, normalement non-détectables, sont encore perceptibles chez les patientes avec prééclampsie [64]. Seulement 10% de la zone jonctionnelle des artères spiralées seraient transformés lors de prééclampsie contre 96% dans les grossesses normotensives. Finalement, il est proposé que l'invasion inadéquate des trophoblastes soit la conséquence d'une mauvaise décidualisation de l'endomètre [65].

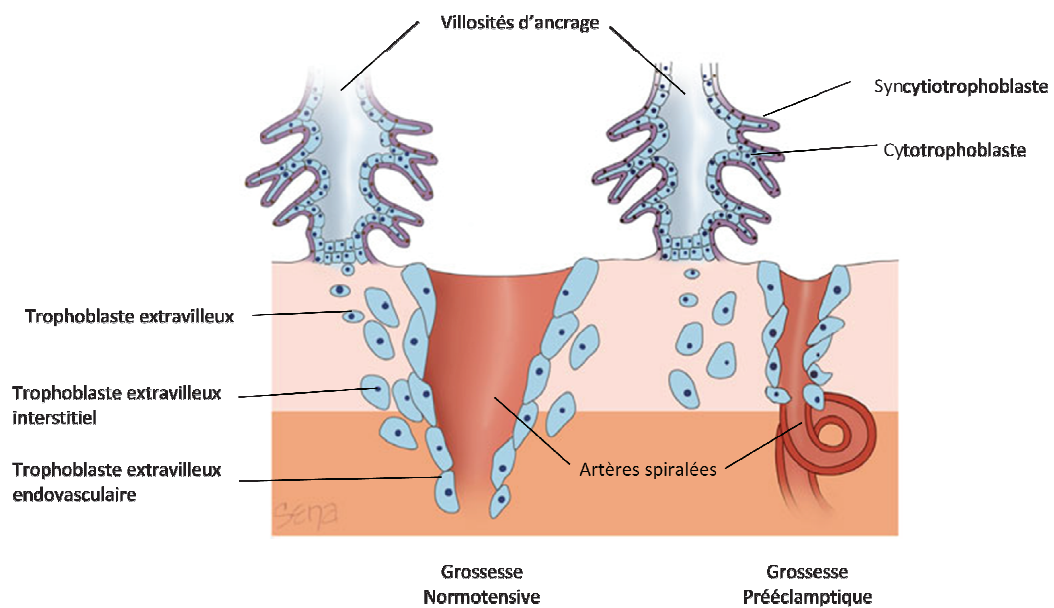


Figure 5 : Invasion trophoblastique dans le cas d'une grossesse normotensive comparée à une grossesse avec prééclampsie (traduit de Cunningham et al. [2])

2.3.2. Les changements hémodynamiques

La grossesse normotensive s'accompagne de nombreuses modifications cardiovasculaires qui chez une personne non-enceinte entraîneraient une hypertension artérielle mais qui sont, chez la femme gestante, à l'origine d'une chute paradoxale de la pression artérielle [66]. Parmi ces modifications, il est clairement établi que le débit et la fréquence cardiaques, le volume d'éjection systolique, le volume circulant et l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) sont augmentés alors que les résistances vasculaires systémiques sont diminuées. En effet, dès la 6^{ème} semaine de gestation, la fréquence cardiaque et le volume d'éjection systolique commencent à augmenter, la première de façon graduelle tout au long de la grossesse et le second essentiellement durant les 20 premières semaines environ pour ensuite rester stable ou diminuer un peu. Le volume sanguin quant à lui peut augmenter de 1 à 2L en atteignant son maximum autour de la 32^{ème} semaine de gestation. Cette expansion de la volémie est due à une augmentation de 40 à 50% du volume plasmatique combinée à une augmentation de 20% des érythrocytes maternels et ferait intervenir, entre autres, une augmentation de l'activité du SRAA et de la libération du cortisol et de la vasopressine impliqués dans la rétention hydrique. La hausse de l'activité du SRAA est en partie le résultat d'une augmentation de la libération de rénine par les ovaires et la caduque maternelle, ainsi que de la stimulation, par les œstrogènes sécrétés par le placenta, de la transcription du gène de l'angiotensinogène dans le foie. De plus, les réponses au peptide natriurétique auriculaire, qui favorise l'excrétion de Na⁺ et par conséquent d'eau, sont inhibées durant la grossesse. Par ailleurs, les résistances vasculaires systémiques commencent également à changer dès la 6^{ème} semaine de grossesse et sont rapportées pour être déjà diminuées de 30% à la 8^{ème} semaine comparées à des valeurs d'avant grossesse. Elles atteignent alors un minimum vers les 20-24^{ème} semaines de gestation pour ensuite stagner voire parfois monter très légèrement. Finalement, les effets sur la pression artérielle sont observés dans un 1^{er} temps uniquement sur la pression diastolique qui diminue dès le début de la grossesse alors que la pression systolique n'est affectée qu'après le 1^{er} trimestre. Entre les semaines 16 et 24, la pression artérielle moyenne atteint son minimum, soit une baisse d'environ 6 mmHg comparée aux valeurs

d'avant grossesse, puis elle remonte graduellement jusqu'à terme pour revenir à une valeur normale à l'état non gravide [67-73].

Chez les patientes atteintes de prééclampsie cependant, ces changements hémodynamiques sont perturbés et ce, dès le début de grossesse bien que la maladie soit en général diagnostiquée beaucoup plus tard. En effet, la hausse des pressions artérielles diastolique et systolique sont visibles dès la 6^{ème} semaine de gestation [68]. De même, il a été rapporté que le débit cardiaque des femmes avec prééclampsie était plus élevé que celui des femmes normotensives aux environs de la 12^{ème} semaine de grossesse [69]. Cependant, le débit cardiaque de ces patientes chute considérablement après la 34^{ème} semaine lors de la manifestation clinique de la maladie. Aussi, il apparaît que les résistances vasculaires périphériques des patientes atteintes de prééclampsie restent normales tout au long de la grossesse pour finalement monter en flèche dès la 34^{ème} semaine. Comparé à celui des femmes normotensive, le volume circulant des patientes avec prééclampsie augmente moins, voire pas, dans la phase clinique de la maladie. La protéinurie, l'activité du SRAA qui n'augmente pas et la hausse des niveaux du peptide natriurétique auriculaire observées chez les patientes avec prééclampsie semblent d'importance dans l'absence d'expansion du volume [68-71]. Malgré tout, les modifications hémodynamiques de la prééclampsie restent à l'heure actuelle un sujet controversé pour lequel il semble indispensable de prendre en compte l'âge gestationnel au moment de l'étude et par conséquent de différencier la phase latente de la maladie, soit avant que le diagnostic ne soit posé, de la phase clinique de la maladie, soit quand les symptômes font leur apparition [74].

2.3.3. Les facteurs de croissances

Depuis quelques années, l'attention a porté sur les différences dans l'expression de certains facteurs de croissance chez les patientes avec prééclampsie comparées aux patientes normotensives. En effet, les facteurs angiogéniques semblent d'importance dans le développement de la maladie, en particulier le VEGF, le PlGF, le sFlt-1 et l'endogline soluble (sEng) [63;75].

Au cours de la grossesse, le développement du placenta ainsi que l'invasion trophoblastique sont essentiels et sont contrôlés par des facteurs de croissance variés tels que l'EGF, le VEGF, le PDGF, le PIGF et l'IGF, sécrétés à l'interface fœto-maternelle par divers types cellulaires dont les CT. Bien que l'invasion trophoblastique soit d'une nécessité absolue, elle doit être bien contrôlée pour ne pas être trop profonde. Ce contrôle est assuré par la sécrétion de protéines inhibitrices telles que les membres de la famille des *transforming growth factors* β (TGF β), l'interféron γ et le TNF α , et par la sécrétion de protéines de liaison régulatrices dont le sFlt-1 et la sEng [76].

Le VEGF et le PIGF, tous deux de la même famille, sont impliqués dans l'angiogenèse, soit la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants, et dans la vasculogenèse, soit la formation *de novo* de vaisseaux sanguins. Ces 2 glycoprotéines induisent leurs effets en agissant sur les cellules endothéliales en se liant à des récepteurs communs, les récepteurs au VEGF qui sont de type tyrosine kinase et dont il existe 3 sortes : VEGFR-1 ou Flt1, VEGFR-2 ou KDR/Flk1 et le VEGFR-3. Le PIGF, cependant, n'agira que sur le VEGFR-1 alors que VEGF, dépendamment du variant, peut agir sur l'un des trois récepteurs. PIGF est libéré par les trophoblastes et il est important durant la période embryonnaire et le développement. Sa concentration est élevée jusqu'à la 30^{ème} semaine de gestation puis elle diminue. Le VEGF, quant à lui, est important pour l'intégrité endothéliale. En entraînant la libération de NO et de prostacycline, il permet la dilatation des vaisseaux. De plus, il est impliqué au niveau du rein où il maintient l'ultrastructure du glomérule et permet la fenestration des cellules endothéliales glomérulaires. Chez les patientes prééclampsiques, il est rapporté que les niveaux plasmatiques de VEGF et de PIGF libres sont réduits avant même l'apparition clinique de la maladie [63;75;77].

La baisse des concentrations de VEGF et de PIGF libres dans les cas de prééclampsie est accentuée par l'augmentation de la concentration de sFlt-1 déjà perceptible 5 à 6 semaines avant la manifestation clinique de la maladie. Cette protéine est en fait un récepteur soluble au VEGF qui neutralise les effets du VEGF et du PIGF en les liant et en les empêchant d'agir sur leurs récepteurs membranaires pour produire leurs effets pro-angiogéniques. Parallèlement, il est établi que la concentration de sFlt-1 corréle avec la sévérité de la maladie et qu'elle est plus élevée dans les cas sévères et précoces ou encore

ceux compliqués par un RCIU [63;75;77]. On a montré que les rapports VEGF/sFlt-1 et PlGF/sFlt-1 étaient diminués de 53 et 70% respectivement chez les femmes avec prééclampsie. Par ailleurs, la même étude a démontré l'effet anti-angiogénique du sFlt-1 qui empêche la migration des cellules endothéliales et la formation de la structure tubulaire dans les expériences *in vitro* [78].

D'autre part, la prééclampsie s'accompagne également d'une augmentation des niveaux de sEng qui constitue un co-récepteur du TGF β et qui inhibe ses effets dans la vascularisation. La sEng est sécrétée à fortes doses par le ST et les CT qui acquièrent un phénotype invasif. Bien que son rôle soit encore nébuleux dans le développement placentaire normal, la sEng semble avoir des caractéristiques semblables à sFlt-1. En outre, elle pourrait agir au niveau des cellules endothéliales en interférant avec la libération de NO. Comme le sFlt-1, les niveaux exacerbés de sEng peuvent être détectés plusieurs semaines avant que le diagnostic de prééclampsie ne soit posé [63;75].

Finalement, l'IGF, également impliqué dans le développement fœto-placentaire, voit aussi sa concentration diminuée chez les femmes atteintes de prééclampsie. Ceci serait le résultat d'une baisse de l'expression des protéases des IGFBP censées cliver ces dernières pour qu'elles relâchent l'IGF augmentant ainsi sa biodisponibilité. Cependant, bien que des niveaux plus faibles de protéases soient détectés chez les patientes sujettes à développer une prééclampsie, il apparaît qu'après l'apparition clinique de la maladie, les protéases soient en concentrations beaucoup plus élevées que chez les femmes normotensives. Il est proposé que ce retournement de situation puisse être un mécanisme compensateur du développement placentaire anormal [79].

Bien que d'autres études soient encore nécessaires pour faire la lumière complète sur l'implication des facteurs de croissances dans la prééclampsie, leur importance n'est plus à démontrer. De surcroît, les variations de concentrations de ces facteurs étant précoces dans la maladie et facilement dosables (par tests d'urine ou sanguin), ils seraient utilisables comme biomarqueurs de la prééclampsie, ce qui permettrait de détecter les patientes à risque avant que les symptômes cliniques n'apparaissent. Cependant, il semble qu'ils soient plus efficaces pour détecter les cas de prééclampsie précoces, surtout quand ils sont utilisés en combinaison avec d'autres facteurs tels que le PlGF (ex : rapport PlGF/sEng)

En outre, leurs implications dans la dysfonction endothéliale accompagnant la prééclampsie seraient une des autres raisons pour les garder sous les projecteurs [63;75;80].

2.3.4. La fonction endothéliale

L'endothélium constitue un régulateur important de l'hémostase et du tonus vasculaire dans l'organisme. En effet, en libérant du NO et de la PGI₂, l'endothélium prévient les dommages vasculaires et évènements thrombotiques en inhibant les plaquettes, les neutrophiles et l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA). D'autre part, la libération de NO et de PGI₂ entraîne une dilatation des vaisseaux en réponse à certains facteurs humoraux, comme l'acétylcholine et la bradykinine, et des facteurs physiques, en particulier les forces de cisaillement exercées par la circulation du sang sur la paroi des vaisseaux. L'endothélium peut également provoquer une contraction des vaisseaux en libérant de l'ET-1 qui agira sur les récepteur ET_A, mais il peut aussi devenir pro-thrombotique en libérant le facteur von Willebrand, le facteur activateur de plaquette et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène. Cependant, en temps normal, l'endothélium présente une surface anti-thrombotique [81-83].

La grossesse s'accompagne d'une augmentation de la libération de PGI₂ et de NO, ce qui jouerait un rôle dans le maintien d'une faible résistance vasculaire et la régulation de la pression artérielle et de l'activité plaquettaire [2;82]. En effet, les études effectuées chez les animaux, mais aussi chez les humains, ont révélé que l'expression et l'activité des synthases de NO et de PGI₂, de même que l'activité vasomotrice de ceux-ci, étaient augmentées par la grossesse [84-88]. Par conséquent, l'intégrité de l'endothélium semble nécessaire au bon déroulement de la grossesse et ceci est encore plus probant chez les patientes atteintes de prééclampsie qui présentent souvent un dysfonctionnement endothélial. En effet, la dysfonction endothéliale dans la prééclampsie a été mise en évidence via des mesures de biomarqueurs plasmatiques tels que la fibronectine cellulaire, le facteur von Willebrand, la thrombomoduline et l'ET-1 [89-94]. Par ailleurs, en plus de se passer au niveau systémique, la dysfonction endothéliale se manifeste aussi dans les reins [95]. De nombreuses études ont été entreprises pour comprendre les raisons d'une telle dysfonction endothéliale chez

ces patientes. Parmi elles, le rôle du NO a été étudié abondamment et malgré tout, il est encore difficile de faire la lumière sur son implication. En effet, les résultats sont assez controversés en ce qui a trait aux concentrations plasmatiques et placentaires de NO ou de ses métabolites chez les patientes atteintes de prééclampsie, puisque les études rapportent des concentrations plus fortes [96-98], inchangées [99] ou encore diminuées [100;101]. D'autre part, la production de PGI₂ par les cellules endothéliales pourrait également être une des raisons de ce dysfonctionnement puisqu'elle est un antiagrégant plaquettaire et rapportée pour être plus faible en cas de prééclampsie [102;103]. Il est proposé que le rôle joué par la libération spontanée de PGI₂ par l'endothélium puisse être réduit dans les artères de résistance omentales des femmes avec prééclampsie, puisque ces vaisseaux ont une production basale de 6-keto-PGF_{1α}, un métabolite stable de la PGI₂, réduite comparés à ceux de femmes normotensives [96]. Plus récemment, l'implication des facteurs angiogéniques, comme le VEGF et le PlGF, de même que leur récepteur sFlt-1 a été envisagée pour expliquer la dysfonction endothéliale accompagnant la prééclampsie. En plus de son effet angiogénique, VEGF a la capacité de dilater les vaisseaux [40;104]. On a rapporté que, chez les patientes prééclamptiques, la concentration de sFlt-1 était augmentée alors que celles du VEGF et du PlGF étaient réduites [77]. Il apparaît donc que la diminution des niveaux sériques de VEGF et PlGF est proportionnelle à l'augmentation de la concentration sérique de sFlt-1. Ainsi, en plus d'inhiber le rôle angiogénique de VEGF et PlGF, sFlt-1 inhiberait également la vasodilatation générée par ces deux facteurs [105]. Finalement, l'inflammation, augmentée chez les patientes avec prééclampsie [106], le déversement de particules membranaires, le stress oxydatif, les lipides plasmatiques élevés, l'activation des neutrophiles pourraient faire partie des causes de la dysfonction endothéliale [90;107]. Malgré tout, on ignore encore à l'heure actuelle ce qui la provoque réellement chez les femmes atteintes de prééclampsie.

3. Les prostanoides

3.1. Synthèse des prostanoides

3.1.1. Prostaglandines et Thromboxane A₂

Les prostanoides sont des dérivés cycliques (cyclopentane) des eicosanoïdes qui sont des composés oxygénés hydrophobiques fonctionnant comme des médiateurs paracrines. Globalement, elles sont formées à partir de l'AA issu des phospholipides membranaires via l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂). L'AA est à son tour converti en prostaglandines endoperoxides, PGG₂ et PGH₂, suite à l'activation d'une cyclooxygénase (COX). Finalement, la PGH₂ est transformée en diverses prostaglandines et thromboxane A₂ grâce à plusieurs enzymes spécifiques à la prostanoides produite (fig.6) [108-110].

La formation de prostanoides est donc le résultat d'une cascade de productions impliquant l'activation de diverses enzymes qui ont été étudiées depuis plusieurs décennies. En ce qui concerne la PLA₂ qui libère l'AA des phospholipides membranaires, il en existe 4 catégories différentes : les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂) de groupe IV, les enzymes sécrétoires (sPLA₂) de faible poids moléculaire, les enzymes du groupe VI indépendantes du calcium et les PLA₂ des groupes VII et VIII, hydrolases acétyles sélectives du facteur activant les plaquettes (PAF). Cependant, seules la cPLA₂-α de groupe IV et les sPLA₂ sont impliquées dans la génération d'eicosanoïdes [108;111;112]. Ensuite, la conversion de l'AA par une COX, ou prostaglandine H₂ synthase, fait intervenir 2 étapes : la première, une bisoxygénation, convertit l'AA en PGG₂, alors que la seconde transforme la PGG₂ en PGH₂ grâce à l'activité peroxydase de la COX. Il existe deux isoformes de COX, soit COX-1 et COX-2, qui chez l'humain constituent des homodimères de 576 et 581 acides aminés. COX-1 est constitutive, largement distribuée dans les tissus et son gène code pour un ARNm relativement stable. COX-2, quant à elle, est une forme inductible dont le gène est activé par des stimuli inflammatoires et prolifératifs. À l'inverse de COX-1, l'ARNm produit à partir du gène de COX-2 est rapidement dégradé [109;113]. Finalement, dépendamment d'où elle se trouve, la PGH₂ peut être prise en charge par différentes enzymes pour former des prostaglandines dont il existe plusieurs types, soit PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} et PGI₂, et la thromboxane A₂. PGH₂ subit un réarrangement non-oxydatif par les isomérases PGD₂

synthase ou la PGE₂ synthase pour former PGD₂ et PGE₂ respectivement. La formation de PGF_{2α} fait intervenir la réductase PGF synthase qui induit une réduction de 2 électrons de PGH₂. De leur côté, la PGI₂ synthase et la thromboxane synthase sont à l'origine de la conversion de PGH₂ en PGI₂ et TXA₂ respectivement (fig.6) [108;112].

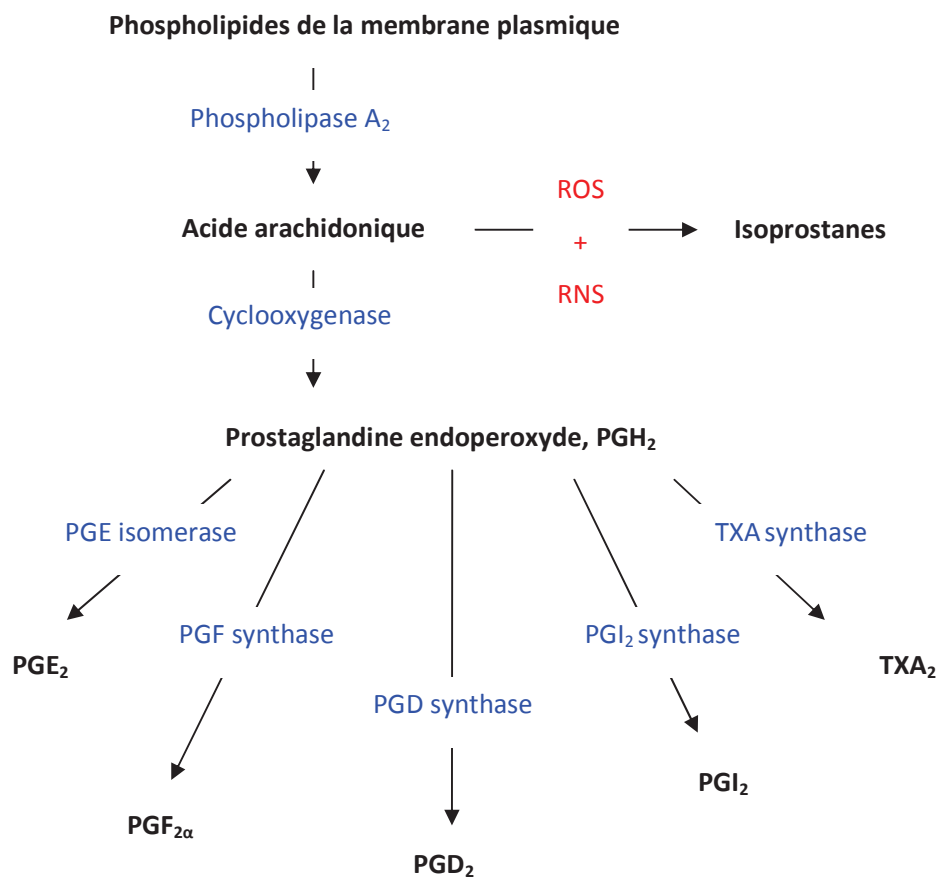


Figure 6 : Synthèse des prostanoïdes. Diagramme représentatif de la synthèse des principales prostaglandines (PGI₂, PGF_{2α}, PGE₂ et PGD₂), TXA₂ et isoprostanes.

3.1.2. Isoprostanes

En plus d'être formées par la voie des COXs, les prostanoïdes peuvent aussi être générées par une voie non-enzymatique faisant intervenir les radicaux libres. Dans ce cas, les produits formés sont appelés « isoprostanes » (fig.6). Ceux-ci constituent des composés semblables aux prostaglandines. Leur formation *in vivo* chez l'humain a été mise en évidence dans les années 1990 par l'équipe de Jason D. Morrow [114]. Les isoprostanes existent dans des liaisons ester des phospholipides membranaires avant d'être libérées sous forme libre. Aussi, à l'inverse des prostaglandines qui sont formées *de novo* à partir de l'AA, les isoprostanes sont formées *in situ* des phospholipides suite à la peroxydation de l'AA par attaque radicalaire [115].

Par ailleurs, comme pour les prostaglandines, il a été mis en évidence qu'il existait plusieurs types d'isoprostanes tels que les isoprostanes F₂, D₂ et E₂. Fait intéressant, le schéma de formation de ces isoprostanes suit celui des prostaglandines dans le sens que les isoprostanes E₂ et D₂ sont issues d'un réarrangement des endoperoxydes alors qu'elles sont réduites pour former les isoprostanes F₂ [114;116]. D'autre part, leur biosynthèse étant le résultat d'une attaque radicalaire, les isoprostanes sont considérés comme des biomarqueurs du stress oxydatif [117-119].

3.2. Les récepteurs des prostanoïdes

Afin d'exercer leurs effets biologiques une fois libérées, les prostaglandines et la TXA₂ vont agir sur différents récepteurs couplés à des protéines G à 7 passages transmembranaires. Il existe 5 types de récepteurs aux prostanoïdes soit EP, DP, FP, IP et TP, et chacun d'entre eux présente une sensibilité plus importante pour l'une des 5 prostanoïdes principales, soit PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ et TXA₂ respectivement [120;121] (tableau 1). Chez l'humain, les récepteurs aux prostanoïdes se retrouvent dans de nombreux organes comme par exemple le rein [122], l'intestin [123], le cerveau [124], l'appareil reproducteur féminin (ex : myomètre et trompes de Fallope) [125-127] et les vaisseaux sanguins [128;129].

Tableau 1

Tableau récapitulatif des protéines G et seconds messagers associés aux différents récepteurs des prostanoïdes.

Récepteur	Protéine G associée	Second messenger
DP	G _s	↑[Ca ²⁺] _i , ↑AMPc
CRTH2	G _{αi}	↑[Ca ²⁺] _i , ↓AMPc
IP	G _s	↑AMPc
FP	G _q	↑[Ca ²⁺] _i , turnover IP
TP	G _q , G _{α11} , G _{α12} , G _{α13} , G _{α15} , G _{α16} , G _h	↑[Ca ²⁺] _i , turnover IP
EP ₁	Non-identifiée	↑[Ca ²⁺] _i
EP ₂	G _s	↑AMPc
EP ₃	G _i	↓AMPc
EP ₄	G _s	↑AMPc

Adapté de Woodward et al. [121] et de la littérature décrite dans la section 3.2. *Les récepteurs des prostanoïdes.*

Les récepteurs DP et IP, une fois activés par un agoniste, présentent la même voie de signalisation cellulaire. En effet, ces récepteurs sont tous deux couplés à une protéine G_s et entraînent une augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire [120;121;130;131]. Cependant, il a été montré que le récepteur IP pourrait également être à l'origine d'une augmentation simultanée des valeurs d'AMPc et de Ca²⁺ intracellulaires [132]. De plus, il apparaît que le récepteur IP pourrait aussi entraîner une chute de l'inositol phosphate intracellulaire lorsque couplé à un autre type de protéine G, soit probablement une G_q [133]. Récemment, un autre récepteur à 7 passages transmembranaires couplé à une protéine G et liant la PGD₂, le CRTH2 pour *chemoattractant receptor molecule expressed on Th2 cells* a été mis en évidence. L'activation du récepteur CRTH2 sur les leucocytes entraîne une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire et induit des signaux

chémotactiques/chémocinétiques des cellules Th2, basophiles et éosinophiles. À l'inverse du récepteur DP qui couple une G_s , le récepteur CRTH2 humain véhicule ses effets par l'activation d'une $G_{\alpha i}$ qui réduit la concentration d'AMPc intracellulaire [134;135], alors que son orthologue murin apparaît en plus activer la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [136].

L'activation des récepteurs FP mène à une élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire associée à une augmentation de la formation d'inositol-3-phosphate (IP_3). Ceci est le résultat d'un couplage du récepteur FP avec une protéine G_q qui entraîne l'activation d'une phospholipase C (PLC) menant à une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire générée par l' IP_3 [121;137]. 3 sous-types de récepteurs FP, qui diffèrent tous par leur domaine C-terminal, ont été mis en évidence grâce à des études de clonage : FP_A , FP_B [138] et FP_a [139].

En ce qui concerne les récepteurs TP, il en existe 2 sous-types : TP_α et TP_β qui diffèrent par leur queue C-terminale [140]. De nombreuses protéines G comme par exemple $G_{\alpha q}$ [141], $G_{\alpha 11}$ [142], $G_{\alpha 12}$, $G_{\alpha 13}$ [143], G_h [144], $G_{\alpha 15}$ et $G_{\alpha 16}$ [145] peuvent être couplées aux récepteurs TP (revues dans Halushka et al. [146]). L'activation des récepteurs TP génère souvent une augmentation d' IP_3 associée à la mobilisation du Ca^{2+} suite à l'activation d'une PLC [142;144;145]. Par ailleurs, bien que TP_α et TP_β activent de la même façon la PLC, il a été rapporté que TP_α active également l'adénylate cyclase alors que TP_β l'inhibe [147].

Finalement, les récepteurs EP sont au nombre de 4, EP_1 , EP_2 , EP_3 et EP_4 , dont les voies de signalisation divergent. EP_1 était connu pour augmenter la concentration de Ca^{2+} intracellulaire en contrôlant l'ouverture des canaux calciques membranaires sans faire intervenir la réponse phosphatidylinositide, ceci via un couplage à une protéine G non-identifiée [120]. Cependant, il a récemment été montré que l'activation d' EP_1 pouvait augmenter la formation d' IP_3 par activation d'une PLC, ce qui est caractéristique d'un couplage avec une protéine $G_{q/11}$ [148;149]. EP_1 serait aussi capable de coupler une protéine $G_{i/o}$ pour régulariser à la hausse l'expression de l'*hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) [149]. Les récepteurs EP_2 et EP_4 agissent sensiblement de la même façon en augmentant la concentration d'AMPc intracellulaire suite à l'activation de l'adénylate cyclase par couplage à une protéine G_s [120;121]. Cependant, EP_4 peut également être couplé à une protéine $G_{\alpha i}$

menant à l'activation de la voie des PI3K/ERK [150;151]. L'existence de plusieurs isoformes d'EP₃ a été rapportée dans diverses espèces dont l'humain [120;152;153]. EP₃ est en général à l'origine d'une inhibition de l'adénylate cyclase par couplage avec G_i, bien que dépendamment de l'isoforme, il peut être couplé à d'autres protéines G telles que G_s et G_q [120;154;155].

3.3. Effets des prostanoides

3.3.1. Implication dans la réponse inflammatoire

Lors d'une blessure ou d'une infection, le système immunitaire déclenche une réponse inflammatoire pour assurer la défense de l'organisme. L'inflammation permet d'une part l'élimination des éléments attaquant l'organisme et d'autre part la réparation des tissus endommagés et la restauration de leur fonction physiologique. La phase aiguë de l'inflammation est caractérisée par 4 éléments distincts, soit la rougeur, la chaleur, la douleur et l'enflure dues à la mobilisation de leucocytes tels que les neutrophiles et les monocytes qui se transforment en macrophages inflammatoires [156]. Les études impliquant une activation des monocytes [157] et macrophages [158;159], de même que celles impliquant une inhibition [160;161] ou une absence d'expression des COXs [162-165] ont mis en évidence le fait que la voie des prostanoides soit impliquée dans les mécanismes d'inflammation [166]. En effet, l'étude impliquant les monocytes humains a montré que l'incubation de ceux-ci avec des lipopolysaccharides (LPS), connus pour entraîner une réponse inflammatoire, augmentait la libération de TXA₂ et PGE₂ par les monocytes de façon dépendante du temps et de la concentration de LPS utilisée. L'augmentation de la libération de TXA₂ et PGE₂ était, quant à elle, directement reliée à une augmentation de l'activité des COX [157]. De même, la production de PGE₂ dans les co-cultures de cellules épithéliales/macrophages était augmentée par une stimulation par les LPS [159], alors que ceux-ci augmentaient également la production de diverses prostaglandines (TXA₂, PGD₂, PGE₂ et PGF_{2α}) dans les macrophages alvéolaires de lapins où ils augmentaient l'activité et la synthèse *de novo* des COXs [158]. D'autre part, l'absence des COXs (COX-1 dans certains cas et COX-2 dans d'autres) peut soit réduire l'inflammation, ce qui a été montré dans

l'hippocampe [162] et dans l'oreille [164] de souris, de même que dans cas d'arthrite induite chez la souris [165] ; soit augmenter l'inflammation, comme cela a été rapporté dans la muqueuse intestinale de souris suite à l'inhibition de la production de prostaglandines endogènes qui semblent avoir un effet protecteur dans les lésions intestinales [163]. De plus, il a été montré que l'administration de LPS engendrait chez des personnes saines des symptômes rencontrés en cas d'infection par le virus de l'influenza, soit maux de têtes, fièvre, malaises, myalgie, nausée et fatigue. Ces symptômes étaient accompagnés d'une augmentation de la formation de prostanoïdes incluant la TXA₂ et la PGI₂ mais aussi les isoprostanes, supportant leurs effets pro-inflammatoires [167].

Diverses études ont révélé que les prostaglandines [168], en particulier les PGE₂ et PGI₂ [169;170], sont impliquées dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et par conséquent de l'œdème observé lors de la réponse inflammatoire. Or, il semble que ces prostaglandines n'ont que peu d'effets directs sur la perméabilité vasculaire et que leur effet de potentialisation de l'œdème soit essentiellement dû à leur effet vasodilatateur agissant en synergie avec des médiateurs augmentant la perméabilité vasculaire, telles la bradykinine [171] ou l'histamine [172]. De même, l'implication des prostanoïdes dans le développement de la douleur a également été rapportée au niveau central et périphérique [173-177]. Par ailleurs, même si le développement de la fièvre est associé à une libération de prostanoïdes, il n'y a aucune corrélation entre la quantité de prostaglandines libérées et l'intensité de la fièvre déclenchée lors d'une infection virale ou bactérienne [178;179].

Bien que l'effet pro-inflammatoire des prostanoïdes soit évident, il apparaît depuis quelques temps qu'elles peuvent aussi agir comme des agents anti-inflammatoires [180]. En effet, il a été rapporté que l'expression de COX-2, en plus d'être augmentée dans la phase aiguë de l'inflammation, est également accrue dans sa phase de résolution et l'inhibition de son activité augmente la quantité de cellules inflammatoires [181]. De même, la sécrétion de PGD₂ et son métabolite 15désoxy $\Delta^{12,14}$ PGJ₂, ainsi que celle de PGF_{2 α} , sont augmentées dans la phase de résolution de l'inflammation et une inhibition de ces sécrétions exacerbe la réponse inflammatoire [181-183]. Finalement, PGE₂ a aussi été montrée pour atténuer la libération de cytokines induite par l'activation de NF- κ B, démontrant ainsi un effet anti-inflammatoire malgré son côté pro-inflammatoire bien connu [184].

3.3.2. Implication dans la coagulation

La coagulation sanguine est un processus faisant intervenir les plaquettes et permettant la réparation de la paroi des vaisseaux sanguins grâce à la formation d'un caillot qui limite les risques d'hémorragie. Techniquement, l'activation des plaquettes se fait suite à l'interaction d'un agoniste avec son récepteur plaquettaire, entraînant une cascade de signalisation cellulaire. Ainsi, la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire suite à la libération d' IP_3 , de même que l'activation d'une PKC par DAG, entraînent la sécrétion des granules plaquettaires qui favorisent l'interaction cellulaire. De plus, la stimulation d'une PKC peut également mener à l'activation du récepteur de GPIIb/IIIa activant les plaquettes. D'autre part, la liaison d'un agoniste à son récepteur peut aussi activer la voie des MAP kinases, stimulant ainsi l'activation de PLA_2 et donc la libération d'AA [185]. L'activation des plaquettes peut se faire par l'intervention de différents agents comme par exemple l'ADP, la thrombine, le collagène, l'ionophore A23,187 et l'adrénaline. Ceux-ci peuvent activer la voie de l'AA, initiant ainsi la formation de TXA_2 qui favorise l'agrégation plaquettaire [186].

Les nombreuses études réalisées ont pu mettre en évidence que les prostanoïdes étaient de grande importance dans la régulation de la fonction plaquettaire que ce soit en promouvant l'agrégation des plaquettes ou en l'inhibant. En effet, alors que l'utilisation de souris déficientes en récepteurs TP révèle l'importance de la TXA_2 dans l'induction de l'agrégation plaquettaire [187], l'utilisation de souris déficientes en récepteurs IP montre à l'inverse que la PGI_2 en permet l'inhibition [173]. En outre, il est intéressant de noter que l'absence de l'un ou de l'autre des récepteurs chez ces souris n'a révélé aucun problème de croissance, aucune anomalie histologique ou morphologique, aucune modification significative de la pression sanguine ou encore aucun problème de fertilité [Murata ; Thomas]. Il semble donc que, dans des conditions normales, l'action de la TXA_2 , radicalement opposée à celle de la PGI_2 , ne prédomine pas sur cette dernière ou vice versa. Il a également été rapporté que les prostanoïdes, comme par exemple la PGE_2 , dépendamment des concentrations utilisées ainsi que du récepteur sur lequel elle agit, pouvaient, à travers le contrôle des niveaux d'AMPc intracellulaire, moduler l'activité des agents pro-agrégant tels que l'ADP et le collagène en potentialisant ou en inhibant leurs

effets [188;189]. Effectivement, Fabre et al. [188] ont montré que de faibles concentrations de PGE₂ (<10⁻⁵M) augmentaient l'agrégation des plaquettes isolées de souris induite par le mimétique de la TXA₂, l'U-46619, l'ADP ou le collagène et ce, suite à l'activation des récepteurs EP₃. En revanche, une dose plus forte de PGE₂ (10⁻⁴M) inhibait la capacité de l'ADP à induire l'agrégation, phénomène qui semble être le résultat d'une activation des récepteurs IP plaquettaires. De cette façon, les prostanoïdes semblent d'importance dans la régulation de l'hémostase et de la thrombose.

3.3.3. Effets vasoactifs des prostanoïdes

En plus de jouer un rôle important dans la modulation de la coagulation sanguine, les prostanoïdes sont également connues pour posséder des propriétés vasoactives leur permettant ainsi de participer à la régulation du tonus vasculaire systémique. L'effet vasoactif engendré par les prostanoïdes dépend essentiellement des récepteurs présents au lieu de leur libération, mais aussi de la voie enzymatique utilisée et donc du produit final formé [129]. Par exemple, comme dans le cas de la coagulation sanguine, la TXA₂ et la PGI₂ présentent des effets opposés sur les vaisseaux, la première étant une puissante substance vasoconstrictrice capable d'augmenter de façon significative la pression artérielle moyenne des souris [187], alors que la seconde génère plutôt une hypotension marquée [173], deux observations qui ne sont pas relevées chez les souris déficientes en récepteurs TP ou IP respectivement.

La présence de récepteurs aux prostanoïdes et leurs effets physiologiques sur la vascularisation ont été mis en évidence dans différentes espèces et lits vasculaires tels que l'artère et la veine ombilicale humaines [190-192], l'aorte de rat [193], l'artère rénale de souris [194] et l'artère et la veine pulmonaires de cochon [195]. En général, les récepteurs DP, EP₂, EP₄ et IP génèrent une relaxation du muscle lisse vasculaire alors que les récepteurs EP₁, EP₃, FP et TP le contractent [196]. L'importance des prostanoïdes dans le maintien de l'homéostasie vasculaire a été rapportée depuis maintenant plusieurs décennies et elle continue de l'être étant donné l'impact grandissant des maladies cardiovasculaires dans les pays développés. En effet, une modification de la fonction vasculaire de la voie des

prostaglandines est souvent identifiée dans des pathologies telles que l'hypertension, l'athérosclérose, le diabète, de même que le vieillissement et le cancer [197;198], confirmant ainsi la nécessité d'une parfaite régulation du métabolisme de l'AA.

3.4. Prostaglandines et grossesse

3.4.1. Prostaglandines et réactivité des vaisseaux placentaires

Les substances vasoactives qui contrôlent le tonus vasculaire placentaire n'ont pas encore été clairement identifiées. En revanche, comme mentionné précédemment, les prostaglandines pourraient être de bonnes candidates pour remplir ce rôle. En effet, les études utilisant le mimétique stable de la TXA_2 , l'U-46619, ont montré que celui-ci était capable d'augmenter considérablement la pression de perfusion (environ 200 mmHg) dans les cotylédons placentaires humains [27]. De même, ses effets vasoconstricteurs ont été démontrés dans les vaisseaux ombilicaux [191;199] et chorioniques [23;26;200]. Ceux-ci semblent être, au moins en partie, le résultat d'une activation des récepteurs TP [191;199].

Cependant, la TXA_2 n'est pas la seule prostaglandine à présenter des effets vasoactifs dans le placenta puisque d'autres prostaglandines comme la $PGF_{2\alpha}$ et la PGE_2 sont également capables de contracter les vaisseaux placentaires [22;24;25]. Daray et al. [191] proposent que dans la veine ombilicale humaine, les effets de la PGE_2 seraient dus à une activation des récepteurs TP, alors que la $PGF_{2\alpha}$ agirait sur les récepteurs FP. Aussi, les isoprostanes, telles la 8-iso $PGF_{2\alpha}$ et la 8-iso PGE_2 , possèdent également des propriétés vasoconstrictrices dans les vaisseaux ombilicaux [190;199] et chorioniques [201]. Dans les vaisseaux chorioniques, il apparaît que la 8-épi $PGF_{2\alpha}$ (ou 8-iso $PGF_{2\alpha}$) peut contracter les vaisseaux en agissant, au moins en partie, via les récepteurs TP. De plus, Oliveira et al. [199] ont montré que les composés avec un anneau E comme la 8-iso PGE_2 et la 8-iso PGE_1 étaient plus puissants que les composés avec un anneau F comme la 8-iso $PGF_{2\alpha}$ et la 8-iso $PGF_{1\alpha}$. De même, les composés doublement insaturés comme la 8-iso PGE_2 sont également plus puissants que ceux simplement insaturés comme la 8-iso PGE_1 . Finalement, il apparaît que, dans les vaisseaux ombilicaux [190;199] et chorioniques [201], les isoprostanes véhiculent leurs effets via une activation des récepteurs TP.

A l'opposé, comme le NO, la PGI₂ possède des effets vasorelaxants dans les vaisseaux placentaires pré-contractés [22;25]. En effet, Read et al. [27] ont observé une diminution de plus de 40% de l'augmentation de pression de perfusion induite par la PGF_{2α} dans les cotylédons. Ces observations suggèrent que la PGI₂, avec le NO, pourrait faire partie des substances capables de jouer la contrepartie vasodilatatrice dans le contrôle du tonus vasculaire placentaire.

3.4.2. Implications des prostanoïdes de l'implantation à l'accouchement

Les prostanoïdes sont présentes et impliquées dans le fonctionnement du système reproducteur femelle (voir revue Craig et al. [202]), mais plus encore, elles jouent un rôle important dans le maintien et le développement de la grossesse du tout début à la toute fin. En effet, les prostaglandines interviennent tout d'abord en début de gestation en facilitant le processus d'implantation de l'embryon dans l'utérus en augmentant la perméabilité vasculaire endométriale, en participant à la décidualisation [203-206] et en favorisant la migration des TEV [148]. Ensuite, pour permettre le bon déroulement de la grossesse, l'expression des protéines enzymatiques associées au métabolisme de l'AA va être modifiée tout au long de la gestation. Par exemple, chez la femme enceinte, l'expression de COX-2 augmente avec l'âge gestationnel dans le myomètre [207] et dans les membranes fœtales [208]. De même, l'expression de la PGI₂ synthase est également augmentée [84], ce qui pourrait s'expliquer par la nécessité pour l'utérus de maintenir un état quiescent, c'est-à-dire d'éviter les contractions pour favoriser le développement du fœtus. De plus, il a été rapporté que la concentration de 6-kétoPGF_{1α} était augmentée lors de l'étirement de bandes de myomètre humain [209] supportant ainsi cette hypothèse. Cependant, la PGI₂ ne semble pas la seule à être impliquée dans la quiescence de l'utérus puisque la grossesse s'accompagne aussi d'une chute d'environ 50% des niveaux d'ARNm des récepteurs FP et EP₃ myométriaux permettant ainsi de réduire les risques de contraction utérine induite par la liaison de leur ligand respectif [210]. Finalement, l'accouchement semble lui aussi, au moins en partie, contrôlé par l'action des prostanoïdes puisque les études réalisées jusqu'ici suggèrent leur implication dans l'initiation du processus [211-213]. Les comparaisons

effectuées entre les patientes en travail ou non suggèrent un effet de l'accouchement sur la voie de formation des prostanoïdes, telles qu'une augmentation de la quantité d'ARNm de COX-2 dans le myomètre [214;215], une diminution de l'activité de la PLA₂ cytosolique dans l'amnios [216] et une augmentation de la production de prostaglandines (PGE₂ et PGF_{2α}) dans le liquide amniotique [217]. De même, l'expression des COXs, de la TXA₂ synthase et de la PGI₂ synthase a été rapportée pour être plus faible dans le myomètre de patientes n'étant pas entrées en travail ou dont l'induction de celui-ci a échoué, comparées aux patientes étant entrées en travail (même observation effectuée pour l'expression des COXs dans les membranes fœtales) [218]. L'implication des prostanoïdes à ce niveau est d'autant plus évidente lorsque l'on s'attarde à regarder leur impact sur la durée de la grossesse. Par exemple, il a été montré que, bien que non statistiquement significative, la durée de la gestation était augmentée de 2 jours chez les souris traitées avec un inhibiteur de COX-1 [219]. Parallèlement, la même étude a révélé qu'une injection intrapéritonéale de LPS, augmentant la production de prostanoïdes, initiait le travail prématurément dans un délai de 24h, ce qui n'était pas observé chez les souris traitées avec l'inhibiteur de COX-1. Aussi, il est intéressant de noter que cette observation ne se limite pas aux souris puisqu'une étude similaire effectuée avec des singes rhésus arrive à la même conclusion [220], fournissant encore une fois une preuve de l'implication des prostanoïdes dans la réalisation de l'accouchement. Cependant, malgré les nombreuses études réalisées jusqu'ici, il reste encore des zones obscures quant à la façon dont elles sont impliquées. Il apparaît même qu'elles pourraient, entre autres, interagir avec les glucocorticoïdes en s'activant les uns les autres lors de l'initiation de l'accouchement [213].

3.4.3. Les prostanoïdes et la prééclampsie

Chez les patientes atteintes de prééclampsie, le profil de la voie des prostanoïdes diffère quelque peu de celui observé chez les femmes normotensives, suggérant un lien entre la maladie et le métabolisme de l'AA. Une des différences les plus marquées observées concerne la production relative de TXA₂ et de PGI₂. Les niveaux plasmatiques de PGI₂ normalement plus élevées chez la femme enceinte sont réduits chez les femmes avec

prééclampsie [221]. Aussi, chez une femme enceinte normotensive, la production placentaire de TXA_2 est équivalente à celle de la PGI_2 , ce qui permet de contrebalancer leurs actions. En revanche, chez les patientes avec prééclampsie, le rapport $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ passe de 1/1 à 7/1, favorisant ainsi les effets vasoconstricteurs et pro-agrégants de la TXA_2 . Ce déséquilibre, qui est observé dans le liquide amniotique, le plasma utérin veineux et périphérique, l'urine et le placenta, peut causer l'hypertension, mais il peut également affecter les flots sanguins fœtaux et placentaires compromettant ainsi le développement du fœtus [42]. L'expression du gène de la TXA_2 synthase semble être plus élevée dans la couche trophoblastique et les cellules déciduales des femmes atteintes de prééclampsie [222]. De même, l'EIV et les cellules trophoblastiques de patientes avec prééclampsie produisent plus de TXA_2 que ceux de patientes normotensives [223;224]. Cependant, bien que le déséquilibre $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ ne soit plus à démontrer dans les grossesses avec prééclampsie, il apparaît qu'au niveau du trophoblaste, la production de PGI_2 soit aussi augmentée [223] même si l'expression de la PGI_2 synthase est plus variable à ce niveau. En effet, Woodworth et al. [222] ont rapporté que, dans les cellules déciduales et la couche trophoblastique, elle était augmentée dans 70% des cas de grossesses avec prééclampsie comparée aux grossesses normales, diminuée dans 10% des cas et équivalente dans 20% des cas. L'augmentation de la production trophoblastique de PGI_2 , malgré tout inférieure à celle de TXA_2 , pourrait être vue comme un mécanisme compensateur, bien qu'insuffisant, induit par la maladie pour rétablir le système. D'ailleurs, l'exposition de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine à du plasma de femme atteinte de prééclampsie augmente la production de PGI_2 , même si celle-ci est contrebalancée par une production accrue du vasoconstricteur $\text{PGF}_{2\alpha}$ [225].

Par ailleurs, on a suggéré qu'étant donné que l'activité de la TXA_2 synthase est augmentée et celle de la PGI_2 synthase diminuée par l'action des peroxydes lipidiques, le déséquilibre entre la production de TXA_2 et la PGI_2 pourrait être le résultat du stress oxydatif observé dans la prééclampsie [42;226]. De même, le stress oxydatif observé chez les patientes avec prééclampsie contribuerait à modifier le profil du métabolisme de l'AA en augmentant également la production d'isoprostanes, conclusions rapportées dans différentes études [225;227]. Alors, même si l'on ignore encore si les modifications

observées avec les prostanoïdes sont une cause ou une conséquence de la prééclampsie, il semble qu'il y a une interaction étroite entre les deux.

4. Le monoxyde d'azote

4.1. Synthèse du monoxyde d'azote

La libération du NO, ou EDRF, a été pour la première fois mise en évidence il y a plus de 30 ans dans des aortes de lapins par Furchgott et Zawadzki [228]. Ceux-ci ont montré que les vaisseaux possédant leur endothélium dilataient en présence d'acétylcholine, ce qui n'était pas le cas avec les vaisseaux qui en étaient dépourvus, démontrant ainsi l'implication d'une substance libérée par les cellules endothéliales dans la vasodilatation induite par l'acétylcholine. L'identification du NO en tant qu'EDRF n'a cependant été faite que 7 ans plus tard dans les vaisseaux intra-pulmonaires bovins par l'équipe d'Ignarro [229] ainsi que dans les aortes de lapins par l'équipe de Moncada [230]. Ainsi, au cours des 3 dernières décennies, les nombreuses études sur le NO et sa synthèse ont permis de bien établir diverses découvertes dont certaines ont même été récompensées par une Prix Nobel de physiologie ou médecine en 1998 (reçu par Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad).

La L-arginine est transformée en NO et L-citrulline par les NO synthases (NOS) dont il existe 3 isoformes : La NOS neuronale (nNOS ou NOS I), la NOS inductible (iNOS ou NOS II) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS III). L'iNOS est, comme son nom l'indique, une enzyme inductible qui va être activée en présence d'un stimulus externe. Le plus souvent, elle joue un rôle dans la réponse immunitaire non-spécifique. À l'inverse, les NOSs neuronales et endothéliales sont constitutives. La nNOS se retrouve au niveau du système nerveux et le NO qu'elle produit possède essentiellement un rôle de neurotransmetteur. L'eNOS, quant à elle, est exprimée par les cellules endothéliales et le NO libéré est un puissant vasodilatateur et est impliqué, comme mentionné en amont, dans le maintien de la fonction endothéliale [231].

Bien qu'ils ne se retrouvent pas au même endroit et ne fonctionnent pas tout à fait de la même façon, les 3 isoformes sont structurellement très semblables. En effet, chaque

enzyme possède deux domaines distincts, soit un domaine C-terminal réductase, homologue du cytochrome P450 réductase et possédant un site de liaison pour chacune des molécules NADPH, FAD et FMN, ainsi qu'un domaine N-terminal oxygénase liant un hème, la tétrahydrobiopterine (BH₄) et la L-arginine. Ces deux domaines sont reliés entre eux par un domaine de liaison de la calmoduline (CaM). L'isoforme iNOS lie la CaM de façon irréversible en présence de faible dose de Ca²⁺. En revanche, les isoformes nNOS et eNOS lient la CaM de manière dépendante du calcium conférant ainsi à la CaM une propriété régulatrice de l'activité de ces deux enzymes, qui fonctionneront à pleine capacité en présence d'une forte quantité de Ca²⁺. De plus, bien que semblables aux deux autres, l'eNOS possède en plus des sites de palmitoylation et myristoylation du côté N-terminal, qui lui permettent de s'ancrer dans les cavéoles de la membrane plasmique. De même, la nNOS possède un domaine PDZ du côté N-terminal qui permet de diriger l'enzyme au site d'action dans les synapses nerveuses (fig.7) [231-233].

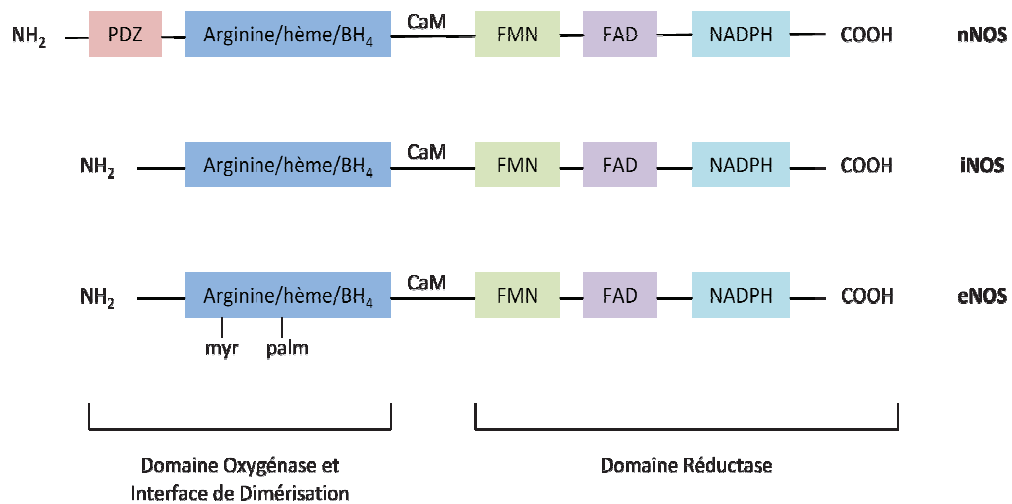


Figure 7 : Structures des trois isoformes de NO synthase (adapté de Bruckdorfer [231])

Pour être actives, les NOSs doivent être sous la forme d'homodimère. Les deux sous-unités, ou NOSs, de l'homodimère sont reliées par leur hème respectif, indispensable à la formation du dimère (fig.8). La stabilité de celui-ci est, entre autres, contrôlée par la présence de BH_4 . Une fois active, la NOS va catalyser deux réactions d'oxydation dépendantes du NADPH et de l' O_2 et impliquant un transfert d'électrons entre les différents cofacteurs. Dans un premier temps, la L-arginine est oxydée en N-hydro-L-arginine. Celle-ci est à son tour oxydée en NO et L-citrulline, bien qu'elle puisse aussi servir de substrat pour la NOS (fig.9). Les électrons requis pour cette réaction doivent tout d'abord passer du NADPH au FAD, puis du FAD au FMN pour terminer leur course à l'atome de fer de l'hème. La capacité du domaine réductase à délivrer les électrons à l'hème est une étape limitante de l'activité enzymatique, ce qui fait de ce domaine un déterminant clé de l'activité globale de l'enzyme [232-234].

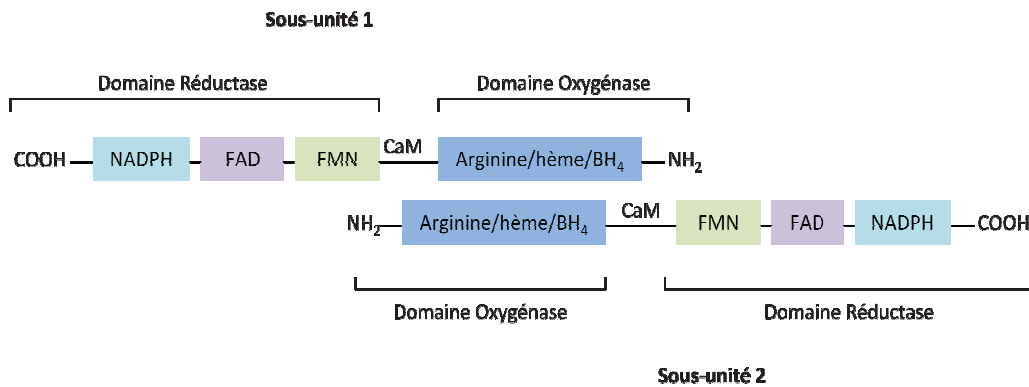


Figure 8 : NO synthase sous forme de dimère (adapté d'Andrew et Mayer [232])

Par ailleurs, il arrive dans certains cas qu'en plus de produire du NO, les NOSs produisent des espèces radicalaires telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) ayant des effets délétères sur les cellules. En effet, pour former du NO, il semble important que les deux sous-unités soient couplées à BH_4 . Or, dans le cas de la nNOS, les 2 sous-unités peuvent fonctionner de façon indépendante et, le dimère normal de nNOS consiste en une sous-unité couplée à BH_4 associée à une autre sans BH_4 en raison de la forte différence d'affinité existante entre les 2 sous-unités au site de liaison de BH_4 . Ceci signifie qu'il est nécessaire d'avoir des concentrations suffisamment élevées de BH_4 pour palier à la différence d'affinité existant entre les sites de liaison de BH_4 de chacune des sous-unités et donc pour que l'enzyme fonctionne bien comme une synthase de NO. Ainsi, en présence de concentrations saturantes de L-arginine mais insaturantes de BH_4 , les NOSs vont produire du NO et de $O_2^{\bullet-}$ de façon simultanée. Ceux-ci peuvent alors interagir ensemble pour former de $ONOO^-$. En présence de faibles quantités, voire en absence de L-arginine, l'enzyme catalyse la réaction découplée d' O_2 , menant à la production d' $O_2^{\bullet-}$ et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [231;232]. En conséquence, une activation adéquate des NOSs, ainsi que la présence d'un système antioxydant fonctionnel, sont indispensables pour éviter les effets délétères pouvant être engendrés par l'activité de ces enzymes.

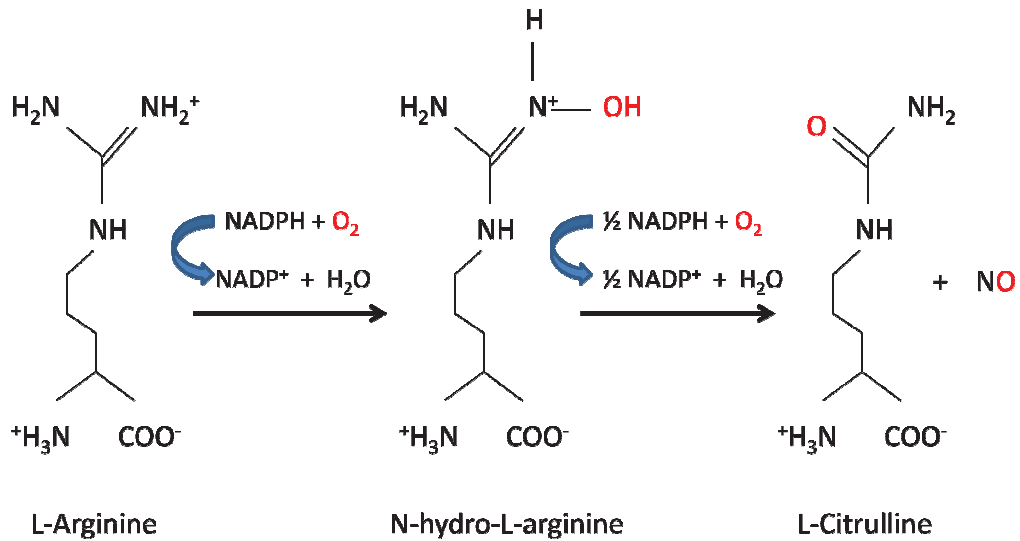


Figure 9 : Réaction catalysée par les NOS (adapté de Andrew et Mayer [232])

4.2. Le NO dans la régulation du tonus vasculaire

Le NO joue un rôle très important dans les vaisseaux sanguins puisqu'il est un déterminant clé de l'homéostasie vasculaire par son action dans le maintien du tonus vasodilatateur et ses propriétés antithrombotiques [235;236]. En effet, les propriétés vasodilatatrices du NO, en tant que substance libérée par l'endothélium, sont connues depuis longtemps et ne sont plus à démontrer [229;230]. Lors de sa libération, le NO diffuse soit dans les cellules adjacentes telles que les cellules du muscle lisse vasculaire, soit directement dans le lumen du vaisseau où il pourra agir sur les plaquettes. Une fois à son site d'action, il active une guanylate cyclase cytosolique entraînant ainsi une augmentation de la concentration de GMPc. Celui-ci active à son tour une protéine kinase G qui phosphoryle les résidus sérine ou thréonine sur d'autres protéines modifiant ainsi leur

activité. Par exemple, la PKG peut activer directement la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP) inhibant ainsi la formation du complexe myosine-actine et donc la contraction ; mais elle peut aussi inactiver la kinase RhoA, qui en temps normal, inhibe la MLCP pour induire la contraction du muscle lisse vasculaire. De même, la PKG peut phosphoryler les protéines du réticulum sarcoplasmique ce qui favorise la recapture du Ca^{2+} dans les réserves de la cellule et diminue la concentration de Ca^{2+} intracellulaire menant ainsi à une relaxation du muscle. Finalement, la concentration de Ca^{2+} intracellulaire peut également être diminuée suite à une activation des canaux potassiques dépendant du Ca^{2+} . Ceci mène à l'hyperpolarisation de la cellule, ce qui réduit l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques dépendant du voltage et favorise donc la relaxation musculaire [231;235;237;238].

La libération du NO dans les vaisseaux peut être induite par des facteurs biochimiques tels que l'acétylcholine, la bradykinine, l'ADP et la thrombine, mais aussi par des facteurs mécaniques tels que les forces de cisaillement. Sous des conditions normales, le NO est libéré sous l'action des forces de cisaillement induites par les battements cardiaques impliquant un état de vasodilatation au repos. L'inhibition de l'eNOS par l'utilisation d'un analogue de L-arginine a été rapportée pour induire une contraction d'anneaux aortiques *in vitro* [239] et pour augmenter la pression artérielle *in vivo* [240] chez les lapins, démontrant cet état dilaté des vaisseaux sanguins au repos. De même, il est maintenant bien établi que le NO possède des propriétés athéroprotectrices en réduisant l'activation et l'apoptose des cellules endothéliales [241] et en prévenant l'interaction des cellules endothéliales avec les leucocytes [242]. Finalement, les maladies cardiovasculaires fréquentes, telle l'hypertension, s'accompagnent en général d'une dysfonction endothéliale résultant en partie d'un déséquilibre entre la production d'espèces radicalaires de l'oxygène et la diminution de la biodisponibilité du NO [235;243;244]. Ces observations démontrent à quel point le NO est un médiateur important de la fonction endothéliale et qu'une modification de sa production peut avoir de graves conséquences sur l'homéostasie vasculaire et donc la santé d'un individu.

4.3. NO, grossesse et prééclampsie

Bien que certaines questions restent encore sans réponse, le rôle important que joue le NO dans l'adaptation maternelle à la grossesse n'est plus à démontrer. En effet, les études réalisées sur diverses espèces animales dont l'humain ont montré 1) que la production de NO et l'expression de la protéine eNOS dans l'artère utérine sont augmentées durant la grossesse [245], 2) que le NO diminue la fréquence des contractions utérines, ainsi que le tonus basal de segments de myomètre de femmes enceintes [86] et 3) que l'inhibition de la production de NO diminue la vélocité du sang artériel utérin plus fortement chez les rates gestantes que non-gestantes [85]. Également, l'expression d'eNOS dans le ST et l'endothélium placentaires [246;247] et l'action vasoconstrictrice d'une inhibition de la production de NO sur les artères villositaires [248] suggèrent que le NO est également d'importance dans le développement et le flot sanguin placentaires.

D'autre part, la dysfonction endothéliale accompagnant la prééclampsie [249] supporte d'autant plus le fait que le NO est un déterminant clé du bon déroulement de la grossesse. Effectivement, de nombreuses études impliquant des cas de prééclampsie rapportent des différences marquées avec les grossesses normotensives relativement à la voie du NO. Bien que les études évaluant les concentrations plasmatiques [99;101;103] et placentaires [97;100] de nitrites et nitrates chez les patientes atteintes de prééclampsie soient assez controversées, celles mesurant les concentrations plasmatiques de GMPC s'accordent à dire qu'elles sont diminuées chez ces patientes [250;251], suggérant ainsi que la prééclampsie s'accompagne d'une baisse de la biodisponibilité du NO. De plus, la maladie semble également modifier la voie du NO au niveau placentaire puisque l'expression d'eNOS dans les tissus placentaires de femmes avec prééclampsie diffère de celle des tissus de femmes normotensives et ce tant de façon spatiale que quantitative. Par exemple, le ST des placentas issus de grossesses avec prééclampsie exprime l'eNOS à un niveau plus basal comparé au ST de placentas obtenus de grossesses normotensives [252]. Aussi, bien que l'expression d'eNOS soit diminuée dans les artères ombilicales [253] et les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaines [249] suggérant une dysfonction endothéliale, elle est augmentée dans le trophoblaste villositaire, supportant l'idée d'un

mécanisme compensatoire aux changements de la circulation maternelle liés à la prééclampsie [253]. Malgré tout, il reste encore beaucoup de travail pour tirer au clair la véritable façon dont est impliqué le NO dans ces états physiologiques et physiopathologiques que sont respectivement la grossesse et la prééclampsie.

5. Le stress oxydatif

5.1. Généralités

Au cours de la respiration aérobie et du métabolisme cellulaire normal, les cellules produisent des molécules plus ou moins réactives, dérivées de l'oxygène ou de l'azote et appelées respectivement, espèces réactives de l'oxygène (ROS) et espèces réactives de l'azote (RNS). La majorité des ROS et RNS est formée dans les mitochondries via les transferts d'électrons dans les complexes I et III de la chaîne respiratoire. Les molécules réactives formées peuvent se trouver à l'état radicalaire, c'est-à-dire qu'elles possèdent un ou plusieurs électrons non-appariés, ou elles peuvent être à l'état non-radicalaire. Lorsqu'à l'état radicalaire, ces molécules sont communément appelées « radicaux libres ». $O_2^{\bullet-}$ et NO sont des radicaux libres de base qui, lors de diverses réactions, vont engendrer d'autres ROS ou RNS souvent beaucoup plus réactifs. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une molécule réactive secondaire formée suite à dismutation d' $O_2^{\bullet-}$. En présence de fer, ces deux molécules peuvent interagir ensemble dans une réaction de Haber-Weiss (dont la réaction nette est : $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow HO^{\bullet} + HO^- + O_2$) pour former une nouvelle molécule réactive, le radical hydroxyle (HO^{\bullet}). Techniquement, HO^{\bullet} est issu de la réaction de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO^{\bullet}$) qui constitue une des deux réactions impliquées dans la réaction de Haber-Weiss. En ce qui concerne les RNS, une des molécules réactives secondairement formées les plus connues est $ONOO^-$ qui, comme décrit précédemment, provient de l'interaction entre NO et $O_2^{\bullet-}$ (fig.10) [254-256].

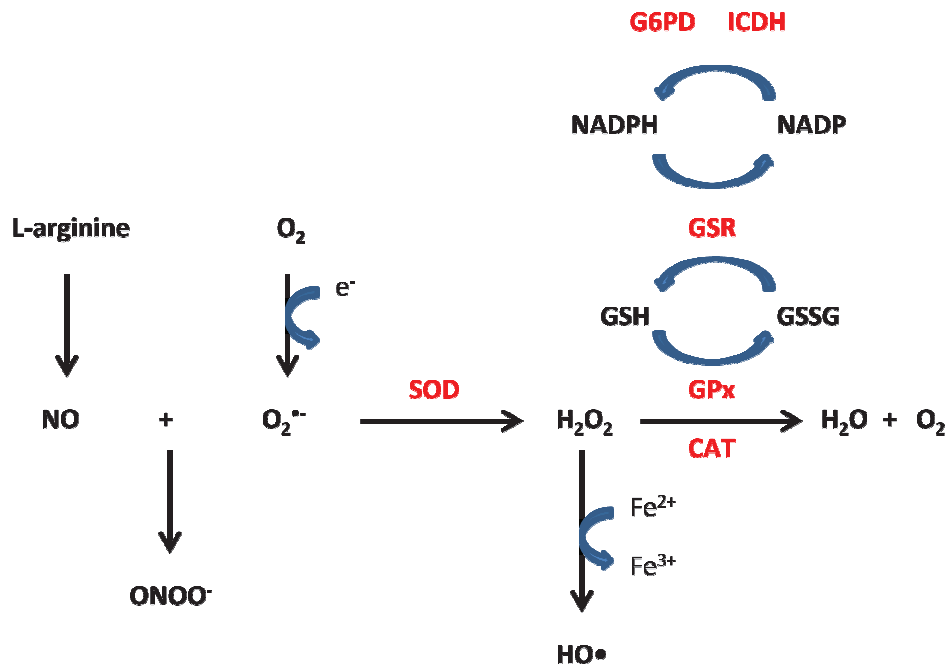


Figure 10 : Formation des ROS et des RNS et élimination par les enzymes antioxydantes (adapté de Al-Gubory et al. [254]).

Dépendamment de leur concentration, ces molécules peuvent avoir des effets bénéfiques ou délétères sur les cellules. En effet, à faible concentration les radicaux libres sont connus pour intervenir dans les défenses immunitaires, la signalisation cellulaire, l'expression génique, le maintien de l'homéostasie redox et les voies de transduction signalétique impliquées dans la fonction, la croissance, la différenciation et la mort cellulaires. Par contre, à forte concentration, ils sont connus pour endommager les lipides membranaires, les protéines et l'ADN. Ainsi, les organismes vivants se doivent de posséder un système antioxydant fonctionnel de manière à éviter l'établissement d'un stress oxydatif défini par un déséquilibre entre la production de ROS et leur élimination par les antioxydants. De cette façon, il existe deux types d'antioxydants soit les enzymatiques et les non-enzymatiques. Parmi les antioxydants enzymatiques, les plus connus sont la

superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation d' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et O_2 , la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) qui, toutes deux, catalysent la conversion d' H_2O_2 en H_2O via des réactions qui leur sont propres (fig.9). La SOD existe sous 3 formes différentes : Cu,Zn-SOD qui est une protéine dimérique essentiellement localisée dans le cytoplasme, Mn-SOD qui est une protéine homotétramérique localisée dans la mitochondrie et EC-SOD une glycoprotéine tétramérique extracellulaire contenant du cuivre et du zinc. Parmi les antioxydants non-enzymatiques, souvent issus de la nourriture, la vitamine C protège l'ADN contre l'attaque des radicaux libres alors que la vitamine E protège les membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique. La vitamine C peut également interagir avec le radical tocophéroxyde pour régénérer la vitamine E. Les caroténoïdes, les polyphénols et les éléments trace tels que le cuivre, le zinc, le manganèse et le sélénium, sont également des antioxydants non-enzymatiques importants. Finalement, le glutathion (GSH), en plus d'être un cofacteur pour la GPx, est un antioxydant important puisqu'à l'état réduit, il peut donner un équivalent réduit ($H^+ + e^-$) à une molécule instable comme un ROS et réagir ensuite avec un autre GSH réactif pour former une molécule de glutathion oxydé (GSSG) qui sera alors réduite en GSH sous l'action de la glutathion réductase (GSR) [254-256].

Il est bien accepté que le stress oxydatif est associé à de nombreuses maladies telles que l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le diabète et le syndrome métabolique, les tumeurs et les maladies de la peau, mais aussi les maladies psychiques comme la schizophrénie [255;256]. Ces observations ne sont pas étonnantes si l'on considère le fait que les NOSs sont, comme expliqué précédemment, exprimées tant dans le système cardiovasculaire que le système nerveux et peuvent, en plus de produire du NO, produire de l' $O_2^{\bullet-}$ [231;232] et que la dysfonction endothéliale est entre autres associée à des maladies comme l'hypertension et le diabète [243;244]. De plus, il a été montré que les radicaux libres possédaient également des propriétés vasoactives qui varient en fonction du lit vasculaire étudié. En effet, dans les artères mésentériques de résistance pré-contractées à la phényléphrine, H_2O_2 dilate les vaisseaux de façon indépendante des NOSs, des COXs, de l'endothélium et des canaux potassiques dépendant du Ca^{2+} , alors que si les artères ont été pré-contractées au KCl, H_2O_2 contracte les vaisseaux via l'activation d'une p38-MAP kinase [257]. En revanche, dans les artères ombilicales

humaines pré-contractées au KCl, H₂O₂ induit une contraction des vaisseaux qui, elle, semble être due à une inhibition de l'activité des NOSs dans l'endothélium [258]. Les observations rapportées ici ont toutes deux été faites sur des vaisseaux contractés au préalable. Il apparaît que dans les artères rénales de rats, H₂O₂ peut aussi contracter directement les vaisseaux en requérant l'utilisation du Ca²⁺ extracellulaire et l'activation d'une PKC [259]. De même, les observations faites dans les aortes de rats [260], les artères pulmonaires de lapins [261] et les cotylédons placentaires humains [262], suggèrent que le stress oxydatif est, d'une certaine manière, relié à la voie des prostanoides puisque la contraction générée par H₂O₂ semble être, entre autres, le résultat d'une activation des COXs menant sans doute à la libération de TXA₂ qui initie la contraction. L'activation des COXs par les espèces réactives a également été rapportée dans les plaquettes isolées humaines où ONOO⁻ provoque l'activation de COX-1 et l'agrégation plaquettaire [263]. Finalement, l'interaction entre ces molécules réactives et la voie des prostanoides ne s'arrête pas là, puisque les isoprostanes, qui possèdent des propriétés vasoactives, sont des produits de la peroxydation lipidique initiée par le stress oxydatif [114;116].

5.2. Stress oxydatif, grossesse et prééclampsie

En début de grossesse et jusqu'à ce que la circulation utéroplacentaire soit en place, le développement du placenta se fait dans un environnement pauvre en oxygène. Il est alors spéculé que cette caractéristique préviendrait l'embryon d'une éventuelle attaque des espèces radicalaires et de leurs effets tératogènes. Cependant, le stress oxydatif semble jouer un rôle important dans les mécanismes d'implantation et de développement placentaire. Par exemple, la forme discoïde du placenta serait en partie due à l'action des ROS dans les zones périphériques de celui-ci au moment de l'initiation de la circulation utéroplacentaire. En effet, il est reconnu que l'initiation de la circulation utéroplacentaire se fait en premier lieu dans les zones périphériques du placenta et ce, probablement à cause du fait que les bouchons cytotrophoblastiques qui ferment les artères spiralées sont plus petits à ce niveau et donc plus rapidement détruits pour laisser entrer le sang maternel dans l'EIV. Ceci s'accompagne alors d'une augmentation de la tension d'oxygène et par

conséquent de la génération de ROS à la périphérie placentaire. Les mécanismes de défense par les enzymes antioxydantes n'étant pas encore très prononcés à ce stade, les villosités périphériques dégénèrent sous l'action des ROS, favorisant ainsi la forme discoïde du placenta et la formation des membranes fœtales, les villosités étant initialement présentes sur toute la surface du sac chorionique. La circulation utéroplacentaire s'initiant plus tardivement dans la zone centrale du placenta, les tissus placentaires commencent à surexprimer les enzymes antioxydantes avant l'arrivée du sang maternel, de manière à contrebalancer l'attaque radicalaire et ainsi maintenir l'étendue des villosités centrales tout en ramenant un équilibre entre la production de ROS et les défenses antioxydantes pour le restant de la grossesse [264-268].

D'autre part, le stress oxydatif semble également impliqué dans la fonction trophoblastique où il influence en particulier la différenciation et la fusion des CT. En effet, une surexpression de SOD dans les CT limite leur différenciation et fusion en ST suggérant un rôle direct des ROS dans la modulation de la fusion cellulaire essentielle au développement placentaire normal [269]. De plus, les niveaux d'oxygène sont connus pour influencer l'expression de certains facteurs de transcription impliqués dans la différenciation et la prolifération des CT [270-272].

Alors que chez les femmes enceintes normotensives l'augmentation du stress oxydatif semble bien contrôlé, il est maintenant bien accepté que chez les femmes atteintes de prééclampsie, le stress oxydatif est bien présent, en plus de jouer probablement un rôle majeur dans l'apparition de certains symptômes tels que la dysfonction endothéliale. Bien que les données et les méthodes utilisées varient un peu en fonction des études, les mesures dans le sang maternel de marqueurs du stress oxydatif, tels que les produits de la peroxydation lipidique (ex : isoprostanés et malondyaldéhyde) et les espèces réactives (ex : ONOO⁻, H₂O₂), rapportent toutes un stress oxydatif marqué chez les patientes atteintes de prééclampsie, alors que les capacités antioxydantes (SOD, CAT, GPx) semblent diminuées [273-276].

Bien que l'on ignore encore quelle est la cause réelle du stress oxydatif lors de la prééclampsie, il est supposé qu'il résulte du processus d'ischémie/reperfusion que subit le placenta. Ce phénomène serait la conséquence du mauvais remodelage vasculaire que

subissent les artères spiralées lors d'une grossesse avec prééclampsie. En temps normal, la conversion des artères spiralées en vaisseaux de faible résistance permet de limiter les fluctuations du flot sanguin arrivant à l'EIV. Or, en cas de prééclampsie, les fluctuations du flot sanguin seraient plus importantes, instaurant ainsi un état d'ischémie/reperfusion. Ceci résulterait en un stress oxydatif suite à la diminution de la concentration d'oxygène, en particulier au niveau de la mitochondrie, où l'oxygène est l'accepteur final des électrons libérés par la chaîne respiratoire. De cette façon, au moment de la reperfusion, la grande quantité d'électrons accumulée lors de l'hypoxie entre en contact avec l'oxygène arrivant, entraînant ainsi une forte production d' $O_2^{\bullet-}$. De la même façon, l'ischémie/reperfusion générerait un stress oxydatif via l'augmentation de la synthèse de l'holoenzyme xanthine déshydrogénase/xanthine oxydase. Celle-ci est convertie en xanthine oxydase qui transforme la xanthine et l'hypoxanthine en acide urique en produisant $O_2^{\bullet-}$ [265;277].

L'implication du placenta dans l'état oxydatif de ces patientes est supporté par le fait que, lorsqu'issu d'une grossesse avec prééclampsie, il présente un stress oxydatif important. De fait, la peroxydation lipidique [223], les isoprostanes [278], la nitrotyrosine (marqueur de la nitration des protéines par le peroxy-nitrite) et l'activité de la xanthine oxydase [279] sont augmentées dans les placentas de grossesses prééclamptiques. Cependant, les études sur la capacité antioxydante placentaire ne rapportent pas nécessairement de différences entre les placentas de grossesses normotensives et avec prééclampsie [280;281]. Le fait que la capacité antioxydante ne soit, au moins en partie, pas modifiée dans les placentas de femmes atteintes de prééclampsie pourrait expliquer l'état de stress oxydatif observé chez ces patientes, étant donné le déséquilibre instauré entre les mécanismes pro- et antioxydants. Cependant, la raison/origine de l'établissement du stress oxydatif reste encore à déterminer.

6. Hypothèses et objectifs de l'étude

Le fait que le placenta soit dénué d'innervation autonome [21] implique que le tonus vasculaire placentaire est sous le contrôle de facteurs humoraux et tissulaires. En effet, de nombreux stimuli vasoactifs tels que les prostanoïdes, l'ET-1, la sérotonine, le KCl,

l'angiotensine II et le NO, ont été rapportés pour agir sur les vaisseaux placentaires, que ce soit en les contractant ou en les dilatant [16;27;30;33]. Parmi ceux-ci, les prostanoides semblent être les stimuli les plus puissants dans la circulation fœto-placentaire puisque le mimétique de la TXA₂, l'U-46619, peut augmenter la pression de perfusion de presque 200 mmHg dans les cotylédons placentaires perfusés, alors qu'on observe des augmentations d'environ 40 mmHg avec la sérotonine et de 100 mmHg avec l'ET-1 et le KCl [27]. De plus, avec la TXA₂, par rapport aux autres, on observe des réponses à faibles concentrations, de l'ordre des concentrations circulantes de ces substances pouvant produire 15 à 20% de la réponse maximale. Malgré tout, les études réalisées jusqu'ici ne nous permettent pas encore d'assurer l'identité des substances réellement impliquées dans la régulation du tonus vasculaire placentaire humains. D'autre part, les enzymes responsables de la synthèse des prostanoides, COX-1 et COX-2, sont présentes et actives dans les membranes fœtales [208] et le placenta humain [282]. De même, il a été montré que la thromboxane synthase était présente dans plusieurs types cellulaires des villosités placentaires, du cordon ombilical et des membranes fœtales humaines [283]. Bien que ces observations ne nous permettent pas de confirmer le rôle des prostanoides dans la fonction placentaire, elles laissent suggérer qu'elles sont impliquées à un quelconque niveau dans celle-ci.

Comme les prostanoides, le NO fait partie des substances vasoactives qui sont produites par le placenta, ce qui laisse suggérer que lui aussi est important dans le maintien de la fonction placentaire [246-248], bien que son rôle ne soit pas encore clairement défini. De plus, en réagissant avec O₂^{•-}, NO initie la production de ONOO⁻, un puissant agent radicalaire pouvant avoir des effets délétères sur les cellules [273]. Bien que sa fonction ne soit pas encore bien définie, l'implication du NO dans l'initiation d'un stress oxydatif souligne l'importance de clairement déterminer son rôle dans la fonction placentaire.

D'autant plus, la prééclampsie, qui touche encore 5 à 7% des grossesses et qui reste à l'heure actuelle une des causes les plus importantes de morbidité et mortalité fœto-maternelles, s'accompagne d'un état de stress oxydatif important [273-276]. Les produits du stress oxydatif ont, entre autres, été rapportés pour avoir des actions vasoactives dans différents lits vasculaires [257-263], mais aussi pour oxyder l'AA et ainsi former des isoprostanes [114;115], elles aussi, capables d'actions vasoactives [190;193]. Le stress

oxydatif placentaire a été mis en évidence chez les patientes atteintes de prééclampsie grâce à la mesure de biomarqueurs spécifiques tels que les isoprostanes [223;278;279].

Ainsi, le recoupement des informations collectées jusqu'à présent nous pousse à faire les trois hypothèses suivantes : 1) les prostanoïdes et le NO font partie des molécules endogènes impliquées dans le contrôle du tonus vasculaire placentaire, 2) la réponse aux isoprostanes dans les vaisseaux placentaires de grossesse avec prééclampsie est modifiée en raison des effets du stress oxydatif et 3) l'induction d'un stress oxydatif placentaire entraîne une réponse vasoactive par activation de la voie du métabolisme de l'AA.

Pour vérifier ces hypothèses, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

➤ Pour la première :

- Mesurer les effets du mimétique de la TXA₂, l'U-46619, et de la 8-isoPGE₂, une isoprostane, sur la pression de perfusion dans les cotylédons perfusés *in vitro* et sur la tension dans les artères chorioniques de placentas humains obtenus de grossesses normotensives.
- Déterminer quels sont les récepteurs aux prostanoïdes impliqués dans ces réponses grâce à une étude pharmacologique utilisant des antagonistes des récepteurs TP et EP.
- Évaluer les effets d'inhibiteurs non-sélectifs des COXs, l'ibuprofène et l'indométacine, sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons humains perfusés *in vitro*. L'effet d'un inhibiteur sélectif de COX-2, le N-(2-Phenylethyl)indométhacinamide (N-2PIA), sera également évalué sur cette même réponse pour déterminer si la COX inductible est activée en réponse à une augmentation de pression de perfusion.
- Déterminer l'implication du NO dans la régulation du tonus vasculaire en mesurant les effets d'un inhibiteur de NOS, le N^G-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons et les artères chorioniques placentaires de femmes normotensives.

➤ Pour la seconde :

- Mesurer les réponses à l'U-46619 et la 8-isoPGE₂, dans les artères chorioniques placentaires humaines obtenues de grossesses normotensives et avec prééclampsie après délivrance prématurée et à terme.
- Déterminer si ces réponses évoluent avec l'âge gestationnel et si elles sont influencées par le mode de délivrance étant donné le fait que la prééclampsie implique fréquemment des naissances prématurées et par césarienne.

➤ Pour la dernière :

- Mesurer les effets de H₂O₂ sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons perfusés *in vitro* et dans les artères chorioniques de placentas humains issus de grossesses normotensives.
- Mesurer les effets de H₂O₂ sur la pression de perfusion dans les cotylédons perfusés et sur la tension dans les artères chorioniques placentaires de femmes normotensives.
- Déterminer si ces réponses impliquent la voie des prostanoïdes via l'utilisation d'un inhibiteur non sélectif des COXs, l'ibuprofène, et un antagoniste des récepteurs TP, administrés séparément ou en combinaison.

CHAPITRE 2

**Thromboxane and isoprostane share the same prostanoid
receptors to increase human placental tone.**

Placenta 32 : 941-948, 2011

Participation des auteurs :

Leslie Hausermann : Réalisation des expériences, des analyses statistiques et rédaction de l'article

Jean St-Louis, Ph.D. : Supervision des travaux (expériences, analyses statistiques et rédaction de l'article)

**THROMBOXANE AND ISOPROSTANE SHARE THE SAME PROSTANOID
RECEPTORS TO INCREASE HUMAN PLACENTAL TONE**

Leslie HAUSERMANN & Jean ST-LOUIS

Centre de recherche, CHU Sainte-Justine, and Departments of Obstetrics & Gynecology
and of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec,
Canada

Corresponding author:

Jean St-Louis, Ph.D.

Centre de recherche, CHU Sainte-Justine

3175, chemin de la Côte Ste-Catherine

Montréal, Québec H3T 1C5, Canada

Telephone: 1-514-345-4931 Extension 2996

Fax: 1-514-345-4994

Abstract

As the placenta is devoid of autonomic innervation, umbilical-placental vascular tone should be under the control of tissue and humoral factors. Among the numerous stimuli capable of challenging the placental circulation, we propose that prostanoids could be responsible for the regulation of placental vascular tone. Consequently, we measured vasomotor responses to the thromboxane A₂ (TXA₂) mimetic U-46619 and the isoprostane 8-iso-prostaglandin E₂ (8-isoPGE₂) in the human placental vasculature. Placental tissues were collected from normotensive women after elective caesarean delivery. Cotyledons were set up in a perfusion system, whereas chorionic arteries were prepared as rings and installed in glass-jacketed tissue baths. The effects of U-46619 and 8-isoPGE₂ were measured in the absence and presence of blockers of TXA₂ receptors (TP), SQ29,548 and ICI192,605, and of PGE₂ receptors (EP), AH6809. The influence of nitric oxide (NO) was assessed with NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). U-46619 and 8-isoPGE₂ markedly increased perfusion pressure in cotyledons and tension in chorionic arteries. Dose-response curves to both prostanoids were competitively shifted to the right by all antagonists, but to different extents. L-NAME had no significant impact on the dose-response curves to U-46619. The effects of U-46619 and 8-isoPGE₂ were found to be mediated by both TP and EP. The presence of these receptors and the actions exerted by their agonists support our postulate that prostanoids play an important regulatory role in placental vascular tone and resistance. NO, however, does not seem to be involved.

Keywords: Perfused cotyledon, Nitric oxide, Placental artery, Pregnancy

Introduction

During normal pregnancy, increased heart rate, circulating volume, cardiac output and renin-angiotensin-aldosterone system activity are associated with a paradoxical decrease of blood pressure [1]. However, these cardiovascular modifications do not occur in 5-7% of pregnancies, leading to a pathological state of hypertension, preeclampsia [2], reinforcing the above-described paradox.

Preeclampsia is characterized by pregnancy-induced hypertension with proteinuria. It is a major cause of foetal and maternal morbidity and mortality. The only way to cure women manifesting this condition is the delivery of both the foetus and placenta, which suggests that the placenta plays a capital role in the pathophysiology of the disease. It is considered that in preeclampsia, trophoblast invasion of the endometrial vessels is often shallow compared to normal pregnancy [3;4]. Oxidative stress [5] as well as an imbalanced thromboxane A_2 (TXA₂)/prostacyclin (PGI₂) ratio in the maternal circulation and placenta [6;7] are observed in preeclamptic women. Oxidative stress can increase prostanoid production through direct oxidation of arachidonic acid, augmenting isoprostane production [8].

The placenta is known to be devoid of autonomic innervation [9], indicating that vascular tone is under the control of humoral factors that are not properly identified. However, placental vessels respond to numerous vasoactive stimuli, including prostanoids produced from arachidonic acid. The latter is converted to an endoperoxide by cyclooxygenases and then anabolized in various prostaglandins (PGE₂, PGI₂, etc.) and TXA₂ [10]. TXA₂, engaged in platelet aggregation, is a potent vasoconstrictor when

acting on its receptors (TP). Thromboxane and isoprostanes are generated in placental tissues, and their production increases in preeclampsia [11;12].

Isoprostanes are also known to act via prostanoid receptors, such as TP and EP (receptor to PGE₂) [13]. It has been documented that the isoprostane 8-isoPGE₂ is a more potent and effective vasoconstrictor than 8-isoPGF_{2 α} isomer in the human umbilical vein [14]. TP and EP receptors are present in the placenta [15;16]. When activated in the vessels, TP elicit potent vasoconstriction [17-19], whereas responses due to EP stimulation depend upon the receptor subtype activated. Indeed, there are 4 EP receptor subtypes: EP₁ to EP₄ [20]. EP₂ and EP₄ induce vasodilatation through increased adenylate cyclase activity. In contrast, EP₁ and EP₃ mediate vasoconstriction through increases of phosphoinositol turnover and calcium mobilization or reduced adenylate cyclase activity [16]. All these receptor subtypes are present in human placental villous tissue [16]. Such observations make us believe that prostanoids are important in regulation of the foetoplacental circulation.

Nitric oxide (NO) is well-known to participate in maintaining low vascular resistance in the foetoplacental circulation. Its synthesis can be enhanced in human umbilical vein endothelial cells when challenged by various agents, such as histamine and β_2 -adrenoceptor agonists [21;22]. NO is derived from cellular L-arginine by NO synthases (NOSs). Once released, NO activates soluble guanylate cyclase to yield cGMP, which activates G phosphokinase to relax smooth muscle and then evokes vasodilatation. During gestation, it has been reported that NO is produced in placental tissues, such as the trophoblast and vascular endothelium [23]. Pregnancy is accompanied by heightened oxidative stress brought on by elevated antioxidant enzyme activity [24]. In

preeclampsia, imbalance between the production of reactive oxygen species, including NO and superoxide anion (O_2^-), and the activity of antioxidant enzymes elicits significant oxidative stress in the placenta [23]. When reacting to O_2^- , NO is inactivated and generates peroxynitrite anion, a powerful free radical [4]. Since NO is involved in oxidative stress and since isoprostanes are the outcome of oxidative stress, it is important to better understand how NO production is influenced in the placenta.

We hypothesized that substances, such as prostanoids (TXA₂, isoprostanes) as well as NO could be among the endogenous molecules involved in the control of placental vascular tone. Since the mechanism regulating placental vascular tone in normal pregnancy is not clearly established, *in vitro* perfused placental cotyledons and placental chorionic arteries from normal pregnancies were investigated in the present study. Our objectives were to: 1) measure the effects of a powerful TXA₂ mimetic (U-46619) as well as an isoprostane (8-isoPGE₂) on perfusion pressure and tension, 2) identify prostanoid receptor type(s) involved in these responses with TP and EP antagonists, and 3) ascertain the involvement of NO in the placental circulation with an inhibitor of NOS, NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME).

Materials and Methods

Tissue collection

Normotensive term (>36 weeks of amenorrhea) women, hospitalized at CHU Sainte-Justine, were asked to participate in this study before delivery by giving their informed consent to the use of their placenta. All experiments were performed on tissues from healthy placentas after elective caesarean section. The placentas were collected post-delivery, and brought to the laboratory for experimentation. The protocol was approved by the Research Ethics Committee of the CHU Sainte-Justine.

Placental cotyledons

Placental cotyledons were perfused according to the method of Schneider et al. [25] with modifications. Briefly, 2 chorionic arteries were isolated and cannulated with polyethylene tubing (1.7 mm O.D.); the maternal side was not perfused. Krebs solution with heparin was injected into each vessel to prevent further blood coagulation within the cotyledons.

Two cotyledons were dissected, set up in parallel systems and perfused at a constant flow rate of 4 mL/min with Krebs solution kept at 37°C and bubbled with a gas mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ to maintain pH at 7.4. Perfusion pressure was recorded with a pressure transducer (TRN050) connected to an amplifier (TRN005), both from Kent Scientific Corporation (Torrington, CT, USA). The amplifier was connected to a data acquisition recorder (BD 300, Kipp & Zonen, Delft, The Netherlands).

After 45-min recovery, vascular reactivity was tested with a bolus (0.1 mL) of potassium chloride (KCl, 2 mol/L), followed by another 45-min recovery period. To test

the presence and role of thromboxane (TP) and prostaglandin E₂ (EP) receptors, responses to U-46619 and 8-isoPGE₂ were measured in the absence or presence of TP (SQ29,548 (10 or 30 nmol/L) and ICI192,605 (3, 10 or 30 nmol/L)) and EP (EP_{1,2,3}) blockers (AH6809 (3 μmol/L)). U-46619 was used instead of TXA₂ because its half-life is longer. The effects of the NOS blocker L-NAME (10⁻⁴ mol/L) on basal perfusion pressure and vascular reactivity were assessed to study the influence of NO on vascular relaxation.

Each blocker was infused in the perfusate with a syringe infusion pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) at a flow of 0.4 mL/min in 1 of the 2 cotyledons, the other receiving only the vehicle (Krebs). After approximately 30 min, and to reach steady state, boluses (0.1 mL) of U-46619 or 8-isoPGE₂ were given in increasing concentrations (10⁻⁹ to 10⁻³ mol/L), and perfusion pressure variations were recorded. Only 1 antagonist was tested per cotyledon.

Chorionic arteries

Chorionic arterial segments were isolated from a secondary branch of the chorionic plate before their insertion in the parenchyma. Therefore, arteries were carefully dissected and tested immediately or stored (24h) at 4°C in a Hepes-PSS solution for experimentation the next day (storage of the arteries did not reduce vascular reactivity to KCl, data available in annexe 1). Then, they were cut into 8 rings of 3-5 mm axial length. The rings were hung isometrically in a 8-unit, glass-jacketed tissue bath system (Radnoti Glass Technology, Monrovia, CA, USA) under 3g of passive tension [26]. Myotropic activity was recorded with a force displacement transducer (FT-03; Grass

Instruments, Quincy, MA, USA) connected to a chart recorder (No. 7, Grass Instruments,). Each ring was immersed in 15 mL of physiological solution (Krebs) pre-heated to 37°C and bubbled with a gas mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. The values obtained were converted to mN/mm, where 1 mN equalled 0.102g and “mm” represented axial length of the ring x 2.

After 1-hr equilibration, during which tension was adjusted continuously to 3g while the bathing solution was changed every 15 min, vascular reactivity was tested by adding 60 mmol/L of KCl to each bath and tension was quantified for each artery. After 30-min recovery, stimulation was repeated until a stable response (difference between 2 consecutive stimulations <10%) was obtained.

After 45-min recovery, concentration-response curves to U-46619 (10⁻⁹ to 10⁻⁵ mol/L) and 8-isoPGE₂ (10⁻⁹ to 10⁻⁵ mol/L) were plotted in the absence and presence of 10⁻⁴ mol/L of L-NAME (only for responses to U-46619), of SQ29,548 (3, 10 and 30 nmol/L), of ICI192,605 (3, 10 and 30 nmol/L) or of AH6809 (3, 10 and 30 μmol/L) to establish the existence and role of TP and EP in chorionic arteries. We charted 1 concentration-response curve per arterial segment.

In these experiments, “n” represents the number of placentas which were used rather than the global number of rings used. Briefly, since the maximal number of groups for one experiment was 4 (1 control group and 1 experimental group for each concentration of the antagonist used), each group could be represented more than once depending on the vascular reactivity of the arteries. Then, for each placenta, arterial rings from a same group were pooled to obtain a mean value for that specific group.

Drugs and chemicals

U-46619, AH6809, SQ29,548, 8-isoPGE₂ and L-NAME were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA), and ICI192,605 from Tocris Cookson, Inc. (Ellisville, MO, USA). Drug concentrations were chosen according to previous work and the literature in which they have been shown to be efficient [13;18;27;28]. Krebs solution was prepared with: 118 mmol/L NaCl, 1.18 mmol/L MgSO₄, 1.18 mmol/L KH₂PO₄, 2.5 mmol/L CaCl₂, 4.65 mmol/L KCl, 25 mmol/L NaHCO₃ and 5.55 mmol/L dextrose, pH 7.4. NaCl and MgSO₄ were obtained from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada), KCl, KH₂PO₄ and NaHCO₃ were procured from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada), dextrose was bought from J.T. Baker Chemicals (Phillipsburg, NJ, USA), and CaCl was supplied by EMD Chemicals (Gibbstown, NJ, USA).

Statistical analysis

Dose-response curves were analyzed by computer fitting with nonlinear regression (Prism 4, GraphPad, San Diego, CA, USA) to assess the dose (ED₅₀) or concentration (EC₅₀) producing 50% of the maximum response and the maximum response (E_{max}). Agonist sensitivity was quantified with the negative logarithm of ED₅₀ or EC₅₀ (pD₂) while E_{max} served as an index of responsiveness. To compare the effects of 2 different antagonists, the dose ratio was calculated and defined as: ED₅₀ (or EC₅₀) in the presence/ED₅₀ (or EC₅₀) in the absence of the antagonist. All values are expressed as mean ± SEM. Multiple comparisons of mean sensitivity or E_{max} were undertaken with analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test to compare the effect of blockers to the respective controls. Single comparisons were made with Student's

unpaired T test for 2 groups (graphs with only 2 curves). Differences were considered significant at $\leq 5\%$ probability error ($p \leq 0.05$).

Results

U-46619 and 8-isoPGE₂ effects on the human placental vasculature

We measured the effects of the powerful TXA₂ mimetic U-46619, and the isoprostane 8-isoPGE₂, on placental vascular tone in perfused cotyledons and isometrically-isolated chorionic arteries.

Figure 1 reveals that U-46619 and 8-isoPGE₂ are potent vasoconstrictors in both cotyledons and arteries. Indeed, the 2 agonists markedly increased perfusion pressure in cotyledons (Fig. 1A: E_{max} 185 ± 6 mmHg for U-46619 and 210 ± 13 mmHg for 8-isoPGE₂) and tension in chorionic arteries (Fig. 1B: E_{max} 4.3 ± 0.2 mN/mm for U-46619 and 4.8 ± 0.2 mN/mm for 8-isoPGE₂). However, the placental vasculature was significantly less sensitive to 8-isoPGE₂ than to U-46619 in both preparations (Table 1; Student's T test).

U-46619 and 8-isoPGE₂ actions on TP

We measured the effects of the 2 prostanoids on the placental circulation in cotyledons and chorionic arteries in the absence and presence of TP antagonists (SQ29,548 and ICI192,605). When challenged with SQ29,458 (Fig. 2), responses to U-46619 and 8-isoPGE₂ were significantly shifted to the right in a competitive manner, demonstrating decreased sensitivity of tissue preparations to the agonists. While the TP antagonist was significantly effective only at 30 nmol/L (1-way ANOVA) when challenging responses to U-46619 in cotyledons (Fig. 2A), it showed significant variation at 10 nmol/L on responses to 8-isoPGE₂ in cotyledons (Fig. 2B) (1-way ANOVA). In arteries, decreased sensitivity to U-46619 (Fig. 2C) was progressive with escalating

agonist concentrations (Table 1), and although significance was not apparent at 3 nmol/L, it was reached at 10 and 30 nmol/L (1-way ANOVA).

To confirm these observations, we tested the effects of another selective TP antagonist ICI192,605. Figure 3 illustrates that the dose-response curves to U-46619 (Fig. 3A) and 8-isoPGE₂ (Fig. 3B) in cotyledons were significantly shifted to the right in a competitive manner in the presence of ICI192,605 (1-way ANOVA). In chorionic arteries, sensitivity to U-46619 (Fig. 3C) and to 8-isoPGE₂ (Fig. 3D) was significantly decreased in the presence of the TP antagonist (1-way ANOVA). ICI192,605 seemed to be more powerful than SQ29,548, since, at 10 nmol/L, it significantly shifted the dose-response curve to U-46619 in cotyledons to the right ($p < 0.01$; dose ratio: 48), while SQ29,548 did not (n.s.; dose ratio: 1.8) (Table 1). These observations indicate that TP are present in the human placental vasculature and that both prostanoids studied target these receptors to exert their vasoconstrictor effect.

U-46619 and 8-isoPGE₂ actions on EP

To determine if these prostanoids act via other prostanoid receptors, we tested the impact of AH6809, an EP blocker, on responses to U-46619 and 8-isoPGE₂. In cotyledons, AH6809 significantly shifted the dose-response curves to U-46619 (Fig. 4A) and 8-isoPGE₂ (Fig. 4B) to the right in a competitive manner (Student's T test) and with similar effectiveness (dose ratio: 4.76 for U-46619 vs. 3.42 for 8-isoPGE₂; Table 1). In chorionic arteries, sensitivities to the TXA₂ mimetic (Fig. 4C) and the isoprostane 8-isoPGE₂ (Fig. 4D) were decreased progressively by increasing antagonist concentrations

(1-way ANOVA; Table 1). These results suggest that EP occur in human placental vessels and are targeted by the 2 agonists to exert their effects.

On another hand, when AH6809 was added with ICI192,605, inhibition of the response to U-46619 was not stronger than when ICI192,605 was used alone in the cotyledons (Fig.5A). This specific result would insinuate that in these vessels, EP and TP act through the same signalling pathway.

NO effects on human placental vessels

We evaluated the response to U-46619 in the absence and presence of the NOS inhibitor L-NAME to ascertain the role of NO in the human placental circulation. The results in Figure 5B-C illustrate that NOS inhibition did not induce any modification of the dose-response curve to U-46619 in cotyledons (Fig. 5B) as well as in chorionic arteries (Fig. 5C). Indeed, neither E_{\max} (175 ± 9 mmHg in the cotyledon control group vs. 192 ± 10 mmHg in the cotyledon L-NAME group, and 4.8 ± 0.3 mN/mm in the artery control group vs. 4.5 ± 0.2 mN/mm in the artery L-NAME group) nor pD_2 (Table 1) was significantly altered in presence of L-NAME. Moreover we did not see any influence of L-NAME on basal perfusion pressure (data not reported). These observations indicate that NO is not a major player in these placental vessels.

Discussion

With the placenta being devoid of autonomic innervation [9], the mechanisms by which placental vascular tone is controlled need to be elucidated. For this reason, we wanted to characterize the effects of prostanoids and the receptors involved in these responses. Simultaneously, we measured the role of NO in the vascular tone of functional human placental units and chorionic arteries.

In our study, prostanoids, such as U-46619 and 8-isoPGE₂, were shown to markedly raise perfusion pressure in human placental cotyledons as well as tension in chorionic arteries. Furthermore, the dose-response curves of these prostanoids were significantly shifted to the right by the TP and EP blockers SQ29,548, ICI192,605 and AH6809 in cotyledons and arteries, indicating that both U-46619 and 8-isoPGE₂ exert their vasoconstrictor effects through both TP and EP. On the other hand, responses to U-46619 were not altered in the presence of L-NAME. Thus, prostanoids, but not NO, are thought to be involved in the regulation of placental vascular tone.

The present results demonstrated potent vasopressor effects of the TXA₂ mimetic U-46619 and isoprostane 8-isoPGE₂ in perfused human placental cotyledons and isolated human chorionic arteries, reinforcing previous findings of significant vasoconstrictor outcomes of these substances in isolated small chorionic arteries [29] and the umbilical vein [14;18] and artery [30]. Moreover, even if it is less potent than U-46619, the isoprostane 8-isoPGE₂ exerts a pressor action in cotyledons with low doses (nmoles), i.e. concentrations lower than those observed in placenta [31]. These data also demonstrate that, at least in the placental circulation, isoprostanes act via prostanoid receptors in a non-selective manner.

ICI192,605 and SQ29,548 have been described as competitive antagonists of TP in various tissues, such as the human umbilical artery [19] and vein [18] and the non-pregnant porcine myometrium [32], whereas AH6809 exerts a competitive antagonist action on 8-isoPGE₂ responses in the porcine pulmonary vasculature [33], as well as in the human pulmonary vein on responses to 17-phenyl-PGE₂, an EP agonist [34]. Although Boersma et al. [19] did not report EP₁ and EP₃ in the human umbilical artery, various prostanoid receptors (FP, TP, EP₁, EP₂, EP₃, DP and IP) have been encountered in the human uterus [35], and TP have been observed in the human placenta [15;36]. In the present study, we determined that TP and EP blockers significantly decreased sensitivities to prostanoids, demonstrating that they exert competitive antagonist effects towards the isoprostane and the thromboxane mimetic in human placental cotyledons. Furthermore, our results are in agreement with previous findings that these prostanoid receptors (TP and EP) occur in the human foetoplacental vasculature [15;16;18;19;36]. These observations support the concept that prostanoids are deeply involved in vascular placental regulation during pregnancy. Moreover, we noted that TXA₂ and 8-isoPGE₂ did not act selectively on their own receptors but that they simultaneously activated at least 2 types of prostanoid receptors. The non-selectivity of prostanoids for their receptors has been reported, especially for isoprostanes. Indeed, 8-isoPGE₂ and 8-isoPGF_{2α} were found to act via TP in the human umbilical artery [30] and vein [14]. However, Sametz et al. [13] established that while 8-isoPGE₂ activates TP and EP₁, U-46619 and 8-isoPGF_{2α} target TP only in the rat gastric fundus and guinea pig ileum. Alternatively, our results suggest that the antagonists were not totally selective for their receptor types. In support of this interpretation, Tang et al. [37] proposed that the antagonistic effect of AH6809 on

U-46619 responses could be limited to some partial antagonist activity on TP in spontaneously hypertensive rat aortas. It has also been reported that AH6809 could have low affinity for other prostanoid receptors, such as DP and TP receptors [20;38]. On another hand, the fact that the TP and EP blockers used together did not show a stronger inhibition of the response to U-46619, compared to the inhibition observed with the TP blocker alone, could be explained by the fact that, in the human placental vessels, EP and TP activate the same signalling pathway to contract the smooth muscle. Consequently, if one of these two receptors is activated, activation of the second receptor won't change the cellular response since the signalling pathway would already be engaged. To our knowledge, no similar experiment has been done in the human placental vessels.

Furthermore, this study show negligible effects of L-NAME, a NO synthase inhibitor, on responses to U-46619 in cotyledons and chorionic arteries, but did not obtain statistical significance. These observations indicate that in our experimental conditions, there was no basal NO production to help regulate vascular tone in the placenta. However, Myatt et al. [39] reported that, although they did not detect any effect in the absence of the vasoconstrictor, NO donors induced vasodilatation of the foetoplacental vasculature when pre-contracted with U-46619. It has also been demonstrated that L-NAME can significantly increase perfusion pressure in pre-contracted, perfused human cotyledons [40]. Differences between the results of these authors and ours could be explained by the fact that they observed some NO effects on already-contracted cotyledons, whereas we did not succeed in preventing contractions induced by exogenous vasoconstrictors with the NOS inhibitor. This suggests that inducible NOS (iNOS) could be responsible for the findings of Myatt et al. [40] and that

pre-contraction of the experimental preparation could lead to iNOS activation. Buhimschi et al. [41] have proposed that iNOS could be involved in high NO release in the uterus and placenta, while endothelial NOS (eNOS) could induce global vasodilatation and decrease the responsiveness to vasoconstrictors seen during pregnancy. Furthermore, L-NAME was reported to be more powerful in inhibiting eNOS than iNOS [41]. Altogether, these considerations indicate that NO could be released by iNOS in our preparations, but the L-NAME effect on this specific enzyme would not be sufficient to change the response to U-46619. Many natural agents, such as histamine [42], substance P [43] and bradykinin [28], have been shown to evoke EDRF (known as NO or NO adduct) release in different vessels. In human umbilical arteries, it has been established that such substances cannot relax pre-contracted vessels, while sodium nitroprussiate (SNP, a NO donor) can [43], suggesting that human umbilical arteries are sensitive to NO but not to EDRF. These authors proposed that the human umbilical artery is sensitive to NO (through NO donors such as SNP), but that the EDRF produced in this vessel is somewhat not “functional” and has to be converted to NO. The putative conversion mechanism is believed to be absent in the placental circulation at the end of pregnancy [43]. Nevertheless, NO involvement in the placental vasculature is controversial. Indeed, Poston [44] reported that NO played a major role in maintaining low foetoplacental vascular resistance, whereas Hampl et al. [45] obtained evidence that, even if it did contribute to sustaining low vascular tone, NO did not seem to exert a key role in the foetoplacental vasculature.

In summary, we demonstrated that TP and EP are present in the human placental vasculature. It is also clear that, when acting through these receptors, the TXA₂ mimetic

U-46619 and the isoprostone 8-isoPGE₂ are potent vasoconstrictors of human placental vessels. These observations indicate that prostanoids are major players in the regulation of human placental vascular tone and resistance, whereas NO does not appear to be involved.

Acknowledgements

We thank the Heart and Stroke Foundation of Québec for its financial support and express our gratitude to the obstetricians-gynaecologists as well as the medical staff of the CHU Sainte-Justine birthing unit for facilitating our access to placentas studied. Finally, we thank the mothers who participated in this research.

Figure Legends

Figure 1: Effects of prostanoids on perfusion pressure and tension in placental vessels. Global (all control groups pooled) dose-response curves to U-46619 (●) (n = 20 and 37 in cotyledons and arteries, respectively) and 8-isoPGE₂ (■) (n = 32 and 20 in cotyledons and arteries, respectively) in perfused human cotyledons (A) and chorionic arteries (B).

Figure 2: Effects of the TP blocker SQ29,548 on responses to prostanoids. Dose-response curves (A) to U-46619 in the absence (●) (n = 10) and presence of 10 nmol/L (□) (n = 15) and 30 nmol/L (△) (n = 15) of SQ29,548 and (B) to 8-isoPGE₂ in the absence (●) (n = 12) and presence of 10 nmol/L of SQ29,548 (□) (n = 12) in perfused human cotyledons. Concentration-response curves (C) to U-46619 in the absence (●) (n = 10) and presence of 3 nmol/L (◇) (n = 10), 10 nmol/L (□) (n = 9) and 30 nmol/L (△) of SQ29,548 (n = 9) in chorionic arteries.

Figure 3: Effects of the TP blocker ICI192,605 on responses to prostanoids. Dose-response curves (A) to U-46619 in the absence (●) (n = 10) and presence of 10 nmol/L (□) (n = 10) and 30 nmol/L (△) of ICI192,605 (n = 10) and (B) to 8-isoPGE₂ in the absence (●) (n = 12) and presence of 3 nmol/L (◇) of ICI192,605 (n = 12) in perfused human placental cotyledons. Concentration-response curves (C) to U-46619 in the absence (●) (n = 11) and presence of 3 nmol/L (◇) (n = 11), 10 nmol/L (□) (n = 11) and 30 nmol/L (△) (n = 10) of ICI192,605 and (D) to 8-isoPGE₂ in the absence (●) and presence of 3 nmol/L (◇), 10 nmol/L (□) and 30 nmol/L (△) (n = 10 for each group) of ICI192605 in chorionic arteries.

Figure 4: Effects of the EP blocker AH6809 on responses to prostanoids. Dose-response curves (A) to U-46619 in the absence (●) (n = 10) and presence of 3 $\mu\text{mol/L}$ (Δ) of AH6809 (n = 10) and (B) to 8-isoPGE₂ in the absence (●) (n = 9) and presence of 3 $\mu\text{mol/L}$ (Δ) of AH6809 (n = 10) in perfused human placental cotyledons. Concentration-response curves (C) to U-46619 in the absence (●) (n = 9) and presence of 3 $\mu\text{mol/L}$ (\diamond) (n = 10), 10 $\mu\text{mol/L}$ (\square) (n = 10) and 30 $\mu\text{mol/L}$ (Δ) of AH6809 (n = 10) and (D) to 8-isoPGE₂ in the absence (●) and presence of 3 $\mu\text{mol/L}$ (\diamond), 10 $\mu\text{mol/L}$ (\square) and 30 $\mu\text{mol/L}$ (Δ) (n = 10 for each group) of AH6809 in chorionic arteries.

Figure 5: Effects of the combined EP and TP blockers (A) and of the NOS blocker L-NAME on the response to U-46619 (B and C). Dose-response curve to U-46619 in the absence (○) (n = 9) and presence (○) of AH6809 3 $\mu\text{mol/L}$ combined with ICI192,605 10 nmol/L (n = 9) (A). Dose- and concentration-response curves to U-46619 in the absence (●) (n = 10 for cotyledons and n = 7 for chorionic arteries) and presence (\square) (n = 11 for cotyledons and 7 for chorionic arteries) of L-NAME 10^{-4} mol/L in perfused human placental cotyledons (B) and placental chorionic arteries (C).

Figure 1

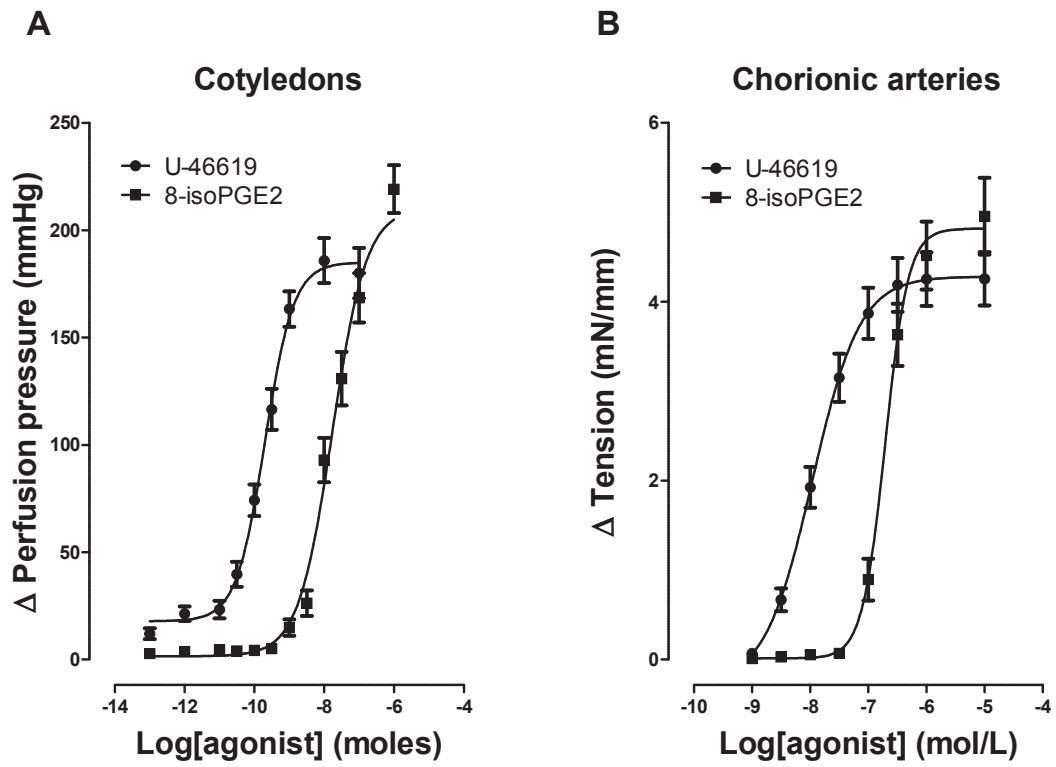


Figure 2

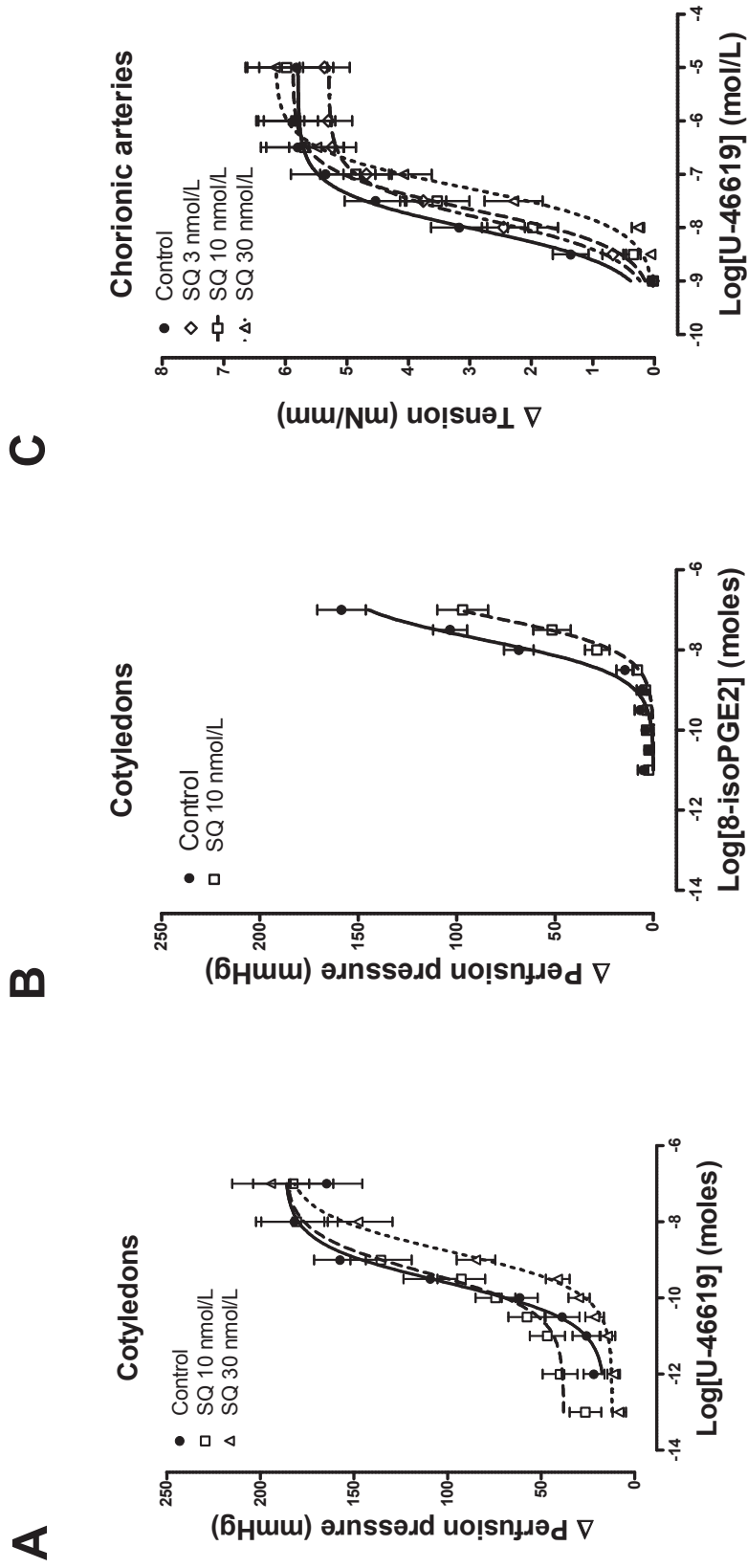


Figure 3

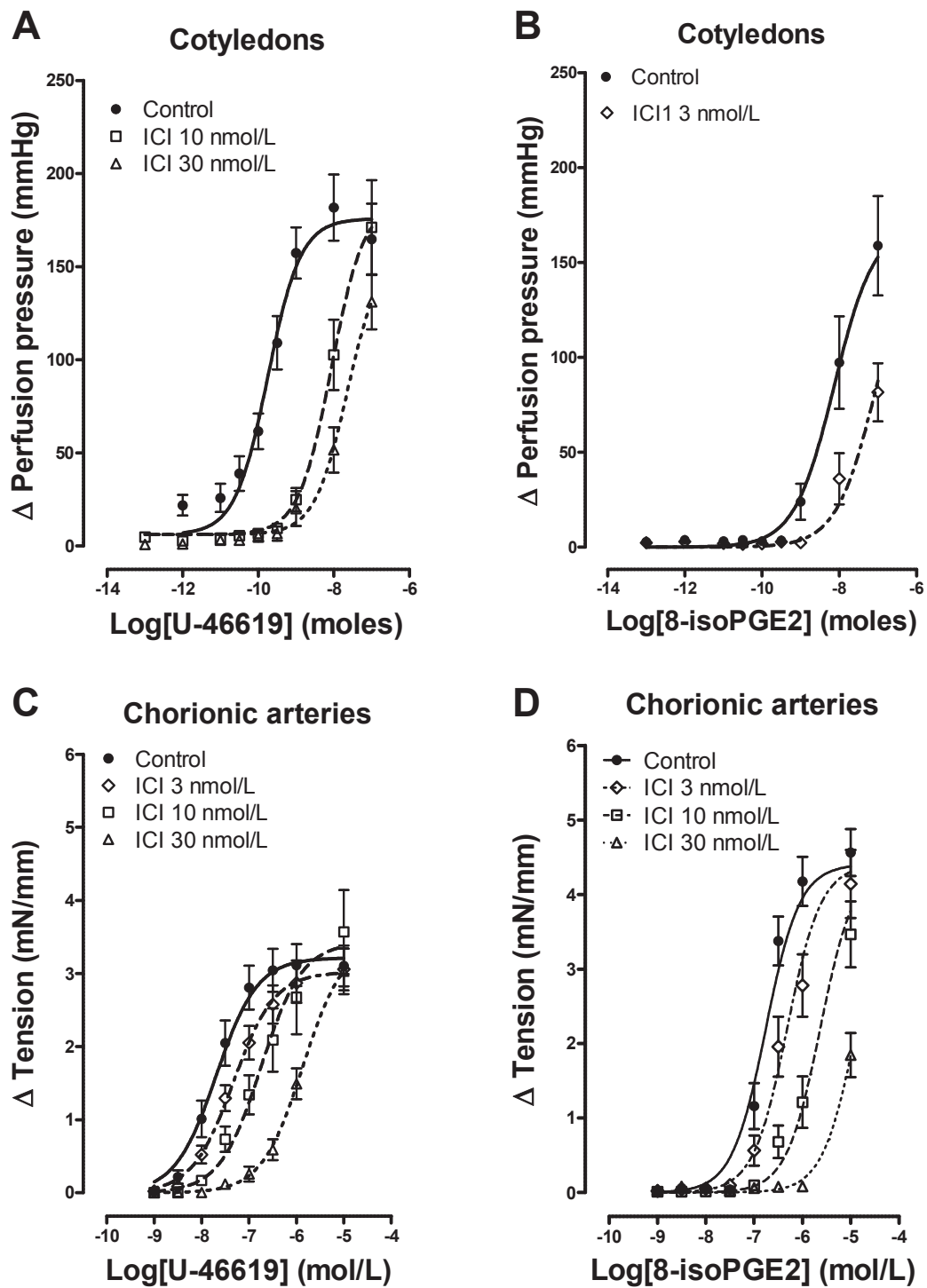


Figure 4

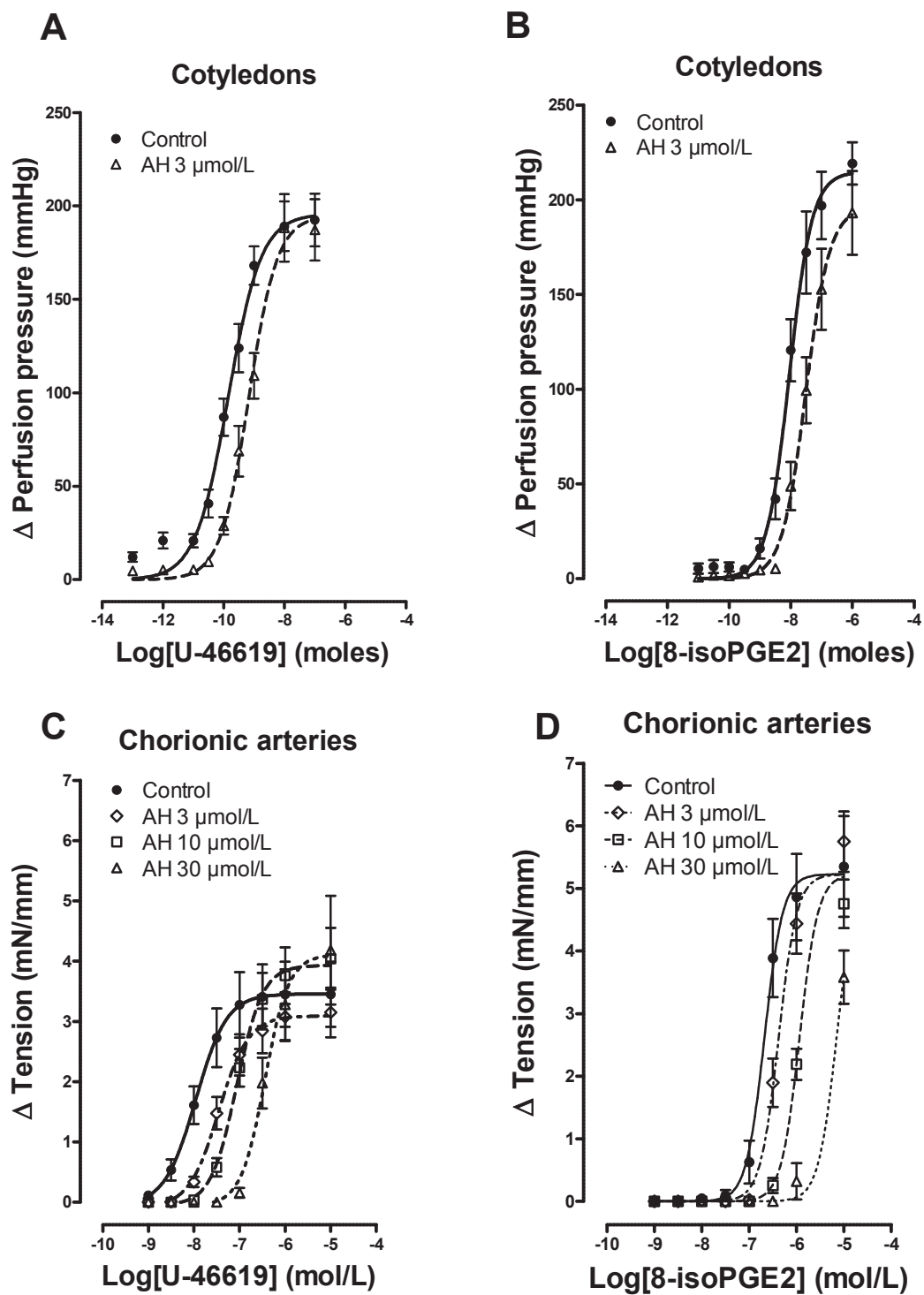


Figure 5

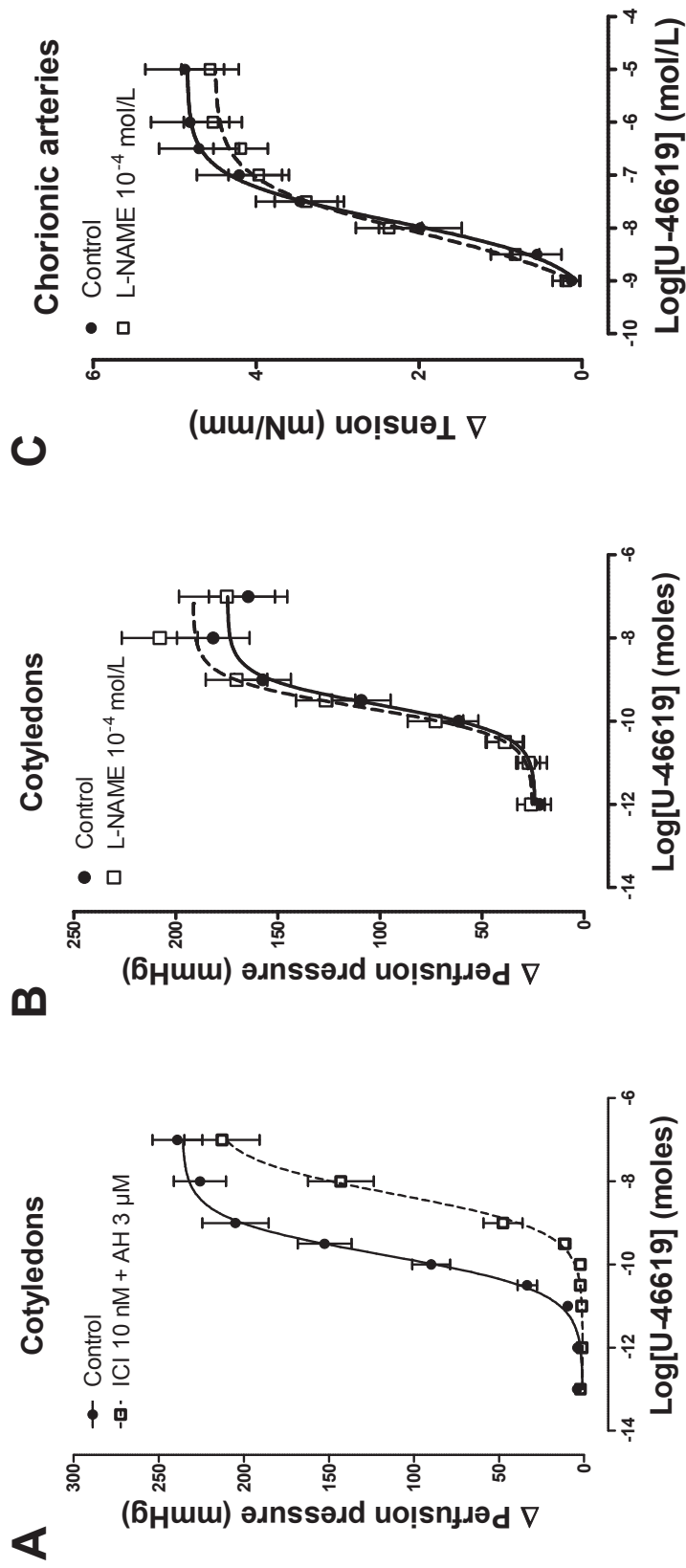


Table 1pD₂ values obtained for cotyledons and chorionic arteries of each group

Groups	pD₂ Cotyledons	pD₂ Chorionic arteries
Total control groups (Fig. 1)		
U-46619	9.70 ± 0.07 (20)	7.96 ± 0.13 (37)
8-isoPGE ₂	7.77 ± 0.09 ⁺⁺⁺ (32)	6.71 ± 0.05 ⁺⁺⁺ (20)
± SQ29,548 (Fig. 2)		
U-46619	9.59 ± 0.15 (10)	8.03 ± 0.08 (10)
U-46619 + 3 nmol/L		7.87 ± 0.09 (10)
U-46619 + 10 nmol/L	9.32 ± 0.14 (15)	7.67 ± 0.09* (9)
U-46619 + 30 nmol/L	8.77 ± 0.14 ^{***} (15)	7.25 ± 0.09 ^{***} (9)
8-isoPGE ₂	7.76 ± 0.07 (12)	
8-isoPGE ₂ + 10 nmol/L	7.15 ± 0.06 ^{***} (12)	
± ICI192,605 (Fig. 3)		
U-46619	9.75 ± 0.09 (10)	7.69 ± 0.10 (11)
U-46619 + 3 nmol/L		7.33 ± 0.09 (11)
U-46619 + 10 nmol/L	8.06 ± 0.13 ^{***} (10)	6.75 ± 0.15 ^{***} (11)
U-46619 + 30 nmol/L	7.64 ± 0.19 ^{***} (10)	5.87 ± 0.08 ^{***} (10)
8-isoPGE ₂	8.13 ± 0.19 (12)	6.76 ± 0.06 (10)
8-isoPGE ₂ + 3 nmol/L	7.03 ± 0.17 ^{***} (12)	6.32 ± 0.06 ^{***} (10)
8-isoPGE ₂ + 10 nmol/L		5.63 ± 0.09 ^{***} (10)
8-isoPGE ₂ + 30 nmol/L		4.88 ± 0.08 ^{***} (10)
± AH6809 (Fig. 4)		
U-46619	9.85 ± 0.09 (10)	7.96 ± 0.21 (9)
U-46619 + 3 µmol/L	9.17 ± 0.10 ^{***} (10)	7.46 ± 0.12* (10)
U-46619 + 10 µmol/L		7.06 ± 0.09 ^{***} (10)
U-46619 + 30 µmol/L		6.44 ± 0.12 ^{***} (10)
8-isoPGE ₂	8.05 ± 0.07 (9)	6.68 ± 0.05 (10)
8-isoPGE ₂ + 3 µmol/L	7.51 ± 0.10 ^{***} (10)	6.38 ± 0.05 ^{***} (10)
8-isoPGE ₂ + 10 µmol/L		5.93 ± 0.05 ^{***} (10)
8-isoPGE ₂ + 30 µmol/L		5.15 ± 0.05 ^{***} (10)
U-46619 (Fig.5)	9.76 ± 0.07 (9)	
U-46619 ± AH6809 + ICI192,605	8.31 ± 0.12 (9) ^{***}	
U-46619 – L-NAME (Fig. 5)	9.62 ± 0.11 (10)	7.88 ± 0.19 (7)
U-46619 + L-NAME	9.67 ± 0.12 (11)	8.10 ± 0.23 (7)

* p<0.05, ***p<0.001 for values compared to their respective controls, ⁺⁺⁺p<0.001 for values compared to the U-46619 group presented in Figure 1. N values for each group are in parenthesis.

Reference List

- [1] St-Louis J, Brochu M. [The cardiovascular paradox of pregnancy]. *Med Sci (Paris)* 2007 Nov;23(11):944-9.
- [2] Ayala DE, Hermida RC, Mojon A, et al. Blood pressure variability during gestation in healthy and complicated pregnancies. *Hypertension* 1997 Sep;30(3 Pt 2):611-8.
- [3] Regnault TR, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental development in normal and compromised pregnancies-- a review. *Placenta* 2002 Apr;23 Suppl A:S119-S129.
- [4] Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JA, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol Res* 2006;39(2):229-36.
- [5] McKinney ET, Shouri R, Hunt RS, Ahokas RA, Sibai BM. Plasma, urinary, and salivary 8-epi-prostaglandin f2alpha levels in normotensive and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2000 Oct;183(4):874-7.
- [6] Benoit C, Zavec J, Wang Y. Vasoreactivity of chorionic plate arteries in response to vasoconstrictors produced by preeclamptic placentas. *Placenta* 2007 May;28(5-6):498-504.
- [7] Walsh SW, Wang Y. Trophoblast and placental villous core production of lipid peroxides, thromboxane, and prostacyclin in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Jun;80(6):1888-93.
- [8] Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Dec;87(23):9383-7.
- [9] Walker DW, McLean JR. Absence of adrenergic nerves in the human placenta. *Nature* 1971 Jan 29;229(5283):344-5.
- [10] Halushka PV. Thromboxane A(2) receptors: where have you gone? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000 Mar;60(4-6):175-89.
- [11] Zhao S, Gu Y, Lewis DF, Wang Y. Predominant basal directional release of thromboxane, but not prostacyclin, by placental trophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies. *Placenta* 2008 Jan;29(1):81-8.
- [12] Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J* 2000 Jul;14(10):1289-96.

- [13] Sametz W, Hennerbichler S, Glaser S, Wintersteiger R, Juan H. Characterization of prostanoid receptors mediating actions of the isoprostanes, 8-iso-PGE(2) and 8-iso-PGF(2 α), in some isolated smooth muscle preparations. *Br J Pharmacol* 2000 Aug;130(8):1903-10.
- [14] Daray FM, Minvielle AI, Puppo S, Rothlin RP. Vasoconstrictor effects of 8-iso-prostaglandin E2 and 8-iso-prostaglandin F(2 α) on human umbilical vein. *Eur J Pharmacol* 2004 Sep 19;499(1-2):189-95.
- [15] Hedberg A, Mento PF, Liu EC, Hollander AM, Wilkes BM. Evidence for functional thromboxane A2-prostaglandin H2 receptors in human placenta. *Am J Physiol* 1989 Feb;256(2 Pt 1):E256-E263.
- [16] Grigsby PL, Sooranna SR, Brockman DE, Johnson MR, Myatt L. Localization and expression of prostaglandin E2 receptors in human placenta and corresponding fetal membranes with labor. *Am J Obstet Gynecol* 2006 Jul;195(1):260-9.
- [17] Errasti AE, Luciani LI, Cesio CE, et al. Potentiation of adrenaline vasoconstrictor response by sub-threshold concentrations of U-46619 in human umbilical vein: involvement of smooth muscle prostanoid TP(α) receptor isoform. *Eur J Pharmacol* 2007 May 21;562(3):227-35.
- [18] Daray FM, Minvielle AI, Puppo S, Rothlin RP. Pharmacological characterization of prostanoid receptors mediating vasoconstriction in human umbilical vein. *Br J Pharmacol* 2003 Aug;139(8):1409-16.
- [19] Boersma JI, Janzen KM, Oliveira L, Crankshaw DJ. Characterization of excitatory prostanoid receptors in the human umbilical artery in vitro. *Br J Pharmacol* 1999 Dec;128(7):1505-12.
- [20] Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 1994 Jun;46(2):205-29.
- [21] White DG, Munding JW, Sumner MJ, Watts IS. The effect of endothelins on nitric oxide and prostacyclin production from human umbilical vein, porcine aorta and bovine carotid artery endothelial cells in culture. *Br J Pharmacol* 1993 Aug;109(4):1128-32.
- [22] Ferro A, Queen LR, Priest RM, et al. Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br J Pharmacol* 1999 Apr;126(8):1872-80.
- [23] Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol* 2006 Apr 1;572(Pt 1):25-30.

- [24] Hung JH. Oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *J Chin Med Assoc* 2007 Oct;70(10):430-2.
- [25] Schneider H, Panigel M, Dancis J. Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine. *Am J Obstet Gynecol* 1972 Nov 15;114(6):822-8.
- [26] Bertrand C, Duperron L, St-Louis J. Umbilical and placental vessels: modifications of their mechanical properties in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993 May;168(5):1537-46.
- [27] Vedernikov YP, Belfort MA, Saade GR, Garfield RE. Inhibition of cyclooxygenase but not nitric oxide synthase influences effects on the human omental artery of the thromboxane A2 mimetic U46619 and 17beta-estradiol. *Am J Obstet Gynecol* 2001 Jul;185(1):182-9.
- [28] Learmont JG, Poston L. Nitric oxide is involved in flow-induced dilation of isolated human small fetoplacental arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1996 Feb;174(2):583-8.
- [29] Wareing M, Crocker IP, Warren AY, Taggart MJ, Baker PN. Characterization of small arteries isolated from the human placental chorionic plate. *Placenta* 2002 May;23(5):400-9.
- [30] Oliveira L, Stallwood NA, Crankshaw DJ. Effects of some isoprostanes on the human umbilical artery in vitro. *Br J Pharmacol* 2000 Feb;129(3):509-14.
- [31] Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Buonocore G, Rossi V, Ciccoli L. Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med* 2004 Sep 1;37(5):724-32.
- [32] Cao J, Wakatsuki A, Yoshida M, Kitazawa T, Taneike T. Thromboxane A2 (TP) receptor in the non-pregnant porcine myometrium and its role in regulation of spontaneous contractile activity. *Eur J Pharmacol* 2004 Feb 6;485(1-3):317-27.
- [33] Janssen LJ, Tazzeo T. Involvement of TP and EP3 receptors in vasoconstrictor responses to isoprostanes in pulmonary vasculature. *J Pharmacol Exp Ther* 2002 Jun;301(3):1060-6.
- [34] Walch L, de M, V, Brink C, Norel X. Prostanoid EP(1)- and TP-receptors involved in the contraction of human pulmonary veins. *Br J Pharmacol* 2001 Dec;134(8):1671-8.
- [35] Senior J, Marshall K, Sangha R, Clayton JK. In vitro characterization of prostanoid receptors on human myometrium at term pregnancy. *Br J Pharmacol* 1993 Feb;108(2):501-6.

- [36] Kwek K, Read MA, Khong TY, Bisits AT, Walters WA. Vasoactive effects of 8-epi-prostaglandin F(2alpha) in isolated human placental conduit and resistance blood vessels in vitro. *Placenta* 2001 Jul;22(6):526-33.
- [37] Tang EH, Jensen BL, Skott O, et al. The role of prostaglandin E and thromboxane-prostanoid receptors in the response to prostaglandin E2 in the aorta of Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2008 Apr 1;78(1):130-8.
- [38] Palea S, Toson G, Pietra C, et al. Pharmacological characterization of thromboxane and prostanoid receptors in human isolated urinary bladder. *Br J Pharmacol* 1998 Jul;124(5):865-72.
- [39] Myatt L, Brewer A, Brockman DE. The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 1991 Feb;164(2):687-92.
- [40] Myatt L, Brewer AS, Langdon G, Brockman DE. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 1992 Jan;166(1 Pt 1):224-30.
- [41] Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update* 1998 Jan;4(1):25-42.
- [42] Van d, V, Vanderstichele H, Leusen I. Release of endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vessels. *Circ Res* 1987 Apr;60(4):517-22.
- [43] Sugawara M, Tohse N, Nagashima M, Yabu H, Kudo R. Vascular reactivity to endothelium-derived relaxing factor in human umbilical artery at term pregnancy. *Can J Physiol Pharmacol* 1997 Jul;75(7):818-24.
- [44] Poston L. The control of blood flow to the placenta. *Exp Physiol* 1997 Mar;82(2):377-87.
- [45] Hampl V, Bibova J, Stranak Z, et al. Hypoxic fetoplacental vasoconstriction in humans is mediated by potassium channel inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Dec;283(6):H2440-H2449.

CHAPITRE 3

Responses to prostanoids in placental chorionic arteries from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm delivery.

(en préparation)

Participation des auteurs :

Ofélie Bélanger Monast : Réalisation des expériences

Leslie Hausermann : Évaluation des résultats, analyses statistiques et rédaction de l'article

Jean St-Louis, Ph.D. : Supervision des travaux (expériences, analyses statistiques et rédaction de l'article)

Les journaux envisagés pour soumission sont *Placenta* ou *American Journal of Obstetrics and Gynecology*.

Responses to prostanoids in placental chorionic arteries from pregnancies complicated by preeclampsia and preterm delivery

Ofélie Bélanger Monast, Leslie Hausermann and Jean St-Louis*

Research Center of the CHU Sainte-Justine

And Department of Obstetrics & gynecology

Faculty of medicine, Université de Montréal

Short title: Placental arteries of preeclampsia: isoprostane

*to whom editorial correspondence should be addressed:

Pavillon Paul G. Desmarais

Université de Montréal

P.O. Box 6128

Montréal, Québec

Canada

H3C 1J7

Abstract

Placental circulation is devoid of autonomic innervation. Therefore, placental vascular tone should be controlled by local influences. Circulating substances such as isoprostanes and thromboxane A₂ (TXA₂) are believed to be part of the endogenous vasoactive stimuli of the placental vascular tone. Preeclampsia is a pregnancy-related human disease associated with poor uteroplacental perfusion and oxidative stress. We hypothesized that responses to isoprostanes, generated by radical attack on arachidonic acid, could be altered in placental chorionic arteries from preeclamptic women. Effects of the isoprostane, 8-isoprostaglandin E₂ (8-isoPGE₂), and of U-46619, a TXA₂ mimetic, were measured in chorionic arteries of placentas from normotensive (NT) and preeclamptic (PE) pregnancies, and after term and preterm and vaginal or caesarean section deliveries. Artery rings were set-up in isolated organ bath to measure isometric contractions to the above mentioned vasoconstrictors. Although arteries were less sensitive to 8-isoPGE₂ than U-46619, both drugs markedly increased tension in the isolated arteries. Maximal responses to U-46619 were increased in both preeclampsia and preterm delivery, whereas the ones to 8-isoPGE₂ were decreased in the disease but increased in preterm delivery. Baby weight was significantly reduced in preeclampsia, while gestational age was not affected by the disease. Mode of delivery had no effect on the responses to the prostanoids. As well, gestational age and birth weight were not different between babies born vaginally and those born by caesarean section. Our results support the hypothesis that responses to prostanoids in the human chorionic arteries are altered in placentas from PE women, suggesting an abnormal vascular reactivity in PE placentas. Moreover, increased responses to prostanoids in the preterm groups suggest some progressive regulation of vascular reactivity throughout pregnancy. However, placental prostanoids did not seem to be involved in the process of delivery.

Keywords: placental arteries, preeclampsia, preterm delivery, isoprostane, U-46619.

Introduction

Preeclampsia is a human pregnancy-related disease occurring in 5-7% pregnancies. Together with intra-uterine growth restriction (IUGR), they constitute the major causes of maternal and foetal morbidity and mortality. Pregnancy is normally characterised by decreased blood pressure. This appears paradoxical in face of accompanying increases in blood volume, heart rate, cardiac output and renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) [1]. In preeclampsia, these hemodynamic changes do not take place. Indeed, patients specifically present pregnancy-induced hypertension and proteinuria.

In 2000, Walsh et al. [2] demonstrated that preeclampsia is associated with oxidative stress and lipid peroxidation. Furthermore, isoprostanes (oxidized prostanoids) production and the thromboxane A₂ (TXA₂)/prostacyclin (PGI₂) ratio were shown to be increased in the maternal blood and placenta of preeclamptic women [2;3]. Moreover, endothelial dysfunction [4] and shallow trophoblast invasion of the maternal spiral arteries were demonstrated as being representative of the disease [5]. Despite numerous studies, causes of preeclampsia are still unknown and, so far, there is no pharmacological treatment to cure the syndrome. Nevertheless, delivery of both the foetus and placenta usually leads to spontaneous resolution of the symptoms. This supports a central role of the placenta in the genesis of the disease. Unfortunately, when the clinical manifestations of the disease are exacerbated, there is a need to immediately stop pregnancy, leading sometimes to premature births.

Walker and McLean [6] have demonstrated that placental and umbilical vessels are devoid of autonomic innervation. Consequently, humoral and tissue factors should be the regulators of umbilicoplacental vascular tone. Indeed, it is well accepted that placental circulation is able to respond to various vasoactive stimuli such as prostanoids. It was recently reported that U-46619, a potent TXA₂ mimetic, and isoprostane 8-isoPGE₂ induce concentration-dependent constrictions in human placental chorionic arteries and increase in pressure in perfused human placental cotyledons [7]. Moreover, 8-isoPGE₂ and 8-isoPGF_{2 α} have been shown to have vasoconstrictor effects in human umbilical vein [8] and artery [9]; the former isoform being much more potent than the latter (Bertrand and St-Louis, unpublished observation).

Prostanoids are products of arachidonic acid that is converted to prostaglandin endoperoxides by cyclooxygenases, and then transformed in various prostaglandins (PGI₂, PGF_{2 α} and PGE₂) and TXA₂; the latter being a potent vasoconstrictor and activator of platelet aggregation. Isoprostanes also derive from arachidonic acid but are non-enzymatic products, since they result from lipid peroxidation following radical attack [10]. Isoprostanes are considered markers of oxidative stress [11], an imbalance between reactive oxygen species and protective antioxidant

mechanisms. Prostanoids also seem to be widely involved in labour onset [12-14] and isoprostanes have been shown to be increased in umbilical blood of preterm compared to term newborns [15]. These observations suggest that prostanoids are presumably of significant importance for the regulation of fetoplacental circulation.

On another hand, normal pregnancy is associated with increased lipid peroxidation, balanced by increased antioxidant capacity. However, in preeclampsia, these protective responses are not increased, causing oxidative stress [16]. The latter can damage placental functions by altering trophoblast differentiation and proliferation, increasing trophoblast apoptosis and decreasing angiogenesis and vascular reactivity in the placenta (reviewed in [17]).

In this study, we postulate that, if preeclampsia is associated with some radical attack, responses to isoprostanes will be altered in the placental arterial circulation. Then, we measured the vasoconstrictor effects of both 8-isoPGE₂ and U-46619 in the human placental chorionic arteries obtained after normotensive and preeclamptic pregnancies, each terminating in term and preterm deliveries. Furthermore, prostanoids being involved in labour onset, we also investigated the influence of delivery mode (vaginal or caesarean section) on the responses to both vasoconstrictors.

Materials and Methods

Tissue collection

The protocol was approved by the Ethics Committee of the CHU Sainte-Justine. Selected patients were requested to sign written consent to allow our team to use tissues of their placenta. 80 placentas were obtained at term (≥ 35 weeks of amenorrhea) or preterm (< 34 weeks of amenorrhea) delivery after normotensive or preeclamptic pregnancies. Patients with preeclampsia were selected according to the following criteria: blood pressure $\geq 140/90$ mm Hg, proteinuria ≥ 0.3 g/L, no history of hypertension before pregnancy, and resolution of hypertension and proteinuria in the postpartum period. Normotensive patients were selected on the basis of the following criteria: normal blood pressure before, during and after pregnancy, no proteinuria and no oedema. Preterm deliveries were due to unexplained labour, rupture of membranes or severe preeclampsia needing pregnancy cessation.

Placentas were first separated in vaginal or caesarean section and in term or preterm delivery, from normotensive (NT) or preeclamptic (PE) pregnancy, making eight groups to observe (Table 1). NT term pregnancies, vaginal or caesarean section, were considered the reference control groups. Each placenta was obtained immediately after delivery and chorionic arterial tissues were isolated within the next hour. The arteries were either used immediately for experimentation or exceptionally stored at 4°C and used within the next 24 hours (no significant difference in reactivity was observed between placental arteries used immediately and after 24 hours storage, data not shown).

Chorionic arterial segments were isolated from a secondary branch of the chorionic plate before their insertion in the parenchyma. Arteries were carefully dissected and cut into 8 rings of 3-5 mm axial length. Rings were isometrically suspended in individual glass-jacketed tissue baths (Radnoti Glass Technology, Monrovia, Ca, USA) under 3g passive tension [18]. Myotropic activity was recorded with force displacement transducers (FT-03; Grass Instruments, Quincy, MA, USA) connected to a chart recorder (Grass Instruments, N°7). Each ring was immersed in 15 mL of physiological solution (Krebs) preheated at 37°C and bubbled with a gas mixture of 95% oxygen and 5% carbon dioxide to maintain pH at 7.4.

Experimental procedures

During the first hour of experimentation, equilibration was performed by continuously adjusting tension to 3 g and changing the bathing solution every 15 min. Then, arterial segments were challenged with 60 mmol/L potassium chloride in order to test the vascular reactivity.

Developed tension was recorded for each ring. After 30-min recovery, stimulation was repeated until a stable response was obtained (difference between 2 consecutive stimulation < 10%).

After 1-h recovery, cumulative concentration-response curves to 8-isoPGE₂ (10⁻⁸ mol/L to 10⁻⁶ mol/L) and U-46619 (10⁻⁹ mol/L to 10⁻⁶ mol/L) were then performed on the rings, half of them receiving the isoprostane and the others receiving U-46619. Responses were then averaged for each group, "n" representing the mean results of the different arterial segment of the same placenta.

Drugs and chemicals

U-46619 and 8-isoPGE₂ were purchased from *Cayman Chemicals* (Ann Arbor, MI, USA). Prostanoid concentrations were chosen according to previous work [7]. The Krebs solution used in this study contained: 118 mmol/L NaCl, 1.18 mmol/L MgSO₄, 1.18 mmol/L KH₂PO₄, 25 mmol/L NaHCO₃, 2.5 mmol/L CaCl, 4.69 mmol/L KCl and 5.5 mmol/L dextrose. NaCl and MgSO₄ were bought from *Sigma Aldrich* (Oakville, ON, Canada), KCl, KH₂PO₄ and NaHCO₃ were obtained from *Fisher Scientific* (Ottawa, ON, Canada), dextrose was supplied by *J.T. Baker Chemicals* (Phillipsburg, NJ, USA), and CaCl was procured from *EMD Chemicals* (Gibbstown, NJ, USA).

Statistical analysis

Contractile responses were measured in gram tension and transformed in mN/mg tissue wet weight (1 mN = 0.102g). Concentration-response curves were analyzed using nonlinear regression (Prism 4, GraphPad, San Diego, CA, USA) to determine the concentration producing 50% of the maximum response (EC₅₀) and the maximum response (E_{max}). Sensitivity of the agonists was determined as the negative logarithm of EC₅₀ (pD₂), while E_{max} was indicative of tissue responsiveness. All values are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). Multiple comparisons of the mean sensitivity or responsiveness were performed with 2-ways ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison tests. Single comparisons were made using Student's T test when appropriate. Differences were considered significant when reaching ≤ 5% probability (p ≤ 0.05).

Results

Baby weight and gestational age

Placentas were obtained from 41 normotensive and 39 preeclamptic women (Table 1). For each group, baby weight and gestational age were similar for both vaginal and caesarean section deliveries (Table 1; Student's T test). Data of baby weight and gestational age from vaginal and caesarean section deliveries were then pooled to evaluate the effect of preeclampsia. As expected, gestational age and baby weight were significantly lower for preterm delivery when compared to their respective controls (Table 2; 2-way ANOVA). Preeclampsia was significantly associated with decreased baby weight (Table 2; $p < 0.001$, 2-way ANOVA). 2-way analysis of variance did not reveal any effect of preeclampsia on gestational age. Nevertheless, there was some interaction ($p < 0.0006$) indicating that the difference in gestational age of PE and NT pregnancies was greater in the term groups compared to preterm ones. This result, which was confirmed by post-hoc Bonferroni test, could explain why PE infants were smaller than NT ones.

Responses to U-46619 and 8-isoPGE₂

We measured the contractile effects of both U-46619 and 8-isoPGE₂ on the human placental chorionic arteries of NT and PE term and preterm women in the two different modes of delivery. Figure 1 shows the results obtained for U-46619 in which important rises in tension in chorionic arteries were observed in response to the agonist. There was no difference in response to U-46619 (E_{max} and sensitivity) between placentas obtained after vaginal or caesarean section delivery. Responses to the isoprostane are presented in figure 2. Again, there was no difference in responses of the chorionic arteries to 8-isoPGE₂ in each group for placentas obtained from caesarean section or vaginal delivery. That is why the pharmacologic parameters were pooled for further analysis. However, it was observed that chorionic arteries were significantly more sensitive to U-46619 than to 8-isoPGE₂ ($p < 0.001$; Student's T test). Moreover, E_{max} for both vasoconstrictors were similar in magnitude only in the NT term groups. Maximal responses were lower for 8-isoPGE₂ than U-46619 in all other groups (Table 3).

Figure 3A and Table 3 (upper part) present the results obtained for U-46619 in the 4 groups of placentas studied. As shown on the table, sensitivity of the chorionic artery rings to the agonist was similar in all 4 groups. However, two way analysis of variance revealed that maximum response of the chorionic artery to U-46619 was increased in preeclampsia as well as preterm delivery (both significant to $p < 0.001$). Moreover, there was some interaction ($p < 0.0453$) indicating that the increase in maximum response to U-46619 was smaller in magnitude, compared to the corresponding term group, in PE than in NT. This result was confirmed by post-hoc Bonferroni test.

Figure 3B and Table 3 (lower panel) present the corresponding results for the isoprostane. In Table 3, preeclampsia was associated with some decrease in affinity to 8-isoPGE₂. Indeed, two way analysis of variance revealed that sensitivity (pD_2) to the agonist was almost significantly reduced in both groups of preeclampsia ($p<0.07$). Opposite to what was observed for the thromboxane mimetic, maximum response to the isoprostane was markedly reduced in preeclampsia ($p<0.001$, 2-way ANOVA), while slightly but significantly increased in the preterm groups compared to term ones ($p<0.028$, 2-way ANOVA). There was no interaction.

Discussion

In this study, we wanted to evaluate if the reported increase of isoprostane production by the placenta of preeclamptic women [2] would affect the blood vessels of that foetal structure. To do so, we used placentas from 8 different clinical conditions: normal *versus* preeclamptic pregnancies, coupled with term and preterm delivery by either caesarean section or vaginal delivery. Our results revealed that the mode of delivery did not affect the myotropic responses of the chorionic artery rings studied *in vitro* in response to the isoprostane, 8-isoPGE₂, as to the corresponding reference agonist, the thromboxane mimetic U-46619. Responses to the latter agonist were increased in PE and in preterm delivery while they were markedly decreased by preeclampsia for the isoprostane and slightly increased by preterm delivery. This confirms our postulate that the response to placental arteries to isoprostane is altered in preeclampsia in a way compatible with increased production of this type of substances possibly through the associated radical attack.

Vessels studied here showed high responsiveness to the TXA₂ mimetic and the isoprostane since vascular tension was strongly increased in presence of these drugs. Moreover, although sensitivity to 8-isoPGE₂ was significantly below the one of U-46619, pD₂ values revealed biologically significant sensitivity of human chorionic arteries to prostanoid products. These results are in agreement with the one previously reported in which we showed that placental blood vessels from normotensive pregnancy were highly responsive and sensitive to these substances [7]. Also, as for the present observations, this previous study showed that chorionic arteries and perfused placental cotyledons were significantly less sensitive to the isoprostane than to the thromboxane mimetic.

In the present study, preeclampsia appeared to alter responses to both prostanoids. Indeed, maximal response to U-46619 was significantly increased in placentas obtained from PE women, while maximal response to 8-isoPGE₂ was significantly reduced by the disease. In placental resistance arteries (200-600 µm diameter), Kwek et al. [19] also observed a reduction of the effect of 8-épiPGF_{2α}, another isoprostane, in PE pregnancies. However, our data on the influence of preeclampsia on the response to U-46619 do not fit with those reported by other investigators. Indeed, it was reported either no significant effect on the responses of conduit (1.5-2.5 mm diameter) and resistance (200-600 µm diameter) human placental chorionic arteries [19], or decreased maximal responses to U-46619 in perfused human placental cotyledons [20] and small arteries from human chorionic placental plate [21]. This could be explained by differences in vessel preparations and the methods used in each investigation. For example, Read et al [20] studied the whole placental cotyledon, while Kwek et al. [19] used either vessels smaller than 600 µm or bigger than 1.5 mm in diameter and Wareing et al. [21] performed their experiments on vessels with resting

internal diameter above 500 μm . As well, Wareing et al. [21] used a gas mixture of 5% CO_2 in air gassing (20% O_2), while we and others used a gas mixture of 95% O_2 and 5% CO_2 . Consequently, discrepancies observed between the studies could reflect some variation in prostanoid receptor expression all along the placental vasculature, but also show that used gas mixture influences human placental vessel reactivity. In this regard, effect of level of oxygenation on placental vessel reactivity has been shown in human placental chorionic vessels, in which a 7% media oxygenation increased both maximal arterial vasoconstriction and sensitivity to U-46619 compared to 20% oxygenation [22].

Such an effect of preeclampsia could be the consequence of a TP and EP receptor expression regulation. Indeed, isoprostanes have been shown to be significantly elevated in placentas from preeclampsia [2], and we have shown that 8-isoPGE₂ acts on EP and TP receptors in chorionic arteries [7]. High concentrations of isoprostanes could produce down-regulation of the EP receptors, as defense mechanism, leading to the observed decrease in response to 8-isoPGE₂ in the PE chorionic vessels. Interestingly, in some cells such as HEK293 and human and mouse artery smooth muscle cells, TP receptor activation brings reactive oxygen species generation leading to TP receptor up-regulation [23]. Moreover, these authors reported that TP receptors are also activated by isoprostanes which, once again, lead to receptor up-regulation. Moreover, in COS-7 cells, Valentin et al. [24] observed that oxidative stress was responsible for maturation and stabilization of TP receptors probably through translocation from the endoplasmic reticulum to the Golgi compartment. These investigators then suggested that it may contribute in cases of oxidative stress to augment TP receptor density in order to potentiate the vasoactive effects of isoprostanes in cardiovascular diseases. These observations would suggest that in preeclampsia, oxidative stress could lead to TP receptors up-regulation which could explain the increased response to U-46619 observed in this study.

On the other hand, we observed that placental vascular reactivity evolves in the third trimester of pregnancy. Indeed, maximal responses to the TXA₂ mimetic and the isoprostane were significantly increased in placenta obtained after preterm delivery in both the NT and PE groups. Unfortunately, studies on prostanoid placental vascular reactivity in preterm birth are lacking. Nevertheless, it has been reported that isoprostanes are increased in umbilical blood of preterm compared to term newborns [15]. Furthermore, Abad et al. showed that vascular reactivity to KCl was decreased in human chorionic arteries procured after preterm delivery compared to those obtained after term delivery [25]. These observations support the hypothesis of structural or functional vascular evolution of placental vessels throughout pregnancies. Such an evolution could reflect the changes in the foetus needs throughout gestation. Also, it suggests the importance of keeping placental blood flow well regulated during pregnancy in order for the foetus to grow

properly. This could explain why preeclampsia, in which the vascular reactivity is obviously disrupted, was associated with decreased baby weight. This result is in agreement with reported studies showing that the disease is associated with decreased birth weights [26;27]. However, this could be due to a tendency of PE women to deliver sooner than NT ones, as shown here by the interaction observed and as already reported by others [28]

Finally, this study did not reveal any effect of delivery mode on gestational age, baby weight as well as responses to both prostanoids. To our knowledge, no study compared gestational age of babies delivered vaginally and those delivered by caesarean section. Regarding birth weight, Elter et al. [29] reported that babies born by caesarean section were heavier than those born vaginally. However, they also concluded that this could depend on populations and institutions and then, that difference in birth weight would be negligible between babies delivered vaginally and those delivered by caesarean section. As well, lack of effect of delivery mode on vascular responsiveness to the prostanoids is in agreement with the observations already made in arteries from human chorionic plate in response to the thromboxane mimetic. Indeed, Mills et al. [30] did not show any effect of delivery mode on the concentration-response curve to U-46619 in the human chorionic arteries. Furthermore, Abad et al. [25] did not observe any effect of delivery mode on the human chorionic reactivity to KCl. These results suggest that prostanoids are not involved in the process of delivery at a placental level.

In summary, the present study demonstrated that preeclampsia, in addition to decreasing baby weight, affected the responses to prostanoids in the human placental chorionic arteries. This is supporting our postulate that responses to isoprostanes in these vessels are altered in preeclampsia in a way compatible with increased production of these substances probably due to radical attack. Moreover, it appeared that vascular reactivity to prostanoids seems to evolve throughout pregnancy, possibly in order to fit the baby's changing needs. Finally, delivery mode did not seem to be related to baby weight or gestational age. As well, it did not affect responses to prostanoids, suggesting that placental prostanoids are not involved during the process of delivery.

Acknowledgments

We thank the Heart and Stroke Foundation of Québec for its financial support. We also express our gratitude to the obstetricians-gynaecologists and the medical staff of the Birth Unit of the CHU Sainte-Justine for their precious help by facilitating our access to the parturient placentas. Finally, we thank the mothers who have participated in this research.

Reference List

- [1] St-Louis J, Brochu M. [The cardiovascular paradox of pregnancy]. *Med Sci (Paris)* 2007 Nov;23(11):944-9.
- [2] Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J* 2000 Jul;14(10):1289-96.
- [3] Walsh SW, Wang Y. Trophoblast and placental villous core production of lipid peroxides, thromboxane, and prostacyclin in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Jun;80(6):1888-93.
- [4] Wang Y, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004 Mar;190(3):817-24.
- [5] Robertson WB. Uteroplacental vasculature. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1976;10:9-17.
- [6] Walker DW, McLean JR. Absence of adrenergic nerves in the human placenta. *Nature* 1971 Jan 29;229(5283):344-5.
- [7] Hausermann L, St-Louis J. Thromboxane and isoprostane share the same prostanoid receptors to increase human placental tone. *Placenta* 2011 Dec;32(12):941-8.
- [8] Daray FM, Minvielle AI, Puppo S, Rothlin RP. Vasoconstrictor effects of 8-iso-prostaglandin E2 and 8-iso-prostaglandin F(2alpha) on human umbilical vein. *Eur J Pharmacol* 2004 Sep 19;499(1-2):189-95.
- [9] Oliveira L, Stallwood NA, Crankshaw DJ. Effects of some isoprostanes on the human umbilical artery in vitro. *Br J Pharmacol* 2000 Feb;129(3):509-14.
- [10] Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Nov 15;89(22):10721-5.
- [11] Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2002 Aug;23(8):360-6.
- [12] Erkinheimo TL, Saukkonen K, Narko K, Jalkanen J, Ylikorkala O, Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 and prostanoid receptors by human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Sep;85(9):3468-75.
- [13] Hurd WW, Gibbs SG, Rudinsky KA. Differential regulation of myometrial prostaglandin production by changes in length. *Am J Obstet Gynecol* 2008 Feb;198(2):225-4.
- [14] Slater DM, Dennes WJ, Campa JS, Poston L, Bennett PR. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human myometrium throughout pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1999 Sep;5(9):880-4.
- [15] Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Buonocore G, Rossi V, Ciccoli L. Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med* 2004 Sep 1;37(5):724-32.

- [16] Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JA, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol Res* 2006;39(2):229-36.
- [17] Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004 Oct;122(4):369-82.
- [18] Bertrand C, Duperron L, St-Louis J. Umbilical and placental vessels: modifications of their mechanical properties in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993 May;168(5):1537-46.
- [19] Kwek K, Read MA, Khong TY, Bisits AT, Walters WA. Vasoactive effects of 8-epi-prostaglandin F(2alpha) in isolated human placental conduit and resistance blood vessels in vitro. *Placenta* 2001 Jul;22(6):526-33.
- [20] Read MA, Leitch IM, Giles WB, Bisits AM, Boura AL, Walters WA. U46619-mediated vasoconstriction of the fetal placental vasculature in vitro in normal and hypertensive pregnancies. *J Hypertens* 1999 Mar;17(3):389-96.
- [21] Wareing M, Baker PN. Vasoconstriction of small arteries isolated from the human placental chorionic plate in normal and compromised pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2004;23(3):237-46.
- [22] Wareing M, Greenwood SL, Baker PN. Reactivity of human placental chorionic plate vessels is modified by level of oxygenation: differences between arteries and veins. *Placenta* 2006 Jan;27(1):42-8.
- [23] Wilson SJ, Cavanagh CC, Leshner AM, Frey AJ, Russell SE, Smyth EM. Activation-dependent stabilization of the human thromboxane receptor: role of reactive oxygen species. *J Lipid Res* 2009 Jun;50(6):1047-56.
- [24] Valentin F, Field MC, Tippins JR. The mechanism of oxidative stress stabilization of the thromboxane receptor in COS-7 cells. *J Biol Chem* 2004 Feb 27;279(9):8316-24.
- [25] Abad A, Estan L, Morales-Olivas FJ, Serra V. Reactivity of isolated human chorionic vessels: analysis of some influencing variables. *Can J Physiol Pharmacol* 2003 Dec;81(12):1147-51.
- [26] Bakker R, Steegers EA, Hofman A, Jaddoe VW. Blood pressure in different gestational trimesters, fetal growth, and the risk of adverse birth outcomes: the generation R study. *Am J Epidemiol* 2011 Oct 1;174(7):797-806.
- [27] Ferrazzani S, Luciano R, Garofalo S, et al. Neonatal outcome in hypertensive disorders of pregnancy. *Early Hum Dev* 2011 Jun;87(6):445-9.
- [28] Kashanian M, Baradaran HR, Bahasadri S, Alimohammadi R. Risk factors for pre-eclampsia: a study in Iran. *Arch Iran Med* 2011 Nov;14(6):412-5.
- [29] Elter K, Ay E, Erenus M. Does the mode of delivery affect the birthweight? [corrected]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003 Aug 15;109(2):138-40.
- [30] Mills TA, Baker PN, Wareing M. The effect of mode of delivery on placental chorionic plate vascular reactivity. *Hypertens Pregnancy* 2007;26(2):201-10.

Figure legends

Figure 1: Effects of the mode of delivery on the response to the TXA_2 mimetic in human placental chorionic arteries. Concentration-response curves to U-46619 in the NT term (A) (n = 11 and 12 for vaginal and caesarean section delivery respectively) and preterm (B) (n = 9 for each group) and PE term (C) (n = 12 and 6 for vaginal and caesarean section delivery respectively) and preterm (D) (n = 9 and 12 for vaginal and caesarean section delivery respectively) placental arteries after vaginal (●) or caesarean section (○) delivery.

Figure 2: Effects of the mode of delivery on the response to the isoprostane in human placental chorionic arteries. Concentration-response curves to 8-isoPGE₂ in the NT term (A) (n = 11 for each group) and preterm (B) (n = 9 for each group) and PE term (C) (n = 12 and 6 for vaginal and caesarean section delivery respectively) and preterm (D) (n = 9 and 12 for vaginal or caesarean section delivery respectively) placental arteries after vaginal (●) or caesarean section (○) delivery.

Figure 3: Global effects of both prostanoids on tension in human placental chorionic arteries. Concentration-response curves to U-46619 (A) and to 8-isoPGE₂ (B) in the NT term (●) (n = 23 and 22 for U-46619 and 8-isoPGE₂ respectively) and preterm (■) (n = 18) and PE term (○) (n = 18) and preterm (□) (n = 21) placental arteries.

Table 1

Baby weight and gestational age for the eight groups formed from the different placentas obtained.

Groups	(n)	Baby weight (grams)	Gestational age (weeks)
NT term	11	3622 ± 158	39.4 ± 0.4
Vaginal	12	3396 ± 88	38.5 ± 0.2
Cæsarean			
NT preterm			
Vaginal	9	1614 ± 168 ⁺⁺⁺	30.4 ± 0.8 ⁺⁺⁺
Cæsarean	9	1735 ± 124 ⁺⁺⁺	31.1 ± 1.1 ⁺⁺⁺
PE term			
Vaginal	12	2745 ± 252 ^{**}	36.7 ± 0.5 [*]
Cæsarean	6	2666 ± 247	37.0 ± 0.6
PE preterm			
Vaginal	9	1637 ± 266 ⁺⁺⁺	32.3 ± 0.6 ⁺⁺⁺
Cæsarean	12	1201 ± 58 ⁺⁺⁺	31.3 ± 0.5 ⁺⁺⁺

*p<0.05 and **p<0.01 for values showing a significant effect of preeclampsia when compared to their respective controls. ⁺⁺⁺p<0.001 for values showing a significant difference between the term and preterm groups when compared to their respective control.

Table 2

Pooled means of baby weight and gestational age for the NT and PE groups after term or preterm delivery.

Groups	N	Baby weight (grams)	Gestational age (weeks)
NT term	23	3498 ± 88	38.4 ± 0.3
NT preterm	18	1678 ± 101 ^{†††}	30.7 ± 0.6 ^{†††}
PE term	18	2719 ± 183 ^{***}	36.8 ± 0.4
PE preterm	21	1387 ± 126 ^{†††***}	31.7 ± 0.4 ^{†††}

***p<0.01 for values being significantly different in preeclampsia compared to NT. †††p<0.001 for values being significantly different in preterm compared to term delivery.

Table 3

pD₂ and E_{max} values obtained for the normotensive and preeclamptic term and preterm groups for both prostanoids.

Groups	N	pD ₂	E _{max}
U-46619			
NT Term	23	7.92 ± 0.09	3.48 ± 0.17
NT Preterm	18	7.95 ± 0.07	4.63 ± 0.19 ^{†††}
PE Term	18	8.00 ± 0.08	4.58 ± 0.18 ^{***}
PE Preterm	21	7.93 ± 0.06	5.00 ± 0.18 ^{†††***}
8-isoPGE₂			
NT Term	22	7.06 ± 0.08	3.03 ± 0.21
NT Preterm	18	7.07 ± 0.08	3.78 ± 0.24 [†]
PE Term	18	6.78 ± 0.18	1.73 ± 0.29 ^{***}
PE Preterm	21	6.91 ± 0.13	2.03 ± 0.23 ^{***}

***p<0.001 being significantly different in preeclampsia compared to NT. †p<0.05 and †††p<0.001 being significantly different in preterm compared to term delivery. pD₂ is the negative logarithm of the concentration required to produce 50% of the maximum response.

Figure 1

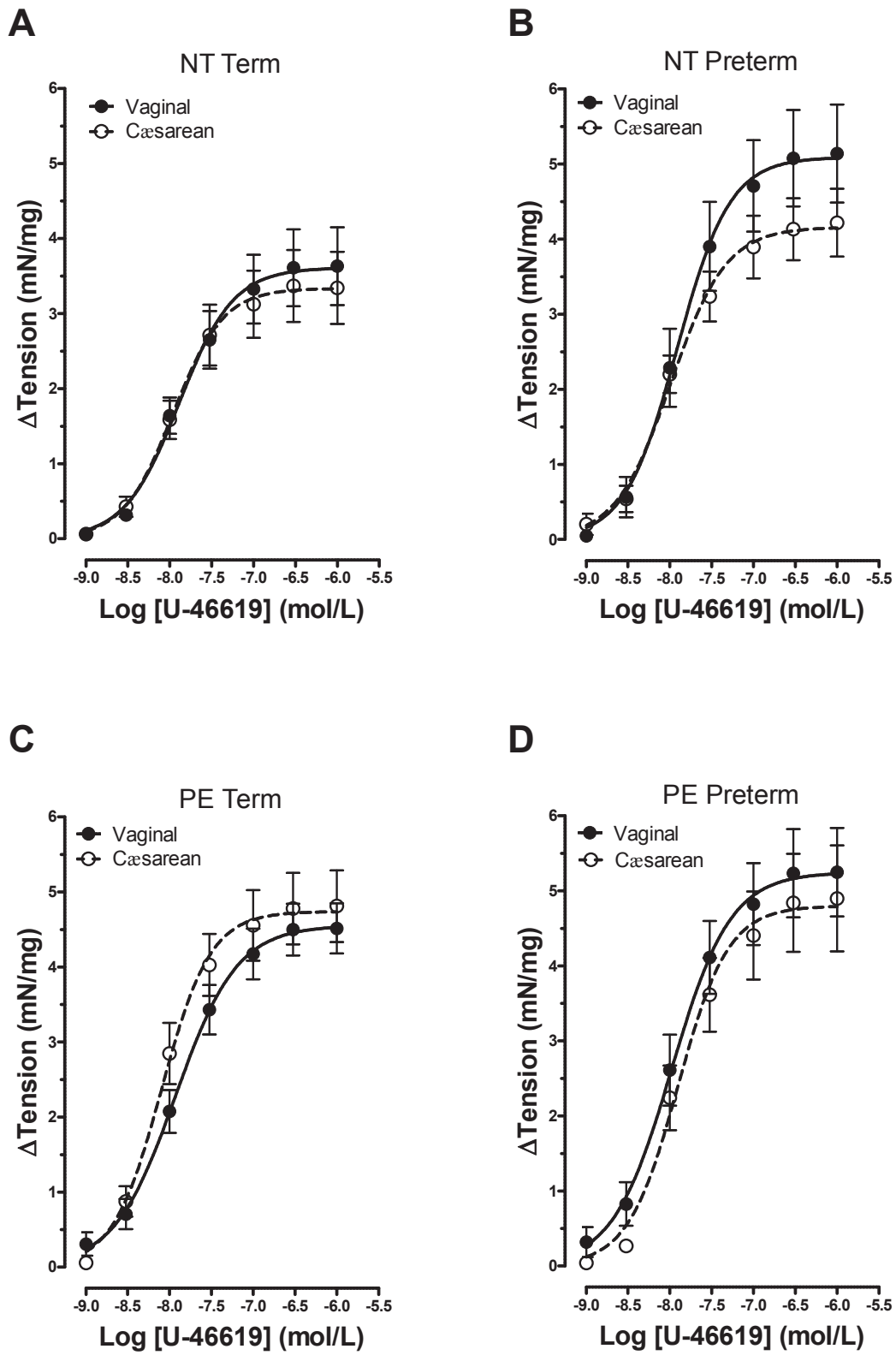


Figure 2

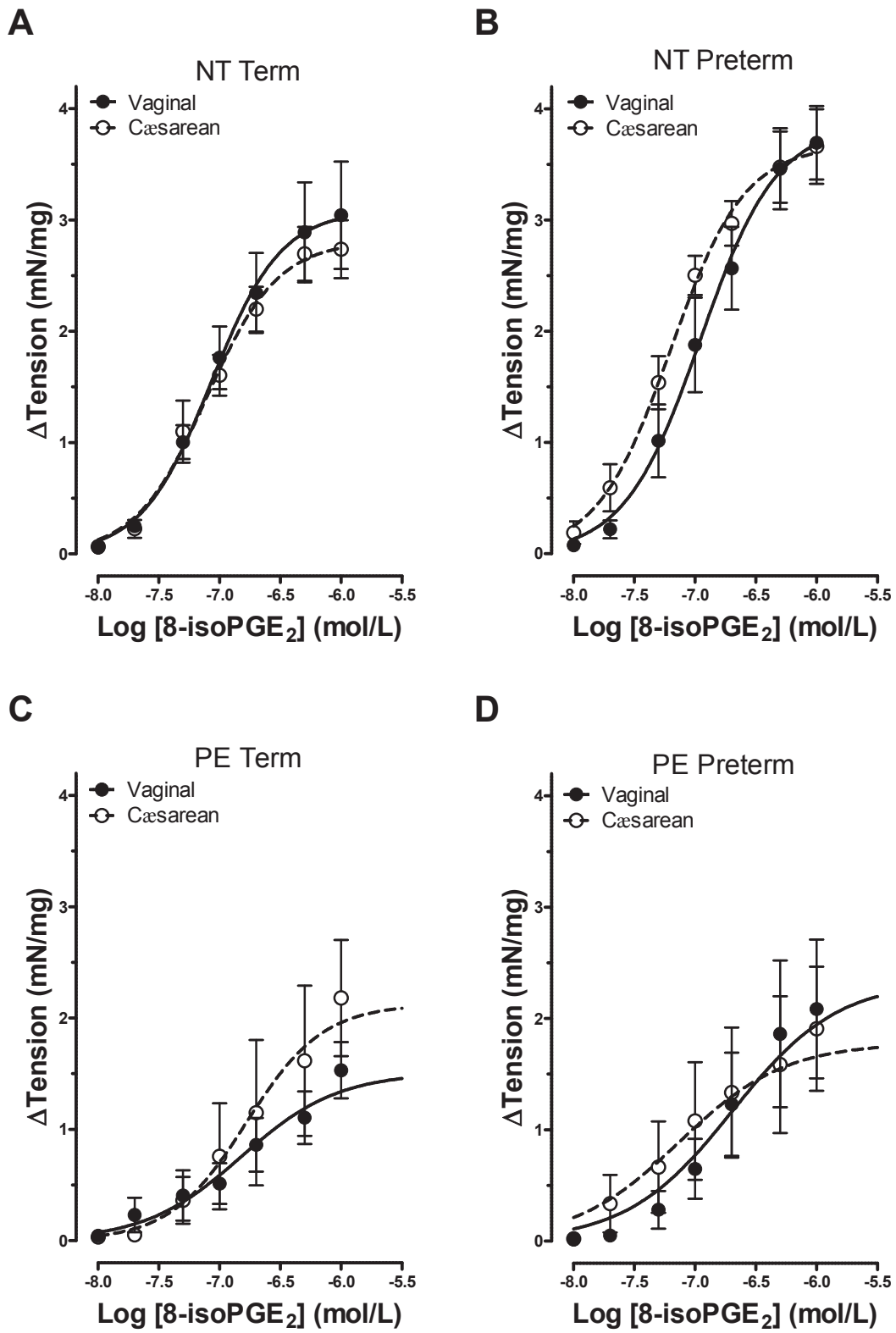
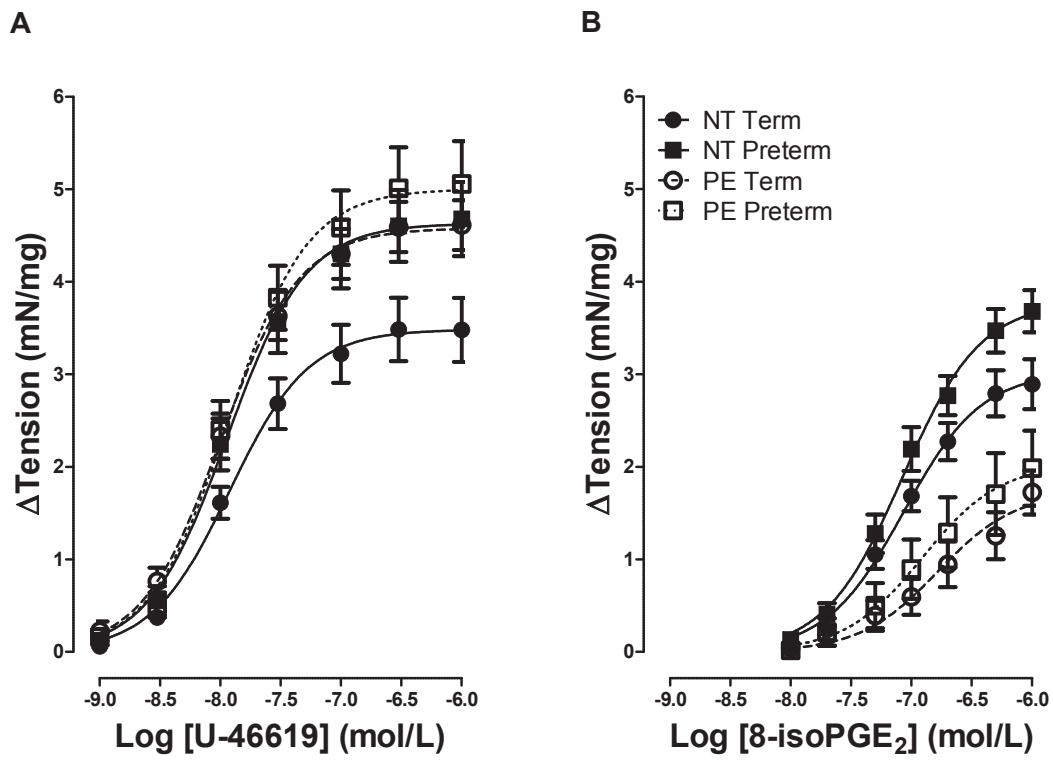


Figure 3



CHAPITRE 4

**L'induction d'un stress oxydatif dans un placenta humain
génère une contraction des vaisseaux placentaires suite à
l'activation des cyclooxygénases.**

Participation des auteurs :

Leslie Hausermann : Réalisation des expériences, des analyses statistiques et rédaction de l'article.

Jean St-Louis, Ph.D. : Supervision des travaux (expériences, analyses statistiques et rédaction de l'article)

Article non destiné à la publication.

**L'induction d'un stress oxydatif dans un placenta humain
génère une contraction des vaisseaux placentaires suite à
l'activation des cyclooxygénases.**

Leslie HAUSERMANN & Jean ST-LOUIS*

Centre de recherche, CHU Sainte-Justine, et Départements d'Obstétrique & Gynécologie et
de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

***Correspondance :**

Pavillon Paul G. Desmarais

Université de Montréal

B.P. 6128

Montréal, Québec

Canada

H3C 1J7

Résumé

La circulation placentaire se contracte sous l'effet des prostanoides vasoconstrictrices, telle la thromboxane A₂ (TXA₂). Dans un placenta de grossesse avec prééclampsie, le stress oxydatif est accru, le rapport TXA₂/PGI₂ est augmenté et les réponses aux prostanoides des vaisseaux sanguins placentaires sont modifiées. Nous formulons l'hypothèse qu'un stress oxydatif placentaire exerce des actions vasoactives par activation de la voie des prostanoides. Sur des placentas obtenus de grossesses normotensives à terme, deux cotylédons ont été isolés et perfusés *in vitro* en parallèle et la pression de perfusion a été mesurée. Des anneaux d'artères chorioniques ont aussi été suspendus dans des bains à organe isolé pour mesurer les variations de tension. Les effets d'inhibiteurs des cyclooxygénases (COXs), l'ibuprofène, l'indométacine et le N-2PIA, et ceux du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ont été mesurés sur la réponse au mimétique de la TXA₂, l'U-46619. De plus, les effets du H₂O₂, en présence ou non de xanthine oxydase (XO), ont été évalués en l'absence ou en présence d'un bloqueur des récepteurs de la TXA₂ et d'ibuprofène. Les résultats n'ont révélé aucun effet des inhibiteurs des COXs ou du H₂O₂ sur la réponse à l'U-46619. En revanche, H₂O₂ augmentait significativement la pression de perfusion et la tension dans les cotylédons et les artères chorioniques respectivement. La présence de XO amplifiait l'augmentation de pression induite par H₂O₂ dans les cotylédons. La réponse maximale au H₂O₂ était significativement inhibée en présence du bloqueur des récepteurs de la TXA₂ et d'ibuprofène dans les deux préparations. Les effets de la combinaison des 2 bloqueurs n'étaient pas significativement différents de ceux observés avec l'ibuprofène seul. Ainsi, les prostanoides vasorelaxantes, telle la prostacycline, ne semblent pas faire partie des substances pouvant jouer la contrepartie dilatatrice dans la régulation du tonus vasculaire placentaire. En outre, il apparaît que l'induction d'un stress oxydatif dans le placenta entraîne une vasoconstriction par l'activation des COXs. Les résultats suggèrent de plus que les prostanoides libérées véhiculent leurs effets en partie par l'activation des récepteurs de la TXA₂. Ces observations pourraient aider à expliquer la mauvaise perfusion placentaire observée dans les placentas obtenus de grossesses avec prééclampsie.

Mots clés : Cotylédons placentaires, Artères chorioniques, U-46619, prééclampsie.

Introduction

Le placenta étant dénué d'innervation autonome [1], le tonus vasculaire placentaire doit être sous le contrôle de facteurs humoraux et tissulaires. Le mimétique de la TXA₂, l'U-46619, et l'isoprostane 8-isoPGE₂ possèdent de puissants effets vasoconstricteurs dans les cotylédons et les artères chorioniques placentaires humaines [2]. De plus, ces actions sont véhiculées par les récepteurs TP à la TXA₂ et EP à la PGE₂. Combinées au fait que la présence d'enzymes productrices de prostanoïdes, telle la thromboxane synthase, ait été rapportée dans le placenta [3], ces observations suggèrent que les prostanoïdes sont importantes dans le contrôle du tonus vasculaire placentaire.

En temps normal, les vaisseaux placentaires sont dans un état dilaté, ce qui permet une meilleure perfusion placentaire. Bien que nous ignorions à l'heure actuelle quelles sont les molécules dilatatrices impliquées dans cet état, il semble que le NO joue un rôle important dans le maintien d'une faible résistance vasculaire. En effet, il apparaît que dans les petites artères fœto-placentaires, une augmentation du flot engendre une dilatation des vaisseaux résultant d'une libération de NO [4]. Cependant, l'utilisation du L-NAME, un inhibiteur des enzymes productrices de NO, n'a pas permis de mettre en évidence l'action du NO en réponse à une contraction importante des vaisseaux placentaires humains [2]. Ainsi, d'autres molécules doivent exercer le contrôle dilatateur sur le tonus vasculaire placentaire. Dans une grossesse normotensive, le rapport TXA₂/PGI₂ est de 1/1, alors qu'il passe à 7/1 dans une grossesse avec prééclampsie [5]. La PGI₂ est une puissante prostanoïde vasodilatatrice. Elle pourrait donc jouer un rôle dans la dilatation de la circulation placentaire, ce qui supporterait encore plus un rôle pour les prostanoïdes comme molécules endogènes responsables du contrôle du tonus vasculaire placentaire.

Lors d'une grossesse normotensive, on observe une augmentation du stress oxydatif qui est contrebalancée par une augmentation des défenses antioxydantes [6-8]. En revanche, chez les patientes atteintes de prééclampsie, cet équilibre n'est pas atteint, laissant les patientes sous un état de stress oxydatif augmenté [9-12]. On pense que ceci est le résultat du mauvais remodelage des artères utérines qui, dans les grossesses avec prééclampsie, conservent des propriétés d'artères de résistance au lieu d'acquérir des propriétés de conduits sanguins comme elles le font chez les femmes en grossesse normale [13-15]. Par conséquent, les fluctuations du flot sanguin arrivant à l'espace intervillitaire observées dans une grossesse normotensive seraient augmentées dans une grossesse avec

prééclampsie. Ceci se traduirait alors par un phénomène d'ischémie/reperfusion placentaire, probablement à l'origine du stress oxydatif observé chez ces patientes [16;17].

En plus de causer des dommages cellulaires, le stress oxydatif peut générer des isoprostanes par oxydation directe de l'acide arachidonique (AA) des phospholipides membranaires [18;19]. D'autre part, il est connu que certaines espèces réactives de l'oxygène telles que H_2O_2 peuvent augmenter la formation de prostanoïdes suite à l'activation des COXs dans des aortes de rat [20], des artères pulmonaires de lapin [21] et dans les cotylédons placentaires humains [22]. Le rapport TXA_2/PGI_2 étant augmenté chez les patientes atteintes de prééclampsie [5], ces observations suggèrent que la production placentaire de prostanoïdes via les voies enzymatiques et non-enzymatiques peut être augmentée dans les grossesses avec prééclampsie en réponse à l'augmentation du stress oxydatif.

Nous avons observé que les isoprostanes, en l'occurrence la 8-isoPGE₂, et le mimétique de la TXA_2 , l'U-46619, possèdent de puissants effets vasoconstricteurs dans les vaisseaux placentaires [2]. De plus, les réponses à l'U-46619 sont augmentées dans les artères chorioniques de placentas obtenus après une grossesse avec prééclampsie, alors que celles à la 8-isoPGE₂ sont diminuées (Chapitre 3). Ainsi, les nombreuses différences observées quant à la synthèse (rapport TXA_2/PGI_2) ou à l'action (réactivité vasculaire) des prostanoïdes entre les patientes normotensives et celle avec prééclampsie, laissent supposer que ces dernières puissent jouer un rôle dans la physiopathologie de la prééclampsie.

Par conséquent, nous émettons l'hypothèse qu'une molécule de type prostanoïde est libérée en réponse à de fortes augmentations de la pression de perfusion dans les cotylédons placentaires perfusés *in vitro* et de la tension dans les artères chorioniques. Aussi, nous proposons que le stress oxydatif possède des propriétés vasoactives suite à l'activation de la voie des prostanoïdes. Ainsi, l'étude a pour buts 1) de mesurer les effets d'inhibiteurs des COXs sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons, 2) d'évaluer les effets du stress oxydatif sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons et les artères chorioniques placentaires, 3) de mesurer les effets de la génération d'un stress oxydatif sur la pression de perfusion dans les cotylédons placentaires perfusés *in vitro* et sur la tension dans les artères chorioniques et 4) de déterminer si la voie des prostanoïdes est impliquée dans ces réponses grâce à l'inhibition des COXs et/ou le blocage des récepteurs TP.

Matériel et Méthodes

Collecte des placentas

Les tissus placentaires utilisés ont été obtenus après un accouchement à terme (>36 semaines d'aménorrhée). Comme nous avons tenté de reproduire, dans un placenta de grossesse normale, le stress oxydatif comme il pourrait être présent dans celui d'une grossesse avec prééclampsie, seuls les placentas obtenus après une grossesse normotensive ont été utilisés. Les patientes ont été hospitalisées au CHU Sainte-Justine pour subir une césarienne électorale. Les placentas obtenus par césarienne électorale présentent des avantages logistiques puisqu'ils sont généralement dans un meilleur état que ceux obtenus par accouchement vaginal, ils ne subissent aucun stress lié à l'accouchement et il est possible de déterminer à quel moment de la journée ils seront disponibles. De plus, une étude précédente n'a révélé aucun effet du mode de délivrance sur la réactivité des vaisseaux (chapitre 3). Avant la chirurgie, l'étude a été expliquée aux patientes et celles désireuses de participer ont dû signer un consentement éclairé nous autorisant à utiliser leur placenta. Les patientes présentant des complications telles que prééclampsie, diabète, RCIU, VIH, hépatite ou toute maladie engendrant une réponse inflammatoire ou compromettant l'intégrité placentaire, n'ont pas été enrôlées dans l'étude. Les placentas ont alors été récupérés directement après la délivrance puis transportés au laboratoire. Le protocole a été approuvé par le Comité d'Éthique de Recherche du Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine.

Perfusion des cotylédons placentaires

Les méthodes utilisées pour la perfusion des cotylédons placentaires ont été décrites dans l'article de Hausermann et al. [2] et sont une modification de celles décrites par Schneider et al. [23]. En bref, deux artères du plateau chorionique ont été canulées avec un tube de polyéthylène d'un diamètre extérieur de 1,7 mm ; le côté maternel n'a pas été perfusé. 5 mL d'une solution de Krebs additionnée d'héparine ont été injectés dans chacun des vaisseaux.

Deux cotylédons ont ensuite été isolés et installés en parallèle dans un système de perfusion et perfusés avec une solution de Krebs à un flot constant de 4 mL/min. La solution de Krebs a été maintenue à une température de 37°C et gazéifiée avec un mélange de 95% d'oxygène et 5% de dioxyde de carbone de façon à maintenir le pH à 7,4. Ce débit de

perfusion a été déterminé en perfusant des cotylédons à un débit variant entre 0 et 20 mL/min. Un certain plateau s'établissait entre les débits de 4 et 12 mL/min, reflet d'une autorégulation de la pression par les vaisseaux (fig.1, Bertrand et St-Louis, non-publié). La pression de perfusion a été enregistrée grâce à un transducteur (TRN050) relié à un amplificateur (TRN005) (Kent Scientific Corporation (Torrington, CT, USA). L'amplificateur a été lui-même connecté à un enregistreur d'acquisition de données (BD 300, Kipp & Zonen, Delft, The Netherlands).

Après une équilibration de 45 min, chaque cotylédon a reçu un bolus (0,1 mL) d'une solution de KCl à 2 mol/L dans le but de tester la réactivité des vaisseaux. Les différentes expérimentations ont alors été réalisées après une nouvelle période d'équilibration de 45 min. Les effets de l'ibuprofène (3 $\mu\text{mol/L}$), de l'indométacine (10 $\mu\text{mol/L}$) et du N-(2-Phenylethyl)indométhacinamide (N-2PIA, 1 $\mu\text{mol/L}$) sur la réponse à l'U-46619 ont été mesurés. Par ailleurs, les effets de H_2O_2 (10^{-4} mol/L) sur la réponse à l'U-46619 ont été évalués. L'ibuprofène, l'indométacine, le N-2PIA ou H_2O_2 ont été administrés par infusion dans le perfusé via une pompe à infusion par seringue (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) à un débit de 0,4 mL/min dans un des cotylédons, l'autre recevant une solution de Krebs. Après 30 min d'infusion, chaque cotylédon recevait des bolus (0,1 mL) de concentrations croissantes (10^{-9} à 10^{-3} mol/L) d'U-46619 de façon à effectuer des courbes dose-réponse et enregistrer les variations de la pression de perfusion.

Les effets vasoactifs de H_2O_2 ont également été testés dans les cotylédons en l'absence et en présence de xanthine oxydase (XO, 0,02 U/mL). Celle-ci produit l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ en convertissant la xanthine et l'hypoxanthine en acide urique. Les effets vasoactifs de l' H_2O_2 ont été testés en l'absence et en présence d'un bloqueur sélectif des récepteurs TP, l'ICI192,605 (1 nmol/L) et/ou d'un bloqueur non-sélectif des COXs, l'ibuprofène (3 $\mu\text{mol/L}$). La XO, l'ICI192,605 et l'ibuprofène ont été infusés dans le perfusé à l'aide de la pompe à infusion par seringue. Le groupe contrôle (H_2O_2 seul) a reçu quant à lui une infusion de Krebs. Les courbes dose-réponse à H_2O_2 ont été obtenues par l'administration de bolus (0,1 mL) de concentrations croissantes (10^{-5} à 10^{-1} mol/L) et les variations de la pression de perfusion ont été enregistrées.

Artères chorioniques isolées

Les méthodes utilisées ont également été décrites dans les chapitres 2 et 3. Brièvement, les artères d'embranchement secondaire du plateau chorionique ont été délicatement disséquées et découpées en 8 anneaux de 3-5 mm de longueur axiale. Chaque anneau a été isométriquement suspendu dans un système de 8 bains à organe isolé (Radnoti Glass Technology, Monrovia, CA, USA) sous une tension passive de 3 g [24]. L'activité myotrope a été enregistrée grâce un transducteur de force (FT-03) connecté à un enregistreur graphique (Grass Instruments, Quincy, MA, USA). Chaque segment d'artère a été immergé dans 15 mL d'une solution de Krebs. La solution de Krebs a été maintenue à une température de 37°C et gazéifiée avec un mélange de 95% d'O₂ et 5% de CO₂. Les valeurs obtenues ont par la suite été converties en mN/mm, où 1 mN correspond à 0,102 g et « mm » représente 2 fois la longueur axiale de l'anneau.

Durant une équilibration d'une heure, la tension a été constamment réajustée à 3 g et la solution de Krebs changée toutes les 15 min. La réactivité vasculaire a ensuite été testée sur chaque anneau en ajoutant 60 mmol/L de KCl dans le bain, puis la tension développée a été enregistrée. Après une période de repos de 30 min, la stimulation au KCl a été répétée et ce jusqu'à ce qu'une réponse stable soit obtenue (c'est-à-dire que la différence entre 2 stimulations est inférieure à 10%).

Après une récupération de 45 min, les courbes concentration-réponse à l'U-46619 (10⁻⁹ à 10⁻³ mol/L) ou H₂O₂ (10⁻⁵ à 3.10⁻³ mol/L) ont été effectuées. Les réponses à l'U-46619 ont été évaluées en l'absence ou en présence de 3.10⁻⁵, 10⁻⁴ ou 3.10⁻⁴ mol/L d'H₂O₂. Les effets vasoactifs de H₂O₂, additionné ou non de XO (0,02 U/mL), ont été testés en l'absence ou en présence d'ICI192,605 (10⁻⁹ mol/L) et/ou d'ibuprofène (3.10⁻⁶ mol/L). Les variations de tension ont alors été enregistrées.

Agents pharmacologiques et produits chimiques

L'U-46619 a été obtenu chez Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA), l'ICI192,605 a été acheté chez Tocris Cookson Inc. (Ellisville, MO, USA), la XO (grade I de lait bovin), l'ibuprofène, l'indométacine et le N-2PIA ont été commandés chez Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada) et la solution de H₂O₂ a été achetée à la pharmacie publique du CHU Sainte-Justine. Les concentrations utilisées pour les drogues ont été choisies en accord avec les caractéristiques des agents pharmacologiques, des travaux précédents ou de la littérature

dans laquelle elles ont été rapportées pour efficaces [2;21]. Les concentrations d'H₂O₂ ont été choisies en fonction des doses efficaces décrites dans la littérature et d'observation chez les patientes atteintes de prééclampsie [10;25;26]. La solution de Krebs a été préparée comme suit : 118 mmol/L de NaCl, 1,18 mmol/L de MgSO₄, 1,18 mmol/L de KH₂PO₄, 2,5 mmol/L de CaCl₂, 4,65 mmol/L de KCl, 25 mmol/L de NaHCO₃ et 5,55 mmol/L de dextrose, pour un pH de 7,4. Le NaCl et le MgSO₄ ont été commandés chez Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada), les KCl, KH₂PO₄ et NaHCO₃ ont été obtenus de Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada), le dextrose a été acheté chez J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) et CaCl₂ a été commandé chez EMD Chemicals (Gibbstown, NJ, USA).

Analyses statistiques

Dans le but de déterminer la réponse maximale à l'agoniste (E_{max}) ainsi que la dose (ED_{50}) ou la concentration (EC_{50}) de la drogue produisant 50% de l' E_{max} , les courbes dose- et concentration-réponse ont été analysées par régression non-linéaire (Prism 5, GraphPad, San Diego, CA, USA). Le logarithme négatif d' ED_{50} ou d' EC_{50} (pD_2) a été utilisé pour estimer la sensibilité de l'agoniste, alors que l' E_{max} a été utilisée comme un indice de la réactivité des vaisseaux.

Toutes les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM). Des comparaisons multiples de la sensibilité moyenne ou de l' E_{max} ont été réalisées par une analyse de variance (ANOVA) suivie soit par un test Dunnett dans le but de comparer les effets de chaque bloqueur sur leur contrôle respectif, soit par un test Bonferroni afin de comparer les groupes expérimentaux entre eux. Finalement, un test T non-apparié a été utilisé pour évaluer les effets de l'ibuprofène, de l'indométacine, du N-2PIA et de H₂O₂ sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons. Les différences entre les groupes ont été considérées comme significatives quand elles atteignaient une probabilité d'erreur inférieure à 5% ($p \leq 0,05$).

Résultats

Effets de l'inhibition des COXs sur la réponse à U-46619 dans les cotylédons perfusés

Nous voulions déterminer si l'administration d'un mimétique de la TXA₂ induisait une activation de la voie enzymatique des prostanoïdes, plus particulièrement la libération d'une substance vasodilatatrice qui interfèrerait avec ses effets. Pour ce faire, nous avons mesuré les effets d'inhibiteurs non-sélectifs des COXs, soit l'indométacine (10 µmol/L) et l'ibuprofène (3 µmol/L), et d'un inhibiteur sélectif de COX-2, le N-2PIA (1 µmol/L), sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons placentaires perfusés.

La figure 2 montre que l'ibuprofène n'a pas eu d'effet sur la pression de perfusion basale dans les cotylédons (fig.2A). Une observation similaire a été faite avec l'indométacine et le N-2PIA (données non-montrées). Ceci suggère que les COXs ne sont pas activées à l'état basal dans les vaisseaux placentaires. L'ibuprofène (fig.2B), l'indométacine (fig.2C) et le N-2PIA (fig.2D) n'ont pas modifié la réponse à l'U-46619, autant la sensibilité que la réponse maximale. Ces résultats laissent supposer qu'une forte augmentation de la pression de perfusion n'entraîne pas d'activation des enzymes COXs, que ce soit pour diminuer la pression via la libération d'une substance vasodilatatrice ou pour accroître les effets du vasoconstricteur par la libération d'une substance vasoconstrictrice.

Effets de H₂O₂ sur la réponse à l'U-46619 dans les vaisseaux placentaires humains

Pour évaluer les effets du stress oxydatif sur la réponse à l'U-46619 dans les vaisseaux placentaires humains, le H₂O₂ a été additionné dans les bains des artères chorioniques (fig.3A) ou perfusée dans les cotylédons (fig.3B). La figure 3 ne révèle aucun effet de H₂O₂ sur les courbes concentration- et dose-réponse à la prostanoïde dans les artères chorioniques et les cotylédons respectivement (NS, test T de Student). Ces résultats suggèrent à première vue qu'un stress oxydatif aigu n'est pas en mesure de modifier la réponse au mimétique de la TXA₂.

Effets vasoactifs du stress oxydatif sur le lit vasculaire placentaire humain

L'effet direct du stress oxydatif sur la réactivité vasculaire a ensuite été mesuré en réalisant des courbes concentration- et dose-réponse au H₂O₂ dans les artères chorioniques et les cotylédons respectivement (fig.4). En plus de H₂O₂, nous avons ajouté une autre source de stress oxydatif dans la moitié des cas, soit la xanthine oxydase (XO). La figure 4

montre les effets de H_2O_2 sur la tension dans les artères chorioniques (fig.4A) et sur la pression de perfusion dans les cotylédons perfusés (fig.4B) en l'absence ou en présence de XO. Dans les artères chorioniques, H_2O_2 augmentait la tension, mais l'ajout de XO n'a pas significativement modifié ni la sensibilité des vaisseaux, ni la réponse maximale à H_2O_2 . Il semble donc que dans ces vaisseaux, la réponse engendrée par le stress oxydatif atteint un maximum qui n'est dépendant ni de l'intensité, ni de la nature de celui-ci. En revanche, dans les cotylédons, bien que nous n'ayons pas été en mesure de déterminer l' E_{max} dans chacune des courbes, l'ensemble des points de la courbe du groupe recevant uniquement H_2O_2 est significativement inférieur à celui du groupe recevant H_2O_2 combiné à la XO (test T de Student). Ceci est compatible avec une augmentation de la réponse des vaisseaux cotylédonaires en présence d'un stress oxydatif plus important.

Ensuite, les effets d'ICI192,605, un bloqueur spécifique des récepteurs TP, et de l'ibuprofène, un inhibiteur non-sélectif des COXs, sur la réponse à H_2O_2 ont été mesurés dans les artères chorioniques en l'absence ou en présence de XO (fig.5). La figure 5A représente les courbes concentration-réponse à H_2O_2 obtenues avec les artères n'ayant pas reçu de XO mais dont la solution de Krebs dans les bains était additionnée du bloqueur des récepteurs TP, de l'inhibiteur des COXs ou des deux antagonistes. L'analyse statistique sur la sensibilité à H_2O_2 (pD_2) n'a révélé aucun effet significatif des bloqueurs, utilisés seuls ou combinés (ANOVA). En revanche, la réponse maximale à H_2O_2 était significativement diminuée en présence de l'un ou l'autre des bloqueurs (tableau 1 ; ANOVA 1 facteur). L'inhibition était par ailleurs beaucoup plus importante avec le bloqueur des COXs qu'avec l'ICI192,605 ($p < 0.001$ et $p < 0,05$ respectivement, test de Dunnett). De plus, la réponse maximale à H_2O_2 était significativement diminuée en présence des deux bloqueurs combinés comparée à celle du groupe recevant uniquement le bloqueur des récepteurs TP (tableau 1 ; $p < 0,001$, test de Bonferroni). Ces résultats suggèrent que le stress oxydatif induit une vasoconstriction des artères chorioniques placentaires humaines via la voie des prostanoïdes. Aussi, il semble que les produits dérivés de l'activation des COXs contribuent de façon importante à cette réponse puisque l'addition d'un bloqueur des récepteurs TP à l'ibuprofène ne change pas significativement la réponse à H_2O_2 (n.s., test de Bonferroni).

Des résultats semblables ont été obtenus avec les quatre groupes recevant la XO (fig.5B). La sensibilité des vaisseaux à H_2O_2 n'est pas modifiée par l'ajout des inhibiteurs. La présence des bloqueurs diminuait significativement la réponse maximale à H_2O_2 (ANOVA 1

facteur). Cependant, la diminution de E_{max} n'était pas significative en présence de ICI192,605. Encore là, la réponse à H_2O_2 était significativement diminuée de façon similaire en présence d'ibuprofène et d'ibuprofène additionné de ICI192,605. Ces résultats supportent l'observation que les récepteurs TP n'interviennent que faiblement dans la réponse engendrée par H_2O_2 , alors que les dérivés de l'AA jouent un rôle important dans l'augmentation de tension générée par le stress oxydatif.

Nous avons réalisé la même expérience avec des cotylédons placentaires perfusés (fig.6). La figure 6A présente les résultats obtenus en l'absence de XO. Bien que l'analyse statistique des courbes dans leur ensemble ne nous permette pas de tirer des conclusions pertinentes des résultats obtenus (tableau 1), la comparaison de la réponse engendrée par la dose maximale de H_2O_2 utilisée (10^{-1} mol/L) pour chaque groupe révèle que les observations faites dans les cotylédons sont similaires à celles obtenues dans les artères chorioniques. En effet, l'utilisation des bloqueurs, seuls ou combinés, réduisait de façon très significative la réponse à la dose maximale de H_2O_2 dans les cotylédons (tableau 2, ANOVA 1 facteur). Cependant, à l'inverse de ce qui était observés dans les artères chorioniques, le bloqueur des récepteurs TP et celui des COXs engendraient une inhibition de semblable importance. De plus, l'inhibition n'était pas amplifiée par l'utilisation des bloqueurs en combinaison (n.s., test de Bonferroni).

Ici aussi, des résultats semblables ont été obtenus en présence de XO (fig.6B). En effet, la présence des bloqueurs diminuait significativement et de façon similaire l' E_{max} à H_2O_2 (tableau 1 ; ANOVA 1 facteur suivi d'un test de Dunnett), de même que la réponse à la dose maximale utilisée (tableau 2 ; ANOVA 1 facteur). Encore une fois, il n'y a pas de différence significative entre la réponse obtenue en réponse à la dose maximale de H_2O_2 en présence des bloqueurs combinés et celle du groupe ne recevant que le bloqueur des récepteurs TP (n.s., test de Bonferroni). Même si la XO augmentait la réponse à H_2O_2 (fig.4) dans le groupe contrôle, la XO n'avait aucun effet sur la réponse à H_2O_2 dans les groupes recevant les bloqueurs. Ainsi, les résultats obtenus dans les cotylédons appuient ceux obtenus dans les artères chorioniques, et suggèrent qu'un stress oxydatif induit dans le placenta initie la libération de prostanoides. De plus, il semble que dans les cotylédons, les prostanoides dérivées de l'activation des COXs véhiculent essentiellement leurs effets via l'activation des récepteurs TP puisque l'inhibition de la réponse à H_2O_2 est similaire en présence de l'un ou l'autre des bloqueurs utilisés.

Discussion

Dans cette étude, nous avons tenté de vérifier, d'une part, si une forte augmentation de pression dans les cotylédons entraînait la libération d'un agent vasodilatateur dérivé de l'AA pouvant contrebalancer la vasoconstriction observée ; et d'autre part, si le stress oxydatif possédait des propriétés vasoactives impliquant le métabolisme de l'AA. Pour ce faire, nous avons utilisé des placentas humains obtenus après césarienne électorale de patientes normotensives ayant mené leur grossesse à terme. Nos résultats ont montré qu'une forte augmentation de tension ou de pression dans les artères chorioniques et les cotylédons respectivement n'entraînait pas la libération de substances dérivées de l'AA capables de jouer la contrepartie vasodilatatrice, ce qui ne supporte pas notre première hypothèse. Par ailleurs, bien qu'il n'ait eu aucun effet sur la réponse à l'U-46619, les présentes observations révèlent que l'induction d'un stress oxydatif dans les vaisseaux placentaires est à l'origine d'une forte vasoconstriction, qui semble être le résultat d'une libération de prostanoïdes essentiellement dérivées de l'activation des COXs, ce qui vient confirmer notre seconde hypothèse.

Les résultats présentés ici ont démontré que ni COX-1, ni COX-2, n'étaient activées en réponse à une forte augmentation de pression dans les cotylédons placentaires perfusés *in vitro*. Les études réalisées jusqu'à présent par d'autres investigateurs sont en accord avec nos observations. En effet, Cruz et al. [27] ont rapporté que l'indométacine n'avait d'effet ni sur la réponse à la sérotonine dans les artères chorioniques, ni sur celle à l'endothéline dans les cotylédons [28]. Ainsi, les prostanoïdes vasodilatatrices ne semblent pas intervenir dans la régulation du tonus vasculaire placentaire lors d'une forte augmentation de la pression de perfusion.

Par ailleurs, la présente étude a montré que l'induction d'un stress oxydatif augmentait significativement la tension et la pression de perfusion dans les artères chorioniques et les cotylédons respectivement. De plus, il est apparu clair que ces augmentations étaient le résultat d'une activation des COX comme démontrée par la diminution significative de la réponse maximale à H₂O₂ engendrée par l'utilisation d'ibuprofène. À l'inverse de ce qui a été observé dans les cotylédons où les effets du bloqueur des récepteurs TP étaient similaires à ceux générés par l'ibuprofène, les récepteurs TP ne semblent contribuer que faiblement à la réponse des vaisseaux au stress

oxydatif. La présence des récepteurs EP ayant été montrée dans ces vaisseaux [2], il est possible que ceux-ci interviennent également dans l'augmentation de tension résultante du stress oxydatif. Nos observations sur l'effet vasoconstricteur de H_2O_2 correspondent à ce qui a été rapporté dans d'autres études, puisque H_2O_2 serait capable de contracter les aortes de rats WKY et SHR [20], les artères pulmonaires de lapin [21] et d'augmenter la pression dans les cotylédons humains perfusés [22]. Ceci se ferait par la production de TXA_2 . Bien que nos résultats nous permettent d'affirmer que les COXs sont activées par le stress oxydatif, nous n'avons pas été en mesure de démontrer un effet concret des isoprostanes dérivant de l'oxydation de l'AA par les ROS. Cependant, l'effet maximal de H_2O_2 tendait à diminuer dans toutes les préparations lors de l'utilisation des 2 bloqueurs comparés à celui du groupe ne recevant que l'ibuprofène. Il se pourrait donc que les isoprostanes interviennent faiblement dans la réponse des vaisseaux placentaires au stress oxydatif. Bien qu'une étude plus poussée soit nécessaire pour répondre à cette hypothèse, certains travaux le suggèrent. En effet, Walsh et al. [22] ont montré que l'administration de H_2O_2 était corrélée avec une augmentation du taux de peroxydes lipidiques et de TXA_2 dans les cotylédons placentaires humains. De même, les concentrations d'isoprostanes sont connues pour être augmentées dans les placentas de grossesses avec prééclampsie [29], qui sont le siège d'un stress oxydatif important [29;30]. Ainsi, il est fort probable que le stress oxydatif placentaire soit à l'origine d'une activation des COXs combinée à une augmentation de la production d'isoprostanes, ce qui pourrait expliquer pourquoi la génération des dérivés de l'AA, par les voies enzymatiques et non-enzymatiques, est modifiée dans les placentas de femmes atteintes de prééclampsie [29;31]. Finalement, l'absence d'effet de H_2O_2 sur la réponse à l'U-46619 dans les vaisseaux placentaires peut être due au fait que l'activation des COXs par le stress oxydatif produit une concentration négligeable de prostanoïdes comparée à la forte concentration (ou dose) d'U-46619 utilisée.

En résumé, nous avons montré 1) qu'une forte augmentation de la pression de perfusion dans les cotylédons perfusés *in vitro* n'entraîne pas d'activation des COXs et donc, que les prostanoïdes vasodilatatrices ne semblent pas être impliquées dans la régulation du tonus vasculaire placentaire, 2) que H_2O_2 ne modifie pas la réponse à l'U-46619 dans les vaisseaux placentaires, bien qu'il ait un effet vasoconstricteur dans ces tissus et, 3) que la vasoconstriction engendrée par le stress oxydatif est dépendante de l'activation des COXs.

Cependant, d'autres études sont nécessaires pour évaluer l'implication des isoprostanes dans la réponse au stress oxydatif dans les vaisseaux placentaires.

Remerciements

Nous remercions la Fondation des Maladies du Cœur du Québec pour son support financier. Nous remercions également les obstétriciens-gynécologues et le personnel médical de l'Unité des Naissances du CHU Sainte-Justine pour leur aide dans le recrutement des patientes et l'approvisionnement de tissus placentaires. Finalement, nous tenons à remercier toutes les mamans ayant généreusement participé à cette étude.

Références

- [1] Walker DW, McLean JR. Absence of adrenergic nerves in the human placenta. *Nature* 1971 Jan 29;229(5283):344-5.
- [2] Hausermann L, St-Louis J. Thromboxane and isoprostane share the same prostanoid receptors to increase human placental tone. *Placenta* 2011 Dec;32(12):941-8.
- [3] Woodworth SH, Li X, Lei ZM, et al. Eicosanoid biosynthetic enzymes in placental and decidual tissues from preeclamptic pregnancies: increased expression of thromboxane-A2 synthase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 May;78(5):1225-31.
- [4] Learmont JG, Poston L. Nitric oxide is involved in flow-induced dilation of isolated human small fetoplacental arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1996 Feb;174(2):583-8.
- [5] Walsh SW. Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004 Feb;70(2):223-32.
- [6] Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004 Oct;122(4):369-82.
- [7] Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol* 2003 Jan;162(1):115-25.
- [8] Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000 Dec;157(6):2111-22.
- [9] Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JA, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol Res* 2006;39(2):229-36.
- [10] Dordevic NZ, Babic GM, Markovic SD, et al. Oxidative stress and changes in antioxidative defense system in erythrocytes of preeclampsia in women. *Reprod Toxicol* 2008 Feb;25(2):213-8.
- [11] Harsem NK, Braekke K, Staff AC. Augmented oxidative stress as well as antioxidant capacity in maternal circulation in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006 Sep;128(1-2):209-15.
- [12] Mehendale S, Kilari A, Dangat K, Taralekar V, Mahadik S, Joshi S. Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2008 Mar;100(3):234-8.
- [13] Robertson WB. Uteroplacental vasculature. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1976;10:9-17.

- [14] Hirano H, Imai Y, Ito H. Spiral artery of placenta: development and pathology-immunohistochemical, microscopical, and electron-microscopic study. *Kobe J Med Sci* 2002 Apr;48(1-2):13-23.
- [15] Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY. *Williams obstetrics*. 23rd ed. ed. New York : McGraw-Hill Medical, 2010.
- [16] Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011 Jun;25(3):287-99.
- [17] Hung TH, Burton GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006 Sep;45(3):189-200.
- [18] Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Dec;87(23):9383-7.
- [19] Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, et al. Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J Biol Chem* 1994 Feb 11;269(6):4317-26.
- [20] Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salaices M, Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol* 1998 Nov;125(6):1329-35.
- [21] Tate RM, Morris HG, Schroeder WR, Repine JE. Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline-perfused rabbit lungs. *J Clin Invest* 1984 Aug;74(2):608-13.
- [22] Walsh SW, Wang Y, Killian A. AA-2414, an antioxidant and thromboxane receptor blocker, completely inhibits peroxide-induced vasoconstriction in the human placenta. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Jul;290(1):220-6.
- [23] Schneider H, Panigel M, Dancis J. Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine. *Am J Obstet Gynecol* 1972 Nov 15;114(6):822-8.
- [24] Bertrand C, Duperron L, St-Louis J. Umbilical and placental vessels: modifications of their mechanical properties in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1993 May;168(5):1537-46.
- [25] Lucchesi PA, Belmadani S, Matrougui K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens* 2005 Mar;23(3):571-9.
- [26] Moreno JM, Rodriguez G, I, Wangenstein R, et al. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced vasoconstriction in the isolated perfused rat kidney. *J Physiol Pharmacol* 2010 Jun;61(3):325-32.

- [27] Cruz MA, Gonzalez C, Gallardo V, Albornoz J, Munoz ME, Lagos M. Endothelial modulation of vascular tone and 5-hydroxytryptamine-induced responses in human chorionic arteries and veins. *Gen Pharmacol* 1995 Nov;26(7):1571-7.
- [28] Gude NM, King RG, Brennecke SP. Autacoid interactions in the regulation of blood flow in the human placenta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998 Sep;25(9):706-11.
- [29] Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J* 2000 Jul;14(10):1289-96.
- [30] Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol* 2000 Jan;156(1):321-31.
- [31] Walsh SW, Wang Y. Trophoblast and placental villous core production of lipid peroxides, thromboxane, and prostacyclin in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Jun;80(6):1888-93.

Légende des figures

Figure 1 : Courbe débit-pression dans les cotylédons perfusés in vitro. Cette expérience a été réalisée pour déterminer le débit de perfusion à utiliser dans les cotylédons placentaires humains pour des réponses optimales lors des expérimentations (n = 6).

Figure 2 : Effets des inhibiteurs des COXs sur la pression de perfusion de base et sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons placentaires humains. (A) Pression de perfusion de base dans les cotylédons en l'absence (colonne noire) ou en présence (colonne blanche) d'ibuprofène. Courbes dose-réponse à l'U-46619 en l'absence (●) ou en présence (□) (A) d'ibuprofène (n = 8 et 9 respectivement), (B) d'indométacine (n = 9 pour chacun des groupes) ou (C) de N-2PIA (n = 9 pour chacun des groupes).

Figure 3 : Effets du peroxyde d'hydrogène sur la réponse à l'U-46619. (A) Courbes concentration-réponse à l'U-46619 dans les artères chorioniques en l'absence (●) ou en présence de $3 \cdot 10^{-5}$ mol/L (□), 10^{-4} mol/L (△) ou $3 \cdot 10^{-4}$ mol/L (▽) de H_2O_2 (n = 10 dans chaque groupe). (A) Courbes dose-réponse à l'U-46619 en l'absence (●) ou en présence (△) de 10^{-4} mol/L de H_2O_2 (n = 10 dans chaque groupe).

Figure 4 : Effets du peroxyde d'hydrogène sur la tension dans les artères chorioniques et sur la pression de perfusion dans les cotylédons. (A) Courbes concentration-réponse à H_2O_2 dans les artères chorioniques placentaires en l'absence (●) et en présence (○) de xanthine oxydase (n = 14 et 13 respectivement). Courbe dose-réponse à H_2O_2 dans les cotylédons perfusés en l'absence (●) et en présence (○) de xanthine oxydase (XO)(n = 10 et 11 respectivement).

Figure 5 : Effets du peroxyde d'hydrogène sur la tension dans les artères chorioniques. Courbes concentration-réponse à H_2O_2 en l'absence (●) ou en présence d'ICI192,605 1 nmol/L (■), d'ibuprofène 3 μ mol/L (▲) ou des deux (▼), sans (B)(n = 14, 13, 13 et 12 respectivement) ou avec (C)(n = 13 pour chaque courbe excepté pour les bloqueurs combinés où n = 12) xanthine oxydase (XO, 0,02 U/mL).

Figure 6 : Effets du stress oxydatif sur la pression de perfusion dans les cotylédons. Courbes dose-réponse à H_2O_2 en l'absence (●) ou en présence d'ICI192,605 1 nmol/L (■), d'ibuprofène 3 $\mu\text{mol/L}$ (▲) ou des deux (▼), sans (B)(n = 10 pour chaque courbe excepté pour celle des deux bloqueurs combinés où n = 9) ou avec (C)(n = 10, 9, 8 et 9 respectivement) xanthine oxydase (XO, 0,02 U/mL).

Tableau 1

Réponses maximales obtenues suite à la stimulation par H₂O₂ dans les artères chorioniques et les cotylédons placentaires perfusés.

	Contrôle	ICI192,605	Ibuprofène	ICI + Ibu
<u>Artères Chorioniques</u>				
H ₂ O ₂	1,8 ± 0,1 (14)	1,3 ± 0,2*(13)	0,7 ± 0,2*** (13)	0,29 ± 0,1*** ^a (12)
H ₂ O ₂ + XO	1,4 ± 0,1 (13)	1,3 ± 0,2 (13)	0,9 ± 0,2*(13)	0,5 ± 0,2*** ^b (12)
<u>Cotylédons</u>				
H ₂ O ₂	31 ± 7 (10)	10 ± 15 (10)	12 ± 5 (10)	- (9)
H ₂ O ₂ + XO	45 ± 13 (9)	10 ± 3**(9)	6 ± 2**(8)	- (9)

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, pour les valeurs comparées à leur contrôle respectif.

^ap<0,001 pour les valeurs comparées au groupe recevant ICI192,605 et ^bp<0,001 pour les valeurs comparées au groupe recevant ICI192,605 additionné de xanthine oxydase.

Tableau 2

Variation de la pression de perfusion moyenne engendrée par une dose de 10^{-1} mol/L de H_2O_2 dans les cotylédons placentaires perfusés.

	Contrôle	ICI192,605	Ibuprofène	ICI + Ibu
H₂O₂	27,8 ± 4,1(10)	10,2 ± 1,9***(10)	11,1 ± 3,7**(10)	5,4 ± 2,1***(9)
H₂O₂ + XO	43,6 ± 10,8(10)	10,1 ± 2,0**(9)	10,1 ± 3,4**(8)	5,0 ± 1,8***(9)

p<0,01, *p<0,001 pour les valeurs comparées à leur contrôle respectif. Le nombre de cotylédons utilisés pour chaque groupe est donné entre parenthèse.

Figure 1

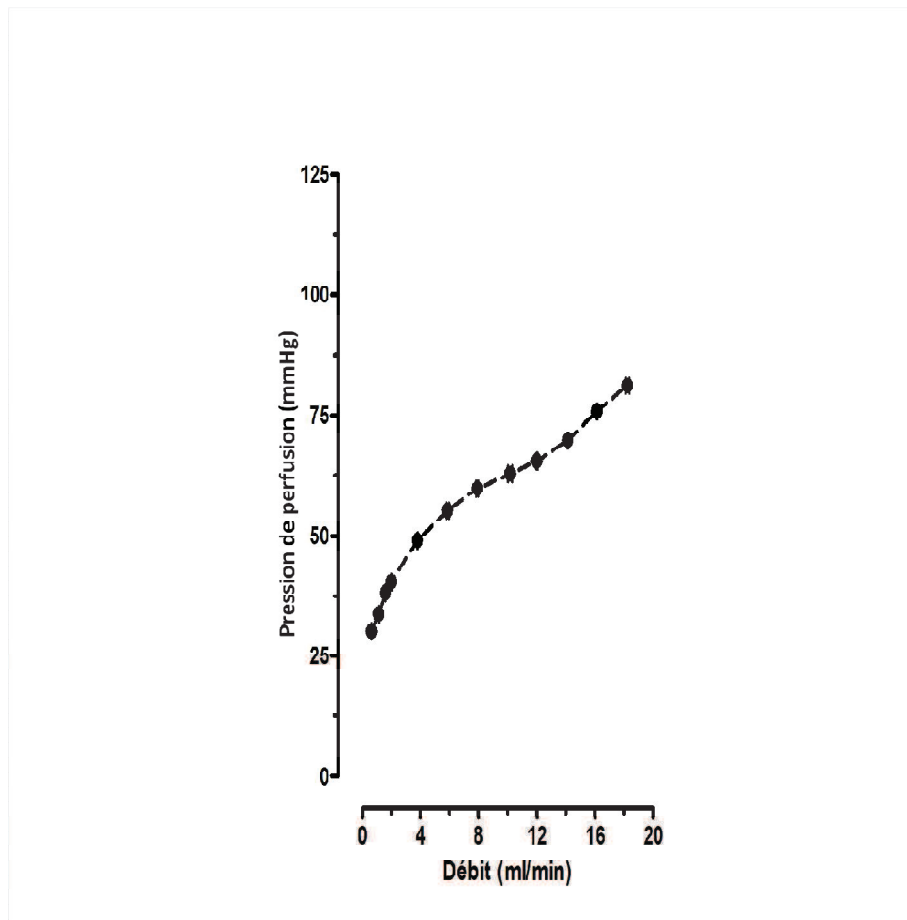


Figure 2

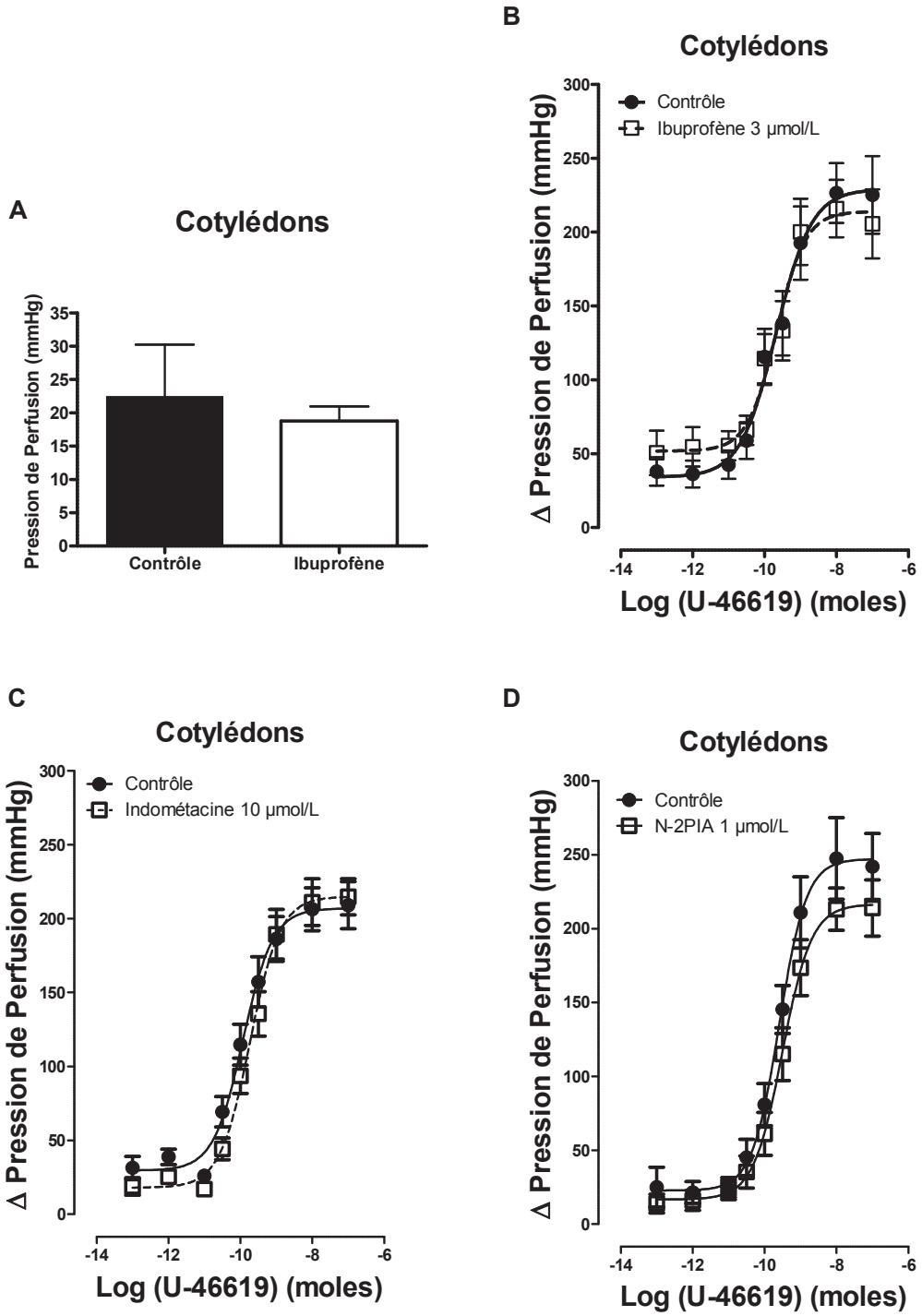


Figure 3

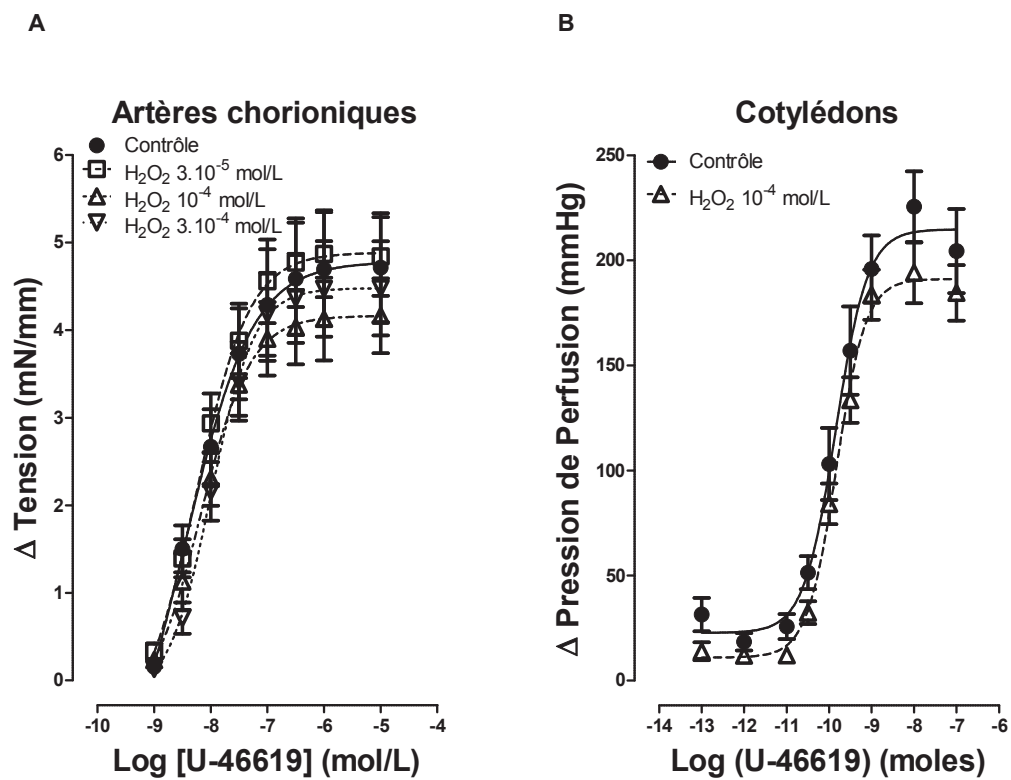


Figure 4

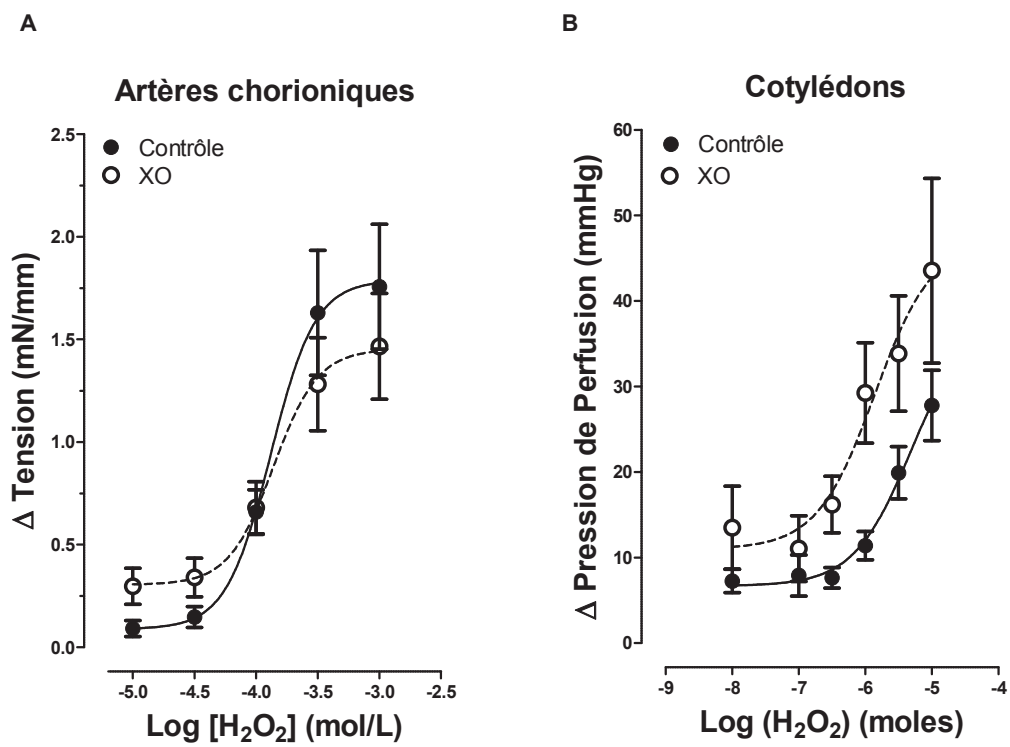


Figure 5

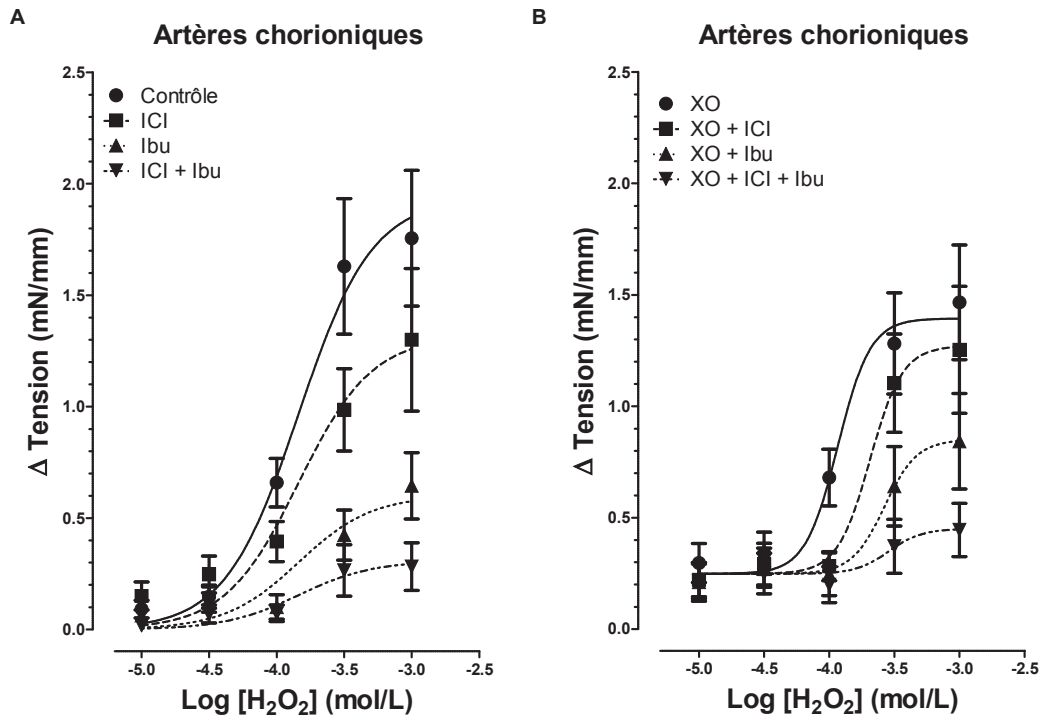
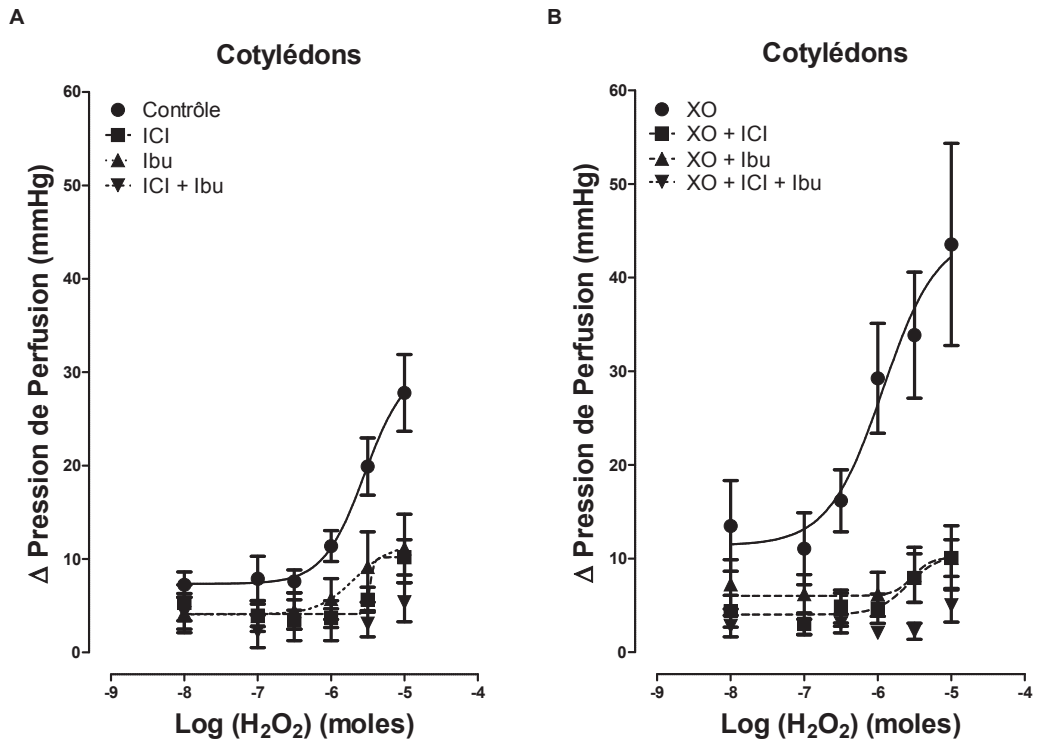


Figure 6



CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE

La grossesse s'accompagne de nombreux changements hémodynamiques menant à une chute paradoxale de la pression artérielle [66-71]. L'absence de ces modifications peut résulter en une condition physiopathologique, la prééclampsie, caractérisée par l'apparition d'une hypertension gestationnelle et une protéinurie [284]. De nos jours, il n'existe aucun traitement médicamenteux et seul le retrait du placenta mène à une disparition complète des symptômes, suggérant un rôle central de ce dernier dans la maladie. De plus, l'implantation placentaire est souvent inadéquate, surtout dans les cas de prééclampsie précoce, et le placenta est généralement le siège d'un stress oxydatif élevé accompagné d'une production accrue des prostanoides [223;278;279].

Le placenta est totalement dépourvu d'innervation autonome [21], ce qui implique un tonus vasculaire placentaire entièrement sous le contrôle de facteurs humoraux et tissulaires. De nos jours, on ignore encore l'identité de ces agents, bien que de nombreuses substances vasoactives aient été démontrées ayant des effets sur les vaisseaux placentaires [27;30;33]. Parmi elles, les prostanoides se sont révélées très puissantes dans la vascularisation placentaire, où le mimétique stable de la TXA_2 , l'U-46619, peut augmenter la pression de perfusion cotylédonaire de presque 200 mmHg [27]. Ceci, associé au fait que la voie métabolique de l'AA semble perturbée dans les placentas de prééclampsie, nous laisse supposer que les prostanoides font partie des molécules endogènes qui contrôlent le tonus vasculaire placentaire.

Afin d'évaluer le rôle des prostanoides dans le contrôle de la circulation placentaire, nous avons utilisé deux modèles différents, les cotylédons placentaires perfusés *in vitro* et l'artère chorionique en bain à organe isolé. Le premier nous a permis d'étudier les effets globaux des prostanoides sur la résistance périphérique du placenta. La seconde, en revanche, a permis d'étudier l'action localisée de ces substances puisqu'on utilise seulement un des nombreux types de vaisseaux sanguins que l'on retrouve dans les placentas. La TXA_2 est une substance très instable. Alors, nous avons utilisé l'U-46619, un mimétique beaucoup plus stable. Parallèlement, le stress oxydatif placentaire ayant été démontré chez les patientes avec prééclampsie [278;279], nous avons évalué l'effet des isoprostanes qui en résultent, en l'occurrence, la 8-isoprostaglandine E_2 , une des plus puissantes isoprostanes

sur la veine ombilicale humaine [190]. Ainsi, les premiers résultats présentés [285] corroborent les études mettant en évidence le puissant effet vasoconstricteur de l'U-46619 dans les cotylédons [27] et dans les artères chorioniques [23;286] humaines. De plus, les résultats démontrent que bien que les artères placentaires soient moins sensibles à l'isoprostane, ils y sont tout autant réactifs. En effet, l'augmentation de la pression de perfusion dans les cotylédons et de la tension dans les artères était similaire pour les deux agents. L'effet vasoconstricteur de la 8-isoPGE₂, démontré ici, est supporté par d'autres études rapportant une action comparable dans l'artère [199] et la veine [190] ombilicales humaines et, il laisse supposer que les isoprostanes issues du stress oxydatif placentaire accompagnant la prééclampsie pourraient perturber la circulation fœto-placentaire en la contractant, ce qui pourrait avoir des effets délétères sur le bon développement du fœtus.

Par la suite, nous avons identifié les récepteurs impliqués dans les réponses observées. L'U-46619 étant un mimétique de la TXA₂ et la 8-isoPGE₂ étant un dérivé de la PGE₂, nous avons porté notre attention sur les récepteurs TP et EP. Nos études utilisant des antagonistes sélectifs des ces récepteurs, soit le SQ29,548 et l'ICI192,605 (antagonistes des TP) et l'AH6809 (antagoniste des EP), supportent la présence des récepteurs aux prostanoïdes étaient présents dans les vaisseaux placentaires humains. Ceci est en accord avec les études montrant la présence des récepteurs TP dans les cotylédons placentaires [201;287]. Ainsi, il apparaît que, dans le placenta humain, les prostanoïdes ne sont pas attirées à un récepteur particulier, mais sont au contraire capables d'agir sur l'un ou l'autre des récepteurs, en l'occurrence les TP et EP [285]. Ces résultats sont intéressants car bien que la 8-isoPGE₂ soit connue pour agir sur différents récepteurs des prostanoïdes [190;199], cela n'a, à notre connaissance, pas été rapporté pour l'U-46619 qui, dans une étude réalisée par Sametz et al. [193], semble en mesure de n'agir que sur les récepteurs TP dans d'autres muscles lisses tels que le fundus gastrique de rat et l'iléum de cochon d'Inde. Bien que les expériences comparatives manquent quant à l'action d'U-46619 sur les récepteurs EP dans le placenta, il a été montré que la 8-épiPGF_{2α}, une isoprostane, était capable d'agir sur les récepteurs TP placentaires [201]. La différence entre nos résultats et ceux de Sametz et al. pourrait donc s'expliquer par la nature des tissus utilisés [193]. D'autre part, la classification des récepteurs des prostanoïdes décrit l'AH6809 comme étant un antagoniste sélectif des

récepteurs EP₁ [121]. Ceci suggère que le récepteur EP₁ pourrait être impliqué dans les réponses observées ici et donc qu'il serait présent dans les vaisseaux sanguins placentaires humains. Les 4 sous-types de récepteurs EP ont été rapportés être présents dans les membranes fœtales et le tissu villositaire placentaire [288]. Bien que nos observations suggèrent une implication du récepteur EP₁, d'autres études sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse et déterminer si les autres sous-types du récepteur EP sont également présents dans les vaisseaux placentaires. En revanche, elles pourraient fournir quelques informations sur les mécanismes utilisés par les récepteurs pour exercer leurs actions. Les récepteurs aux prostanoïdes sont des récepteurs couplés aux protéines G. Dans le cas du récepteur TP, de nombreuses protéines G ont été rapportées y être couplées (tableau 1). Or, la ou les protéines G couplées au récepteur EP₁ n'ont, à l'heure actuelle, pas encore été clairement définies. L'activation du récepteur TP peut mener soit à une augmentation de l'AMPc par activation d'une adénylate cyclase par l'implication d'une protéine G_s, soit à une augmentation du calcium libre intracellulaire et d'IP₃ suivant l'activation d'une PLC [142;144;145;147], caractéristique d'un couplage avec les protéines G_{q/11}. Récemment, on a rapporté que l'activation des récepteurs EP₁ pourrait être à l'origine d'une augmentation d'IP₃ suite à l'activation d'une PLC [148;149]. En utilisant le bloqueur des récepteurs TP combiné au bloqueur des récepteurs EP, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'inhibition de la réponse à l'U-46619 par rapport à l'utilisation des bloqueurs utilisés séparément. Ces observations suggèrent que, dans le placenta, les récepteurs TP et EP₁ sont couplés à la même protéine G, probablement une G_{q/11}. À notre connaissance, cette problématique n'a pas encore été décrite dans la littérature. De plus, même s'ils activent la même protéine G, les mécanismes de signalisation cellulaire induits par l'activation de celle-ci, pourraient différer entre les récepteurs TP et EP, leur conférant des propriétés qui leur sont propres selon le concept de sélectivité fonctionnelle des récepteurs. En effet, il est maintenant établi que les voies de transduction du signal cellulaire peuvent être activées sélectivement en fonction de l'agoniste activant le récepteur couplé à une protéine G [289]. Par conséquent, bien qu'ils semblent en mesure d'agir sur l'un ou l'autre des récepteurs, U-46619 et la 8-isoPGE₂, de même que les agonistes naturels comme la TXA₂, pourraient activer des mécanismes de signalisation cellulaire différents.

Pour vérifier si des substances vasodilatatrices étaient libérées suite à des augmentations de pression, nous avons testé les effets d'un inhibiteur des NOSs, le L-NAME, sur la réponse induite par l'U-46619 dans la circulation placentaire. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un quelconque rôle protecteur du NO, ni en réponse à l'augmentation de la pression de perfusion dans les cotylédons, ni en réponse à une augmentation de tension localisée aux artères chorioniques. Ces observations sont quelque peu contradictoires des données de la littérature montrant que le NO pouvait atténuer les effets vasoconstricteurs de l'U-46619 dans les cotylédons placentaires humains perfusés *in vitro* [290;291]. Nous avons perfusé le L-NAME avant l'induction de la contraction par l'U-46619, alors que Myatt et al. [290] commencent par contracter la préparation placentaire avec l'U-46619, puis additionnent les inhibiteurs des NOS, le NMMA (N^G-monométhyl-L-arginine) ou le NLA (N^G-nitro-L-arginine), différents du L-NAME que nous avons utilisé. De plus, ils utilisent une infusion constante de 10⁻⁸ mol/L d'U-46619, alors que nous avons effectué des courbes dose-réponse, en bolus (0,1 mL) d'U-46619. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'établissement d'un mécanisme de défense lorsque qu'il y a perturbation constante de la circulation fœto-placentaire sur une plus « longue » période (travaux de Myatt), ce qui ne serait pas le cas lors de perturbations plus « aiguës » comme nous l'avons observé. Cependant, la plupart des études rapportent des résultats comparables à ceux obtenus par Myatt [292-294]. Néanmoins, en utilisant un protocole comparable au nôtre et de la N^ω-nitro-L-arginine, il a été observé que l'inhibition des NOSs augmente la résistance vasculaire basale et la réponse à la sérotonine dans les artères chorioniques, alors qu'elle n'a aucun effet dans les veines, suggérant ici aussi un rôle du NO dans le tonus artériel fœto-placentaire [294]. Or, deux études ont révélé que le L-NAME n'avait d'effet ni sur le tonus basal, ni sur le tonus après contraction à la sérotonine ou à l'U-46619 dans les vaisseaux ombilicaux [295] ou dans les vaisseaux omentaux [296] humains respectivement. Il a été montré que le L-NAME était beaucoup plus sélectif pour les NOS constitutives (eNOS et nNOS) que pour la NOS inductible [297]. Cependant, même si les inhibiteurs des NOSs utilisés dans les autres études ont une affinité pour la iNOS plus forte que celle du L-NAME, ils sont néanmoins, comme le L-NAME, plus sélectifs pour les NOS constitutives. Malheureusement, nous ignorons quelle isoenzyme est impliquée dans les réponses

observées et il est impossible d'affirmer que la différence d'affinité pour iNOS existante entre les différents inhibiteurs soit suffisante pour expliquer la différence entre nos résultats et ceux des autres équipes. Learmont et Poston [248] ont montré que dans les petites artères fœto-placentaires, la dilatation induite par le flot était le résultat d'une libération de NO, suggérant une implication de celui-ci dans le maintien d'une faible résistance vasculaire. D'autant plus que l'expression d'eNOS est modifiée de différentes façons dans les placentas de prééclampsie [249;252;253], suggérant encore une fois que le NO joue un rôle important dans le maintien de la fonction placentaire, même si ce rôle n'est pas encore clairement déterminé.

Nous avons utilisé 3 agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens : l'indométacine et l'ibuprofène, deux inhibiteurs non-sélectifs des COXs et le N-2PIA, un inhibiteur sélectif de la COX inducible, COX-2. Aucun des trois inhibiteurs n'a démontré d'effet sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons placentaires perfusés *in vitro*. Ces résultats suggèrent qu'une forte vasoconstriction des vaisseaux placentaires n'induit pas d'activation des COXs et encore moins la libération d'une prostaglandine vasodilatatrice capable de contrecarrer les effets de l'U-46619. Nos observations sont en accord avec ceux d'autres investigateurs dont les études n'ont révélé aucun effet de l'indométacine sur la réponse à la sérotonine dans les vaisseaux chorioniques [294] ou à l'endothéline dans les cotylédons perfusés [293]. Une autre étude a démontré un effet inhibiteur du méclofenamate, un anti-inflammatoire non-stéroïdien, sur la réponse à l'U-46619 dans les cotylédons humains perfusés [298]. Cependant, le méclofenamate et l'indométacine auraient la capacité d'inhiber la liaison de l'agoniste au récepteur TP, bien que le blocage de la liaison de l'agoniste à son récepteur par l'indométacine a été rapporté être 12 fois moins puissant que celui du méclofenamate. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé d'inhibition de la réponse au vasoconstricteur par cet inhibiteur. Les résultats disponibles ne suggèrent donc aucunement que les prostaglandines vasodilatatrices puissent intervenir de façon significative dans la régulation du tonus vasculaire placentaire, même si les vaisseaux placentaires sont sensibles à la PGI₂ [299].

Étant donné que les isoprostanes possèdent de puissants pouvoirs vasoconstricteurs dans la circulation placentaire [285]) et que leurs niveaux placentaires

sont augmentés dans les placentas de patientes avec prééclampsie [278], leur action vasoactive pourrait s'en trouver modifiée dans les vaisseaux placentaires de grossesse compliquée par la prééclampsie. Nous avons comparé les réponses vasculaires aux prostanoïdes (U-46619 et 8-isoPGE₂) dans les artères chorioniques de placentas de grossesses normotensives et compliquées par la prééclampsie dont les patientes ont accouché à terme ou prématurément, par voie vaginale ou délivrée par césarienne. Le type de délivrance n'affecte pas la réactivité et la sensibilité des vaisseaux placentaires aux prostanoïdes. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature [286;300].

Nos résultats ont démontré que la maladie n'affectait pas la sensibilité des artères chorioniques aux prostanoïdes. En revanche, la réponse maximale aux prostanoïdes a été substantiellement modifiée et ce, de façon opposée pour les 2 agonistes. En effet, les artères chorioniques de placentas obtenus après prééclampsie répondaient plus fortement à l'U-46619 et moins fortement à la 8-isoPGE₂. Nos observations pour l'U-46619 diffèrent de ceux d'autres investigateurs obtenus dans les cotylédons placentaires perfusés [27;301] et dans les petites artères du plateau chorionique [23]. Ils ont montré une réponse réduite au vasoconstricteur dans les groupes avec prééclampsie. En revanche, Kwek et al. [201] n'ont rapporté aucun effet de la prééclampsie sur la réponse à l'U-46619 et la 8-épiPGF_{2α} dans les artères chorioniques de conductance (1,5 à 2,5 mm), alors que dans les artères chorioniques de résistance (200 à 600 μm de diamètre), la prééclampsie diminuait significativement la réponse à la 8-épiPGF_{2α}, ce qui est en accord avec nos observations; par contre, dans la maladie la réponse à l'U-46619 n'a pas été significativement altérée. Les différences entre les diverses études pourraient s'expliquer par la nature des tissus utilisés, les premiers utilisaient des artères placentaires de résistance et nous des artères chorioniques. Bien que les résultats soient quelque peu contradictoires en ce qui a trait à la réactivité des vaisseaux placentaires à l'U-46619, ceux concernant les isoprostanes sont semblables et, malgré les différences, les études s'accordent à dire que la prééclampsie modifie, dans tous les sens, la réponse aux prostanoïdes dans le placenta.

D'autre part, la prééclampsie ne semble pas être la seule à jouer un rôle dans la réactivité des vaisseaux placentaires. Effectivement, nos résultats ont démontré que les vaisseaux placentaires de prématurés étaient plus réactifs aux prostanoïdes comparés à

ceux de placentas obtenus à terme. Il semble donc que la réactivité vasculaire placentaire aux prostanoïdes réduit avec l'avancement de la grossesse. La baisse de réactivité des vaisseaux pourrait être le résultat de l'auto-régulation négative des récepteurs aux prostanoïdes pour favoriser la dilatation des vaisseaux placentaires afin de combler les besoins grandissants du fœtus. Toutefois, dans les placentas de grossesse compliquée par la prééclampsie, la réactivité aux isoprostanes est réduite, alors que la réponse maximale à l'U-46619 est augmentée. Cette baisse de réactivité aux isoprostanes pourrait être le résultat d'un mécanisme normal d'une auto-régulation négative des récepteurs en réponse à la forte production d'isoprostanes observée dans ces placentas. À l'inverse, ce mécanisme de protection serait absent pour les récepteurs TP, compromettant ainsi la perfusion placentaire et donc le développement fœtal.

Les raisons d'une telle modification de la réactivité placentaires aux prostanoïdes peuvent être multiples. Par exemple, il est fort probable que la régulation de l'expression des récepteurs aux prostanoïdes soit impliquée [285]. De plus, il se pourrait que le stress oxydatif contribue au phénomène de régulation des récepteurs, puisque plusieurs études ont mis en évidence le rôle des espèces radicalaires dans la régulation des récepteurs TP dans divers types cellulaires. En effet, il a été démontré que, contrairement à l'auto-régulation négative classique des récepteurs couplés aux protéines G normalement observée après leur stimulation, l'activation des récepteurs TP $_{\alpha}$ peut générer des ROS, qui eux entraînent une auto-régulation positive du récepteur dans les cellules HEK293 et de muscle lisse vasculaire des aortes humaine et murine [302]. Dans cette étude, la génération de ROS serait la conséquence d'une activation des NADPH oxydases, qui pourraient induire la formation d'isoprostanes suite la génération d'O $_2^{\bullet-}$ et NO [303]. Ces isoprostanes ont été rapportées pouvoir agir sur les récepteurs TP [193;285;302] et possiblement augmenter la génération de ROS à leur tour, fermant ainsi la boucle. D'autre part, les ROS produits par l'activation des récepteurs TP ne semblent pas être les seuls responsables de la régulation à la hausse des récepteurs puisqu'il apparaît que, dans les cellules COS-7, le H $_2$ O $_2$ exogène a les capacités de stabiliser le récepteur TP $_{\beta}$. En effet, Valentin et al. [304] ont montré que, dans ces cellules, le stress oxydatif participait à la maturation et à la stabilisation d'une réserve intracellulaire instable de récepteurs TP $_{\beta}$, en favorisant leur translocation du

réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi. Ceci aurait alors comme conséquence une augmentation de la densité des récepteurs à la membrane. Une observation semblable a été faite dans les cellules HEK293, où les investigateurs ont montré que H_2O_2 augmentait l'expression des récepteurs TP_β à la membrane en inhibant leur internalisation après stimulation, favorisant l'idée d'une stabilisation du récepteur par le stress oxydatif [305]. La même équipe a démontré que ce phénomène était observé aussi avec les récepteurs FP, mais pas sur les récepteurs EP_3 et EP_4 . Ces différences sur la stabilisation des récepteurs pourraient expliquer les différences observées entre la réponse à l'U-46619 et celle à l'isoprostane dans les artères de grossesses prééclamptiques. Ainsi, la réponse augmentée à l'U-46619 dans ces vaisseaux pourrait être le résultat d'une augmentation de la densité des récepteurs TP membranaires générée par la présence du stress oxydatif, alors que la diminution de réponse à la 8-isoPGE2 pourrait être le résultat d'une diminution de l'expression des récepteurs EP à la membrane, qui pourrait être caractéristique à la prééclampsie ou la conséquence de l'action d'un autre facteur, peut être le stress oxydatif également. Aussi, ces observations étant centrées sur le récepteur TP_β , il faudrait déterminer si ce sous-type de récepteur est exprimé dans les vaisseaux placentaires. En outre, l'effet pro-oxydatif de l'activation des récepteurs TP semble relativement généralisé puisqu'il a également été rapporté dans les cellules du muscle lisse vasculaire de l'aorte de rat [306], ainsi que dans les reins de rates $ApoE^{-/-}$ diabétiques où un antagoniste des récepteurs TP pouvait diminuer la néphropathie induite par le stress oxydatif [307]. De même, il a été montré dans les segments d'artères pulmonaires, ainsi que dans les cellules endothéliales et du muscle lisse vasculaire des artères pulmonaires de porc, que l'U-46619 augmentait la formation d' $O_2^{\bullet-}$ en agissant sur l'expression/activation de la NADPH oxydase, alors que l'analogue de la PGI_2 , l'iloprost, entraînait le phénomène inverse en inhibant l'induction par l'U-46619 de l'expression de la gp91^{phox}, sous-unité catalytique active de la NADPH oxydase, et donc la formation d' $O_2^{\bullet-}$, suggérant un rôle protecteur de la PGI_2 contre le stress oxydatif résultant de l'activation des récepteurs TP [303]. Ces observations pourraient expliquer la modification de réactivité aux prostanoides observée dans les artères de prééclampsie. Tout du moins, elles soulignent l'évidence d'une étroite relation

entre le stress oxydatif et la voie des prostanoides, ce qui pourrait être d'importance chez les patientes atteintes de prééclampsie.

Le stress oxydatif induisant la formation d'isoprostanes [114;115] et activant les COXs dans différents tissus [260-263], nous nous sommes intéressés aux effets éventuels que pourrait avoir la génération d'un stress oxydatif exogène sur le métabolisme de l'AA dans des placentas de grossesses normales. Les résultats obtenus ont montré que 1) le H₂O₂ exogène n'avait pas d'effet sur la réponse aux prostanoides dans les cotylédons et les artères chorioniques placentaires, 2) H₂O₂ induisait une contraction des vaisseaux cotylédonaires et chorioniques de façon dépendante de la dose ou de la concentration utilisée, 3) l'effet vasoconstricteur de H₂O₂ était diminué par l'inhibiteur des COXs et le bloqueur des récepteurs TP, bien qu'il semble que dans les artères chorioniques, les récepteurs TP contribuent plus faiblement que les COXs à la réponse à H₂O₂, et 4) l'augmentation du stress oxydatif avec la xanthine oxydase ne modifiait pas la réponse à H₂O₂, hormis dans les cotylédons où elle a augmenté la sensibilité des vaisseaux dans le groupe ne recevant aucun des bloqueurs. Le fait qu'une inhibition des COXs et un blocage des récepteurs TP diminuent significativement la réponse à H₂O₂ suggère que, dans les vaisseaux placentaires, l'effet vasoconstricteur initié par H₂O₂ est le résultat d'une activation de la voie enzymatique du métabolisme de l'AA. Aussi, l'intensité ou la nature du stress oxydatif ne semble avoir d'importance que dans certains vaisseaux puisque l'ajout de xanthine oxydase augmentait la réponse à H₂O₂ uniquement dans les cotylédons, comparés aux artères chorioniques où elle n'avait aucun effet. L'effet vasoconstricteur de H₂O₂ a été rapporté par de nombreuses équipes dans différents tissus [258-261], incluant les cotylédons placentaires humains [262]. Cependant, cet effet, bien que fréquemment relié à la production de TXA₂ [260-263] ne semble pas toujours véhiculé par les prostanoides, puisque certains auteurs rapportent une activation des PKC [259], une inhibition du NO [258] ou encore une activation de la p38-MAPK [257]. Notre étude ne nous permet pas de confirmer ou infirmer que les isoprostanes, produites par l'oxydation directe de l'AA par les ROS, interviennent dans la réponse des vaisseaux placentaires au stress oxydatif. Néanmoins, bien que non statistiquement significative, il semble que l'utilisation des deux bloqueurs combinés tendait à réduire la réponse maximale à H₂O₂ comparée au groupe

recevant l'ibuprofène seul. Une telle observation signifierait que des prostanoides, issues d'une autre voie que la voie enzymatique du métabolisme de l'AA et capables d'agir sur les récepteurs TP, pourraient participer à la vasoconstriction induite par le stress oxydatif. Or, nous avons rapporté que l'isoprostane, 8-isoPGE₂, pouvait agir sur les récepteurs TP en plus des récepteurs EP dans les vaisseaux placentaires [285]. Il se pourrait donc que les isoprostanes interviennent, quoique faiblement, dans la réponse au stress oxydatif dans les vaisseaux placentaires. Aussi, même si d'autres études sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse, celle-ci serait en accord avec l'étude de Walsh et al. [262] qui avaient rapporté que l'augmentation de pression dans les cotylédons placentaires associée à l'administration de H₂O₂ était corrélée à une augmentation du taux de peroxydes lipidiques et de TXA₂. Ces constatations permettent de faire un certain rapprochement avec nos observations dans les placentas de grossesses avec prééclampsie. En effet, il est connu qu'en plus de présenter un stress oxydatif placentaire important [278;279], les femmes atteintes de prééclampsie présentent également une augmentation de la sécrétion de TXA₂ [223] et du taux d'isoprostanes [278] placentaires. Ces observations indiquent que les augmentations de TXA₂ et d'isoprostanes dans les placentas issus de grossesses compliquées par la prééclampsie pourraient être le résultat direct du stress oxydatif placentaire. N'a-t-il pas été rapporté que l'hydroperoxyde de tert-butyle augmentait le rapport TXA₂/PGI₂ dans les cotylédons placentaires humains [226]? Ainsi, ces résultats supportent une fois encore l'hypothèse d'une étroite relation entre les prostanoides et le stress oxydatif placentaire et suggèrent même l'existence d'une sorte de cercle vicieux entre ces derniers. De plus, il apparaît qu'un blocage de l'activation des COXs par l'aspirine ne résulte pas seulement en une inhibition de la formation de TXA₂ mais aussi de celle des peroxydes lipidiques dans les placentas de grossesses avec prééclampsie [308], suggérant que chez ces patientes, l'activation des COXs placentaires accroît simultanément le stress oxydatif. De cette façon, le cercle vicieux instauré entre la voie du métabolisme de l'AA et celle du stress oxydatif pourrait entraîner le maintien d'une dysfonction de la circulation fœto-placentaire qui pourrait s'avérer délétère pour le fœtus. Finalement, le fait que le stress oxydatif placentaire observé chez les patientes atteintes de prééclampsie serait le résultat d'un mauvais remodelage utérin [277] suggère que le stress oxydatif soit l'initiateur du cercle

alors que la voie des prostanoïdes en permettrait le maintien. En effet, le stress oxydatif initié engendrerait une augmentation de la production de prostanoïdes, qui à leur tour favoriseraient la formation de nouvelles espèces radicalaires de l'oxygène, qui continueraient d'activer la voie de formation des prostanoïdes et ainsi de suite, bouclant ainsi la boucle.

Parallèlement, bien qu'il ait été rapporté dans les placentas de grossesses compliquées par la prééclampsie que l'expression d'eNOS était diminuée dans l'artère [253] et dans la veine [249] ombilicales humaines, il a aussi été montré qu'elle était augmentée dans le trophoblaste villositaire [253]. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme compensateur au niveau des vaisseaux de résistance du placenta. Malgré tout, s'il s'agit effectivement d'un mécanisme compensateur, il est clair qu'il n'est pas suffisant pour contrer la mauvaise perfusion placentaire. Ici aussi, le stress oxydatif pourrait être la raison d'un tel échec. En effet, il est bien connu que dans certains cas, par exemple en l'absence d'une quantité suffisante de cofacteur BH_4 , les NOSs peuvent produire simultanément de $O_2^{\bullet-}$ et du NO qui vont réagir ensemble pour former $ONOO^-$ [231] et donc augmenter le risque de dommage au placenta. De même, le mauvais remodelage des artères utérines augmenterait aussi la production d' $O_2^{\bullet-}$ [277] réagissant avec NO pour former $ONOO^-$. Ainsi, la diminution de la biodisponibilité du NO, empêcherait ce dernier d'agir comme vasodilatateur et donc de limiter les dommages fœto-placentaires. Ceci est en accord avec ce qui a été montré dans l'artère ombilicale humaine, où $O_2^{\bullet-}$ réagissait avec NO pour former $ONOO^-$ et augmenter ainsi la tension des artères [309], ainsi que dans les cotylédons, où $ONOO^-$ semblait responsable de la dysfonction de la vascularisation fœto-placentaire observée dans les placentas issus de grossesses avec prééclampsie [301]. De cette manière, en plus d'être un symptôme bien établi de la prééclampsie, le stress oxydatif, même s'il n'en est pas l'instigateur, pourrait s'avérer être un élément clé dans le développement de la maladie.

CHAPITRE 6

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons montré que les prostanoïdes, qu'elles soient issues de l'activation des COXs ou de la peroxydation de l'AA, possèdent de puissantes propriétés vasoactives dans la circulation placentaire. Grâce à l'utilisation de bloqueurs des récepteurs TP à la TXA₂ et des récepteurs EP à la PGE₂, nous avons pu démontrer la présence de ces récepteurs dans les vaisseaux sanguins du placenta humain. Parallèlement, les propriétés du bloqueur des récepteurs EP, l'AH6809, combinées aux caractéristiques connues de l'activation des récepteurs EP₁ suggèrent que les effets vasoactifs, véhiculés par les récepteurs EP, observés dans cette étude sont le résultat d'une activation des récepteurs EP₁. Ceci fournit une information supplémentaire quant au type de récepteurs EP présents dans les vaisseaux étudiés. En revanche, nous n'avons pas été en mesure de définir quelle(s) est(sont) la(les) substance(s) capable(s) de jouer la contrepartie vasodilatatrice dans la régulation du tonus vasculaire placentaire.

Les travaux utilisant des placentas obtenus de patientes atteintes de prééclampsie ont montré que la maladie était associée à des changements significatifs sur la réactivité des artères chorioniques aux prostanoïdes. En effet, alors qu'elle diminuait la réponse à l'isoprostane, elle augmentait simultanément celle à l'U-46619. Ces observations suggèrent que la régulation de la pression de perfusion placentaire par les substances prostanoïdes serait compromise dans les placentas de grossesse prééclamptique.

Finalement, l'induction d'un stress oxydatif via l'administration de H₂O₂ exogène, combiné ou non à la xanthine oxydase, a provoqué une augmentation relativement importante de la pression de perfusion dans les cotylédons et de la tension dans les artères chorioniques. D'autre part, l'utilisation d'un bloqueur des récepteurs TP et d'un inhibiteur des COXs, seuls ou en combinaison, a révélé que l'effet vasoconstricteur du stress oxydatif est généré par une activation de la synthèse enzymatique des prostanoïdes. Ces données supportent l'idée d'une relation étroite entre le stress oxydatif et les prostanoïdes dans les vaisseaux placentaires, relation qui pourrait être d'importance dans les placentas de grossesses prééclamptiques puisque le stress oxydatif y est présent et la production de TXA₂ augmentée.

Toutes ces observations prises ensemble supportent nos hypothèses que les prostanoïdes font partie des molécules endogènes qui contrôlent le tonus vasculaire

placentaire. De plus, le stress oxydatif, en modifiant la voie de production, pourrait être à l'origine de l'augmentation de TXA₂ décrite dans les placentas obtenus de grossesses avec prééclampsie. En revanche, nous n'avons pas réussi à démontrer un quelconque effet protecteur du NO ou de la PGI₂ en réponse à une forte contraction des vaisseaux placentaires. Ceci suggère que d'autres substances doivent être impliquées dans la contrepartie vasodilatatrice. Cependant, d'autres études sont encore nécessaires pour mieux comprendre la régulation du tonus vasculaire placentaire.

Finalement, il est important de garder à l'esprit que les études faites sur les placentas humains et, en particulier sur le contrôle du tonus vasculaire placentaire, sont essentiellement réalisables *in vitro*. En effet, la grossesse ne se comparant qu'à elle-même, il est pour le moins délicat de réaliser des études *in vivo* chez des femmes enceintes, puisque celles-ci pourraient comporter de gros risques pour la mère et son enfant. Par conséquent, il apparaît difficile de confirmer *in vivo*, ce que l'on observe *in vitro*. Néanmoins, les études *in vitro* restent très efficaces pour mieux comprendre la physiologie placentaire, mais aussi les physiopathologies telles que la prééclampsie et le RCIU. D'autre part, notre étude impliquant des placentas de grossesses avec prééclampsie ne fait pas la distinction entre les différents cas de prééclampsie (légère-moderée vs sévère, précoce vs tardive). Ceci pourrait être d'importance dans l'explication des différences observées entre les études quant à la réactivité placentaire, puisque les différents cas de prééclampsie semblent posséder des étiologies qui divergent. Aussi, bien que l'étude présentée dans le chapitre 4 nous apporte de l'information quant à l'interaction qui peut exister entre le stress oxydatif et la voie du métabolisme de l'AA dans le placenta, elle nous ne permet pas de confirmer que ceci est impliqué dans la physiopathologie de la prééclampsie. D'autres études sont nécessaires pour démontrer et comprendre ce phénomène dans les placentas de femmes atteintes de prééclampsie.

CHAPITRE 7

PERSPECTIVES DE CES TRAVAUX

Dans notre étude, nous avons montré qu'il semble exister un lien étroit entre les prostanoïdes et le stress oxydatif. Ce lien pourrait être d'importance dans le développement de la prééclampsie. Cependant, plusieurs études sont encore nécessaires pour répondre aux questions qui subsistent.

Par exemple, nous avons observé que la prééclampsie, de même que l'âge gestationnel, modifient la réponse aux prostanoïdes dans les vaisseaux placentaires, ce qui pourrait être dû à une variation de la quantité de récepteurs aux prostanoïdes présents dans les vaisseaux. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'impact de ces différentes conditions sur les récepteurs aux prostanoïdes des vaisseaux placentaires obtenus de grossesse normotensives ou compliquées par la prééclampsie suite à une délivrance à terme ou prématurée. Ceci pourrait alors être fait d'une part au niveau génique en quantifiant l'ARNm des récepteurs TP et EP via une technique de RT-PCR en temps réel et, d'autre part, au niveau protéique en mesurant l'expression des récepteurs par une technique d'immunobuvardage de type Western.

Il est bien connu que la prééclampsie s'accompagne d'un stress oxydatif marqué [42;107;227]. Aussi, nous avons montré que ce dernier entraînait une activation des COXs lorsqu'induit dans des vaisseaux placentaires de grossesse normale. Ainsi, il serait d'intérêt d'évaluer si, dans les vaisseaux placentaires de grossesse avec prééclampsie, la transcription des gènes des COXs, de même que leur expression protéique, sont modifiées comparées à des vaisseaux placentaires de grossesse normotensive. L'effet sur la transcription génique pourra être évalué en quantifiant l'ARNm de chacune des COX (1 et 2) par une technique de RT-PCR en temps réel, alors que leur expression protéique sera mesurée par immunobuvardage de type Western. De cette façon, une différence entre les vaisseaux placentaires obtenus de grossesses normotensives et ceux obtenus de grossesses avec prééclampsie pourrait refléter les effets du stress oxydatif sur la voie de production des prostanoïdes placentaires.

De plus, il serait intéressant de voir si, comme ce qui a été observé dans d'autres études [302;307], l'activation des récepteurs TP dans les vaisseaux placentaires mène à une augmentation du stress oxydatif. Celui-ci pourrait être évalué par l'utilisation de kits ELISA mesurant les biomarqueurs du stress oxydatifs comme les isoprostanes (8-isoprostanes) ou

le malonedialdéhyde qui reflète la peroxydation lipidique. L'avantage d'une telle étude est qu'elle permettrait de valider ou invalider l'idée de l'existence d'une sorte de cercle vicieux entre les prostanoïdes et le stress oxydatif qui, chez les patientes atteintes de prééclampsie, pourrait favoriser le développement de la maladie et serait donc d'importance dans la compréhension de la prééclampsie. Les kits ELISA mesurant les isoprostanes pourraient également être utilisés afin de compléter l'étude présentée dans le chapitre 4, dans le but de voir si, comme les prostanoïdes de synthèse enzymatique, les isoprostanes participent à l'augmentation de pression (ou de tension) observée dans les vaisseaux placentaires en réponse à l'induction d'un stress oxydatif.

Dans un autre ordre d'idée, le sFlt-1, qui diminue l'action du VEGF en l'empêchant de se lier à son récepteur membranaire, et la sEng, qui empêche entre autres la relaxation endothéliale induite par la liaison du TGF- β à l'endogline de surface, sont augmentés chez les patientes avec prééclampsie. Ces derniers, avec les ROS et les isoprostanes, jouent un rôle dans la dysfonction endothéliale observée chez les femmes atteintes de prééclampsie [249;273;310;311]. Ainsi, il serait intéressant de voir s'il existe une corrélation entre le stress oxydatif, les prostanoïdes et l'expression des récepteurs solubles sFlt-1 et sEng. Ces deux protéines pourraient donc être mesurées, grâce à des kits ELISA, dans les tissus placentaires obtenus de grossesses compliquées ou non par la prééclampsie, dans lesquels la voie des prostanoïdes ou le stress oxydatif seraient inhibés ou activés.

Finalement, il serait important dans les études futures de faire la distinction entre les différents types de prééclampsie. En effet, le fait que le type précoce, en général plus sévère, soit la plupart du temps associé à un mauvais remodelage vasculaire, alors que le tardif ne l'est pas, suggère que l'étiologie de la maladie puisse différer. Par exemple, l'intensité du stress oxydatif corrèle avec la sévérité de la maladie [273;275], alors que les bébés naissants de femmes avec prééclampsie précoce sont généralement plus petits que ceux naissants de femmes avec prééclampsie tardive [312]. Ces observations révèlent l'importance de tenir compte des différents cas de prééclampsie au moment du recrutement des patientes et de l'analyse des résultats. Ainsi, il serait pertinent de classer les prééclampsies dans un premier temps en fonction du moment de l'apparition des symptômes soit : les précoces se déclarant avant la 34^{ème} semaine de grossesse et les

tardives se déclarant après la 34^{ème} semaine; et dans un second temps, en tenant compte de la sévérité de la maladie, soit : les légères à modérées, essentiellement caractérisées par une hypertension gestationnelle et une protéinurie, et les sévères, pouvant également s'accompagner de maux de tête, mauvaise vision, œdème pulmonaire, oligurie, créatine sérique élevée, RCIU visible et convulsion [2].

Bibliographie

- [1] Brinster RL. Embryo development. *J Anim Sci* 1974 May;38(5):1003-12.
- [2] Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Rouse DJ, Spong CY. *Williams obstetrics*. 23rd ed. ed. New York : McGraw-Hill Medical, 2010.
- [3] Johnson MH, Everitt BJ. *Reproduction*. 1re ed. Bruxelles: De Boeck Université, 2001.
- [4] Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update* 2007 Jul;13(4):365-77.
- [5] Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol* 2011 Jul;210(1):5-14.
- [6] Garrido-Gomez T, Dominguez F, Simon C. Proteomics of embryonic implantation. *Handb Exp Pharmacol* 2010;(198):67-78.
- [7] Plaisier M. Decidualisation and angiogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011 Jun;25(3):259-71.
- [8] Aplin JD. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 1991 Aug;99 (Pt 4):681-92.
- [9] Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL. *Obstetrics : Normal and Problem Pregnancies*. 5th ed. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2007.
- [10] Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 1997 May 1;99(9):2139-51.
- [11] Eastabrook G, Hu Y, von DP. The role of decidual natural killer cells in normal placentation and in the pathogenesis of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can* 2008 Jun;30(6):467-76.
- [12] Hu Y, Dutz JP, Maccalman CD, Yong P, Tan R, von DP. Decidual NK cells alter in vitro first trimester extravillous cytotrophoblast migration: a role for IFN-gamma. *J Immunol* 2006 Dec 15;177(12):8522-30.

- [13] King A, Allan DS, Bowen M, et al. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. *Eur J Immunol* 2000 Jun;30(6):1623-31.
- [14] Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Oct 14;94(21):11520-5.
- [15] Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta* 2007 Apr;28 Suppl A:S64-S69.
- [16] Wang Y, Zhao S. *Vascular Biology of the placenta*. Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.
- [17] Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, Kaufmann P. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update* 2000 Sep;6(5):485-94.
- [18] Burton GJ, Charnock-Jones DS, Jauniaux E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction* 2009 Dec;138(6):895-902.
- [19] Gordon Z, Elad D, Almog R, Hazan Y, Jaffa AJ, Eytan O. Anthropometry of fetal vasculature in the chorionic plate. *J Anat* 2007 Dec;211(6):698-706.
- [20] Kingdom JCP, Macara LM, Whittle MJ. Fetoplacental circulation in health and disease. Fetal and Neonatal Edition. *Archives of disease in childhood* 1994;70(3):F161-F165.
- [21] Walker DW, McLean JR. Absence of adrenergic nerves in the human placenta. *Nature* 1971 Jan 29;229(5283):344-5.
- [22] Poston L. The control of blood flow to the placenta. *Exp Physiol* 1997 Mar;82(2):377-87.
- [23] Wareing M, Baker PN. Vasoconstriction of small arteries isolated from the human placental chorionic plate in normal and compromised pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2004;23(3):237-46.
- [24] Altura BM, Malaviya D, Reich CF, Orkin LR. Effects of vasoactive agents on isolated human umbilical arteries and veins. *Am J Physiol* 1972 Feb;222(2):345-55.
- [25] Poston L, McCarthy AL, Ritter JM. Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. *Pharmacol Ther* 1995 Feb;65(2):215-39.
- [26] Wareing M, Greenwood SL, Taggart MJ, Baker PN. Vasoactive responses of veins isolated from the human placental chorionic plate. *Placenta* 2003 Aug;24(7):790-6.

- [27] Read MA, Leitch IM, Giles WB, Bisits AM, Boura AL, Walters WA. U46619-mediated vasoconstriction of the fetal placental vasculature in vitro in normal and hypertensive pregnancies. *J Hypertens* 1999 Mar;17(3):389-96.
- [28] Myatt L, Langdon G, Brewer AS, Brockman DE. Endothelin-1-induced vasoconstriction is not mediated by thromboxane release and action in the human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 1991 Dec;165(6 Pt 1):1717-22.
- [29] Myatt L, Brewer AS, Brockman DE. The comparative effects of big endothelin-1, endothelin-1, and endothelin-3 in the human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 1992 Dec;167(6):1651-6.
- [30] Benoit C, Gu Y, Zhang Y, Alexander JS, Wang Y. Contractility of placental vascular smooth muscle cells in response to stimuli produced by the placenta: roles of ACE vs. non-ACE and AT1 vs. AT2 in placental vessel cells. *Placenta* 2008 Jun;29(6):503-9.
- [31] Bertrand C, St-Louis J. Reactivities to serotonin and histamine in umbilical and placental vessels during the third trimester after normotensive pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999 Mar;180(3 Pt 1):650-9.
- [32] Glance DG, Elder MG, Bloxam DL, Myatt L. The effects of the components of the renin-angiotensin system on the isolated perfused human placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol* 1984 Jun 15;149(4):450-4.
- [33] Amarnani S, Sangrat B, Chaudhuri G. Effects of selected endothelium-dependent vasodilators on fetoplacental vasculature: physiological implications. *Am J Physiol* 1999 Aug;277(2 Pt 2):H842-H847.
- [34] Van d, V, Vanderstichele H, Leusen I. Release of endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vessels. *Circ Res* 1987 Apr;60(4):517-22.
- [35] Buvinic S, Poblete MI, Donoso MV, et al. P2Y1 and P2Y2 receptor distribution varies along the human placental vascular tree: role of nucleotides in vascular tone regulation. *J Physiol* 2006 Jun 1;573(Pt 2):427-43.
- [36] Ramirez RJ, Gibson M, Kalenic J, Einzig S, Omar HA. In Vitro Vascular Relaxation to Progesterone and Its Metabolites in Human Umbilical and Placental Blood Vessels. *J Matern Fetal Investig* 1998 Jun;8(2):61-5.
- [37] Brownbill P, McKeeman GC, Brockelsby JC, Crocker IP, Sibley CP. Vasoactive and permeability effects of vascular endothelial growth factor-165 in the term in vitro dually perfused human placental lobule. *Endocrinology* 2007 Oct;148(10):4734-44.

- [38] Dong YL, Vegiraju S, Chauhan M, et al. Involvement of calcitonin gene-related peptide in control of human fetoplacental vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004 Jan;286(1):H230-H239.
- [39] Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, et al. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature* 2000 Jun 15;405(6788):797-800.
- [40] Brownbill P, Bell NJ, Woods RJ, Lowry PJ, Page NM, Sibley CP. Neurokinin B is a paracrine vasodilator in the human fetal placental circulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 May;88(5):2164-70.
- [41] Glance DG, Elder MG, Myatt L. Prostaglandin production and stimulation by angiotensin II in the isolated perfused human placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol* 1985 Feb 1;151(3):387-91.
- [42] Walsh SW. Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004 Feb;70(2):223-32.
- [43] Fuchs R, Ellinger I. Endocytic and transcytotic processes in villous syncytiotrophoblast: role in nutrient transport to the human fetus. *Traffic* 2004 Oct;5(10):725-38.
- [44] Smith CH, Moe AJ, Ganapathy V. Nutrient transport pathways across the epithelium of the placenta. *Annu Rev Nutr* 1992;12:183-206.
- [45] Woollett LA. Review: Transport of maternal cholesterol to the fetal circulation. *Placenta* 2011 Mar;32 Suppl 2:S218-S221.
- [46] Munro HN, Pilistine SJ, Fant ME. The placenta in nutrition. *Annu Rev Nutr* 1983;3:97-124.
- [47] Salle BL, Delvin EE, Lapillonne A, Bishop NJ, Glorieux FH. Perinatal metabolism of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2000 May;71(5 Suppl):1317S-24S.
- [48] Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta* 2010 Dec;31(12):1027-34.
- [49] Shearer MJ. Vitamin K in parenteral nutrition. *Gastroenterology* 2009 Nov;137(5 Suppl):S105-S118.
- [50] Marin JJ, Macias RI, Serrano MA. The hepatobiliary-like excretory function of the placenta. A review. *Placenta* 2003 May;24(5):431-8.
- [51] Helewa ME, Burrows RF, Smith J, Williams K, Brain P, Rabkin SW. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 1. Definitions, evaluation

- and classification of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ* 1997 Sep 15;157(6):715-25.
- [52] Valensise H, Vasapollo B, Gagliardi G, Novelli GP. Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension* 2008 Nov;52(5):873-80.
- [53] Sibai BM, Caritis S, Hauth J. What we have learned about preeclampsia. *Semin Perinatol* 2003 Jun;27(3):239-46.
- [54] Collange O, Launoy A, Kopf-Pottecher A, Dietemann JL, Pottecher T. [Eclampsia]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2010 Apr;29(4):e75-e82.
- [55] Tukur J. The use of magnesium sulphate for the treatment of severe pre-eclampsia and eclampsia. *Ann Afr Med* 2009 Apr;8(2):76-80.
- [56] Odegard RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Preeclampsia and fetal growth. *Obstet Gynecol* 2000 Dec;96(6):950-5.
- [57] Srinivas SK, Edlow AG, Neff PM, Sammel MD, Andrela CM, Elovitz MA. Rethinking IUGR in preeclampsia: dependent or independent of maternal hypertension? *J Perinatol* 2009 Oct;29(10):680-4.
- [58] Khong TY. Placental vascular development and neonatal outcome. *Semin Neonatol* 2004 Aug;9(4):255-63.
- [59] Sibai BM. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol* 2004 May;103(5 Pt 1):981-91.
- [60] Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth* 2009;9:8.
- [61] Robertson WB. Uteroplacental vasculature. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1976;10:9-17.
- [62] Espinoza J, Romero R, Mee KY, et al. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med* 2006;34(6):447-58.
- [63] Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2010 Jun;37(2):239-53.
- [64] Hirano H, Imai Y, Ito H. Spiral artery of placenta: development and pathology-immunohistochemical, microscopical, and electron-microscopic study. *Kobe J Med Sci* 2002 Apr;48(1-2):13-23.

- [65] Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol* 2002 Nov;187(5):1416-23.
- [66] St-Louis J, Brochu M. [The cardiovascular paradox of pregnancy]. *Med Sci (Paris)* 2007 Nov;23(11):944-9.
- [67] Bridges EJ, Womble S, Wallace M, McCartney J. Hemodynamic monitoring in high-risk obstetrics patients, I. Expected hemodynamic changes in pregnancy. *Crit Care Nurse* 2003 Aug;23(4):53-62.
- [68] Rang S, van Montfrans GA, Wolf H. Serial hemodynamic measurement in normal pregnancy, preeclampsia, and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2008 May;198(5):519.
- [69] Bosio PM, McKenna PJ, Conroy R, O'Herlihy C. Maternal central hemodynamics in hypertensive disorders of pregnancy. *Obstet Gynecol* 1999 Dec;94(6):978-84.
- [70] Ganzevoort W, Rep A, Bonsel GJ, de Vries JI, Wolf H. Plasma volume and blood pressure regulation in hypertensive pregnancy. *J Hypertens* 2004 Jul;22(7):1235-42.
- [71] Anton L, Brosnihan KB. Systemic and uteroplacental renin-angiotensin system in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008 Oct;2(5):349-62.
- [72] Oelkers WK. Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Steroids* 1996 Apr;61(4):166-71.
- [73] Irani RA, Xia Y. The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. *Placenta* 2008 Sep;29(9):763-71.
- [74] Brichant JF, Brichant G, Dewandre PY, Foidart JM. [Circulatory and respiratory problems in preeclampsia]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2010 Apr;29(4):e91-e95.
- [75] Hertig A, Liere P. New markers in preeclampsia. *Clin Chim Acta* 2010 Nov 11;411(21-22):1591-5.
- [76] Knofler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol* 2010;54(2-3):269-80.
- [77] Foidart JM, Schaaps JP, Chantraine F, Munaut C, Lorquet S. Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia--a step forward but not the definitive answer. *J Reprod Immunol* 2009 Nov;82(2):106-11.
- [78] Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res* 2004 Oct 29;95(9):884-91.

- [79] Christians JK, Gruslin A. Altered levels of insulin-like growth factor binding protein proteases in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn* 2010 Sep;30(9):815-20.
- [80] Kusanovic JP, Romero R, Chaiworapongsa T, et al. A prospective cohort study of the value of maternal plasma concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in early pregnancy and midtrimester in the identification of patients destined to develop preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009 Nov;22(11):1021-38.
- [81] Vanhoutte PM. [Endothelial dysfunction and vascular disease]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 2002;1-15.
- [82] Lyall F, Greer IA. The vascular endothelium in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Rev Reprod* 1996 May;1(2):107-16.
- [83] Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989 Jul;3(9):2007-18.
- [84] Korita D, Sagawa N, Itoh H, et al. Cyclic mechanical stretch augments prostacyclin production in cultured human uterine myometrial cells from pregnant women: possible involvement of up-regulation of prostacyclin synthase expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Nov;87(11):5209-19.
- [85] Boujedaini N, Liu J, Thuillez C, Cazin L, Mensah-Nyagan AG. In vivo regulation of vasomotricity by nitric oxide and prostanoids during gestation. *Eur J Pharmacol* 2001 Sep 14;427(2):143-9.
- [86] Wetzka B, Schafer WR, Stehmans A, Zahradnik HP. Effects of nitric oxide donors on the contractility and prostaglandin synthesis of myometrial strips from pregnant and non-pregnant women. *Gynecol Endocrinol* 2001 Feb;15(1):34-42.
- [87] Bobadilla RA, Bracho I, Alvarez VM, Anguiano L, Lopez P. Pregnancy induced changes in Cox-1, Cox-2 and NOSIII vascular and renal expression. *Proc West Pharmacol Soc* 2004;47:25-7.
- [88] 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 Sep 1;87(5):406-11.
- [89] Tsatsaris V, Fournier T, Winer N. [Pathophysiology of preeclampsia]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2008 Feb;37(1):16-23.
- [90] Poston L. Endothelial dysfunction in pre-eclampsia. *Pharmacol Rep* 2006;58 Suppl:69-74.

- [91] Powers RW, Catov JM, Bodnar LM, Gallaher MJ, Lain KY, Roberts JM. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia and risk of adverse pregnancy outcome. *Reprod Sci* 2008 Apr;15(4):374-81.
- [92] Ajne G, Wolff K, Fyhrquist F, Carlstrom K, Hemsén-Mortberg A, Nisell H. Endothelin converting enzyme (ECE) activity in normal pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2003;22(3):215-24.
- [93] Davies JR, Fernando R, Hallworth SP. Hemostatic function in healthy pregnant and preeclamptic women: an assessment using the platelet function analyzer (PFA-100) and thromboelastograph. *Anesth Analg* 2007 Feb;104(2):416-20.
- [94] Nadar SK, Al YE, Blann AD, Lip GY. Thrombomodulin, von Willebrand factor and E-selectin as plasma markers of endothelial damage/dysfunction and activation in pregnancy induced hypertension. *Thromb Res* 2004;113(2):123-8.
- [95] Lafayette RA, Druzin M, Sibley R, et al. Nature of glomerular dysfunction in preeclampsia. *Kidney Int* 1998 Oct;54(4):1240-9.
- [96] Suzuki Y, Hattori T, Kajikuri J, Yamamoto T, Suzumori K, Itoh T. Reduced function of endothelial prostacyclin in human omental resistance arteries in pre-eclampsia. *J Physiol* 2002 Nov 15;545(Pt 1):269-77.
- [97] Shaamash AH, Elsonosy ED, Zakhari MM, Radwan SH, El-Dien HM. Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2001 Feb;72(2):127-33.
- [98] Zhang HH, Wang YP, Chen DB. Analysis of nitroso-proteomes in normotensive and severe preeclamptic human placentas. *Biol Reprod* 2011 May;84(5):966-75.
- [99] Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996 Mar;174(3):1008-13.
- [100] Xiang W, Chen H, Xu X, Zhang M, Jiang R. Expression of endothelial nitric oxide synthase traffic inducer in the placentas of women with pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2005 May;89(2):103-7.
- [101] Dikensoy E, Balat O, Pence S, Balat A, Cekmen M, Yurekli M. The changes of plasma malondialdehyde, nitric oxide, and adrenomedullin levels in patients with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2009 Aug;28(4):383-9.
- [102] Lewis DF, Canzoneri BJ, Gu Y, Zhao S, Wang Y. Maternal levels of prostacyclin, thromboxane, ICAM, and VCAM in normal and preeclamptic pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2010 Dec;64(6):376-83.

- [103] Ranta V, Viinikka L, Halmesmaki E, Ylikorkala O. Nitric oxide production with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1999 Mar;93(3):442-5.
- [104] Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham J. Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:79.
- [105] Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003 Mar;111(5):649-58.
- [106] Szarka A, Rigo J, Jr., Lazar L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol* 2010;11:59.
- [107] Walsh SW. What causes endothelial cell activation in preeclamptic women? *Am J Pathol* 2006 Oct;169(4):1104-6.
- [108] Cook JA. Eicosanoids. *Crit Care Med* 2005 Dec;33(12 Suppl):S488-S491.
- [109] Stables MJ, Gilroy DW. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* 2011 Jan;50(1):35-51.
- [110] Samuelsson B. Prostaglandins and thromboxanes. *Recent Prog Horm Res* 1978;34:239-58.
- [111] Diaz BL, Arm JP. Phospholipase A(2). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003 Aug;69(2-3):87-97.
- [112] Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 1992 Aug;263(2 Pt 2):F181-F191.
- [113] Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* 2009 Apr;50 Suppl:S29-S34.
- [114] Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Dec;87(23):9383-7.
- [115] Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Nov 15;89(22):10721-5.

- [116] Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, et al. Free radical-induced generation of isoprostanes in vivo. Evidence for the formation of D-ring and E-ring isoprostanes. *J Biol Chem* 1994 Feb 11;269(6):4317-26.
- [117] Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 2002 Aug;23(8):360-6.
- [118] Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996 Jan 12;51(1):1-9.
- [119] Pratico D. F(2)-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 1999 Nov 1;147(1):1-10.
- [120] Tsuboi K, Sugimoto Y, Ichikawa A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002 Aug;68-69:535-56.
- [121] Woodward DF, Jones RL, Narumiya S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev* 2011 Sep;63(3):471-538.
- [122] Breyer MD, Davis L, Jacobson HR, Breyer RM. Differential localization of prostaglandin E receptor subtypes in human kidney. *Am J Physiol* 1996 May;270(5 Pt 2):F912-F918.
- [123] Cosme R, Lublin D, Takafuji V, Lynch K, Roche JK. Prostanoids in human colonic mucosa: effects of inflammation on PGE(2) receptor expression. *Hum Immunol* 2000 Jul;61(7):684-96.
- [124] Hutchinson AJ, Chou CL, Israel DD, Xu W, Regan JW. Activation of EP2 prostanoid receptors in human glial cell lines stimulates the secretion of BDNF. *Neurochem Int* 2009 Jun;54(7):439-46.
- [125] Senior J, Sangha R, Baxter GS, Marshall K, Clayton JK. In vitro characterization of prostanoid FP-, DP-, IP- and TP-receptors on the non-pregnant human myometrium. *Br J Pharmacol* 1992 Sep;107(1):215-21.
- [126] Senior J, Marshall K, Sangha R, Baxter GS, Clayton JK. In vitro characterization of prostanoid EP-receptors in the non-pregnant human myometrium. *Br J Pharmacol* 1991 Mar;102(3):747-53.
- [127] Wanggren K, Lalitkumar PG, Stavreus-Evers A, Stabi B, Gemzell-Danielsson K. Prostaglandin E2 and F2alpha receptors in the human Fallopian tube before and after mifepristone treatment. *Mol Hum Reprod* 2006 Sep;12(9):577-85.

- [128] Baxter GS, Clayton JK, Coleman RA, Marshall K, Sangha R, Senior J. Characterization of the prostanoid receptors mediating constriction and relaxation of human isolated uterine artery. *Br J Pharmacol* 1995 Sep;116(1):1692-6.
- [129] Norel X. Prostanoid receptors in the human vascular wall. *ScientificWorldJournal* 2007;7:1359-74.
- [130] Boie Y, Sawyer N, Slipetz DM, Metters KM, Abramovitz M. Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J Biol Chem* 1995 Aug 11;270(32):18910-6.
- [131] Nasrallah R, Landry A, Scholey JW, Hebert RL. Characterization of the PGI₂/IP system in cultured rat mesangial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004 May;70(5):455-64.
- [132] Vassaux G, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R. Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca²⁺-elevating agent. *J Biol Chem* 1992 Jun 5;267(16):11092-7.
- [133] Namba T, Oida H, Sugimoto Y, et al. cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem* 1994 Apr 1;269(13):9986-92.
- [134] Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, et al. Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH₂. *J Exp Med* 2001 Jan 15;193(2):255-61.
- [135] Sawyer N, Cauchon E, Chateauneuf A, et al. Molecular pharmacology of the human prostaglandin D₂ receptor, CRTH₂. *Br J Pharmacol* 2002 Dec;137(8):1163-72.
- [136] Hata AN, Zent R, Breyer MD, Breyer RM. Expression and molecular pharmacology of the mouse CRTH₂ receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 Aug;306(2):463-70.
- [137] Ito S, Sakamoto K, Mochizuki-Oda N, et al. Prostaglandin F₂ alpha receptor is coupled to G_q in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Apr 29;200(2):756-62.
- [138] Pierce KL, Bailey TJ, Hoyer PB, Gil DW, Woodward DF, Regan JW. Cloning of a carboxyl-terminal isoform of the prostanoid FP receptor. *J Biol Chem* 1997 Jan 10;272(2):883-7.
- [139] Ishii Y, Sakamoto K. Suppression of protein kinase C signaling by the novel isoform for bovine PGF₂(alpha) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Jul 6;285(1):1-8.

- [140] Raychowdhury MK, Yukawa M, Collins LJ, McGrail SH, Kent KC, Ware JA. Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor. *J Biol Chem* 1994 Jul 29;269(30):19256-61.
- [141] Knezevic I, Borg C, Le Breton GC. Identification of Gq as one of the G-proteins which copurify with human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors. *J Biol Chem* 1993 Dec 5;268(34):26011-7.
- [142] Kinsella BT, O'Mahony DJ, Fitzgerald GA. The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *J Pharmacol Exp Ther* 1997 May;281(2):957-64.
- [143] Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Jan 18;91(2):504-8.
- [144] Vezza R, Habib A, Fitzgerald GA. Differential signaling by the thromboxane receptor isoforms via the novel GTP-binding protein, Gh. *J Biol Chem* 1999 Apr 30;274(18):12774-9.
- [145] Offermanns S, Simon MI. G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem* 1995 Jun 23;270(25):15175-80.
- [146] Halushka PV. Thromboxane A(2) receptors: where have you gone? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000 Mar;60(4-6):175-89.
- [147] Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest* 1996 Feb 15;97(4):949-56.
- [148] Nicola C, Timoshenko AV, Dixon SJ, Lala PK, Chakraborty C. EP1 receptor-mediated migration of the first trimester human extravillous trophoblast: the role of intracellular calcium and calpain. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Aug;90(8):4736-46.
- [149] Ji R, Chou CL, Xu W, Chen XB, Woodward DF, Regan JW. EP1 prostanoid receptor coupling to G i/o up-regulates the expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha through activation of a phosphoinositide-3 kinase signaling pathway. *Mol Pharmacol* 2010 Jun;77(6):1025-36.
- [150] Fujino H, Regan JW. EP(4) prostanoid receptor coupling to a pertussis toxin-sensitive inhibitory G protein. *Mol Pharmacol* 2006 Jan;69(1):5-10.
- [151] Fujino H, Xu W, Regan JW. Prostaglandin E2 induced functional expression of early growth response factor-1 by EP4, but not EP2, prostanoid receptors via the

- phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 2003 Apr 4;278(14):12151-6.
- [152] Adam M, Boie Y, Rushmore TH, et al. Cloning and expression of three isoforms of the human EP3 prostanoid receptor. *FEBS Lett* 1994 Jan 31;338(2):170-4.
- [153] Regan JW, Bailey TJ, Donello JE, et al. Molecular cloning and expression of human EP3 receptors: evidence of three variants with differing carboxyl termini. *Br J Pharmacol* 1994 Jun;112(2):377-85.
- [154] Namba T, Sugimoto Y, Negishi M, et al. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature* 1993 Sep 9;365(6442):166-70.
- [155] Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 2007 Apr 20;282(16):11613-7.
- [156] Ricciotti E, Fitzgerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 May;31(5):986-1000.
- [157] Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990 Oct 5;265(28):16737-40.
- [158] O'Sullivan MG, Chilton FH, Huggins EM, Jr., McCall CE. Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. *J Biol Chem* 1992 Jul 25;267(21):14547-50.
- [159] Bodet C, Chandad F, Grenier D. Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Microbes Infect* 2006 Jan;8(1):27-35.
- [160] Bombardieri S, Cattani P, Ciabattoni G, et al. The synovial prostaglandin system in chronic inflammatory arthritis: differential effects of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* 1981 Aug;73(4):893-901.
- [161] Kiyomiya K, Oh-Ishi S. Involvement of arachidonic acid metabolites in acute inflammation: detection of 6-keto-PGF1 alpha, thromboxane B2 and PGD2 in rat pleurisy induced by phorbol myristate acetate. *Jpn J Pharmacol* 1985 Oct;39(2):201-6.
- [162] Choi SH, Bosetti F. Cyclooxygenase-1 null mice show reduced neuroinflammation in response to beta-amyloid. *Aging (Albany NY)* 2009 Feb;1(2):234-44.

- [163] Morteau O, Morham SG, Sellon R, et al. Impaired mucosal defense to acute colonic injury in mice lacking cyclooxygenase-1 or cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 2000 Feb;105(4):469-78.
- [164] Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, et al. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 1995 Nov 3;83(3):483-92.
- [165] Myers LK, Kang AH, Postlethwaite AE, et al. The genetic ablation of cyclooxygenase 2 prevents the development of autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 2000 Dec;43(12):2687-93.
- [166] Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001 Jul;108(1):15-23.
- [167] McAdam BF, Mardini IA, Habib A, et al. Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. *J Clin Invest* 2000 May;105(10):1473-82.
- [168] Jain NK, Vegad JL, Katiyar AK, Awadhiya RP. Effects of anti-inflammatory drugs on increased vascular permeability in acute inflammatory response in the chicken. *Avian Pathol* 1995 Dec;24(4):723-9.
- [169] Kolaczowska E, Shahzidi S, Seljelid R, van RN, Plytycz B. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is co-mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. *Inflammation* 2002 Apr;26(2):61-71.
- [170] Damas J, Liegeois JF. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999 Mar;359(3):220-7.
- [171] Williams TJ. Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation. *Br J Pharmacol* 1979 Mar;65(3):517-24.
- [172] Raud J. Vasodilatation and inhibition of mediator release represent two distinct mechanisms for prostaglandin modulation of acute mast cell-dependent inflammation. *Br J Pharmacol* 1990 Mar;99(3):449-54.
- [173] Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, et al. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 1997 Aug 14;388(6643):678-82.
- [174] Johansson T, Narumiya S, Zeilhofer HU. Contribution of peripheral versus central EP1 prostaglandin receptors to inflammatory pain. *Neurosci Lett* 2011 May 16;495(2):98-101.

- [175] Rezende RM, Paiva-Lima P, Dos Reis WG, Camelo VM, Bakhle YS, de Francischi JN. Celecoxib induces tolerance in a model of peripheral inflammatory pain in rats. *Neuropharmacology* 2010 Nov;59(6):551-7.
- [176] Telleria-Diaz A, Schmidt M, Kreuzsch S, et al. Spinal antinociceptive effects of cyclooxygenase inhibition during inflammation: Involvement of prostaglandins and endocannabinoids. *Pain* 2010 Jan;148(1):26-35.
- [177] Okumura T, Sakakibara A, Murata Y, Kita Y. Mathematical analysis of involvement ratio between central and peripheral COX-2 in rat pain models with two types of COX-2 inhibitors with different distribution, celecoxib and CIAA. *Eur J Pharmacol* 2008 Jan 6;578(1):97-9.
- [178] Feldberg W, Gupta KP, Milton AS, Wendlandt S. Effect of pyrogen and antipyretics on prostaglandin activity in cisternal c.s.f. of unanaesthetized cats. *J Physiol* 1973 Oct;234(2):279-303.
- [179] Feldberg W, Gupta KP. Pyrogen fever and prostaglandin-like activity in cerebrospinal fluid. *J Physiol* 1973 Jan;228(1):41-53.
- [180] Scher JU, Pillinger MH. The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J Investig Med* 2009 Aug;57(6):703-8.
- [181] Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999 Jun;5(6):698-701.
- [182] Rajakariar R, Hilliard M, Lawrence T, et al. Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12,14-PGJ2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Dec 26;104(52):20979-84.
- [183] Colville-Nash PR, Gilroy DW, Willis D, Paul-Clark MJ, Moore AR, Willoughby DA. Prostaglandin F2alpha produced by inducible cyclooxygenase may contribute to the resolution of inflammation. *Inflammopharmacology* 2005;12(5-6):473-6.
- [184] Gomez PF, Pillinger MH, Attur M, et al. Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappaB subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 2005 Nov 15;175(10):6924-30.
- [185] Jin RC, Voetsch B, Loscalzo J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation* 2005 Apr;12(3):247-58.
- [186] Packham MA, Mustard JF. Clinical pharmacology of platelets. *Blood* 1977 Oct;50(4):555-73.

- [187] Thomas DW, Mannon RB, Mannon PJ, et al. Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂. *J Clin Invest* 1998 Dec 1;102(11):1994-2001.
- [188] Fabre JE, Nguyen M, Athirakul K, et al. Activation of the murine EP₃ receptor for PGE₂ inhibits cAMP production and promotes platelet aggregation. *J Clin Invest* 2001 Mar;107(5):603-10.
- [189] Philipose S, Konya V, Sreckovic I, et al. The prostaglandin E₂ receptor EP₄ is expressed by human platelets and potently inhibits platelet aggregation and thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 Dec;30(12):2416-23.
- [190] Daray FM, Minvielle AI, Puppo S, Rothlin RP. Vasoconstrictor effects of 8-iso-prostaglandin E₂ and 8-iso-prostaglandin F₂(α) on human umbilical vein. *Eur J Pharmacol* 2004 Sep 19;499(1-2):189-95.
- [191] Daray FM, Minvielle AI, Puppo S, Rothlin RP. Pharmacological characterization of prostanoid receptors mediating vasoconstriction in human umbilical vein. *Br J Pharmacol* 2003 Aug;139(8):1409-16.
- [192] Boersma JJ, Janzen KM, Oliveira L, Crankshaw DJ. Characterization of excitatory prostanoid receptors in the human umbilical artery in vitro. *Br J Pharmacol* 1999 Dec;128(7):1505-12.
- [193] Sametz W, Hennerbichler S, Glaser S, Wintersteiger R, Juan H. Characterization of prostanoid receptors mediating actions of the isoprostanes, 8-iso-PGE₂ and 8-iso-PGF₂(α), in some isolated smooth muscle preparations. *Br J Pharmacol* 2000 Aug;130(8):1903-10.
- [194] Imig JD, Breyer MD, Breyer RM. Contribution of prostaglandin EP₂ receptors to renal microvascular reactivity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 Sep;283(3):F415-F422.
- [195] Janssen LJ, Tazzeo T. Involvement of TP and EP₃ receptors in vasoconstrictor responses to isoprostanes in pulmonary vasculature. *J Pharmacol Exp Ther* 2002 Jun;301(3):1060-6.
- [196] Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 1994 Jun;46(2):205-29.
- [197] Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res* 2001 Oct 12;89(8):650-60.
- [198] Vanhoutte PM. COX-1 and vascular disease. *Clin Pharmacol Ther* 2009 Aug;86(2):212-5.

- [199] Oliveira L, Stallwood NA, Crankshaw DJ. Effects of some isoprostanes on the human umbilical artery in vitro. *Br J Pharmacol* 2000 Feb;129(3):509-14.
- [200] Wareing M, Crocker IP, Warren AY, Taggart MJ, Baker PN. Characterization of small arteries isolated from the human placental chorionic plate. *Placenta* 2002 May;23(5):400-9.
- [201] Kwek K, Read MA, Khong TY, Bisits AT, Walters WA. Vasoactive effects of 8-epi-prostaglandin F(2alpha) in isolated human placental conduit and resistance blood vessels in vitro. *Placenta* 2001 Jul;22(6):526-33.
- [202] Craig GM. Prostaglandins in reproductive physiology. *Postgrad Med J* 1975 Feb;51(592):74-84.
- [203] Kennedy TG, Gillio-Meina C, Phang SH. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction* 2007 Nov;134(5):635-43.
- [204] Kennedy TG. Prostaglandins and increased endometrial vascular permeability resulting from the application of artificial stimulus to the uterus of the rat sensitized for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* 1979 Apr;20(3):560-6.
- [205] Hamilton GS, Kennedy TG. Uterine vascular changes after unilateral intrauterine infusion of indomethacin and prostaglandin E2 to rats sensitized for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* 1994 Apr;50(4):757-64.
- [206] Gillio-Meina C, Phang SH, Mather JP, Knight BS, Kennedy TG. Expression patterns and role of prostaglandin-endoperoxide synthases, prostaglandin E synthases, prostacyclin synthase, prostacyclin receptor, peroxisome proliferator-activated receptor delta and retinoid x receptor alpha in rat endometrium during artificially-induced decidualization. *Reproduction* 2009 Mar;137(3):537-52.
- [207] Slater DM, Dennes WJ, Campa JS, Poston L, Bennett PR. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human myometrium throughout pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1999 Sep;5(9):880-4.
- [208] Slater D, Dennes W, Sawdy R, Allport V, Bennett P. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human fetal membranes throughout pregnancy. *J Mol Endocrinol* 1999 Apr;22(2):125-30.
- [209] Hurd WW, Gibbs SG, Rudinsky KA. Differential regulation of myometrial prostaglandin production by changes in length. *Am J Obstet Gynecol* 2008 Feb;198(2):225-4.
- [210] Matsumoto T, Sagawa N, Yoshida M, et al. The prostaglandin E2 and F2 alpha receptor genes are expressed in human myometrium and are down-regulated during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Sep 29;238(3):838-41.

- [211] Jenkin G, Young IR. Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *Anim Reprod Sci* 2004 Jul;82-83:567-81.
- [212] Olson DM. The role of prostaglandins in the initiation of parturition. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003 Oct;17(5):717-30.
- [213] Challis JR, Sloboda DM, Alfaidy N, et al. Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction* 2002 Jul;124(1):1-17.
- [214] Erkinheimo TL, Saukkonen K, Narko K, Jalkanen J, Ylikorkala O, Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 and prostanoid receptors by human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Sep;85(9):3468-75.
- [215] Astle S, Newton R, Thornton S, Vatish M, Slater DM. Expression and regulation of prostaglandin E synthase isoforms in human myometrium with labour. *Mol Hum Reprod* 2007 Jan;13(1):69-75.
- [216] Skannal DG, Brockman DE, Eis AL, Xue S, Siddiqi TA, Myatt L. Changes in activity of cytosolic phospholipase A2 in human amnion at parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1997 Jul;177(1):179-84.
- [217] Romero R, Munoz H, Gomez R, et al. Increase in prostaglandin bioavailability precedes the onset of human parturition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996 Mar;54(3):187-91.
- [218] Faber BM, Metz SA, Chegini N. Immunolocalization of eicosanoid enzymes and growth factors in human myometrium and fetoplacental tissues in failed labor inductions. *Obstet Gynecol* 1996 Aug;88(2):174-9.
- [219] Loftin CD, Trivedi DB, Langenbach R. Cyclooxygenase-1-selective inhibition prolongs gestation in mice without adverse effects on the ductus arteriosus. *J Clin Invest* 2002 Aug;110(4):549-57.
- [220] Gravett MG, Adams KM, Sadowsky DW, et al. Immunomodulators plus antibiotics delay preterm delivery after experimental intraamniotic infection in a nonhuman primate model. *Am J Obstet Gynecol* 2007 Nov;197(5):518.
- [221] Yamamoto T, Suzuki Y, Kojima K, Suzumori N, Suzuki T. The biological investigation of prostacyclin in preeclamptic women seen reduced endothelial function. *Hypertens Pregnancy* 2010;29(4):484-91.
- [222] Woodworth SH, Li X, Lei ZM, et al. Eicosanoid biosynthetic enzymes in placental and decidual tissues from preeclamptic pregnancies: increased expression of thromboxane-A2 synthase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 May;78(5):1225-31.

- [223] Walsh SW, Wang Y. Trophoblast and placental villous core production of lipid peroxides, thromboxane, and prostacyclin in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Jun;80(6):1888-93.
- [224] Zhao S, Gu Y, Lewis DF, Wang Y. Predominant basal directional release of thromboxane, but not prostacyclin, by placental trophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies. *Placenta* 2008 Jan;29(1):81-8.
- [225] de Groot CJ, Murai JT, Vigne JL, Taylor RN. Eicosanoid secretion by human endothelial cells exposed to normal pregnancy and preeclampsia plasma in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998 Feb;58(2):91-7.
- [226] Wang Y, Walsh SW. The ratio of thromboxane to prostacyclin is increased by peroxide in a dose-dependent manner, along with increased vasoconstriction in the human placenta. *Hypertens Pregnancy* 1998;17(1):1-11.
- [227] McKinney ET, Shouri R, Hunt RS, Ahokas RA, Sibai BM. Plasma, urinary, and salivary 8-epi-prostaglandin f2alpha levels in normotensive and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2000 Oct;183(4):874-7.
- [228] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 Nov 27;288(5789):373-6.
- [229] Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Dec;84(24):9265-9.
- [230] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 Jun 11;327(6122):524-6.
- [231] Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med* 2005 Feb;26(1-2):3-31.
- [232] Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999 Aug 15;43(3):521-31.
- [233] Li H, Poulos TL. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem* 2005 Jan;99(1):293-305.
- [234] Ortiz de Montellano PR, Nishida C, Rodriguez-Crespo I, Gerber N. Nitric oxide synthase structure and electron transfer. *Drug Metab Dispos* 1998 Dec;26(12):1185-9.
- [235] Jin RC, Loscalzo J. Vascular Nitric Oxide: Formation and Function. *J Blood Med* 2010 Aug 1;2010(1):147-62.

- [236] Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina (Kaunas)* 2003;39(4):333-41.
- [237] Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987 Dec;61(6):866-79.
- [238] Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994 Apr 28;368(6474):850-3.
- [239] Rees DD, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 1989 Feb;96(2):418-24.
- [240] Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 May;86(9):3375-8.
- [241] De CR, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995 Jul;96(1):60-8.
- [242] Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jun 1;88(11):4651-5.
- [243] Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993 May;87(5):1468-74.
- [244] Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002 Apr 9;105(14):1656-62.
- [245] 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 Apr;280(4):H1692-H1698.
- [246] Lyall F, Bulmer JN, Kelly H, Duffie E, Robson SC. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide. *Am J Pathol* 1999 Apr;154(4):1105-14.
- [247] Conrad KP, Vill M, McGuire PG, Dail WG, Davis AK. Expression of nitric oxide synthase by syncytiotrophoblast in human placental villi. *FASEB J* 1993 Oct;7(13):1269-76.

- [248] Learmont JG, Poston L. Nitric oxide is involved in flow-induced dilation of isolated human small fetoplacental arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1996 Feb;174(2):583-8.
- [249] Wang Y, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia: decreased endothelial nitric oxide synthase expression is associated with increased cell permeability in endothelial cells from preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004 Mar;190(3):817-24.
- [250] Baksu B, Davas I, Baksu A, Akyol A, Gulbaba G. Plasma nitric oxide, endothelin-1 and urinary nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate levels in hypertensive pregnant women. *Int J Gynaecol Obstet* 2005 Aug;90(2):112-7.
- [251] Teran E, Escudero C, Vivero S, Enriquez A, Calle A. Intraplatelet cyclic guanosine-3',5'-monophosphate levels during pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2004;23(3):303-8.
- [252] Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Greer IA, Lyall F. Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Hum Reprod* 1997 Jan;12(1):167-72.
- [253] Rutherford RA, McCarthy A, Sullivan MH, Elder MG, Polak JM, Wharton J. Nitric oxide synthase in human placenta and umbilical cord from normal, intrauterine growth-retarded and pre-eclamptic pregnancies. *Br J Pharmacol* 1995 Dec;116(8):3099-109.
- [254] Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2010 Oct;42(10):1634-50.
- [255] Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 2010;59(4):459-69.
- [256] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
- [257] Lucchesi PA, Belmadani S, Matrougui K. Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens* 2005 Mar;23(3):571-9.
- [258] Okatani Y, Watanabe K, Hayashi K, Wakatsuki A, Sagara Y. Melatonin inhibits vasospastic action of hydrogen peroxide in human umbilical artery. *J Pineal Res* 1997 Apr;22(3):163-8.

- [259] Moreno JM, Rodriguez G, I, Wangensteen R, et al. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced vasoconstriction in the isolated perfused rat kidney. *J Physiol Pharmacol* 2010 Jun;61(3):325-32.
- [260] Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salices M, Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol* 1998 Nov;125(6):1329-35.
- [261] Tate RM, Morris HG, Schroeder WR, Repine JE. Oxygen metabolites stimulate thromboxane production and vasoconstriction in isolated saline-perfused rabbit lungs. *J Clin Invest* 1984 Aug;74(2):608-13.
- [262] Walsh SW, Wang Y, Killian A. AA-2414, an antioxidant and thromboxane receptor blocker, completely inhibits peroxide-induced vasoconstriction in the human placenta. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Jul;290(1):220-6.
- [263] Schildknecht S, van der Loo B, Weber K, Tiefenthaler K, Daiber A, Bachschmid MM. Endogenous peroxynitrite modulates PGHS-1-dependent thromboxane A₂ formation and aggregation in human platelets. *Free Radic Biol Med* 2008 Aug 15;45(4):512-20.
- [264] Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004 Oct;122(4):369-82.
- [265] Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011 Jun;25(3):287-99.
- [266] Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 2006 Nov;12(6):747-55.
- [267] Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol* 2003 Jan;162(1):115-25.
- [268] Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000 Dec;157(6):2111-22.
- [269] Frendo JL, Therond P, Bird T, et al. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology* 2001 Aug;142(8):3638-48.
- [270] Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat* 2009 Jul;215(1):27-35.

- [271] Ali KZ. Stereological study of the effect of altitude on the trophoblast cell populations of human term placental villi. *Placenta* 1997 Jul;18(5-6):447-50.
- [272] Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* 2007;5:6.
- [273] Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JA, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol Res* 2006;39(2):229-36.
- [274] Dordevic NZ, Babic GM, Markovic SD, et al. Oxidative stress and changes in antioxidative defense system in erythrocytes of preeclampsia in women. *Reprod Toxicol* 2008 Feb;25(2):213-8.
- [275] Harsem NK, Braekke K, Staff AC. Augmented oxidative stress as well as antioxidant capacity in maternal circulation in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006 Sep;128(1-2):209-15.
- [276] Mehendale S, Kilari A, Dangat K, Taralekar V, Mahadik S, Joshi S. Fatty acids, antioxidants, and oxidative stress in pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2008 Mar;100(3):234-8.
- [277] Hung TH, Burton GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006 Sep;45(3):189-200.
- [278] Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *FASEB J* 2000 Jul;14(10):1289-96.
- [279] Many A, Hubel CA, Fisher SJ, Roberts JM, Zhou Y. Invasive cytotrophoblasts manifest evidence of oxidative stress in preeclampsia. *Am J Pathol* 2000 Jan;156(1):321-31.
- [280] Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Kossenjans W, Greer IA, Lyall F. Differential localization of superoxide dismutase isoforms in placental villous tissue of normotensive, pre-eclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Histochem Cytochem* 1997 Oct;45(10):1433-8.
- [281] Vanderlelie J, Gude N, Perkins AV. Antioxidant gene expression in preeclamptic placentae: a preliminary investigation. *Placenta* 2008 Jun;29(6):519-22.
- [282] Borekci B, Aksoy H, Toker A, Ozkan A. Placental tissue cyclo-oxygenase 1 and 2 in pre-eclamptic and normal pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2006 Nov;95(2):127-31.
- [283] Wetzka B, Schafer W, Kommos F, et al. Immunohistochemical localization of thromboxane synthase in human intrauterine tissues. *Placenta* 1994 Jun;15(4):389-98.

- [284] Ayala DE, Hermida RC, Mojon A, et al. Blood pressure variability during gestation in healthy and complicated pregnancies. *Hypertension* 1997 Sep;30(3 Pt 2):611-8.
- [285] Hausermann L, St-Louis J. Thromboxane and isoprostane share the same prostanoid receptors to increase human placental tone. *Placenta* 2011 Dec;32(12):941-8.
- [286] Mills TA, Baker PN, Wareing M. The effect of mode of delivery on placental chorionic plate vascular reactivity. *Hypertens Pregnancy* 2007;26(2):201-10.
- [287] Hedberg A, Mento PF, Liu EC, Hollander AM, Wilkes BM. Evidence for functional thromboxane A₂-prostaglandin H₂ receptors in human placenta. *Am J Physiol* 1989 Feb;256(2 Pt 1):E256-E263.
- [288] Grigsby PL, Sooranna SR, Brockman DE, Johnson MR, Myatt L. Localization and expression of prostaglandin E₂ receptors in human placenta and corresponding fetal membranes with labor. *Am J Obstet Gynecol* 2006 Jul;195(1):260-9.
- [289] Stallaert W, Christopoulos A, Bouvier M. Ligand functional selectivity and quantitative pharmacology at G protein-coupled receptors. *Expert Opin Drug Discov* 2011 Aug;6(8):811-25.
- [290] Myatt L, Brewer AS, Langdon G, Brockman DE. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 1992 Jan;166(1 Pt 1):224-30.
- [291] Myatt L, Brewer A, Brockman DE. The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol* 1991 Feb;164(2):687-92.
- [292] Sand AE, Andersson E, Fried G. Effects of nitric oxide donors and inhibitors of nitric oxide signalling on endothelin- and serotonin-induced contractions in human placental arteries. *Acta Physiol Scand* 2002 Mar;174(3):217-23.
- [293] Gude NM, King RG, Brennecke SP. Autacoid interactions in the regulation of blood flow in the human placenta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998 Sep;25(9):706-11.
- [294] Cruz MA, Gonzalez C, Gallardo V, Albornoz J, Munoz ME, Lagos M. Endothelial modulation of vascular tone and 5-hydroxytryptamine-induced responses in human chorionic arteries and veins. *Gen Pharmacol* 1995 Nov;26(7):1571-7.
- [295] Sexton AJ, Loesch A, Turmaine M, Miah S, Burnstock G. Nitric oxide and human umbilical vessels: pharmacological and immunohistochemical studies. *Placenta* 1995 Apr;16(3):277-88.
- [296] Vedernikov YP, Belfort MA, Saade GR, Garfield RE. Inhibition of cyclooxygenase but not nitric oxide synthase influences effects on the human omental artery of the

- thromboxane A2 mimetic U46619 and 17beta-estradiol. *Am J Obstet Gynecol* 2001 Jul;185(1):182-9.
- [297] Boer R, Ulrich WR, Klein T, Mirau B, Haas S, Baur I. The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. *Mol Pharmacol* 2000 Nov;58(5):1026-34.
- [298] Wilkes BM, Hollander AM, Sung SY, Mento PF. Cyclooxygenase inhibitors blunt thromboxane action in human placental arteries by blocking thromboxane receptors. *Am J Physiol* 1992 Oct;263(4 Pt 1):E718-E723.
- [299] Soares de MR. Effect of prostacyclin on the perfusion pressure and on the vasoconstrictor response of angiotensin II in the human isolated foetal placental circulation. *Br J Clin Pharmacol* 1987 Jun;23(6):765-8.
- [300] Abad A, Estan L, Morales-Olivas FJ, Serra V. Reactivity of isolated human chorionic vessels: analysis of some influencing variables. *Can J Physiol Pharmacol* 2003 Dec;81(12):1147-51.
- [301] Kossenjans W, Eis A, Sahay R, Brockman D, Myatt L. Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 Apr;278(4):H1311-H1319.
- [302] Wilson SJ, Cavanagh CC, Leshner AM, Frey AJ, Russell SE, Smyth EM. Activation-dependent stabilization of the human thromboxane receptor: role of reactive oxygen species. *J Lipid Res* 2009 Jun;50(6):1047-56.
- [303] Muzaffar S, Shukla N, Lobo C, Angelini GD, Jeremy JY. Iloprost inhibits superoxide formation and gp91phox expression induced by the thromboxane A2 analogue U46619, 8-isoprostane F2alpha, prostaglandin F2alpha, cytokines and endotoxin in the pig pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 2004 Feb;141(3):488-96.
- [304] Valentin F, Field MC, Tippins JR. The mechanism of oxidative stress stabilization of the thromboxane receptor in COS-7 cells. *J Biol Chem* 2004 Feb 27;279(9):8316-24.
- [305] Ball SK, Field MC, Tippins JR. Regulation of thromboxane receptor signaling at multiple levels by oxidative stress-induced stabilization, relocation and enhanced responsiveness. *PLoS One* 2010;5(9):e12798.
- [306] Zhang M, Dong Y, Xu J, et al. Thromboxane receptor activates the AMP-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells via hydrogen peroxide. *Circ Res* 2008 Feb 15;102(3):328-37.

- [307] Xu S, Jiang B, Maitland KA, et al. The thromboxane receptor antagonist S18886 attenuates renal oxidant stress and proteinuria in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Diabetes* 2006 Jan;55(1):110-9.
- [308] Wang Y, Walsh SW. Aspirin inhibits both lipid peroxides and thromboxane in preeclamptic placentas. *Free Radic Biol Med* 1995 Mar;18(3):585-91.
- [309] Okatani Y, Watanabe K, Wakatsuki A, Tamura S, Sagara Y. Effects of superoxide and peroxynitrite on vascular tension in the human umbilical artery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998 Oct;77(9):883-8.
- [310] Kumar A, Kingdon E, Norman J. The isoprostane 8-iso-PGF₂α suppresses monocyte adhesion to human microvascular endothelial cells via two independent mechanisms. *FASEB J* 2005 Mar;19(3):443-5.
- [311] Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)* 2009 Jun;24:147-58.
- [312] Ferrazzani S, Luciano R, Garofalo S, et al. Neonatal outcome in hypertensive disorders of pregnancy. *Early Hum Dev* 2011 Jun;87(6):445-9.