

Université de Montréal

**Implication du tissu adipeux dans le développement de la
prééclampsie et l'effet bénéfique de l'entraînement
physique**

par Kevin Coutu

Département de biochimie
Faculté de médecine

Mémoire présentée
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en biochimie et médecine moléculaire

Juin 2019

© Kevin COUTU, 2019

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Implication du tissu adipeux dans le développement de la
prééclampsie et l'effet bénéfique de l'entraînement
physique**

Présenté par :
Kevin Coutu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nathalie Grandvaux, Ph. D., présidente-rapporteuse

Julie Lavoie, Ph. D., directrice de recherche

Thierry Alquier, Ph. D., membre du jury

Résumé

Le système rénine-angiotensine (RAS) est impliqué dans l'homéostasie du système cardiovasculaire et contribue aux adaptations maternelles durant la grossesse. Les composantes du RAS sont exprimées dans plusieurs tissus ce qui contribue aux effets systémiques et locaux du RAS. La suractivation du RAS est associée à l'obésité et à l'hypertension chronique. Les altérations locales du tissu adipeux peuvent ainsi contribuer aux hauts niveaux d'angiotensine-II en circulation chez la femme avec prééclampsie. L'activation de la cascade signalétique du RAS mène à une augmentation de la lipogénèse et une diminution de la lipolyse contribuant ainsi à l'obésité.

De manière intéressante, les composantes de l'axe l'angiotensine-II sont favorisées par rapport à l'axe de l'angiotensine-(1-7) dans l'aorte et le placenta chez un modèle murin de prééclampsie surexprimant la rénine et l'angiotensinogène humaines (R^+A^+). Cela pourrait contribuer aux effets exagérés de l'angiotensine-II, comme la vasoconstriction et la dysfonction endothéliale, associé au développement de la prééclampsie.

Nos études précédentes montrent que l'entraînement physique (ExT) pendant 4 semaines avant et durant la gestation suffit à atténuer les symptômes de la prééclampsie, comme l'hypertension et la protéinurie, dans le modèle murin R^+A^+ . En plus d'améliorer les fonctions cardiovasculaires et réduire le stress oxydatif, notre hypothèse est que l'ExT pourrait prévenir les symptômes de la prééclampsie en améliorant les fonctions endocrines et métaboliques du tissu adipeux chez les souris R^+A^+ entraînées. Pour ce faire, nous avons étudié la composition corporelle des souris R^+A^+ comparativement à leur consœur témoin R^-A^- entraînées 4 semaines avant la mise en couple. À la fin de la gestation, une mesure du débit utérin par doppler a été prise pour évaluer le débit dans l'artère utérine. La mesure du profil inflammatoire en circulation et des composantes du RAS ont été mesurées dans les tissus adipeux récoltés et pesés.

Nos résultats montrent que, à la fin de la gestation, les souris R^+A^+ sédentaires ont une moins grande masse adipeuse périgonadique par rapport aux souris témoins R^-A^- sédentaires.

Il est intéressant de noter que l'ExT réduit le gain de masse adipeuse durant la grossesse et élimine l'effet du génotype. Le gain de masse grasse induit par la gestation est accompagné d'une augmentation de l'expression du récepteur de l'angiotensine-II type Ia dans le tissu adipeux périgonadique chez les souris $R^{+}A^{+}$ et $R^{-}A^{-}$. Notre hypothèse est que l'ExT favoriserait l'axe de l'angiotensine-(1-7) par une augmentation de l'expression du récepteur Mas dans le gras périgonadique avant et à la fin de gestation alors que l'angiotensine-II favorise le gain de masse adipeuse. Aussi, l'ExT module les concentrations circulantes de plusieurs adipokines et cytokines. En effet, on observe une augmentation des niveaux de VEGF et de la résistine avec l'ExT ainsi que d'une réduction de la leptine indépendamment du génotype. On observe également une réduction de FGF-21 et fétuine A chez les souris $R^{+}A^{+}$ contribuant potentiellement aux effets délétères de l'Ang-II. Ces résultats sont associés à des changements fonctionnels de l'artère utérine où nous avons remarqué une augmentation de l'indice du débit utérin (VTI) avec l'ExT alors qu'une diminution du VTI est présente chez les souris $R^{+}A^{+}$.

En conclusion, l'ExT avant et durant la gestation favoriserait les fonctions saines du tissu adipeux par la modulation des composantes du RAS et un profil des adipokines antiinflammatoires suggérant que le tissu adipeux pourrait jouer un rôle important dans le développement de la prééclampsie. D'ailleurs, l'ExT augmente significativement le débit utérin autant dans une grossesse pathologique chez les souris $R^{+}A^{+}$ que chez les souris contrôles avec grossesse normale possiblement par une réduction de la résistance périphérique et l'amélioration des fonctions cardiovasculaires.

Mots-clés : Prééclampsie, entraînement physique, tissus adipeux, système rénine-angiotensine, adipokines, débit utérin.

Abstract

The renin-angiotensin system (RAS) is involved in systemic regulation of cardiovascular homeostasis and contributes to maternal adaptations during pregnancy. The RAS components are expressed in several tissues which contribute to systemic and local RAS effects. Interestingly, we report an imbalance in the local components of the angiotensin-(1-7) axis compared to those of angiotensin-II favouring the latter in the adipose tissue in a preeclampsia mouse model, mice overexpressing human renin and angiotensinogen (R⁺A⁺). This could contribute in this tissue to exaggerated angiotensin-II effects, such as vasoconstriction, which have been associated with preeclampsia. Also, exercise training (ExT) 4 weeks before and during pregnancy prevented, in this model, preeclampsia features, such as hypertension and proteinuria, which were associated with a normalization of placental RAS components.

As ExT reduces adiposity before and at the end of gestation, our hypothesis is that ExT modulates adipose tissue function and contributes to the prevention of preeclampsia in R⁺A⁺ mice. Our results showed that ExT reduced increased VEGF and resistin while it reduced leptin independently of genotype suggesting an appropriate glucose distribution to the fetus in response to ExT. Moreover, we found that FGF-21 is reduced in R⁺A⁺ mice independently of ExT. We also found that an index of uterine artery blood flow (VTI) was reduced in R⁺A⁺ mice while ExT improved the VTI. However, we found no changes in the resistance and pulsatility index with genotype nor ExT.

In conclusion, ExT before and during pregnancy may promote healthier adipose tissue function through the modulation of the adipokine profile and improved uterine arteries blood flow.

Keywords : Preeclampsia, exercise training, adipose tissue, renin-angiotensin system, adipokines, uterine arterial blood flow.

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
Liste des tableaux	VI
Liste des figures	VII
Liste des abréviations	VIII
REMERCIEMENTS	XII
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 CLASSIFICATION, DÉFINITIONS ET PHYSIOPATHOLOGIE	2
1.1.1 Hypertension chronique prégestationnelle.....	2
1.1.2 Hypertension gestationnelle.....	2
1.1.3 Prééclampsie.....	2
1.1.4 PESCH.....	3
2 LES COMPOSANTES DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE.....	4
2.1 DÉVELOPPEMENT DU PLACENTA LORS DE LA GROSSESSE NORMALE ET AVEC PRÉÉCLAMPSIE	4
2.2 L'IMPORTANCE DE L'OXYGÈNE DANS LA PLACENTATION	6
2.3 PRÉÉCLAMPSIE PLACENTAIRE.....	7
2.4 PRÉÉCLAMPSIE MATERNELLE	8
2.5 L'OBÉSITÉ DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA PRÉÉCLAMPSIE	8
3 LES COMPOSANTES DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE.....	11
3.1 INTRODUCTION AU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE.....	11
3.2 LE RAS LOCAL DANS LA PRÉÉCLAMPSIE	13
3.3 AT1R DANS LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE.....	13
3.4 IMPLICATION DE AT1R-AA DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA PRÉÉCLAMPSIE.....	14
3.5 L'ANGIOTENSINOGENÈ.....	15
3.6 LA RÉNINE, UNE ENZYME CLEF DANS LA PRODUCTION D'ANG-II.....	16
3.7 LE RAS LOCAL DANS LES ADIPOCYTES ET LEURS RÔLES MÉTABOLIQUES.....	17
3.8 LES COMPOSANTES RAS LOCALES DU TISSU ADIPEUX	18
3.9 L'ÉTUDE DES EFFETS DE L'ANG-II SUR LES ADIPOCYTES	18

3.10	LE RÉCEPTEUR MAS DANS L'AXE DE L'ANG-(1-7)	22
4	LES ADIPOKINES ET HÉPATOKINES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA PRÉÉCLAMPSIE	27
4.1	L'ADIPONECTINE.....	27
4.2	LA LEPTINE	29
4.3	LA RÉSISTINE.....	30
4.4	TNFA.....	31
4.5	FGF-21	31
4.6	FÉTUINE A	32
5	LE TRAITEMENT DE LA PRÉÉCLAMPSIE ET LES BIOMARQUEURS.....	34
5.1	L'APPROCHE PHARMACEUTIQUE	34
5.2	MESURE DU DÉBIT UTÉRIN PAR DOPPLER PULSÉ	35
6	L'EFFET BÉNÉFIQUE DE L'EXT SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA PRÉÉCLAMPSIE	36
6.1	L'EXT AMÉLIORE LA SANTÉ CARDIOVASCULAIRE	36
6.2	L'EXT FAVORISE L'AXE DE L'ANG-(1-7).....	37
6.3	L'EXT RÉDUIT L'INFLAMMATION DE LA PRÉÉCLAMPSIE.....	37
	HYPOTHÈSE.....	39
	MÉTHODOLOGIE	40
	PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS.....	52
	DISCUSSION	83
	PERSPECTIVES	90
	CONCLUSION.....	91
	BIBLIOGRAPHIE	92

Liste des tableaux

Tableau 1 : La liste détaillée des anticorps primaires et secondaires.....	47
Tableau 2 : La séquence des amorces de souris utilisées en PCR en temps réel.	50
Tableau 3 : Les conditions de PCR en temps réel.	51
Tableau 4 : Les conséquences fœtales de l'entraînement physique chez les souris R⁺A⁺.	54
Tableau 5 : Les effets bénéfiques de l'entraînement physique sur les paramètres de l'artère utérine chez les souris R⁺A⁺.....	82

Liste des Figures

Figure 1 : Le défaut de placentation avec la prééclampsie.....	5
Figure 2 : Schéma hypothétique des anomalies de placentation avec l'obésité.....	10
Figure 3 : Le système rénine-angiotensine.....	12
Figure 4 : L'inhibition du RAS dans la différenciation des adipocytes en excès de lipides.	19
Figure 5 : La voie de signalisation biaisée du MasR.....	23
Figure 6 : Les actions auto et paracrine du RAS dans le tissu adipeux.....	27
Figure 7 : Exemple d'immunochemiluminescence de l'Adipokine Array™.....	42
Figure 8 : La Représentation anatomique du système vasculaire reproducteur chez la souris (A) ainsi qu'un exemple d'image de l'artère utérine par doppler pulsé (B).....	43
Figure 9 : Le design d'un gel de Western blot.....	45
Figure 10 : Distance journalière moyenne parcourue avant et pendant la gestation.....	52
Figure 11 : Effets du génotype, de l'Ext et de la gestation sur la masse corporelle, la consommation de nourriture et d'eau chez les souris R ⁺ A ⁺	68
Figure 12 : Effets de la gestation et l'ExT sur la masse grasse et maigre ainsi que sur le gras sous-cutané, périgonadique et périrénal chez les souris R ⁺ A ⁺	72
Figure 13 : Les profils d'expression protéiques de ACE dans le GSC et le GPG avant et à la fin de la gestation.....	74
Figure 14 : Les profils d'expression de MasR dans le GSC et le GPG avant et à la fin de la gestation.....	75
Figure 15 : Le profil d'expression de ACE2.....	76
Figure 16 : Le profil d'expression de AT1Ra dans le GPG avant et à la fin de la gestation.	77
Figure 17 : Le profil d'expression de Mest/Peg1 dans le GPG avant et à la fin de la gestation.....	78
Figure 18 : Le profil d'expression de MCP-1 et de TNF α dans le GPG.....	79
Figure 19 : Le profil d'expression des adipokines en circulation maternelle à la fin de la gestation.....	81

Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine

AgRP : *Agouti-related neuropeptide*

AGT : Angiotensinogène

AKT (ou PKB): Protéine kinase B

ALAT : Alanine aminotransférase

AMPs : Aminopeptidases

Ang : Angiotensine

AP1 : *Activator protein 1*

ASAT : Aspartate aminotransférase

AT1R : Récepteur de l'angiotensine II de type I

AT1R-AA : Auto-anticorps de AT1R

BNP : *Brain natriuretic peptide*

BRET : *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*

C.I. : Contrôle interne (échantillon groupé isovolumique)

CMLv : Cellules musculaires lisses vasculaires

d.p.c. : Jours *post coitum*

EoG : Fin de gestation

ET : Endothéline

ExT : Entraînement physique

FA : Fétuine A

FAS : Acide gras synthase

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes

FOXO1 : Facteurs de transcription de type *Forkhead type 1*

GLUT : Transporteur de glucose

GPCR : Récepteur couplé aux protéines G

GPG : Gras périgonadique

GPR : Gras périrénal

GSC : Gras sous-cutané

HIF-1 α : *Hypoxia inducible factors-1 α*
HMGB1 : *High-Mobility group box 1*
INF : Interféron
IL : Interleukine
IUGR : Restriction de croissance intra-utérine
LIF : *Leukemia inhibitory factor*
LDV : Vitesse diastolique minimale
LOX : Lysyl oxydase
MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*
MasR : Récepteur Mas
MCP-1 (ou CCL2) : Chimiokine des monocytes type 1
MMP-9 : Métalloprotéinase matricielle type 9
Mrgpr : *Mas-related G protein-coupled receptors*
MSC : Cellules souches mésenchymateuses
mTOR : *Mechanistic target of rapamycin*
MT1 : Métallothionéine 1
NEP : Néprilysine
NF- κ B : *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NK : *Natural killer*
NO : Oxyde nitrique
NOS : Oxyde nitrique synthase
PAD : Pression artérielle diastolique
PAS : Pression artérielle systolique
PEP : Prolyl endopeptidase
PESCH : Prééclampsie surajoutée à l'hypertension chronique
PIGF : Facteur de croissance placentaire
PLA : Phospholipase A
PI3K : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
Post-ExT : À la fin des 4 semaines d'entraînement physique, avant la mise en couple
PPAR- γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ*

(P)RR : Récepteur à la prorénine et la rénine
PI : Indice de pulsatilité
PSV : Vitesse systolique maximale
RANTES (ou CCL5) : *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*
RAS : Système rénine-angiotensine
ROCK : *Rho associated protein kinase*
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RI : Indice de résistance
Sem : Semaine
SEM : Erreur standard de la moyenne.
sFlt-1 : *Soluble fms-like tyrosine kinase 1*
SOD : Superoxyde dismutase
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
TGF- β : Transforming growth factor- β
TIMP : Inhibiteur des métalloprotéinases tissulaires
TLR4 : *Toll Like Receptor 4*
TNF α : Facteur de nécrose tumoral α
UA : Artère utérine
U.A. : Unité arbitraire
VEGF : Facteur de croissance soluble de l'endothélium vasculaire
VTI : L'intégrale de la vitesse selon le temps

À mes parents, Robert et Nathalie

À ma sœur, Stéphanie

À ma famille

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Dre Julie Lavoie de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fait confiance. Ses précieux conseils m'ont grandement aidé à progresser dans mon approche scientifique.

Je veux ensuite remercier Dre Émilie Pepin, l'agente de recherche, pour ses précieux conseils et son écoute même tout au long de ma maîtrise. Un gros merci Roxanne Lussier et Johane Morin pour leurs soutiens animaliers et à Paul Tan et Mariane Bertagnolli pour avoir su m'enseigner leurs expertises respectives. Votre travail colossal a été essentiel dans le présent projet et des résultats qui en découlent.

J'adresse également mes remerciements à Alexandre, Nozha, Shahin et Thomas, collègues étudiants au doctorat, avec qui nous avons du plaisir et partagé de nombreux moments inoubliables. Mes honneurs se tournent vers Maude-Marie, Mostafa et Camille pour leurs contributions à ce projet.

Je tiens à remercier les membres de ma famille pour leur soutien, leur amour inconditionnel et leurs encouragements au fil des années d'études complétées et à venir.

1 Introduction

Les troubles hypertensifs gestationnels affectaient mondialement de 6 à 10 % des grossesses en 2009 et sont la cause principale de décès en lien avec la grossesse. Selon l'Organisation mondiale de la santé, l'hypertension gestationnelle serait à l'origine de 16% de la mortalité maternelle dans les pays industrialisés et de 25% dans les pays en voie de développement. Au Canada, les troubles hypertensifs gestationnels sont responsables de 21% des morts maternelles [1] et 14% [2] des morts infantiles par année et engendrent des couts estimés à 88M\$ [3] par année. De ce nombre, 10 à 15% des morts maternelles sont attribués à la prééclampsie et l'éclampsie. La prééclampsie est une pathologie gestationnelle caractérisée par des symptômes materno-fœtaux. La prééclampsie est caractérisée typiquement par de l'hypertension et de la protéinurie après 20 semaines de grossesse et est associée à une réduction de la perfusion du placenta nuisant ainsi à la croissance intra-utérine. De plus, on estime que la prééclampsie serait responsable de 12% des accouchements prématurés (entre 33 et 36 semaines de grossesse) [4]. Les troubles gestationnels hypertensifs se subdivisent en différents types, soit l'hypertension chronique, l'hypertension gestationnelle, la prééclampsie et la prééclampsie surajoutée à l'hypertension chronique (PESCH). Les facteurs de risque de la prééclampsie incluent l'âge (>45 ans), la primiparité, une hypertension préexistante et l'obésité. De ce fait, et en lien avec la pandémie d'obésité actuelle, la prévalence de la prééclampsie tend à s'accroître en Amérique du Nord. De plus, les études épidémiologiques tendent à montrer que les femmes qui ont été atteintes par la prééclampsie sont deux fois plus à risque de développer des maladies cardiovasculaires . Il y a donc des besoins importants pour le développement de nouvelles stratégies pour la prévention et le traitement de la prééclampsie étant donné que le seul traitement disponible actuellement est l'induction de l'accouchement, avec son lot de conséquences pour la mère et le fœtus.

1.1 Classification, définitions et physiopathologie

1.1.1 Hypertension chronique prégestationnelle

Cette condition concerne 1 à 5 % des femmes enceintes, mais sa fréquence augmente rapidement en raison de l'épidémie actuelle d'obésité et de l'âge avancé des femmes lorsqu'elles deviennent enceintes [5]. Dans ces conditions, l'hypertension doit être présente avant la grossesse ou diagnostiquée avant la vingtième semaine de gestation, avec une pression artérielle systolique (PAS) ≥ 140 mmHg et/ou pression artérielle diastolique (PAD) ≥ 90 mmHg, sans protéinurie. Une hypertension chronique sévère est observée lorsque la PAS ≥ 160 mmHg et/ou la PAD > 110 mmHg .

1.1.2 Hypertension gestationnelle

Elle concerne environ 6 à 7 % des femmes enceintes. Il s'agit d'une hypertension transitoire se déclarant de *novo* après vingt semaines de gestation, ou apparaissant dans les 24 premières heures *post-partum*. Une définition fondée sur les niveaux absolus de pression artérielle est maintenant référée avec des valeurs de PAS ≥ 140 et/ou d'une PAD ≥ 90 mmHg [6], sans protéinurie. Le Collège américain des Obstétriciens et Gynécologues (ACOG) définit les symptômes de l'hypertension sévère par une PAS ≥ 160 mmHg ou une PAD ≥ 110 mmHg.

1.1.3 Prééclampsie

La prééclampsie touche 3 à 5 % des femmes enceintes en 2016 [7] et est l'une des complications de la grossesse qui a le potentiel de causer la mort soit de l'enfant, la mère, ou les deux, même dans les pays développés. Ce syndrome est caractérisé par l'apparition d'une hypertension de *novo*, accompagné d'une protéinurie ou d'autres désordres systémiques dans la deuxième partie de la grossesse soient après vingt semaines de grossesse. La définition est semblable à celle de l'hypertension gestationnelle soit une PAS ≥ 140 et/ou d'une PAD ≥ 90 mmHg. La protéinurie est présente chez 14 % des femmes avec une prééclampsie et chez 20 % des femmes avec une éclampsie. La survenue de convulsions définit l'éclampsie [8]. L'ACOG a révisé les critères de diagnostics de la prééclampsie qui est maintenant être diagnostiquée sans protéinurie lorsque l'hypertension est accompagnée de thrombocytopénie, de lésions rénales aiguës, d'œdèmes pulmonaires ou des symptômes neurologiques ou visuels ce qui distingue la prééclampsie de l'hypertension gestationnel [9]. La protéinurie se définit par la présence de protéines dans l'urine et peut être liée à de nombreuses pathologies, particulièrement rénales.

Le risque de prééclampsie et d'éclampsie est plus élevé chez les filles de mères ayant elles-mêmes souffert de prééclampsie suggérant que des composantes génétiques augmentent le risque d'engendrer une grossesse avec prééclampsie [10]. De plus, les hommes de mères qui ont été atteintes de prééclampsie ont un risque plus élevé d'induire la prééclampsie ou l'éclampsie à leur femme [10]. Les facteurs de risque suivants pour la prééclampsie ont été décrits : l'hypertension artérielle avant la grossesse, l'ethnie africaine, nordique ou de l'Asie du Sud, l'âge ($20 <$ et > 40 ans), les grossesses multiples ou gémellaires, un diabète de type II, un antécédent personnel ou familial de prééclampsie, le syndrome des anticorps antiphospholipides, un indice de masse corporelle $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ (obèse) [11, 12]. La prééclampsie est asymptomatique avant la 20^e semaine de grossesse, et l'accouchement peut être provoqué lorsqu'il y a de l'hypoxie fœtale ou lorsqu'il y a risque de mortalité maternelle [13]. Mondialement, la prééclampsie et les troubles hypertensifs gestationnels sont la première cause de maladie et de décès maternels-fœtaux estimés à 76 000 décès maternels et 500 000 décès fœtaux chaque année [14].

1.1.4 PESCH

Elle touche environ 20 à 25 % des femmes souffrant d'une hypertension chronique, ou d'une atteinte rénale même modérée comme une néphropathie diabétique [15]. Elle se définit par une hypertension chronique prégestationnelle et d'une augmentation $\geq 30 \text{ mmHg}$ après 20 semaines de grossesses accompagnées d'une protéinurie. Les critères de PESCH et la PE sont très similaires, la différence étant que chez les femmes qui développent la PESCH, il s'agit d'une augmentation de pression artérielle par rapport à avant la gestation, alors qu'une partie du diagnostic est basé sur les valeurs de pression artérielle.

2 Les composantes du système rénine-angiotensine

2.1 Développement du placenta lors de la grossesse normale et avec prééclampsie

Le placenta est lié aux déciduas maternelles par les villosités d'ancrage. Durant la placentation normale (Figure 1), les cytotrophoblastes forment le pont du côté maternel et migrent le long des déciduas maternelles et des artères spiralées [16]. Les cytotrophoblastes pénètrent les parois des artères spiralées déciduales qui sont obstruées avant 9 semaines de gestation et remplacent une partie de l'endothélium maternel (Figure 1A). Ceci cause une perte des muscles lisses suivie d'une vasodilatation. Dans les déciduas, les cytotrophoblastes sont confrontés à plusieurs cellules *natural killer* et plusieurs macrophages. Durant la grossesse normale, ces cellules immunitaires facilitent l'invasion des cytotrophoblastes dans les segments myométriaux (Figure 1A) et favorisent le remodelage des artères spiralées.

Simultanément, le fœtus est engagé dans la génération d'organes, et est particulièrement vulnérable aux dommages du stress oxydatif et des processus inflammatoires dans le placenta [17, 18]. Après 9 semaines de grossesse, les artères utéroplacentaires commencent à se canaliser du côté maternel vers le côté fœtal du placenta, un processus qui se complète en 3 semaines [19, 20]. D'ailleurs, l'hypoxie et le stress oxydatif placentaires présents, en excès, avec la prééclampsie ont pour effet de retarder l'invasion et la différenciation des trophoblastes . Vers la 20^e semaine de grossesse, ce processus est plus ou moins complété de telle sorte que la circulation maternelle peut alimenter l'expansion de l'espace intervilloux du placenta. D'ici la fin de la grossesse, une grande surface fœtale est formée par les microvillosités établissant un contact direct avec le sang maternel.

Dans le stade préclinique de la prééclampsie, l'invasion cytotrophoblastique est restreinte (Figure 1B) ce qui contribue à un remodelage insuffisant des artères spiralées ce qui produit une ischémie. Cela est appelé une pauvre implantation du placenta et caractérise la prééclampsie placentaire ainsi qu'induit les symptômes cliniques de retard de croissance intra-utérine du fœtus . La prévalence de la restriction de croissance intra-utérine, avec ou sans prééclampsie, est environ 10% des grossesses et constitue un risque majeur de maladies cardiovasculaires, d'hypertension et de diabète de type II pour le fœtus lors de la vie adulte [21].

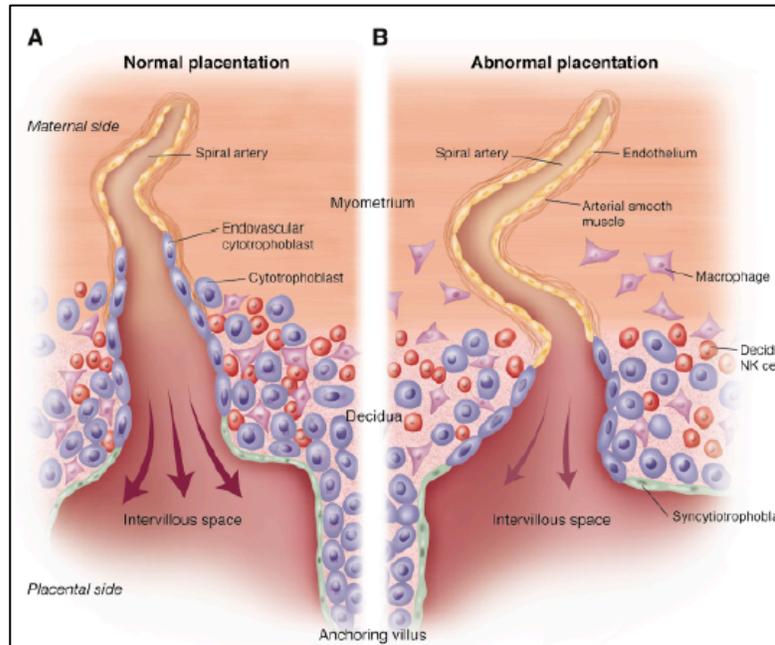


Figure 1 : Le défaut de placentation avec la prééclampsie.

La placentation normale (A) et la placentation lors de la prééclampsie (B) à 15-16 semaines de grossesse. *Image tirée de . Figure reproduite avec l'autorisation du journal.*

En plus des impacts sur le fœtus, cette ischémie placentaire s'accompagne d'une formation de facteurs solubles comme l'endogline et le *soluble fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt-1, une forme soluble du récepteur au VEGF et PlGF) qui sont des protéines anti-angiogéniques et antagonistes au VEGF et PlGF. Ce débalancement angiogénique mène à une dysfonction endothéliale maternelle avec la prééclampsie et peut-être est suivi d'une activation de la cascade de la coagulation . Aussi, les adaptations cardiovasculaires avec la prééclampsie s'accompagnent d'une réduction de l'augmentation du volume plasmatique normalement observée lors de la grossesse, d'une augmentation de la résistance vasculaire systémique et d'une diminution du débit cardiaque.

2.2 L'importance de l'oxygène dans la placentation

Le premier trimestre est critique pour le succès de la gestation. Durant cette période, la prolifération et la différenciation des cytotrophoblastes sont modulées par les changements de pression partielle de l'oxygène [22]. Le débit sanguin au placenta est initialement minimal créant un environnement hypoxique. En fait, la tension partielle de l'oxygène est estimée entre 20 et 40 mmHg à 8-10 semaines de grossesse dans l'espace intervilloux de l'endomètre et de la décidua, respectivement, en comparaison à 60 et 45 mmHg, respectivement, entre 12-14 semaines après que l'invasion trophoblastique a débuté [23]. Ce stade de placentation est caractérisé par une croissance rapide du placenta et contribue au développement futur du fœtus assurant la capacité du placenta à promouvoir les échanges gazeux, de nutriments et des déchets métaboliques.

Les cytotrophoblastes sont hautement prolifératifs en condition hypoxique [22]. Cet état de prolifération est accompagné d'une diminution concomitante de la capacité de ces cellules à se différencier comme démontré par l'expression d'antigènes spécifiques à l'invasion comme une réduction de l'intégrine $\alpha 1$ et du *hypoxia inducible factors-1 α* (HIF-1 α), le principal régulateur de plusieurs gènes en réponse à l'hypoxie [24]. Au fur et à mesure que la prolifération progresse, les cytotrophoblastes en périphérie gagnent l'accès aux artères maternelles riches en oxygène. Les cellules cytotrophoblastiques passent du stade prolifératif à invasif vers la 10^e semaine de grossesse [25]. Pendant ce temps, la différenciation des cytotrophoblastes endovasculaires débute avec la différenciation de ces cellules en cellules mésenchymateuses avec l'expression des métalloprotéinases telles que MMP-9 et TIMP-3. Leur expression permet la motilité et l'invasion des cytotrophoblastes endovasculaires induites par HIF-1 α en conditions hypoxiques [26]. En effet, les études *in vitro* ont démontré qu'une abondance d'oxygène modifie la famille des intégrines αV des cytotrophoblastes caractérisée par une augmentation notable des intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 3\beta 3$ [27]. Ainsi, une tension d'oxygène relativement élevée favoriserait donc la différenciation des cytotrophoblastes et l'invasion endovasculaire des artères spiralées.

Les conditions hypoxiques favorisent l'expression de HIF-1 α puisque le placenta est initialement maintenu dans des conditions pauvres en oxygène jusqu'à la 10^e semaine de grossesse [28]. Dans ces conditions hypoxiques, les niveaux insuffisants de HIF-1 α de même que TGF- $\beta 3$ entraînent une invasion peu profonde des trophoblastes et prédisposent à une grossesse prééclampsie

[29]. Il faut savoir que HIF-1 α stimule l'expression de VEGF, un médiateur angiogénique, ainsi que la famille des angiopoïétines qui sont essentielles à la placentation normale. La famille des VEGFs est impliquée dans la prolifération des cellules endothéliales, l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire et l'inflammation, alors que les angiopoïétines sont impliquées dans la survie endothéliale, la germination capillaire et la stabilisation vasculaire. PlGF est exprimé dans l'endomètre et le placenta. Il est impliqué dans la maturation des cellules NK dans l'artère utérine. La surexpression de PlGF dirige VEGF vers VEGFR-2 renforçant l'angiogenèse. Cependant, lorsqu'il y a un déséquilibre de la voie signalétique de VEGF/VEGFR-1 en faveur de l'activation du VEGFR-2, PlGF peut induire une inflammation sévère causant des dommages tissulaires pouvant conduire à des défauts précoces de la placentation [30]. Il existe deux cas typiques de prééclampsie : (1) prééclampsie placentaire ; (2) prééclampsie maternelle.

2.3 Prééclampsie placentaire

La prééclampsie placentaire se développe en deux étapes clés : 1) Avant 20 semaines et 2) Après 20 semaines. Durant la première étape, la prééclampsie placentaire s'accompagne d'un développement inadéquat du placenta principalement dû à une invasion inadéquate des trophoblastes (voir Figure 1). Dans la deuxième étape, l'hypoxie placentaire induit le relâchement de cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, INF γ , TNF α) essentiels au maintien de réponse immunitaire alors que d'autres facteurs anti-angiogéniques (sVEGF-R1, l'endostatine, l'angiostatine, les thrombospondines-1 et -2) sont utiles lors de la réparation tissulaire, de la cicatrisation et de barrière du développement tumoral. On suspecte que ces médiateurs sont impliqués dans le défaut de placentation et dans le développement des symptômes cliniques maternels dont l'hypertension et la protéinurie, ainsi que l'activation de la cascade de coagulation et une élévation des enzymes hépatiques (ASAT, ALAT, lactate déshydrogénase) qui caractérisent le syndrome HELLP (hémolyse, enzymes hépatiques élevées et faibles plaquettes). L'incidence du syndrome HELLP est de 0,5% à 0,9% de toutes les grossesses et de 10 à 20% chez les femmes atteintes de prééclampsie sévère [31]. Dans une prééclampsie sévère, particulièrement vers la fin de la gestation (vers 34 semaines), les conditions restrictives d'insuffisance respiratoire chez la mère et d'asphyxie fœtale sont fréquentes et potentiellement létales pour le fœtus et la mère [16].

2.4 Prééclampsie maternelle

Dans le modèle à deux étapes présentées précédemment, un placenta dysfonctionnel et hypoxique sécrète des facteurs angiogéniques, inflammatoires, et de croissances dans la circulation maternelle et induisent les symptômes cliniques maternels de la prééclampsie. Cela apparaît à la suite d'une réponse inflammatoire généralisée et systémique causée potentiellement par la dysfonction endothéliale [32]. Généralement, les femmes avec prééclampsie ont une augmentation des concentrations circulantes de sFlt-1 qui est accompagnée d'une réduction des concentrations de VEGF et PlGF libre qui sont des facteurs angiogéniques produits, entre autres, par le placenta. L'anticorps anti-VEGF mimique l'action anti-angiogénique de sFlt-1 qui est utilisée pour traiter le cancer métastatique colorectal et rénal. Cet anticorps cause aussi de l'hypertension et de la protéinurie, symptômes typiques de la prééclampsie, mais dans une condition non enceinte. De plus, l'administration de sFlt-1 cause des lésions endothéliales dans les glomérules rénaux, de l'hypertension et de la protéinurie chez la ratte gestante ce qui est typiquement observé lors de la prééclampsie [33]. Il existe deux hypothèses sur le rôle de sFlt-1 [34] : (1) dans le placenta d'une femme avec prééclampsie, sFlt-1 inhibe l'invasion des cytotrophoblastes [35] et le débit sanguin est ainsi limité dans les artères spiralées produisant ainsi une hypoxie placentaire.(2) Le sFlt-1 placentaire se lie au VEGF et PlGF dans la circulation maternelle ce qui pourrait contribuer à la dysfonction endothéliale généralisée en augmentant résistance périphérique et la perméabilité vasculaire et rénale maternelle donnant lieu à des œdèmes généralisés et de la protéinurie [36]. Il demeure inconnu si l'hypoxie déclenche la sécrétion de sFlt-1 dans le placenta lors de la prééclampsie ou si l'augmentation de l'expression de sFlt-1 interfère avec l'invasion des trophoblastes et le remodelage des artères spiralées impliqué dans l'oxygénation placentaire [33].

2.5 L'obésité dans le développement de la prééclampsie

Une énorme quantité de données suggèrent que l'obésité soit un facteur de risque majeur du développement de l'hypertension durant la gestation [37]. De plus, plus le degré d'obésité est élevé, plus l'incidence et la sévérité de la prééclampsie sont élevées. Typiquement, les femmes avec un surpoids, obèses et obésité morbide sont à risques respectifs croissants de développer la prééclampsie avec des symptômes sévères à 34 semaines de gestation [38]. L'impact de l'obésité et des anomalies métaboliques associées sur la cascade d'évènements contribuant aux troubles hypertensifs gestationnels est méconnu. Réciproquement, l'ensemble des femmes obèses ne développeront pas

toutes la prééclampsie. Cela suggère que 1) plusieurs femmes obèses enceintes sont protégées contre cette pathologie et que 2) les anormalités métaboliques reliées à l'obésité et l'ischémie placentaire peuvent être exagérée chez les femmes obèses avec prééclampsie. La compréhension des différences entre ces deux groupes aiderait dans la compréhension de l'impact de l'obésité sur l'augmentation du risque de développer la prééclampsie. En effet, les femmes obèses sont plus susceptibles de développer une prééclampsie sévère et d'avoir une gestation plus courte [39].

Plusieurs mécanismes reliant l'obésité et le développement de la prééclampsie ont été proposés à ce jour (voir Figure 2). En fait, il a été proposé que l'obésité exagère les actions prohypertensives des cellules inflammatoires qui sont sécrétées en réponse à l'ischémie et les défauts placentaires qui caractérisent la prééclampsie. De plus, les niveaux d'inflammation chronique de faible intensité qui sont souvent associés à l'obésité peuvent contribuer aux altérations placentaires. Des évidences indirectes suggèrent que le récepteur TLR4 serait impliqué dans les mécanismes d'inflammations par lesquels l'obésité augmenterait le risque de la prééclampsie [40]. TLR4 est un nouveau récepteur pour HMGB1 [41] et ce facteur est augmenté dans le placenta chez les femmes avec prééclampsie. En effet, il est relâché par les trophoblastes en conditions hypoxiques [42]. Le tissu adipeux est aussi une source de HMGB1 circulant, et pourrait donc contribuer au développement de la prééclampsie chez les femmes obèses. D'ailleurs, une étude a montré que les niveaux circulants d'HMGB1 étaient supérieurs chez les femmes gestantes avec un surpoids et du diabète gestationnel comparativement aux femmes avec une grossesse normale [43]. Somme toute, HMGB1 est un médiateur induit par l'obésité qui peut contribuer à la résistance à l'insuline.

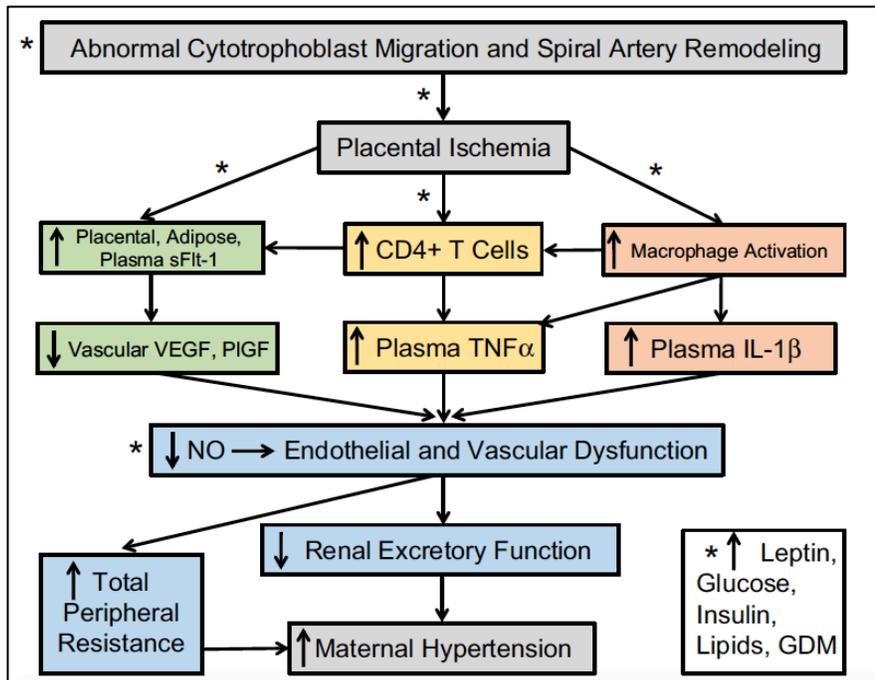


Figure 2 : Schéma hypothétique des anomalies de placentation avec l'obésité.

Les astérisques dénotent où l'obésité peut favoriser et même exagérer les voies de l'ischémie placentaire ou l'hypertension maternelle. *Image tirée de . Figure reproduite avec l'autorisation du journal.*

3 Les composantes du système rénine-angiotensine

3.1 Introduction au système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine (RAS) est important dans la pathogenèse de l'hypertension parce qu'il est impliqué dans la régulation de la pression artérielle et dans l'homéostasie des fluides (Figure 3). De plus, il a été démontré que ce système est altéré chez les femmes atteintes de prééclampsie ainsi que dans plusieurs autres maladies comme le diabète de type II et la néphropathie diabétique [8]. La cascade classique du RAS débute avec le clivage de l'AGT (produite par le foie et le tissu adipeux) par la rénine produisant l'angiotensine I (Ang-I). La rénine, produite par les cellules juxtaglomérulaires du rein, est une enzyme limitante dans la production de l'Ang-II [45]. La peptidase enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), principalement exprimée dans l'endothélium pulmonaire et rénal, ensuite retire 2 acides aminés du côté C-terminal produisant le peptide actif de l'Ang-II. L'Ang-II est le peptide bioactif principal du RAS et agit comme vasoconstricteur par sa liaison au récepteur de l'Ang-II de type 1 (AT1R). ACE2 est important dans la régulation du RAS, car elle convertit l'Ang-II en Ang-(1-7) qui est un vasodilatateur par sa liaison au récepteur Mas (MasR). Plusieurs enzymes tissulaires sont capables de synthétiser l'Ang-(1-7) à partir de l'Ang-II. La néprilysine (NEP ou CD10) convertit l'Ang-I en Ang-(1-7). L'enzyme de conversion de l'Ang de type 2 (ACE2) convertit l'Ang-II en Ang-(1-7). ACE et les aminopeptidases inactivent l'Ang-(1-7) par le clivage en plus petits fragments. Les peptides dérivés de l'AGT agissent comme neurotransmetteur, régulateur de la pression artérielle, la mémoire et l'anxiété [46]. De ce fait, la surexpression de la rénine et l'angiotensinogène humaine avec leurs promoteurs endogènes mènent à une suractivation du RAS [47].

Les composantes du RAS sont surexprimées en circulation et au niveau tissulaire avec la prééclampsie par rapport à la grossesse normale [48]. Ainsi, la prééclampsie serait caractérisée par une hypertension hypovolumique indicative d'une réduction, entre autres, de l'activité de la rénine plasmatique par rapport à une grossesse normale. De plus, notre laboratoire a démontré dans un modèle de souris avec prééclampsie, les souris $R^{+}A^{+}$, que l'axe Ang-II-AT1R est favorisé par rapport à l'axe Ang-(1-7)-MasR dans le placenta et l'aorte [49].

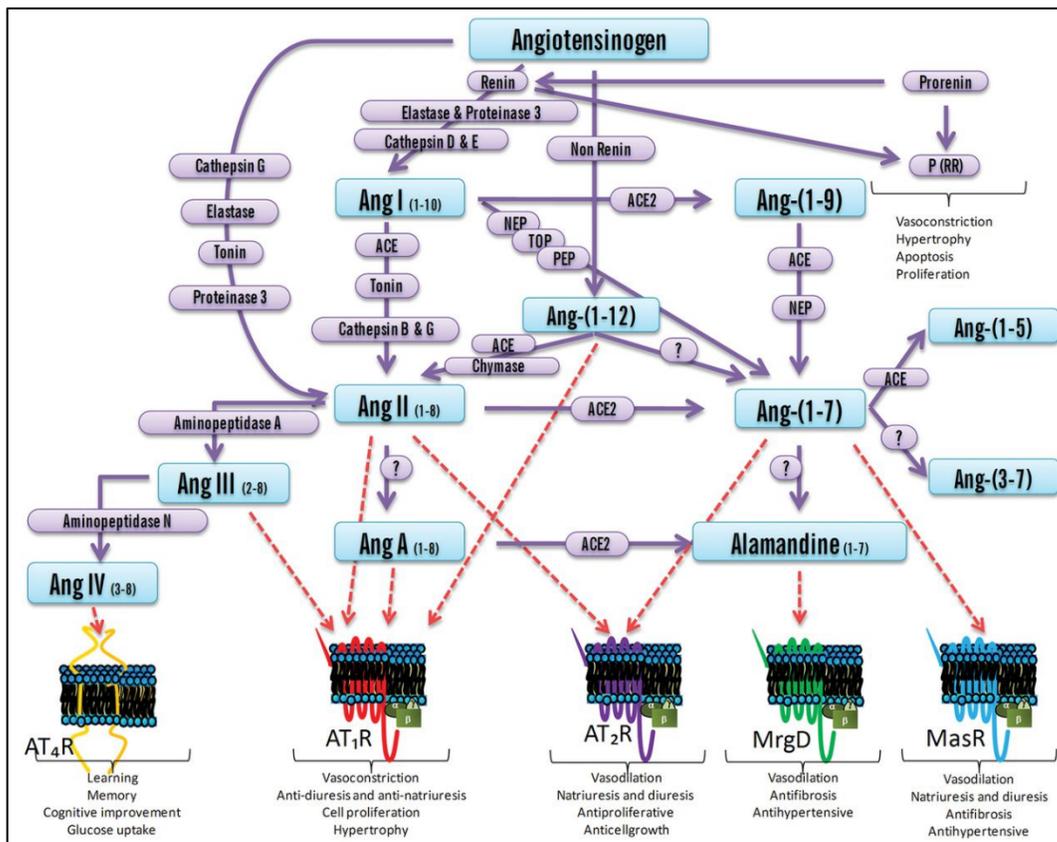


Figure 3 : Le système rénine-angiotensine.

L'AGT, le substrat de départ, est clivé par la rénine en Ang-I. Dans la voie classique, l'Ang-I est clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) en Ang-II où l'Ang-II agit sur ces récepteurs AT₁R et AT₂R. Dans la voie alternative, l'Ang-(1-7), provenant du clivage de l'Ang-II par ACE2 ou de l'Ang-(1-9) par ACE, agit sur les récepteurs MasR et AT₂R. Les actions de l'Ang-(1-7) sur MasR contrebalancent les effets vasoconstricteurs de l'Ang-II sur son récepteur AT₁R. MrgD : *Mas receptor G coupled protein* ; PEP : prolyl endopeptidase ; P(RR) : récepteur à la prorenine et la rénine ; TOP : thimet oligopeptidase. *Image tirée de [50]. Figure reproduite avec l'autorisation du journal.*

3.2 Le RAS local dans la prééclampsie

Initialement le RAS était identifié comme une simple cascade systémique. Maintenant, nous savons que plusieurs tissus expriment les composantes du RAS qui contribuent à des effets tissulaires et possèdent donc un RAS dit local. Quoique chacun des RAS locaux peut être impliqué directement dans les symptômes associés à la prééclampsie, ces éléments ont peu été étudiés dans le passé. En effet, la contribution du RAS local est possiblement impliquée puisque la concentration plasmatique en rénine et en Ang-II sont diminuées avec la prééclampsie par rapport à une grossesse normale et que les composantes locales du RAS exagèrent les effets délétères de l'Ang-II dans ces tissus [51, 52].

3.3 AT1R dans le système rénine-angiotensine

AT1R est un récepteur couplé aux protéines G de classe A de sous-type II couplé aux sous-unités $G\alpha_q$ qui est hautement exprimé dans le système cardiovasculaire comme il régule, entre autres, la sécrétion de l'aldostérone et la pression artérielle [53]. Son ligand, l'Ang-II, exerce la majorité de ses effets sur la pression sanguine par l'activation du récepteur AT1 de par ses effets vasoconstricteurs. Il favorise également la prolifération cellulaire, la libération d'aldostérone et de catécholamines et l'activité sympathique ainsi que la rétention d'eau et la réabsorption de sel dans les tubules rénaux [54]. Le récepteur AT2, beaucoup moins abondant que l'AT1R, excepté en conditions fœtales, possède des fonctions contraires au AT1R puisqu'il peut inhiber la croissance cellulaire, favoriser l'apoptose, la vasodilatation, la natriurèse et la libération de bradykinine [55].

Chez la souris avec prééclampsie R^+A^+ , la liaison de l'Ang-II à son récepteur AT1 de type a est impliqué dans la régulation de la pression artérielle, la vasoconstriction, la dysfonction endothéliale par l'inhibition de la production de NO et l'activation de la NADPH oxydase. Cela aurait comme conséquence de favoriser la production de superoxyde impliquée dans le développement de la fibrose cardiaque, l'inflammation associée avec l'athérosclérose et la formation de plaque d'athérosclérose .

3.4 Implication de AT1R-AA dans le développement de la prééclampsie

Certaines études ont démontré que les patientes atteintes de prééclampsie expriment l'autoanticorps antagoniste du récepteur AT1 (AT1R-AA) suggérant également l'implication du RAS dans la prééclampsie. De manière intéressante, l'AT1R-AA a été identifié dans la circulation chez les femmes prédisposées à développer la prééclampsie. L'AT1R-AA a une grande affinité pour AT1R et capacité d'induire une réponse exagérée, favorisant l'axe de l'Ang-II, résultant, entre autres, en une sécrétion de sFlt-1 par le placenta [56]. L'AT1R-AA agit en se liant à son récepteur, soit AT1R. La signalisation de AT1R ne régule pas seulement la plupart des gènes placentaires, par exemples PAI-1 dans l'invasion des trophoblastes et sFlt1 impliqués dans l'angiogenèse, AT1R est aussi impliqué dans la régulation de protéines reliées à l'invasion des trophoblastes [54]. Cependant, l'élaboration d'un traitement avec un inhibiteur du AT1R n'est pas appropriée chez les femmes enceintes puisque ce traitement cause une sévère malformation des reins chez le fœtus et est donc tératogène [57]. L'action physiologique de AT1R-AA pourrait contribuer au phénotype de vasoconstriction et d'hypercoagulation en lien avec la pathophysiologie de la prééclampsie. Les actions de AT1R-AA sont les suivantes : (i) augmentation de la production de sFlt-1, via l'activation de AT1R et le facteur nucléaire calcineurine, impliqué dans l'hypertension, l'hypertrophie cardiaque et la prééclampsie [58] ; (ii) réduis la fibrinolyse et augmente PAI-1, ce qui favorise la rupture de la matrice extracellulaire placentaire responsable de l'invasion des trophoblastes qui est importante dans le développement placentaire [59] ; (iii) augmentation de la fibrinolyse et la rupture de la matrice extracellulaire dans les reins accompagnée de la production de PAI-1 ce qui contribue au développement la protéinurie et réduit la fonction rénale [60] ; (iv) active la NADPH oxydase endothéliale et produit des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) via la voie MAPK/ERK pour ensuite activer la voie NF- κ B qui est impliquée dans la réponse inflammatoire lors de la prééclampsie [61] ; (v) augmente la concentration intracellulaire de calcium via le facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT) qui encodent les gènes de PAI-1, l'interleukine 8 et TNF α impliqués dans l'inflammation exagérée chez les patientes avec prééclampsie [62], et (vi) augmenter la production de facteurs tissulaires (TF) stimulant la voie extrinsèque de la cascade de coagulation [63]. Ainsi, l'AT1R-AA pourrait contribuer à tous les symptômes cliniques et les changements pathologiques observés avec la prééclampsie. Pourtant, plusieurs études existent concernant la localisation et l'expression de AT1R-AA dans une grossesse normale [54, 64, 65]. Cela fait en sorte que l'AT1R-AA n'est pas un bon marqueur de la PE.

3.5 L'angiotensinogène

L'AGT est produit par plusieurs tissus : le foie (la source principale d'AGT en circulation), le tissu adipeux, les reins, le cœur et le cerveau. Jeunemaitre et al. ont trouvé que le polymorphisme M235T de l'AGT est plus fréquent chez les individus hypertensifs. De plus, les individus M235T ont plus d'AGT en circulation que les individus 235M. Inoue et al. ont démontré que le polymorphisme 235 est lié à un second polymorphisme dans une région promotrice (G à -6 chez 235M et A à -6 chez M235T). La région promotrice avec un A à -6 est associée avec une augmentation de l'AGT en circulation. Jain et al. ont identifié un polymorphisme A/G à -217 dans la région promotrice du gène de l'AGT, et que, particulièrement chez les individus afro-américains, un A à -217 est fortement associé à l'hypertension essentielle due à l'augmentation de la liaison des glucocorticoïdes au promoteur de l'AGT. Les polymorphismes du gène de l'AGT supportent la relation entre le RAS et l'hypertension.

Le tissu adipeux est impliqué dans le contrôle de l'appétit, de la sensibilité à l'insuline et dans le développement des maladies cardiovasculaires. Il est intéressant de noter que même si l'AGT en circulation provient majoritairement du foie, le tissu adipeux blanc peut contribuer de manière significative. Dans le contexte de l'obésité, l'augmentation de la masse du tissu adipeux résulte en une hausse de la production d'AGT localement qui, une fois en circulation, peut représenter jusqu'à 30 % de l'AGT plasmatique. Conséquemment, les études démontrent une augmentation d'Ang-II circulant chez les sujets obèses, favorisant le développement de l'hypertension et d'autres maladies cardiovasculaires.

Des études clefs ont examiné la surexpression de l'AGT spécifiquement dans le tissu adipeux utilisant le promoteur aP2 chez la souris [66]. Ce modèle a été développé sur un fond génétique de type sauvage, et aussi chez des souris déficientes en AGT. Quand l'expression de l'AGT est restreinte au tissu adipeux (sur un fond génétique invalidant AGT), l'AGT a été détecté en circulation et les souris étaient normotensives suggérant que le tissu adipeux contribue significativement aux niveaux circulants d'AGT. De plus, les souris surexprimant l'AGT dans le tissu adipeux (sur un fond génétique de type sauvage) montraient un haut taux d'AGT en circulation et étaient hypertendues. Les résultats de cette étude ont montré que l'AGT produite par le tissu adipeux contribue à l'AGT en circulation.

Chez l'humain, les études ont démontré que la concentration en AGT corrèle positivement avec l'indice de masse corporelle ($r = 0,33$; $p < 0,05$). De plus, dans une étude voulant déterminer l'influence de la perte de poids sur les composantes du RAS du tissu adipeux, les taux circulants d'AGT (-27%), de rénine (-43%), d'aldostérone (-31%) et d'ACE (-12%) ont diminué significativement ($p < 0,05$) avec la perte de poids et étaient associés avec une réduction de 7 mmHg de la pression artérielle systolique [67]. Dans cette même étude, la réduction de l'AGT corrèle hautement avec la réduction de tour de taille ($r=0,74$; $p < 0,001$). Ces résultats suggèrent que la réduction de 5% de la masse corporelle par restriction calorique peut mener à une réduction significative des composantes du RAS en circulation et dans le tissu adipeux qui peut contribuer à une réduction de la pression artérielle.

De pair, les souris avec une invalidation génétique de l'AGT ($AGT^{-/-}$) ont une hypotension sévère et surexpriment la rénine. Ces souris ont aussi un haut taux de mortalité néonatale associée avec une incapacité à concentrer l'urine, et ont des anomalies rénales incluant l'hydronephrose et l'hypertrophie des artères rénales. De plus, les souris invalidant l'AGT sont maigres. Bien que la consommation de nourriture et la sécrétion de gras dans les fèces soient similaires aux souris témoins, les souris $AGT^{-/-}$ ont une augmentation significative de la dépense énergétique en partie due à une augmentation de l'activité motrice. De plus, les niveaux d'expression des protéines de découplage (UCP-1,2,3) dans les tissus adipeux bruns, qui dissipent la chaleur en produisant de l'ATP, ne diffèrent pas entre les $AGT^{-/-}$ et les souris témoins. Cependant, les souris $AGT^{-/-}$ montraient une réduction de la masse des tissus adipeux blancs associés à une diminution de l'activité de l'acide gras synthase.

3.6 La rénine, une enzyme clef dans la production d'Ang-II

Le clivage de l'AGT en Ang-I par la rénine est une étape limitante dans la production de l'Ang-II. La rénine est sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires de la partie afférente du néphron. Dans la population espagnole, les individus avec le génotype GG à l'intron 4 rs5707 ont une pression artérielle significativement plus haute comparée aux génotypes TT ou TG. Les individus avec le génotype GG de la mutation du contresens dans l'exon 9 (G10151A) ont une plus haute activité de la rénine plasmatique, et ce polymorphisme pourrait être impliqué dans l'étiologie de l'hypertension.

Les souris avec invalidation génétique de la rénine ($Ren1c^{-/-}$) ont un niveau indétectable d'activité de la rénine et d'Ang-I et Ang-II plasmatique. De plus, la pression artérielle de ces animaux est plus faible que les souris de type sauvage de 20-30 mmHg. Chez ces souris KO, on observe aussi une augmentation du volume urinaire et de la consommation d'eau, et de l'hydronephrose, comme observé chez les souris $AGT^{-/-}$. Les souris $Ren1c^{-/-}$ sont anémiques, reflétées par leur faible hématocrite ($32 \pm 2\%$ vs $45 \pm 5\%$ chez les souris de type sauvage). L'administration de l'Ang-II (200ng/kg/min) utilisant une mini-pompe osmotique restaure la pression artérielle chez les souris $Ren1c^{-/-}$, mais les dommages préexistants de la médulla des reins causés par l'hydronephrose sont maintenus et préviennent la restauration de l'habileté à concentrer l'urine.

3.7 Le RAS local dans les adipocytes et leurs rôles métaboliques

Le tissu adipeux est jusqu'à récemment décrit comme un organe endocrinien important dans le métabolisme énergétique. Ainsi, les adipocytes aident à maintenir l'équilibre énergétique entre l'utilisation des nutriments et l'entreposage des lipides et du glucose en triglycérides. Les fonctions classiques des adipocytes incluent la sécrétion et la réponse aux hormones de croissance impliquant de la lipolyse (catabolisme des acides gras) et la lipogenèse (synthèse des acides gras). Aussi, les adipocytes exercent d'autres fonctions métaboliques comme l'angiogenèse et la synthèse d'hormones stéroïdiennes. De plus, les adipocytes exprimeraient toutes les composantes du RAS [68]. En fait, le tissu adipeux contribue jusqu'à 30% de l'AGT circulante dans un contexte d'obésité [69]. En conséquence, la production d'AGT par le tissu adipeux, plus particulièrement dans le gras viscéral, de sujet obèse augmente le niveau d'AGT circulant avec l'obésité et pourrait contribuer au développement de l'hypertension et de la résistance à l'insuline. . L'AGT peut aussi agir comme précurseur de l'Ang-II et d'autres peptides dérivés de l'Ang qui peuvent moduler les adipocytes et avoir un effet local sur les autres cellules avoisinantes. L'expression des composantes du RAS local dans le tissu adipeux est augmentée lors du développement de désordres métaboliques comme l'obésité et le diabète de type 2 où l'AGT sécrétée par le tissu adipeux et en circulation corrèle positivement avec la prise de masse grasse viscérale chez l'humain.

3.8 Les composantes RAS locales du tissu adipeux

Plusieurs évidences supportent l'existence d'un système rénine-angiotensine local dans les adipocytes qui présenterait en quelque sorte des mécanismes de régulation distincte des composantes du RAS. Basé sur la littérature, il y aurait deux principales raisons pour lesquelles les adipocytes produiraient les composantes du RAS : (1) les adipocytes serviraient de source des composantes du RAS et d'Ang-II systémiques, et (2) pour produire de l'Ang-II de manière autocrine et paracrine influençant les adipocytes et préadipocytes. Une évidence directe que l'AGT des adipocytes sert de source systémique provient d'études faites chez les adipocytes de souris surexprimant l'AGT ou invalidant l'AGT. L'expression de l'AGT dans les adipocytes augmente les concentrations circulantes chez les souris déficientes en AGT et la surexpression de l'AGT dans les adipocytes augmente l'AGT en circulation et la pression artérielle. Ces résultats sont les premiers à démontrer que l'AGT produite par les adipocytes peut contribuer aux composantes du RAS local et des adipokines en circulation.

3.9 L'étude des effets de l'Ang-II sur les adipocytes

L'obésité est l'un des facteurs de risque majeur du syndrome métabolique avec l'hypertension et l'intolérance au glucose. Cependant, il existe plusieurs opinions divergentes quant aux rôles du RAS dans le tissu adipeux. Il y aurait au moins deux étapes de différenciation des adipocytes impliquant le RAS : 1) les cellules souches mésenchymateuses (MSC) en adipocytes et 2) les préadipocytes en adipocytes. Les effets inhibiteurs de l'Ang-II semblent être différents entre la différenciation des MSC et des préadipocytes. L'Ang-II inhiberait la différenciation des cellules progénitrices des adipocytes résultants en de larges adipocytes insulino-résistants avec un grand contenu en lipides. À l'inverse, l'inhibition du RAS favorise la différenciation des préadipocytes favorisant une augmentation du nombre d'adipocytes plus petits et insulino-sensibles (Figure 4) .

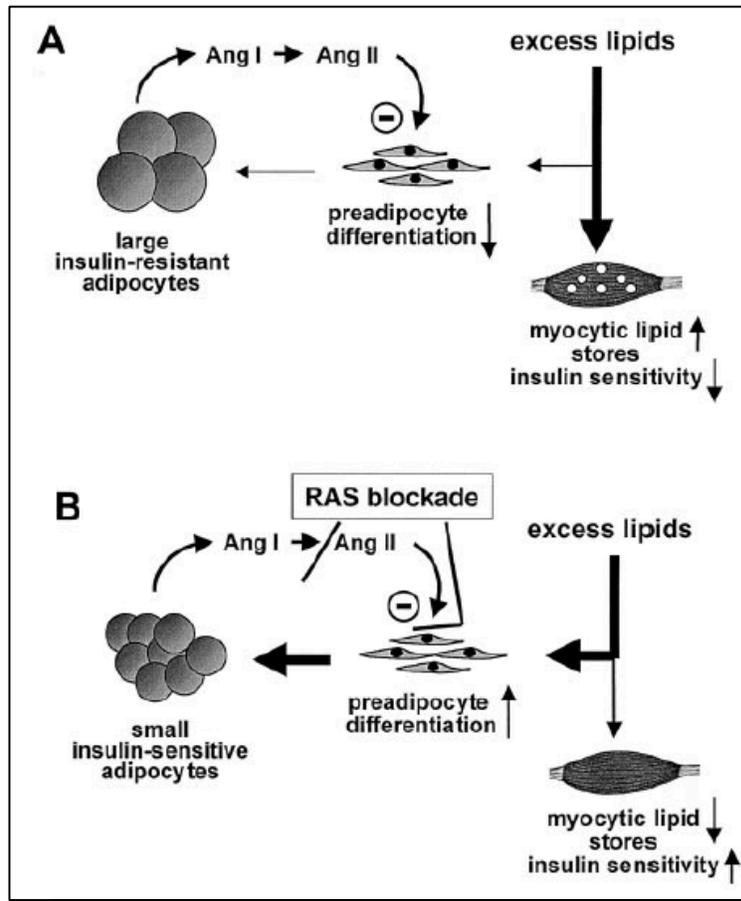


Figure 4 : L'inhibition du RAS dans la différenciation des adipocytes en excès de lipides.

La différenciation des préadipocytes en adipocytes par l'Ang-II favorise la 'mauvaise' différenciation en adipocytes larges ce qui favorise la sécrétion de $TNF\alpha$ et une baisse d'adiponectine qui est impliqué dans la résistance à l'insuline. B. L'inhibition du RAS favorise la 'bonne' différenciation des préadipocytes en adipocytes sécrétant des adipokines cardioprotectrices comme l'adiponectine et moins de $TNF\alpha$, une adipokine proinflammatoire. La redistribution des lipides des muscles et des autres tissus aux adipocytes favorise la sensibilité à l'insuline. *Image tirée de . Figure reproduite avec l'autorisation du journal.*

L'étude de l'expression des récepteurs à l'Ang-II (AT1Ra et AT1Rb et AT2R chez la souris) a démontré que l'Ang-II régule la prolifération et la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes, les composantes du RAS des adipocytes, l'inflammation et le stress oxydatif, l'adiposité et le débit sanguin local. Dans la différenciation des cellules d'adipocytes 3T3-L1, l'expression en ARNm de l'AGT, la rénine, ACE et AT1R sont augmentés durant la prolifération des adipocytes . Cependant, l'expression en ARNm du récepteur AT2R est diminuée durant le processus de différenciation . Similairement, l'expression en ARNm de AT1R et AT2R sont inversement régulés durant la différenciation des adipocytes humains . Cela suggère que l'Ang-II favorise la liaison à AT1R par rapport à AT2R lors la différenciation et la prolifération des adipocytes.

Plusieurs investigateurs ont étudiés les effets directs de l'Ang-II sur la différenciation des adipocytes. Dans les cultures primaires d'adipocytes humains, la stimulation des préadipocytes avec l'Ang-II (1 μ M) résulte en une réduction du nombre d'adipocytes en phase G1 et en une augmentation des adipocytes en phases S et G2-M [71, 72]. Ces effets de l'Ang-II étaient associés avec une augmentation de l'expression de la cycline D1, une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. L'antagoniste sélectif du récepteur AT1R, LosartanTM, atténue significativement la réponse stimulatrice de l'Ang-II, alors que l'antagoniste sélectif du récepteur AT2R, PD 123319, n'a aucun effet . Similairement, une récente étude a démontré que des faibles concentrations d'Ang-II (1pm à 0,01 μ M) augmente la différenciation des préadipocytes humains, isolés du tissu adipeux viscéral et périméridal, en adipocytes .

Il est connu que l'incubation d'adipocytes humains avec de l'Ang-II (0,01-10 μ M) augmente l'expression de PPAR γ et de la leptine, marqueurs de la différenciation des adipocytes . Les auteurs ont suggéré que les adipocytes traités avec un antagoniste de AT1R matures libèrent de l'Ang-II qui agit comme un régulateur négatif de manière à inhiber la différenciation des adipocytes. Des études récentes ont démontré que la différenciation des cellules souches d'adipocytes est associée à une augmentation de l'expression de la rénine et d'AT2R, mais une réduction de l'AGT et de ACE [73]. L'Ang-II inhiberait la différenciation des cellules souches mésenchymateuse en adipocytes, et cet effet est principalement médié par l'expression de AT2R. Les auteurs ont suggéré que l'inhibition du RAS local pourrait réguler négativement la taille et le nombre d'adipocytes, alors de l'activation RAS par l'Ang-II augmente la taille et le nombre d'adipocytes. La divergence des résultats quant aux effets

de l'Ang-II sur la différenciation des adipocytes s'explique parce que ces effets peuvent différer au sein d'une même espèce. Il est possible que l'origine génétique des préadipocytes influence la différenciation et les conditions de culture (par exemple : le mode de différenciation ou le stade de différenciation des préadipocytes) soient à l'origine de la divergence des résultats.

En plus des études *in vitro*, des modèles de souris avec des manipulations des composantes du RAS ont permis d'étudier le rôle de l'Ang-II dans la régulation de la croissance des adipocytes. Chez les souris de type sauvage exprimant l'AGT seulement dans les adipocytes, la masse adipeuse est augmentée, supportant le fait que l'AGT dérivé des adipocytes favorise la prolifération et l'augmentation de la taille des adipocytes [74]. L'expression et la sécrétion de l'AGT augmentent avec l'adipogenèse chez les 3T3-L1 murins et chez les adipocytes humains primaires [75]. Chez les souris mâles avec une déficience du AT1Ra, l'obésité induite par la diète riche en gras est atténuée suggérant un rôle de l'Ang-II pour augmenter la masse adipeuse [76]. En fait, les souris invalidant AT2 sont protégées contre le développement de l'obésité induite par la diète [77]. Cependant, il est difficile de déterminer le rôle des récepteurs à l'angiotensine et ses implications régulatrices dans le tissu adipeux puisque plusieurs modèles d'étude sont basés sur des KO complets alors que les études sur spécifiquement le tissu adipeux sont peu fréquentes. Mis ensemble, l'Ang-II active la lipogenèse par AT2R et inhibe la lipolyse via AT1R favorisant la synthèse et l'emmagasinage de triglycérides dans les adipocytes [78]. Ceci mène à une expansion hypertrophique du tissu adipeux ainsi qu'une hypoplasie des adipocytes. À long terme, une dysfonction du tissu adipeux se développe et mène aux complications de l'obésité.

Il a été observé chez les souris invalidant MasR, le récepteur à l'Ang-(1-7), une augmentation de 50% de la masse grasse viscérale, et ce avec une masse corporelle inchangée . Des études récentes ont montré que les souris invalidant la rénine sont maigres, sensibles à l'insuline, et résistantes au développement de l'obésité induite par la diète . Similairement, les souris invalidant ACE présentent une réduction de masse corporelle, de masse grasse et une augmentation de la dépense énergétique comparativement aux souris de type sauvage . Collectivement, les souris avec des déficiences des composantes systémiques du RAS classique présentent un phénotype similaire de maigreur et de résistance au développement de l'obésité ce qui supporte le rôle de l'Ang-II dans la régulation de la masse adipeuse. Cependant, ces découvertes expérimentales faites chez les rongeurs doivent être

prises avec précaution considérant que les inhibiteurs du RAS sont utilisés mondialement, mais ces médicaments n'auraient pas d'effet marqué sur le poids corporel.

3.10 Le récepteur Mas dans l'axe de l'Ang-(1-7)

Les premières tentatives pour clarifier les fonctions du MasR, un récepteur couplé aux protéines G de classe A sous-type II, ont été faites dans des ovocytes de *Xenopus* et dans les cellules d'humain, de rat et de souris [79]. Après plusieurs années de recherche, l'Ang-(1-7) a été identifié comme un agoniste du MasR [80]. Autrement dit, le récepteur Mas est un récepteur de l'Ang-(1-7) agissant comme un modulateur négatif de la signalisation de AT1R [81]. Il s'avère que la phénylalanine supplémentaire de l'Ang-II comparé à l'Ang-(1-7) interagit avec les résidus présents dans les AT1R et AT2R et qui sont absents dans le MasR [82]. Les souris invalidant Mas ont une perte de réponse aux effets vasodilatateurs, antidiurétiques et antithrombotiques de l'Ang-(1-7) [82]. Similairement, les effets antihypertrophiques de l'Ang-(1-7) dans les cardiomyocytes par l'activation MasR suggèrent l'implication de l'Ang-(1-7) par l'inhibition des voies de EKR1/EKR2 et MAPK . Toutefois, les actions de l'Ang-(1-7) pourraient être médiées par d'autres récepteurs comme le AT2R [83, 84] et d'autres ligands naturels pourraient agir sur le MasR, comme l'Ang-III et l'Ang-IV [85]. Alors, il faut tenir compte du fait que les interactions entre Ang-(1-7) et le MasR ne soient pas mutuellement exclusives.

Les effets de l'Ang-(1-7) ou d'un agoniste non peptidique du MasR, AVE 0991, dans des cellules transfectées avec le MasR dépendent de l'entrée du Ca^{2+} intracellulaire, l'activation de eNOS via la voie AKT ou par l'activation de la phospholipase A_2 (Figure 5). Les récentes études phosphoprotéomiques ont identifié plusieurs voies de transcription possibles induites par la stimulation de l'Ang-(1-7) comme FOXO1 [86]. Jusqu'à maintenant, il n'est pas encore clair comment les éléments signalétiques induits par l'Ang-(1-7) sont liés ou non à la production de NO et la voie de phospholipase A_2 .

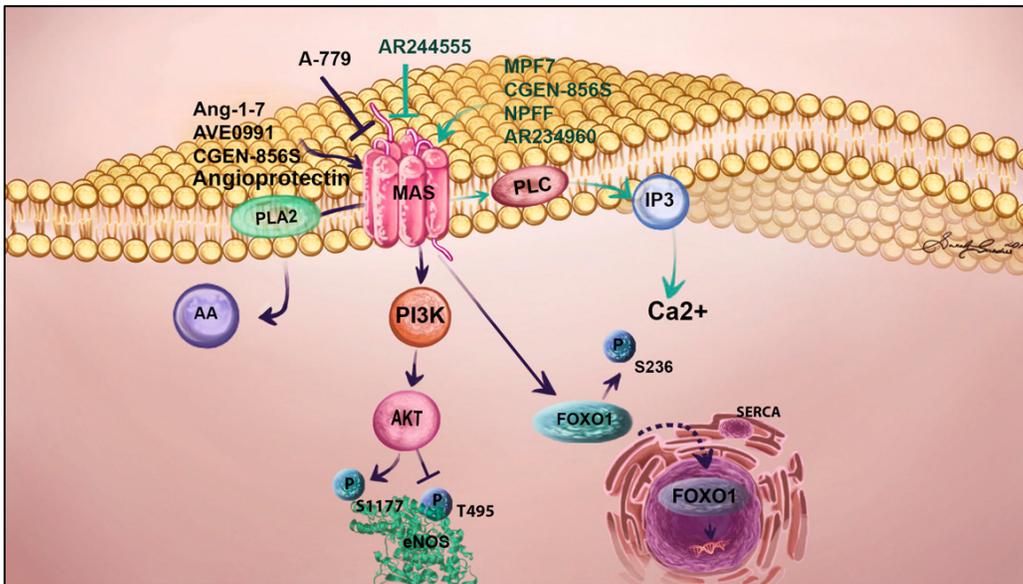


Figure 5 : La voie de signalisation biaisée du MasR.

La voie classique du MasR implique la phospholypase A2 (PLA2) produisant de l'acide arachidonique (AA) et la voie PI3K et AKT pour activer la phosphorylation de la sérine 1177 et la déphosphorylation de la thréonine 495 activant le eNOS. L'Ang-(1-7), AVE0991, CGEN-856S et l'angiotensine sont des agonistes de MasR alors que l'A-799 est un antagoniste de MasR. L'Ang-(1-7) active aussi FOXO1 par déphosphorylation de la sérine 236. La voie PLC/Ca²⁺ est seulement activable avec les ligands NPF, AR234960, MPF7 et CGEN-856S et bloquée par AR244555. Ainsi, les différents ligands de MasR activent des voies de signalisation distinctes, un phénomène appelé agoniste biaisé. *Image tirée de . Figure reproduite avec l'autorisation du journal.*

De plus, une étude de transfert de bioluminescence par résonance (BRET) a montré que MasR peut agir comme un antagoniste fonctionnel de AT1R menant à la formation d'un hétérodimère [88]. Cela peut expliquer les premières découvertes voulant que l'Ang-II soit en mesure d'activer les cellules exprimant le MasR plus que les cellules témoins [89] et que la transfection permanente de cellules de rein avec MasR puisse changer les actions hypertrophiques de l'Ang-II en une réponse proliférative malgré le fait que MasR ne soit pas un récepteur de l'Ang-II [90]. MasR est exprimé dans plusieurs organes et tissus incluant l'hypothalamus, le cortex cérébral, le cœur [91], les reins [92], les artères et les veines [93]. Basé sur les évidences obtenues dans les 10 dernières années, MasR fait partie de la voie alternative du RAS qui est entre autres constituée de l'ACE2 et l'Ang-(1-7).

Il existe beaucoup de littérature concernant les actions cardiaques du MasR. L'expression de MasR a été détectée dans les cardiomyocytes [94] et dans les fibroblastes cardiaques [95] et aussi dans le nœud sino atrial suggérant les bases morphologiques des effets antiarhythmogéniques de l'Ang-(1-7). L'Ang-(1-7) agissant par MasR prévient la dysfonction cardiaque induite par le diabète [96] et renverse la résistance à l'insuline induite par la diète riche en fructose [97]. Aussi, l'Ang-(1-7) a des effets antihypertrophiques sur les cardiomyocytes en culture, lorsque traités avec de l'Ang-II, par la voie NO/cGMP [98]. Ainsi, la plupart des résultats reliés au MasR et son ligand Ang-(1-7) dans le cœur ont démontré des effets cardioprotecteurs [99].

Une étude a démontré que l'endothéline-1 diminue l'expression du MasR au niveau transcriptionnel dans les cardiomyocytes humains via le récepteur de l'ETA par un mécanisme dépendant de p38 MAPK suggérant une fonction régulatrice de l'ET dans l'axe de l'Ang-(1-7) [100]. L'activation du RAS et du système de l'ET est associée au développement des complications cardiovasculaires. Entre autres, les effets hypertrophiques de l'Ang-II et l'ET1 sont accompagnés d'une stimulation de l'expression génique et protéique de la leptine d'au moins 50% dans les cardiomyocytes [101]. Les actions cardihypertrophiques de la leptine sont médiées par la voie NF- κ B et dépendent de l'activation de p38 par l'Ang-II et l'ET1. Ceci suggère un rôle biologique de la leptine dans le lien entre l'obésité et les maladies cardiovasculaires.

MasR est exprimé dans plusieurs tissus (pancréas, foie, tissu adipeux, système cardiovasculaire, muscle squelettique et le rein) où il contribue au métabolisme énergétique. En fait,

l'absence du MasR cause des changements dans le métabolisme des glucides et des lipides, similaire au syndrome métabolique [102]. D'un autre côté, l'élévation chronique des niveaux d'Ang-(1-7) améliore la sensibilité à l'insuline, la tolérance au glucose et augmente la capture du glucose pour être convertie en lipides par les adipocytes [103]. Dans tous ces organes, la stimulation du MasR par l'Ang-(1-7) stimule la sensibilité à l'insuline, facilite la signalisation de l'insuline, augmente l'entrée du glucose et diminue la production de ROS dans les adipocytes [104] ainsi que facilite l'entrée du glucose dans les muscles squelettiques . La suractivation de l'axe de l'Ang-II est associée au développement de la résistance à l'insuline alors que la stimulation de l'axe de l'Ang-(1-7) améliore la sensibilité à l'insuline (Figure 6). De plus, les souris FVB/N invalidant MasR systématiquement (MasR-KO) présentent de la dyslipidémie, des taux élevés de leptine et d'insuline circulant et une augmentation de 50% de la masse des gras viscéraux périgonadique et périrénal. Les souris MasR-KO présentaient aussi une intolérance au glucose et une sensibilité à l'insuline réduites caractérisées par une diminution de GLUT4 dans le tissu adipeux périgonadique [102].

MasR est aussi impliqué dans la fertilité autant chez les mâles que chez les femelles. Les souris MasR-KO montrent une réduction de la masse testiculaire caractérisée par un nombre accru de cellules apoptotiques durant la méiose, la présence de cellules géantes, de vacuoles dans l'épithélium semi-circulaire avec une diminution marquée du volume de sperme journalier [105]. Ces résultats suggèrent que le MasR est impliqué dans la régulation de la spermatogénèse. Chez l'homme, le MasR est principalement exprimé dans le compartiment interstitiel, composé principalement des cellules de Leydig. Aussi, le MasR est exprimé dans les tubules séminifères, mais en moins grande abondance comparativement au compartiment interstitiel. De manière intéressante, l'expression de MasR et de l'Ang-(1-7) est absente dans les échantillons de tubules séminifères avec des défauts de spermatogénèse [106]. L'excès d'Ang-II systémique induit du stress oxydatif, des dommages cytoplasmiques et à l'ADN génomique qui causent l'atrophie des muscles lisses du corps caverneux impliqué dans la dysfonction érectile chez les rats Wistar diabétique induit à la Streptozotocine. Dans ce même modèle, le traitement avec l'Ang-(1-7) renverse les dommages cytoplasmiques et à l'ADN induit par l'Ang-II [107]. Notamment, l'ablation du MasR résulte en une accumulation exagérée de corps fibreux causant une dysfonction érectile. MasR est aussi présent dans le placenta chez la souris [49] et l'expression génique de MasR diminue d'un facteur de 3, sans changement de l'Ang-(1-7), chez les femmes atteintes de prééclampsie comparativement aux femmes avec une grossesse normale [108]. De plus, l'axe de l'Ang-(1-7)/MasR semble jouer un rôle modulateur dans le système

reproducteur par son implication dans la folliculogénèse, l'ovulation et la gestation. Par ailleurs, MasR est un modulateur facultatif diminuant partiellement la fertilité mâle et femelle.

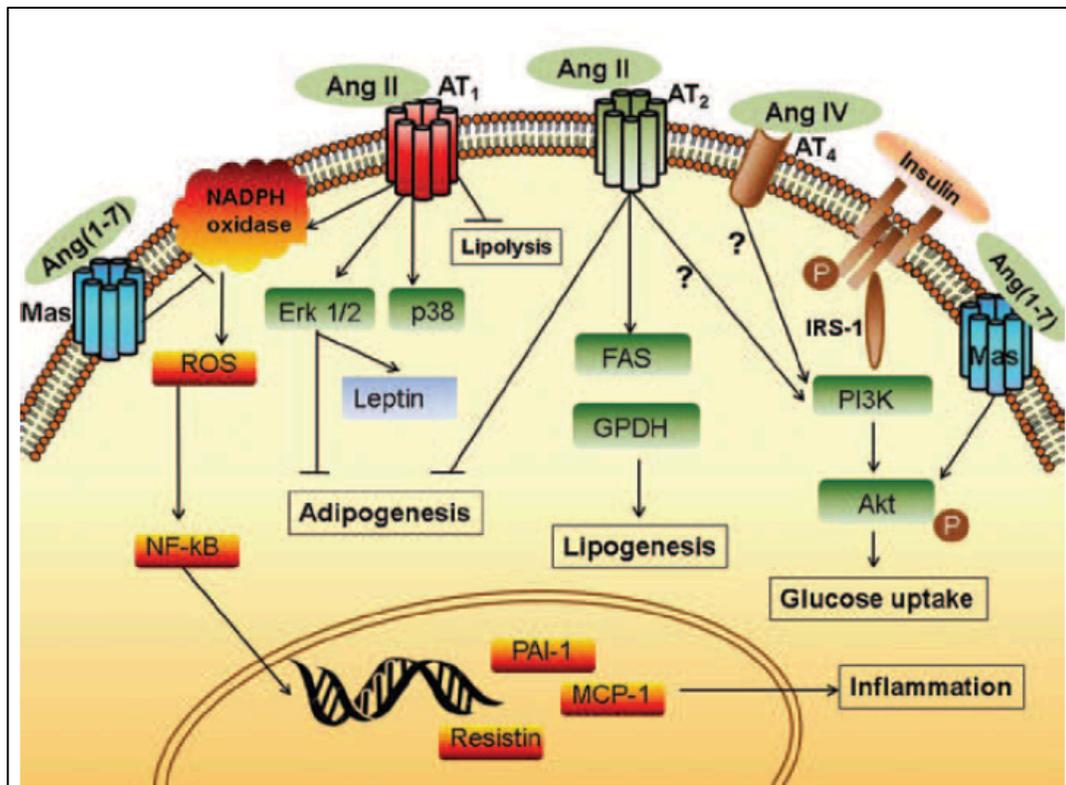


Figure 6 : Les actions auto et paracrine du RAS dans le tissu adipeux.

L'angiotensine II (Ang-II) stimule son récepteur de type 1 (AT1R) activant la NADPH oxydase générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui, à leurs tours, active la voie NF- κ B. Cela mène à la transcription de gènes codant pour des cytokines proinflammatoires telles que MCP-1, PAI-I et la résistine promouvant un état proinflammatoire dans le tissu adipeux. L'activation de AT1R mène aussi à la production de leptine, probablement via ERK 1/2, ainsi qu'inhibe la lipolyse. L'activation de AT2R augmente l'expression de gènes biogéniques comme la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) et l'acide gras synthase (FAS) favorisant la lipogénèse. Il y a quelques évidences que AT2R serait impliqué dans la voie de signalisation de l'insuline. AT1R et AT2R ont des effets inhibiteurs sur l'adipogénèse. D'autres évidences suggèrent que l'Ang-(1-7) et l'Ang-IV agissant par MasR et AT4R respectivement soient impliqués dans la sensibilité au glucose dans le tissu adipeux. MasR aurait le potentiel de contrebalancer les effets proinflammatoires induits par l'AT1R. *Image tirée de . Figure reproduite avec l'autorisation du journal.*

4 Les adipokines et hépatokines dans le développement de la prééclampsie

4.1 L'adiponectine

L'adiponectine est sécrétée exclusivement par le tissu adipeux et codé par le gène *AdipoQ* chez l'humain. L'adiponectine est impliquée dans le métabolisme énergétique, la sensibilité à l'insuline et possède des rôles cardioprotecteurs. Les individus atteints d'obésité, de diabète de type 2 et de maladies coronariennes ont une concentration inférieure en adiponectine associée à une dysfonction du tissu adipeux et à une augmentation des triglycérides circulants. Contrairement à la majorité des adipokines, les niveaux d'adiponectine diminuent avec l'obésité, et plus précisément, en lien avec la masse grasse viscérale. L'adiponectine circule sous trois formes classées par le poids moléculaire soient la forme à haut poids moléculaire, moyen poids moléculaire et petit poids moléculaire. L'adiponectine à haut poids moléculaire est la forme la plus biologiquement active et est celle qui corrèle le plus avec la sensibilité à l'insuline [110].

L'adiponectine est un polypeptide sécrété par les adipocytes en réponse à des facteurs de différenciation adipocytaires comme PPAR γ . TNF α , une cytokine proinflammatoire sécrétée par le tissu adipeux blanc chez les sujets obèses, peut inhiber la production d'adiponectine [111]. Deux récepteurs ont été identifiés pour l'adiponectine: AdipoR1, distribué ubiquitairement, et AdipoR2, dont la distribution est ubiquitaire et particulièrement abondante dans le foie [112]. L'expression génique et protéique de AdipoR2, mais pas AdipoR1, a été observée dans des cytotrophoblastes et des syncytiotrophoblastes chez les femmes normales [113]. La T-cadhérine pourrait aussi agir comme récepteur pour l'adiponectine, mais la signalisation en aval reste inconnue. L'adiponectine est l'une des rares adipokines dont la signalisation améliore l'homéostasie du glucose [112]. Il est généralement admis que l'adiponectine induit ses effets bénéfiques sur l'homéostasie énergétique par le biais de son récepteur AdipoR1. Ainsi, AdipoR1 stimule l'AMP kinase indépendamment de l'AMPK du muscle squelettique augmentant la sensibilité à l'insuline [114], ce qui régule à la baisse l'expression de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et de la glucose-6-phosphatase (G6Pase), deux enzymes néoglucogéniques. En activant la voie signalétique de l'AMPK, l'adiponectine aurait aussi un rôle bénéfique pour le maintien de la fonction vasodilatatrice via l'activation de la voie eNOS, ainsi que par la formation de capillaires après une ischémie [115].

Les cytokines proinflammatoires sont reconnues pour réduire l'expression d'adipokines antiinflammatoires comme l'adiponectine dans les adipocytes en culture. De plus, l'expression de l'adiponectine dans les tissus adipeux et les niveaux d'adiponectine circulant sont diminués avec l'inflammation sévère et une légère inflammation chronique associée à l'athérosclérose. De plus, elle serait capable d'atténuer les processus inflammatoires et la formation de plaques athéromateuses dans les artères . En effet, l'adiponectine inhibe la production par les macrophages de l'IL-6 et induit l'expression d'IL-1 et IL-10, des cytokines antiinflammatoires, chez l'homme [116]. De plus, la surexpression de l'adiponectine, dans les tissus adipeux blancs chez la souris, produit une réduction de la production de cytokines proinflammatoires comme l'IL-17 β , l'IL-11, TNF α et des facteurs de croissance comme la thrombopoïétine et le facteur de croissance de colonie 2 (granulocytes et macrophages) (CFS2). L'habileté de l'adiponectine de protéger des maladies cardiovasculaires liées à l'obésité est due aux effets sur les cellules progénitrices, les cellules endothéliales, les cellules vasculaires lisses, les cardiomyocytes et les cardiofibroblastes. Toutes les formes d'adiponectine (haut, moyen, faible poids moléculaire) activent la voie AMPK par sa liaison au récepteur à l'adiponectine type 1 ou 2 dans les cellules endothéliales chez l'humain, et induit la production

d'oxyde nitrique qui reverse les effets délétères de TNF α et agit de vasodilatateur [117]. Somme toute, l'adiponectine est une adipokine qui pourrait être impliquée dans la prévention de la prééclampsie par ses effets cardioprotecteurs.

4.2 La leptine

La leptine est une hormone polypeptidique codée par le gène *ob* et produit principalement par le tissu adipeux blanc en relation avec la masse adipeuse [118]. La leptine a été découverte à la suite du phénotype associé à la perte de fonction de son gène chez la souris, en l'occurrence une obésité importante associée à une hyperphagie. La leptine est aussi appelée « l'hormone de la satiété » pour son implication via un mécanisme cérébral dans le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique . La résistance à la leptine est fréquemment observée avec l'obésité ce qui induit des altérations de la signalisation au niveau de l'hypothalamus impliqué dans l'inhibition de la satiété et l'augmentation de la prise alimentaire. La résistance à la leptine est associée à des troubles de comportement alimentaire incluant l'hyperphagie, une augmentation de l'activité locomotrice et une stimulation du système sympathique, des effets qui peuvent substantiellement affecter les paramètres cardiométaboliques. Les cellules effectrices de la leptine expriment l'une des formes du récepteur appelées OBRb, considérée comme la plus importante du point de vue de la signalisation cellulaire, puisqu'elle est la seule à induire une signalisation menant à l'activation de nombreuses kinases intracellulaires comme Akt et MAP kinases .

Les effets de la leptine sur la sensibilité à l'insuline sont complexes et variés selon les tissus et l'état métabolique. D'abord, la leptine peut atténuer la libération de l'insuline en stimulant le système nerveux autonome sympathique, et par un effet local sur les ilots du pancréas via la stimulation du OBRb. Cette stimulation favorise l'ouverture du canal KATP des cellules β pancréatiques et nuit à la dépolarisation membranaire puis à l'entrée subséquente de Ca²⁺ nécessaire à la sécrétion de l'insuline [119, 120].

La leptine est une adipokine angiogénique favorisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales chez l'humain, le bovin, le porc, la souris et chez le rat. Des taux élevés en leptine peuvent accélérer l'athérosclérose par le recrutement des monocytes chez la souris [121], l'augmentation du stress oxydatif osseux chez les femmes post-ménopausée [122], et en favorisant la

sécrétion d'autres cytokines athérogéniques comme $TNF\alpha$, IL-6 et VEGF chez l'humain . Il a été suggéré que la leptine requiert la co-stimulation de l'Ang-II et l'ET-1 pour induire l'hypertrophie des cellules musculaires lisses [123]. Les cardiofibroblastes de rats traités avec la leptine ont une augmentation de l'expression de MT1-MMP et MMP2 résultants de l'activité des voies RhoA-ROCK-cofiline et de la formation des fibres de stress [124].

Nous savons que la leptine est principalement produite par les adipocytes en réponse à la prise alimentaire, et aussi, dans plusieurs autres tissus incluant le placenta [125]. Les niveaux de leptine augmentent au début de la grossesse, puis atteignent leur apogée au cours du second trimestre et demeurent stables au troisième trimestre. De façon intéressante, les niveaux de leptine chutent quelques heures après l'accouchement suggérant que le placenta contribue significativement aux niveaux circulants de la leptine durant la gestation. Il a été suggéré que cette sécrétion placentaire de leptine contribue à induire une résistance à l'insuline physiologique avec la grossesse nécessaire pour favoriser l'approvisionnement du fœtus [126]. Également à noter, la production de leptine par le placenta est augmentée avec la PE et particulièrement avec la PE sévère probablement à cause de l'hypoxie placentaire et sont induction par HIF-1 α [127]. De plus, des altérations de la voie signalisation et de la sécrétion de la leptine *in utero* peuvent prédisposer le fœtus à de la résistance à la leptine ce qui peut expliquer la forte association entre l'obésité maternelle et l'obésité infantile [128].

4.3 La résistine

La résistine est une adipokine jouant un rôle dans la résistance à l'insuline est un facteur de risque pour de maladies cardiométaboliques plus tard comme les maladies coronariennes, l'hypertension, le diabète de type II. Les études *in vitro* ont montré que la diminution de l'absorption du glucose médié par une réduction de la translocation du transporteur de glucose GLUT4 (Gène : *SCL2A4*) autant dans les cellules musculaires que dans les adipocytes . Le premier trimestre d'une grossesse normale est caractérisé par un état anabolique avec une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une accumulation de masse grasse pour combler les besoins énergétiques des autres trimestres. Entre le 2^e et le 3^e trimestre d'une grossesse normale, la sensibilité à l'insuline diminue entre 50-60% et est accompagnée d'une diminution de l'adiponectine de haut poids moléculaire et d'une augmentation des niveaux plasmatiques de glucose et d'acide gras libres pour assurer la

disponibilité des nutriments pour le fœtus [129]. À titre de comparaison, les niveaux de sensibilité à l'insuline en fin de gestation sont comparables aux patients intolérants au glucose ou nouvellement diagnostiqués avec le diabète de type II. Ce faisant, la restriction de croissance intra-utérine est associée à une petite taille à la naissance et à la résistance à l'insuline.

4.4 TNF α

TNF α est une adipokine proinflammatoire qui augmente en expression avec l'obésité dans le tissu adipeux. Avec la grossesse normale, il y a une augmentation de la sécrétion de TNF α , de VEGF et PIGF qui favorisent l'angiogenèse et la croissance normale des trophoblastes particulièrement au premier trimestre [130]. En fait, TNF α via TNFR1 est un régulateur clef dans l'implantation et la fonction des trophoblastes au cours du 1^{er} trimestre favorisant la différenciation et la restriction de l'invasion par promotion de l'apoptose chez les trophoblastes [131]. En effet, la plupart du TNF α placentaire est relâché vers la circulation maternelle. Aussi, les niveaux de TNF α corrèlent négativement avec la sensibilité à l'insuline à la fois au 1^{er} trimestre ($r = -0,68$; $p = 0,003$) et au 3^e trimestre ($r = -0,58$; $p = 0,02$) [132].

4.5 FGF-21

FGF-21 est une hormone métabolique avec des effets pléiotropes sur le métabolisme du glucose, des lipides et sur la sensibilité à l'insuline. Il est sécrété principalement par le foie et complémentairement par le tissu adipeux. FGF-21 joue un rôle de médiateur en réponse au jeûne en promouvant l'oxydation des acides gras, la clairance des triglycérides et la céto-genèse [133]. FGF-21 exerce ses actions métaboliques par sa liaison au récepteur de FGF de type 1 et la β -klotho, une protéine transmembranaire hautement exprimée dans le tissu adipeux, le foie, le pancréas et l'hypothalamus [134]. Les adipocytes sont les principales cibles de FGF-21 où cette hormone augmente l'entrée du glucose, stimule la lipolyse, améliore la capacité oxydative mitochondriale, augmente l'activité de PPAR- γ [135] et favorise le brunissement du tissu adipeux blanc [136]. De plus, l'administration de FGF-21 est accompagnée d'une augmentation de la production de l'adiponectine médian les effets bénéfiques de FGF-21 sur la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie des lipides et des glucides chez la souris suggérant que l'adiponectine est un médiateur en amont de FGF-21.

Le rôle de FGF-21 dans l'hypertension est méconnu. Les souris invalidant FGF-21^{-/-} (FGF-21 KO) développent une l'hypertension et une dysfonction vasculaire sévère induite par un traitement à l'Ang-II, alors que l'administration de FGF-21 renverse ces effets négatifs [137]. FGF-21 agit sur les adipocytes et les cellules rénales induisant la production de ACE2 qui, en retour, convertit l'Ang-II en Ang-(1-7) inhibant l'hypertension et renverse les dommages vasculaires associés à l'hypertension [137].

4.6 Fétuine A

La Fétuine A ou la glycoprotéine 2-Heremans-Schmid (FA) est une protéine multifonctionnelle produite principalement par les hépatocytes et minoritairement par le tissu adipeux [138]. L'inhibition des calcifications pathologiques et l'enrichissement passif de la matrice minéralisée de l'os sont les principales fonctions de la FA [139]. L'implication de la FA dans la pathologie de la prééclampsie est controversée. Selon une étude, les niveaux plasmatiques de FA chez des femmes avec prééclampsie précoces (diagnostiquées avant 34 semaines) sont significativement inférieurs comparativement à ce que l'on observe lors de la grossesse normale à 34 semaines ($17,3 \pm 3,3$ ng/mL vs $21,4 \pm 3,5$ ng/mL, $p < 0.001$). Cependant, les niveaux plasmatiques de FA chez des femmes avec prééclampsie tardives étaient significativement plus élevés que chez les femmes avec une grossesse normale au troisième trimestre ($26,1$ ng/mL vs $18,4$ ng/mL ; $p < 0,001$) [140]. Il a aussi été rapporté que les différences dans les phénotypes des femmes avec prééclampsie précoce et tardive peuvent être dues à des altérations dans la pathophysiologie. Les auteurs d'une étude rassemblant plus de 44 220 cas de prééclampsie ont déclaré que la dysfonction placentaire semble être caractéristique de la prééclampsie précoce, alors que la composition d'autres facteurs serait impliquée dans la prééclampsie tardive [141].

Aussi, la FA a des propriétés adipogéniques dans les tissus adipeux et hépatiques lorsque les taux plasmatiques de cette glycoprotéine sont trop élevés [142]. L'association entre de hauts taux de FA et la résistance à l'insuline et le diabète de type II a été démontrée précédemment [143]. De plus, la présence de faibles niveaux de FA chez les enfants est indicative d'un plus haut risque de maladies cardiovasculaires dans la vie adulte [144]. Des données révèlent une diminution des niveaux circulants de FA chez les patients avec des maladies inflammatoires comme la pancréatite, les maladies rénales chroniques et la polyarthrite rhumatoïde [145-147]. D'ailleurs, la FA est classée comme un facteur de rétro-inhibition de phase aiguë empêchant partiellement la relâche de la forme

active de HMGB1 [148].

5 Le traitement de la prééclampsie et les biomarqueurs

5.1 L'approche pharmaceutique

Les multiples facteurs impliqués dans le développement de la prééclampsie tels la génétique et l'environnement sont encore aujourd'hui énigmatiques [149]. Conséquemment, le traitement pharmacologique de la prééclampsie demeure compliqué, particulièrement, que les inhibiteurs du RAS sont reconnus comme étant tératogènes [150]. Citons deux exemples, les inhibiteurs de l'ACE (Captopril™) et du AT1R (Losartan™) sont des médicaments de première ligne dans le traitement de l'hypertension, mais ces médicaments ne peuvent être administrés durant la grossesse puisqu'ils causent une dysfonction rénale chez le fœtus [151]. De plus, un bloqueur de l'adréno-récepteur β -1 (Aténolo™) est associé à une réduction du poids fœtal à la naissance [151]. Une faible dose d'aspirine est recommandée en prophylaxie pour la prééclampsie, le rationnel étant que l'hypertension et la coagulation dans cette maladie est causé, en partie, par un déséquilibre entre les effets vasodilatateurs et vasoconstricteurs des prostaglandines. Ainsi, la thérapie de l'aspirine en faible dose inhibe la production de thromboxane et la prostacycline protégeant contre la vasoconstriction et la coagulation pathologique. Initialement, plusieurs études monocentriques, pour la plupart avec des femmes à risque de prééclampsie, ont démontré une réduction substantielle de la protéinurie et aussi des réductions de l'incidence de grossesse à préterme, d'une petite taille fœtale pour l'âge gestationnel et la mortalité périnatale [152, 153]. Ces études ont mené à l'utilisation massive de l'aspirine en prophylaxie. Pourtant plusieurs études à large spectre ont montré que l'aspirine ne réduit pas significativement (7,5% à 6,8%) l'incidence de la prééclampsie ou améliore les résultats périnataux chez les femmes à haut risque de prééclampsie [154, 155]. De ce fait, la prééclampsie est une complication sévère de la grossesse dont il n'existe pas de traitement valable à ce jour, mis à part l'accouchement précoce. Notre objectif est donc de démontrer l'effet protecteur de l'ExT en utilisant un modèle de prééclampsie murin.

5.2 Mesure du débit utérin par doppler pulsé

Le remodelage vasculaire de l'artère utérine est un processus actif qui dépend d'au moins 4 processus cellulaires : la croissance, la mort et la migration cellulaire ainsi que la production/dégradation de la matrice extracellulaire. Chacun de ces processus est sujet à de nombreuses influences régulatrices, tel les forces physiques comme la pression/l'étirement et le stress de cisaillement, les influences endocrines comme le VEGF et les stéroïdes sexuels ainsi que par les facteurs générés par l'endothélium vasculaire comme le NO, l'angiotensine et l'endothéline. Par exemple, le VEGF, l'œstrogène et le stress de cisaillement stimulent l'activation de eNOS et la MMP9 qui, avec l'œstrogène et la progestérone, sont essentielles pour l'élargissement du diamètre et l'hypertrophie vasculaire de l'artère utérine [156]. Aussi, la participation d'autres types cellulaires comme les cellules NK est probable de jouer un rôle dans la placentation, l'invasion et le remodelage des artères utérines [157]. Une étude de Ong S.S. a observé un remodelage eutrophique intérieur (petites artères ; sans modification du diamètre intérieur) des artères myométriales radiales chez les femmes prééclampsiques ce qui pourrait contribuer à la résistance vasculaire utérine [158]. Ces résultats sont complémentaires aux observations que les femmes avec PE ont un indice de pulsatilité mesuré par Doppler, un marqueur non biaisé de la résistance vasculaire, supérieure aux femmes avec une grossesse normale au troisième trimestre [159].

Aujourd'hui, la prééclampsie est généralement divisée en deux sous-groupes : la prééclampsie précoce et tardive. La IUGR, des anomalies du débit sanguin utérin évalué par ultrason Doppler et d'autres complications communes sont associées avec la prééclampsie précoce, alors que des symptômes maternels légers associés à une croissance périnatale moins compromise sont caractéristiques de la prééclampsie tardive. La mesure du débit sanguin utérin par Doppler est l'un des biomarqueurs utilisés couramment en clinique pour dépister la prééclampsie [160]

6 L'effet bénéfique de l'ExT sur le développement de la prééclampsie

6.1 L'ExT améliore la santé cardiovasculaire

L'ExT abaisse la pression artérielle et améliore la fonction cardiaque autant chez les hommes et les femmes en santé que chez les patients hypertendus [161]. De plus, l'ExT augmente la sensibilité à l'insuline, réduit les triglycérides circulants et les lipoprotéines de faible densité (LDL), des paramètres qui sont associés à un meilleur profil cardiométabolique [162]. De même, l'ExT réduit le risque de maladie cardiovasculaire, du diabète de type II, et améliore les adaptations cardiovasculaires et métaboliques lors de la grossesse aussi bien chez la mère que chez le fœtus. De plus, l'incidence de maladie gestationnelle est augmentée chez les femmes obèses et l'ExT est connu pour réduire le gain de poids gestationnel et ainsi protéger ces femmes contre certaines complications gestationnelles. D'ailleurs, il est bien connu que l'ExT réduit la prévalence de diabète gestationnelle [163].

Certaines études suggèrent même que l'ExT réduit la prévalence de la prééclampsie [164]. Plus spécifiquement, la plupart des études suggèrent que l'ExT est particulièrement important en début de grossesse pour atténuer les symptômes de la prééclampsie [165]. À l'opposé, d'autres études n'ont démontré aucun rôle protecteur ou une diminution non significative du risque de la prééclampsie avec l'ExT. Ces résultats peuvent être attribuables à la petite taille de l'échantillon et la courte période d'évaluation dans ces études [42]. Il a été postulé que l'ExT pourrait réduire le stress oxydatif dans l'endothélium vasculaire par une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes, comme SOD-1 et -3, ce qui pourrait réduire l'effet et la biodisponibilité des dérivés réactifs de l'oxygène causant du stress oxydatif au niveau cellulaire [166]. Notre laboratoire a démontré que l'ExT amenait une augmentation de la masse fœtale et placentaire dans un modèle murin de PE suggérant une amélioration de la croissance à la fois chez le fœtus et le placenta [165]. Il est intéressant de constater que le développement du placenta est complètement normalisé avec l'ExT dans notre modèle de souris $R^{+}A^{+}$ accompagnées d'une normalisation de VEGF [165].

6.2 L'ExT favorise l'axe de l'Ang-(1-7)

Durant l'exercice, les lipides entreposés dans le tissu adipeux sont transportés aux muscles actifs diminuant l'accumulation des acides gras et la lipotoxicité [167]. Il est bien établi que la diète riche en gras et l'obésité peuvent causer une suractivation de l'axe de l'Ang-II/AT1R qui est reconnu pour ses effets vasoconstricteurs conduisant à une augmentation de la pression artérielle. L'ExT peut activer l'enzyme AMPK en augmentant le ratio AMP/ATP. L'AMPK peut alors phosphoryler IRS-1, favorisant l'activation de AKT et la translocation de GLUT-4 et ainsi favoriser la normoglycémie. De l'autre côté, l'axe Ang-(1-7)/MasR est connu pour ses actions vasodilatatrices et ses effets bénéfiques sur l'homéostasie du glucose et des lipides. Les études ont démontré que l'Ang-(1-7), via MasR, a un rôle important dans la prévention du catabolisme des protéines des fibres dans l'atrophie musculaire squelettique [168].

6.3 L'ExT réduit l'inflammation de la prééclampsie

TNF α et IL-1 β favorisent l'hypertrophie des cardiomyocytes et la cytokine IL-6 est impliquée dans la rigidité des cardiomyocytes via la déphosphorylation de la titine. TNF α est capable de déclencher l'apoptose des cardiomyocytes et l'IL-1 β favorise la pyroptose des cardiomyocytes. Pour les fibroblastes cardiaques, TNF α et l'IL-1 β augmentent l'expression du AT1R impliqué dans la fibrose. À l'inverse, la normalisation de TNF α et IL-1 β par l'ExT, atténue les dommages cardiaques induits par l'Ang-II ce qui supporte les actions synergiques entre l'Ang-II, TNF α et IL-1 β . TNF α induit aussi TGF- β et augmente l'expression de la LOX des fibroblastes cardiaques par les voies de signalisation TGF- β et PI3 kinases [169].

Ces cardiofibroblastes produisent du collagène, mais agissent aussi comme médiateur de la réponse inflammatoire par leur capacité d'exprimer des chimiokines et de sécréter des facteurs induisant l'expression membranaire de molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales. Le sous-type de macrophage M1 favorise l'athérosclérose et l'inflammation, tandis que le sous-type M2 est capable de retirer le cholestérol de l'endothélium vasculaire. Par ailleurs, l'activation des fibroblastes peut causer l'hypertrophie et la dysfonction des cardiomyocytes via la sécrétion de facteur profibrotiques comme TGF- β 1, l'Ang-II et le facteur de croissance des fibroblastes [170].

Bien qu'il n'existe pas de traitement actuel pour la prééclampsie, plusieurs études épidémiologiques ont démontré les effets bénéfiques de l'activité physique pour réduire le risque de développer la prééclampsie. On compte parmi ces bénéfices maternels une meilleure adaptation cardiovasculaire, un gain de poids limité et une diminution du risque de diabète gestationnel, alors que chez le fœtus on observe une diminution de la masse grasse, une meilleure tolérance au stress et un développement neuronal avancé. Notre laboratoire a également démontré que l'ExT avant et pendant la gestation pouvait réduire, même presque prévenir, les symptômes associés à la prééclampsie dans des modèles murins [49, 165]. De plus, nous avons démontré que ceci était associé avec une réduction en AT1R, une élévation de MasR dans le placenta et une normalisation de VEGF en circulation [49]

Hypothèse

Notre hypothèse est le tissu adipeux contribue au développement de la PE et que l'ExT pourrait prévenir les symptômes de la prééclampsie en améliorant le profil du RAS, le profil de sécrétion adipokines en circulation et augmenterait la perfusion placentaire chez les souris R⁺A⁺ entraînées.

L'objectif principal est d'évaluer le rôle du tissu adipeux dans la santé cardiométabolique et les modulations du système rénine angiotensine durant la gestation avec l'entraînement physique. Voici les objectifs secondaires:

- Évaluer la composition corporelle des souris avant et à la fin de la gestation par EchoMRI™ accompagné du monitoring la consommation d'eau et alimentaire hebdomadaire.
- Évaluation complète du débit utérin *in vivo* to chez les souris R⁺A⁺ entraînées à l'aide du Vevo 2100™.
- Mesurer les adipokines circulantes à l'aide du mouse Adipokine Array™.
- Mesurer les niveaux protéiques de ACE, ACE2 et MasR dans le gras périgonadique et gras sous-cutané de souris avant et à la fin de la gestation par immunobuvardage de type Western.
- Mesurer les niveaux d'expression de l'ARNm de TNF α , MCP-1, AT1Ra et Peg1 dans le gras périgonadique (et gras sous-cutané – à venir) de souris avant et à la fin de la gestation par qPCR.

La minceur observée les chez souris femelles R⁺A⁺ nous a hautement intriguée. C'est pourquoi notre stagiaire Mostafa a étudié la composition adipeuse d'une cohorte de mâles R⁺A⁺ sédentaires dont les résultats répliquent, de façon identique, ceux obtenus chez les femelles R⁺A⁺

Méthodologie

Entraînement physique. Les souris ont été placées en cage d'exercice, où elles avaient accès à une roue pour courir sur une base volontaire, 4 semaines avant le début de la gestation, et elles y sont restées tout au long de leur gestation. Chaque cage était reliée à un ordinateur doté d'un programme comptant les tours engendrés par la course des souris (Compte-tour5, Boucherville, Québec, Canada), ce qui a permis de calculer la distance journalière parcourue par chacune des souris. Le calcul de la distance considère le nombre de passages d'un aimant sur la roue vis-à-vis un détecteur stationnaire sur la cage sur 24 heures multiplié par la circonférence de la roue (76,27 cm). Les données découlant de la course des souris ont été compilées et analysées en suivant la formule suivante :

$$\text{Distance journalière (km * 24h}^{-1}\text{)} = \text{nb tours} * 24 \text{ h}^{-1} * \frac{76,27 \text{ cm}}{1E6 \text{ km} * \text{cm}^{-1}}$$

Modèle murin R⁺A⁺. Les souris doubles transgéniques R⁺A⁺ ont été générées en croisant une souris femelle hétérozygote exprimant la rénine humaine (lignée hRN8-12) et une souris mâle hétérozygote exprimant l'AGT humaine (lignée 204/1) issue du laboratoire du Dr. Curt Sigmund de l'Université d'Iowa aux États-Unis. Pour les souris en fin de gestation, les souris R⁺A⁺ et leurs consœurs R⁻A⁻ ont été mise en couple avec de mâles de type sauvage (R⁻A⁻) et le mâle était séparé de la femelle lors de la présence d'un bouchon vaginal désignant le jour 0,5 *post coitum*. Pour les souris non gestantes, les souris R⁺A⁺ et leurs consœurs R⁻A⁻ ont été mise en couple avec de mâles vasectomisés de type sauvage (R⁻A⁻) et la présence d'un bouchon vaginal signifiait le stade de l'œstrus. Les souris sédentaires pouvaient être mises en couple jusqu'à une période de deux semaines alors qu'une semaine maximum était consacrée à la mise en couple des souris en cage d'ExT. Un cycle de lumière/noirceur aux 12h prévalait dans l'animalerie où étaient gardées les souris. Les souris R⁺A⁺ et leurs consœurs de type sauvage avaient accès à de l'eau ainsi qu'à une diète standard *ad libidum* (2018 ; Teklab Premier Laboratory Diets, Madison, WI, États-Unis). Toutes les souris non gestantes étaient âgées de 12 à 14 semaines et les souris en fin de gestation (18,5 jours *post coitum*) étaient âgées de 15 à 17 semaines. Les animaux ont été traités conformément aux standards mis de l'avant par le conseil canadien de protection des animaux (CIPA). Toutes les procédures ont été approuvées par le comité institutionnel de protection des animaux du CRCHUM.

Projet mâle R⁺A⁺. Le phénotype de minceur a été confirmé chez les souris mâles R⁺A⁺ en condition sédentaire. La composition corporelle des souris mâles a été mesurée par EchoMRI™ à l'âge de 8 (basale) et 12 (finale) semaines comme pour les souris femelles. À 12 semaines et 1 jour, suite au sacrifice des animaux, les tissus adipeux ont été collectés et pesés pour des analyses subséquentes.

Génotypage. Le génotypage des souris a été effectué à partir de l'ADN génomique extrait à partir d'une biopsie de queue où une partie du gène de la rénine et l'AGT humaines est amplifiée par PCR et migré sur un gel d'agarose 2%.

Nécropsie et collecte d'organes. À la fin du protocole avant la gestation ou à la fin de la gestation, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane, le sang a été collecté par ponction cardiaque intrathoracique avec 8µl Na² EDTA 500 mM (pH=8,0) (EMD, Gibbstown, New Jersey, États-Unis) et les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Le plasma était ensuite isolé par centrifugation 1700g pendant 15 minutes à 4°C pour être ensuite conservé à -80°C. Les tissus adipeux (GSC et GPG) ont été pesés et collectés. Tous les échantillons ont été congelés instantanément dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour des analyses subséquentes.

Efficacité placentaire. Le ratio entre le poids à la naissance et le poids du placenta (BB/Pl) est souvent utilisé comme proxy pour l'efficacité placentaire. On suppose qu'un ratio BB/Pl élevé chez un fœtus développé de manière appropriée est dû à une meilleure capacité de transfert de nutriments placentaire. Dans la IUGR, lorsqu'un fœtus ne parvient pas à atteindre son potentiel de croissance génétiquement prédéterminé, le ratio BB/Pl est souvent réduit ce qui peut indiquer un placenta qui n'adapte pas sa capacité de transfert de nutriments pour compenser la petite taille fœtale [171].

Composition corporelle. Les masses adipeuse et maigre ont été analysées par un appareil EchoMRI™ (Echo Medical Systems, Houston Scientific, Houston, Texas, États-Unis) avant l'ExT (pré-ExT), à la fin de l'ExT (post-ExT) et à 17,5 jours *post coitum* (EoG). La masse corporelle a été mesurée à l'aide d'une balance et un échantillon d'urine a été prélevé avant chaque mesure.

Adipokines circulantes. 20µL de plasma de souris en EoG ont été utilisés pour mesurer les niveaux d'adipokines circulantes à l'aide du Mouse Adipokine Array™ (R&D Systems, Minneapolis, États-Unis) au ChemiDoc™ avec le Clarity Max™ de Bio-Rad (Figure 7). En absence d'un contrôle interne,

les niveaux relatifs sont exprimés par rapport à la moyenne du niveau d'expression des 4 membranes pour chaque adipokine pour un temps donné tel que :

$$\text{Niveau d'expression relatif} = \frac{\text{Intensité Adipokine}_{\text{temps optimal d'exposition}}}{\bar{x} (\text{Intensité Adipokine}_{\text{temps optimal d'exposition}})}$$

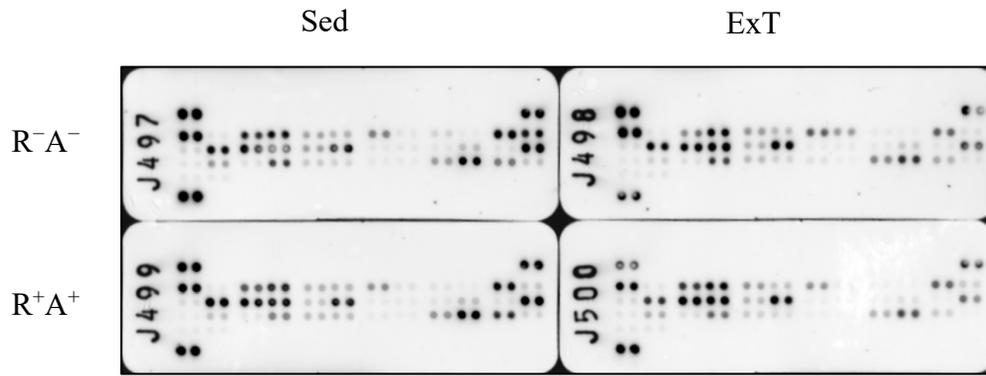


Figure 7 : Exemple d'immunochemiluminescence de l'Adipokine Array™.

Mesure du débit utérin. Les études d'échographie transabdominales ont été effectuées à 18,5 jours *post coitum*. Chaque souris a été anesthésiée par inhalation d'isoflurane entre 2 et 2,5% dans l'oxygène. L'abdomen a été épilé avec une crème épilatoire. La fréquence cardiaque a été maintenue entre 350-400 battements par minutes. La vitesse du sang dans l'artère utérine gauche et droite a été mesurée par Doppler pulsé à haute résolution avec le Vevo 2100™ (Visualsonics, Toronto, Ontario, Canada) équipé de la sonde MS400 avec 18-38MHz (Figure 8). La vitesse en diastole, en systole, l'intégration de la vitesse, et l'indice de résistance et de pulsatilité ont été mesurés sur la base des données acquises avec le logiciel Vevo Lab™ de Visualsonics. L'indice de résistance (RI) et de pulsatilité (PI) ont été calculées tel que :

$$RI = \frac{PSV - LDV}{LDV} \text{ et } PI = \frac{PSV - LDV}{VTI}$$

LDV : Low diastolic velocity ; PSV : Peak systolic velocity ; VTI : Velocity time integration

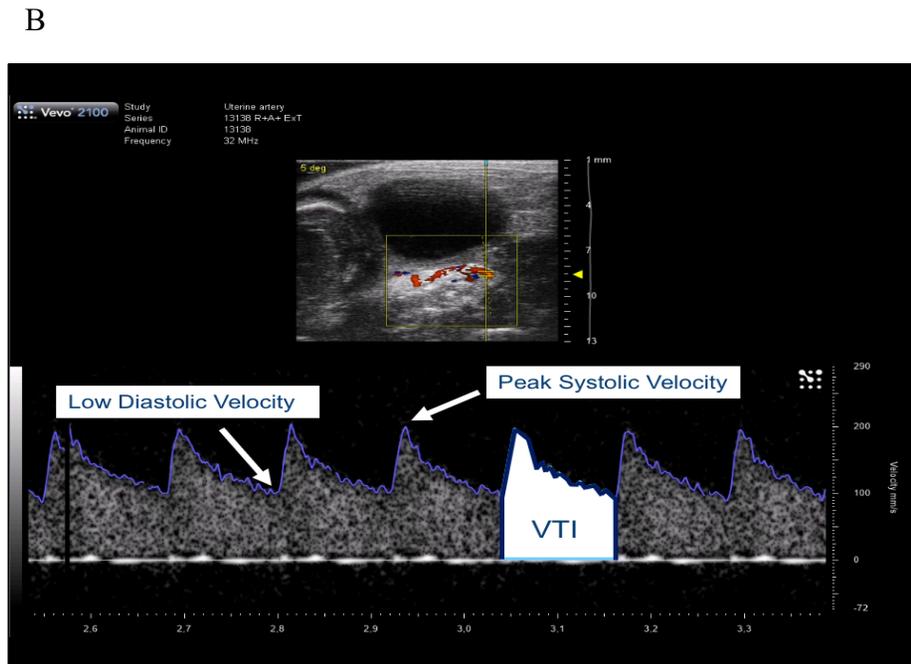
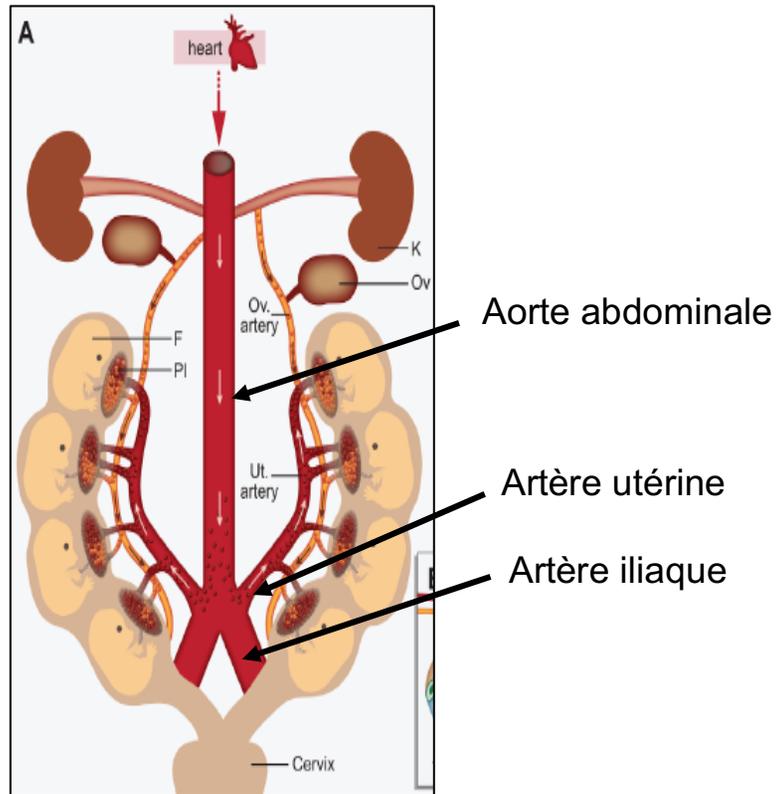


Figure 8 : La Représentation anatomique du système vasculaire reproducteur chez la souris (A) ainsi qu'un exemple d'image de l'artère utérine par doppler pulsé (B).

Image tirée de Raz T. et al, 2012.

Immunobuvardage de type Western quantitatif. Les tissus adipeux ont été collectés, placés dans des papiers d'aluminium, pesés et congelés dans l'azote liquide. Les tissus congelés ont été mis en poudre à l'aide d'un pilon et d'un mortier maintenus au froid avec l'azote liquide. La poudre ainsi obtenue a été uniformisée avec une spatule puis séparée en un premier tube pour l'extraction protéique et un second tube pour l'extraction d'ARN. Les protéines ont été extraites dans un tampon de lyse à 2µL par µg de tissu contenant : 50mM HEPES pH 7.5, 137mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 2mM Na₃VO₄, 10mM Na pyrophosphate, 10mM fluorure de sodium, 2mM EDTA, 1% NP-40, 10% glycérol, 34mg/mL PMSF ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Mississauga, Ontario, Canada) dans l'eau Mili-Q. Les homogénats ont été centrifugés 10 minutes à 10 000g à 4°C et l'interface protéique a été récupérée. Les échantillons ont été congelés à -80°C pour favoriser la formation de gouttelettes lipidiques sur les parois afin de transférer dans un nouvel Eppendorf 1,5 mL. Les échantillons ont été dosés par Bradford. La quantité optimale à charger pour ACE (1:1000, Santa Cruz, sc-12184 (N-20)) était de 30µg et pour MasR (1:500, Alomone, AAR-013) était de 40µg pour le GSC et le GPG établit à partir d'une courbe dose-réponse sur un échantillon groupé isovolumique de GSC et de GPG [172]. Les échantillons ont été préparés dans du Laemmli 4X, β-mercaptoéthanol et du tampon de lyse puis les protéines ont été dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. Le point de saturation de la vinculine (1:25 000, Santa Cruz, sc-73614 (7F9)) est supérieur à 50µg pour les deux types de gras. La vinculine a été choisie comme protéine de contrôle puisque la tubuline et l'actine sont modulées à la baisse avec la gestation et une autre protéine, typiquement utilisée, GAPDH est modulée à la hausse chez les souris R⁺A⁺ dans le GSC post-ExT. Un gel de SDS-polyacrylamide 10% a été utilisé pour ACE alors que 8% pour MasR. 10µL de poids moléculaire Kaléidoscope™ ou All-Blue™ (Bio-Rad, Hercules, Californie, États-Unis) a été utilisé sur chaque gel pour confirmer la présence de la bande attendue. 25µL d'échantillon ont été chargés comme indiqué à la Figure 9.

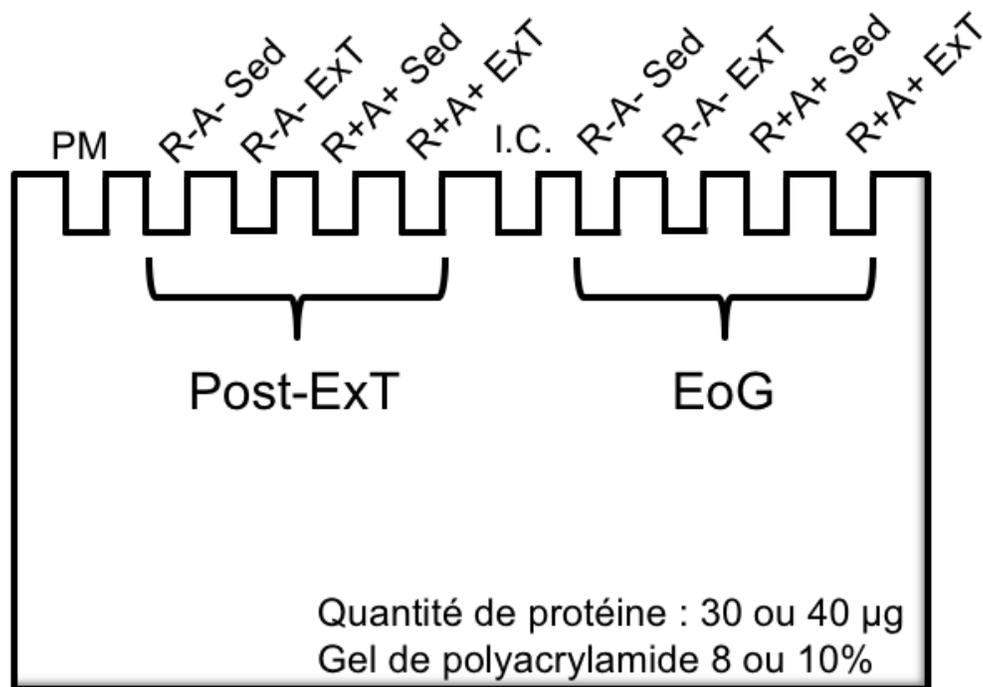


Figure 9 : Le design d'un gel de Western blot.

À partir d'un gel, il était possible de mesurer l'expression protéique des composantes du RAS afin de déterminer les modulations amenées par la prééclampsie, l'ExT et l'effet de la gestation. EoG : Fin de la gestation; ExT : Entraînement physique; I.C. : Contrôle interne; PM : Poids moléculaire; Post-ExT : Avant la gestation et suite à 4 semaines d'ExT; Sed : Sédentaire.

Un courant de 120V constant a été appliqué pour 2h00. Une fois la migration terminée, les protéines séparées dans le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose sous une intensité de courant constant de 400mA pour 2h00 à 4°C. Les sites non spécifiques ont été bloqués pour 15 minutes à température ambiante avec du lait en poudre sans gras 5% dans du TBS-Tween 0,02%. La membrane était ensuite incubée toute la nuit (16 heures) à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du lait en poudre sans gras 5%, du TBS-Tween 0,02% et de l'azote de sodium 0,02%. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 minutes avec du TBS-Tween 0,02% puis incubée à température ambiante avec l'anticorps secondaire pendant 1h avec agitation. Tous les anticorps secondaires ont été dilués 1 : 3000 dans du lait en poudre sans gras 5%, TBS-Tween 0,02, sans azote de sodium.

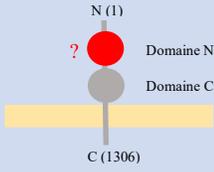
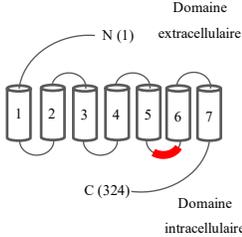
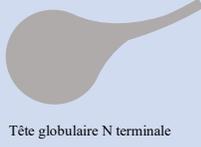
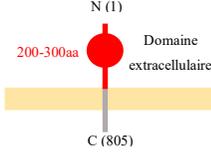
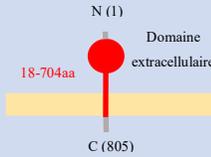
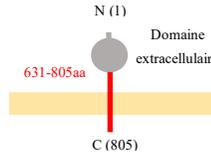
Les bandes sont ensuite révélées au système d'imagerie Chemidoc™ MP (Bio-Rad, Hercules, Californie, États-Unis) en utilisant les substrats électrochimiluminescents Clarity™ pour l'ACE et la

vinculine, et Clarity Max™ pour le MasR. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 minutes avec du TBS-Tween 0.02%. La vinculine a servi de protéine de contrôle de chargement où l'anticorps primaire anti-vinculine a été diluée 1:25 000. Les détails des anticorps utilisés sont énumérés dans le tableau 1. L'expression de la protéine d'intérêt au temps optimal d'exposition est ensuite normalisée avec l'intensité de la vinculine au temps optimal d'exposition pour chaque bande analysée avec le logiciel Image Lab™ de Bio-Rad tel que :

$$L'expression\ de\ \frac{MasR}{Vinculine}\ (en\ U.A.) = \frac{Intensité\ de\ MasR_{Temps\ d'exposition\ optimal}}{Intensité\ de\ Vinculine_{Temps\ d'exposition\ optimal}}$$

MasR : Récepteur mas ; U.A. : Unité arbitraire

Tableau 1 : La liste détaillée des anticorps primaires et secondaires.

Anticorps primaires	Immunogène	Épitope schématisé	Réactivité	Applications
ACE (N-20) (discontinué) Polyclonal Chèvre IgG Santa Cruz Cat # sc-12184 Lot # 62414	Près de la région N terminal chez l'humain.		H, S, R, canine et bovine	WB, IP, IF, IHC(P) et ELISA
MAS1 Polyclonal Lapin IgG Alomone Labs Cat # AAR-013 Lot # AN1002 et 1025	Peptide C-KIRKNTWASHSSK correspondant aux acides aminés 212-224 du MasR de rat.		H, S et R	WB, IHC Peut fonctionner avec ICC, IFC, IP
Vinculine (7F9) Monoclonal souris IgG Santa Cruz Cat # sc-73614 Lot # D0115	Épitope non mentionné de la vinculine d'origine humaine.		H, S et R	WB, IP, IF et IHC
ACE2 [EPR4435(2)] Monoclonal Lapin IgG Abcam Cat # ab108252 Lot# GR145000-1	Peptide synthétique de la région extracellulaire 200-300 de ACE2 d'origine humaine. La séquence exacte est propriété d'Abcam.		H, S, R	WB, IP, IF et IHC Non applicable pour la cytométrie en flux
ACE2 (H-175) (discontinue) Polyclonal Lapin IgG Santa Cruz Cat # sc-20998 Lot # G1210	Peptide correspondant aux acides aminés entre 631-805 en C-terminal de ACE2 d'origine humaine.		H, S et R	WB, IP, IF, ELISA
hACE2 Polyclonal Chèvre IgG R&D Systems Cat # AF932 Lot # HOK0412061	Peptide correspondant à la région Gln18-Ser740.		H	WB et ELISA

Anticorps secondaires	Immunogène	Applications
Anti-Lapin chez la chèvre IgG conjuguée à HRP Bio-Rad Cat # 170-6515 Lot # Non indiqué	Chaines lourdes et légères IgG d'origine de lapin	WB, IHC
Anti-Chèvre chez le singe IgG conjuguée à HRP Santa Cruz Cat # 170-6515 Lot # J0614	Chaines lourdes et légères IgG d'origine de singe	WB, IHC
Anti-Souris chez la chèvre IgG conjuguée à HRP Santa Cruz Cat # sc-2005 Lot # H2213	Chaines lourdes et légères IgG d'origine de chèvre	WB, IHC

ELISA : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée ; H : Humain ; IF : Immunofluorescence ; IHC : Immunohistochimie ; IP : Immunoprécipitation ; R : Rat ; S : Souris ; WB : Immunobuvardage de type Western.

Extraction d'ARN. L'extraction, la détermination de la concentration, la pureté et la qualité de l'ARN issue du tissu adipeux de souris ont été effectuées selon le protocole publié par notre laboratoire [173].

PCR en temps réel. L'expression génique de *Mest/Peg1*, *TNF α* , *MCP-1* et *AT1Ra* a été évalué dans le gras périgonadique avant et à la fin de la gestation avec les amorces décrites dans le tableau 4. L'ADN génomique a été dégradé avec 1 U/ μ L de désoxyribonucléase I (DNase I ; Invitrogen) par μ g d'ARN pour 30 minutes à 37°C. L'inactivation de la DNase a été effectuée par l'ajout de 1 μ L d'EDTA 50 mM puis en chauffant à 65°C pendant 10 minutes. L'ADNc simple brin a été synthétisé par réaction de reverse transcriptase en utilisant 200U/ μ L *Maxima Reverse Transcriptase*TM (Thermo Scientific, Burlington, Ontario, Canada), des désoxynucléotides et 0,2 μ g/ μ L de *Random Hexamer Primer*TM (Thermo Scientific). Un inhibiteur de ARNase à 20 U/ μ L *RiboLock RNase Inhibitor*TM (Thermo Scientific) est ajouté à la fin de la réaction. Un volume de 20 μ L ADNc est ainsi généré et conservé à -20°C. Le volume final pour le PCR en temps réel était de 10 μ L contenant 0,3 μ M d'amorce sens et anti-sens spécifiques à chaque gène avec 2,5 μ L d'ADNc simple brin et 7,5 μ L de *FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)*TM (Roche, Mississauga, Ontario, Canada). La réaction de PCR en temps réel a été effectuée avec le Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les conditions décrites

dans le tableau 5. L'efficacité de l'amplification a été calculée à partir d'une courbe d'efficacité de chaque gène avec des dilutions 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 avec un échantillon représentatif. Chaque échantillon a été fait en duplicata. Les niveaux d'expression ont été ajustés par rapport au gène de référence, le s16, et au groupe R⁻A⁻ Sédentaire non gestante. L'analyse des Ct a été effectuée selon la méthode de Pfaffl [174] telle que :

$$L'expression\ génique = \frac{E_c^{\Delta Ct_{gène\ d'intérêt}}}{E_c^{\Delta Ct_{gène\ de\ référence}}}$$

$$Où, Efficacité\ de\ l'amplification\ corrigé\ (E_c) = \frac{E\ (en\ \%)}{100} + 1$$

Tableau 2 : La séquence des amorces de souris utilisées en PCR en temps réel.

Gène	Nom du gène	Numéro de séquence	Séquence de l'amorce sens (5'→3')	Séquence de l'amorce anti-sens (3'→5')
ms16	Protéine ribosomale s16	NM_013647.2	ATCTCAAAGGCCCTGGTAGC	ACAAAGGTAAACCCCGATCC
mPeg1† ou mMest	<i>Mesoderm-specific Transcript</i> ou <i>paternally expressed gene 1</i>	NM_001252293.1 NM_008590.2 NM_001252292.1	CACACCGACAGAATCTGGTAGAA	GTTTTTCACCTACAAAGGCCTACG
mTNFα	Facteur de nécrose tumorale alpha	NM_013693.3	CACGCTCTTCTGTCTACT	AAGATGATCTGAGTGTGAGG
mMCP-1 ou mCCL2	Protéine chemoattractant des monocytes- ou chimiokine (motif C-C) ligand 2	NM_011333.3	ATTGGGATCATCTTGCTGGT	CCTGCTGTTACAGTTGCC
mAT1Ra	Récepteur de l'angiotensine-II type 1a	NM_177322.3	TGGCTGGCATTTCGTCTGGA	CCTGGGGCAGTCATCTTGAA
mACE2	Enzyme de conversion de l'angiotensine type 2	NM_001130513.1 NM_027286.4	CTACAGGCCCTCAGCAAAG	TGCCCAGAGCCTAGAGTTGT

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine ; AT1Ra : récepteur de l'angiotensine II type a ;

CCL2 : TNFα : Facteur de nécrose tumorale alpha ; m : souris

†Ces amorces ont été générées afin de permettre la détection de toutes les variantes de transcription de l'ARNm.

Tableau 3 : Les conditions de PCR en temps réel.

Gène	Activation de la Taq	Dénaturation	Hybridation	Élongation	Nb de cycles
ms16	95°C 10 min	95°C 15 s	60°C 30 s	72°C 30 s	40
mMest	95°C 10 min	95°C 15 s	58°C 30 s	72°C 30 s	40
ou					
mPeg1					
mTNFa	95°C 10 min	95°C 15 s	58°C 30 s	72°C 30 s	40
mMCP-1	95°C 10 min	95°C 15 s	60°C 30 s	72°C 30 s	40
ou					
mCCL2					
mAT1Ra	95°C 10 min	95°C 15 s	60°C 30 s	72°C 30 s	40
mACE2	95°C 10 min	95°C 15 s	60°C 30 s	72°C 30 s	40

m : souris ; s : Seconde

Analyse statistique. Toutes les valeurs sont exprimées selon la moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été effectuées avec Prism 7.0. Une valeur de $p \leq 0.05$ définit le seuil de significativité. Les différences dans les paramètres de la grossesse, le profil d'expression des adipokines et les paramètres de l'artère utérine ont été comparés par des ANOVA à 2 voies. Les différences dans les masses adipeuses et les niveaux d'expression protéique de ACE et MasR ont été comparés par de multiples ANOVA à 2 voies. Les différences des résultats de composition corporelle et de consommation alimentaire ont été comparées par de multiples ANOVA à 2 voies à mesures répétées. Si une interaction était présente pour l'ANOVA ou l'ANOVA à 2 voies à mesures répétées, l'origine de la différence était déterminée par la comparaison pairée (2x2) sur Prism ce qui revient à un post-hoc de Bonferonni sur le logiciel SPSS. La validité des tests ANOVA a été vérifiée : 1) la normalité des données a été validée par le test d'Agostino-Pearson et 2) l'homoélasticité est vérifiée par le test de Brown-Forsythe. Les données ont été transformées en logarithme, en racine carrée ou en rang lorsque les conditions du test ANOVA ne pouvaient être respectées. Seules les valeurs comprises entre la moyenne ± 2 *écarts-types ont été considérés dans les analyses statistiques.

Présentation et analyse des résultats

Distance journalière parcourue. Nous observons que la distance moyenne parcourue avant la gestation est de 8 km par période de 24 heures, alors que la distance diminue à 4,5 km par période de 24 heures la journée suivant la détection du bouchon copulatoire (dcp0,5) ce qui représente une diminution de presque la moitié par rapport avant la gestation (Figure 10). La distance moyenne parcourue diminue rapidement avec la progression de la gestation pour atteindre un état de quasi-repos où les distances moyennes sont de moins de 1 km par période de 24 heures à la fin de la gestation. Aucune différence significative n'a été observée avec le génotype des souris.

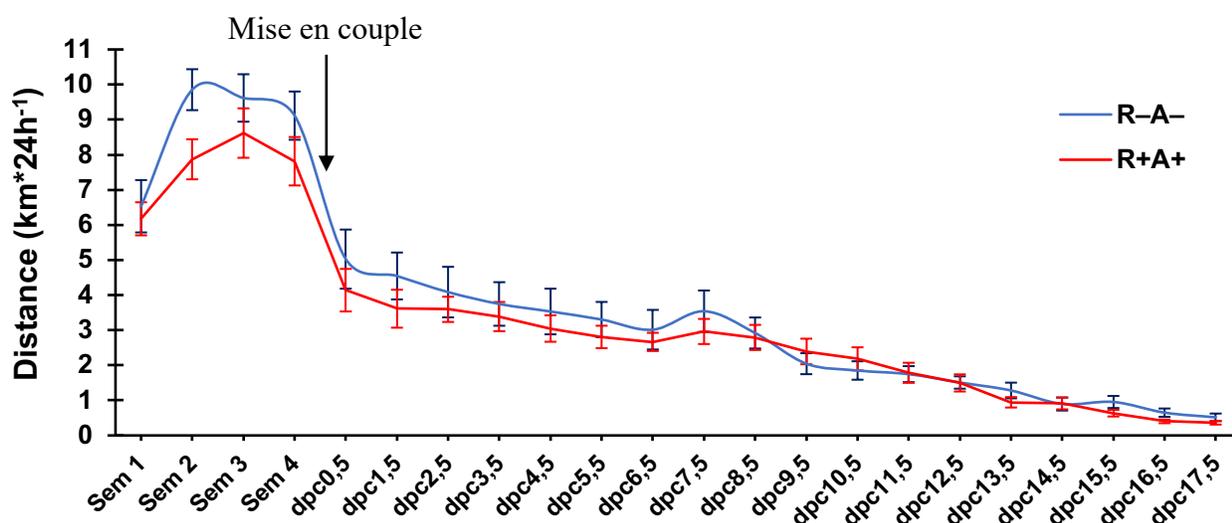


Figure 10 : Distance journalière moyenne parcourue avant et pendant la gestation.

$N = 10 R^{-}A^{-}$ et $13 R^{+}A^{+}$. Sem : semaine ; d.p.c. : jours *post coitum*.

Conséquences fœtales de l'entraînement physique chez les souris R⁺A⁺. Nous observons que l'ExT augmente significativement la masse fœtale totale (somme de la masse de tous les bébés dans une même portée) et moyenne (moyenne du poids de tous les bébés dans une même portée) ainsi que le nombre de bébés par portée accompagnés d'une diminution du nombre de bébés nécrosés comparativement aux consœurs sédentaires. L'ExT réduit l'efficacité placentaire indépendamment du génotype caractérisé par une augmentation de la masse fœtale moyenne sans changement de la masse placentaire. Toutefois, on note une tendance vers une augmentation de la masse placentaire totale par l'ExT ($p = 0,0958$) et le transgène R⁺A⁺ ($p = 0,0958$). Les fœtus issus d'une mère R⁺A⁺ ont une masse fœtale moyenne significativement réduite accompagnée d'une réduction de l'efficacité placentaire. Ces résultats suggèrent que les souris R⁺A⁺ ont un phénotype de IUGR qui est caractérisé par une réduction de l'efficacité placentaire sans changement de la taille de la portée ou du nombre de bébés nécrosés.

Tableau 4 : Les conséquences fœtales de l'entraînement physique chez les souris R⁺A⁺.

Statut d'entraînement	Génotype maternel	N	Taille de la portée (nb)	Bébés (nb)	Bébés nécrosés (nb)	Masse fœtale totale (g)	Masse fœtale moyenne (g)	Masse placentaire totale (g)	Masse placentaire moyenne (g)	Efficacité placentaire (g [*] g ⁻¹)
Sédentaire	R ⁻ A ⁻	14	9,5 ± 0,3	7,9 ± 0,32	1,4 ± 0,3	9,11 ± 0,37	1,14 ± 0,01	0,76 ± 0,03	0,100 ± 0,004	11,99 ± 0,45
	R ⁺ A ⁺	15	8,7 ± 0,4	7,6 ± 0,50	1,3 ± 0,3	8,46 ± 0,37	1,06 ± 0,02#	0,82 ± 0,04	0,102 ± 0,003	10,40 ± 0,23†
Entraînée	R ⁻ A ⁻	8	10,0 ± 0,2*	8,4 ± 0,5*	1,00 ± 0,3*	9,73 ± 0,18*	1,08 ± 0,03**	0,87 ± 0,06	0,102 ± 0,004	10,43 ± 0,37*
	R ⁺ A ⁺	13	10,1 ± 0,6*	9,3 ± 0,5*	0,9 ± 0,34*	8,96 ± 0,70*	0,99 ± 0,02***#	0,92 ± 0,07	0,105 ± 0,004	9,82 ± 0,38*†

Les résultats de la taille de la portée, la masse fœtale et placentaire totale, le nombre de bébés formés et nécrosés ont été transformés en rang pour normaliser les données. († p < 0,05 et #p < 0,0001 comparé aux R⁻A⁻; *p > 0,05 et **p > 0,01 comparé aux sédentaires.)

Paramètres métaboliques et la composition corporelle. Les souris entraînées ont une masse corporelle significativement inférieure à leurs consœurs sédentaires seulement avant la gestation alors qu'aucun effet du génotype n'est observé à ce moment ($n = 7-11$; Figure 11A). De façon conséquente, aucun effet du génotype n'a été observé chez les mâles sur la masse corporelle (Figure 11B). La masse corporelle augmente également avant et à la fin de la gestation ($p < 0,0001$; différence non montrée sur la Figure 11A). Il est intéressant de noter que ces effets de l'ExT sont présents en dépit du fait qu'on observe une augmentation de la prise alimentaire avant et pendant la gestation ($n = 5-6$; Figure 11C). D'ailleurs, l'ExT augmente la consommation d'eau avant la gestation seulement chez les souris de type sauvage (R^-A^-), alors que les souris R^+A^+ boivent plus d'eau autant en conditions sédentaires que d'entraînement en comparaison aux souris de type sauvage ($n = 5-6$; Figure 11D).

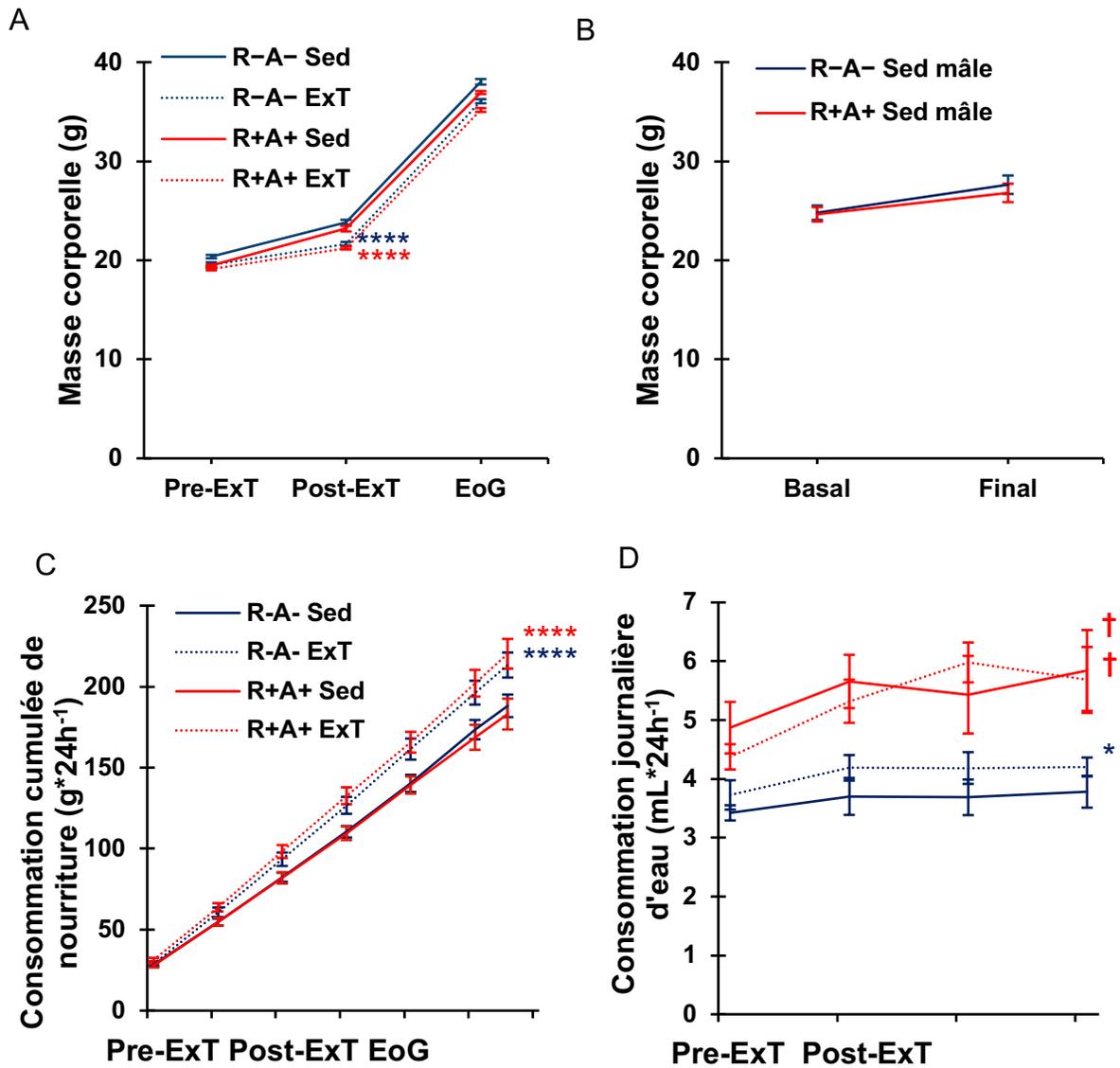


Figure 11 : Effets du génotype, de l'Ext et de la gestation sur la masse corporelle, la consommation de nourriture et d'eau chez les souris $R^{+}A^{+}$

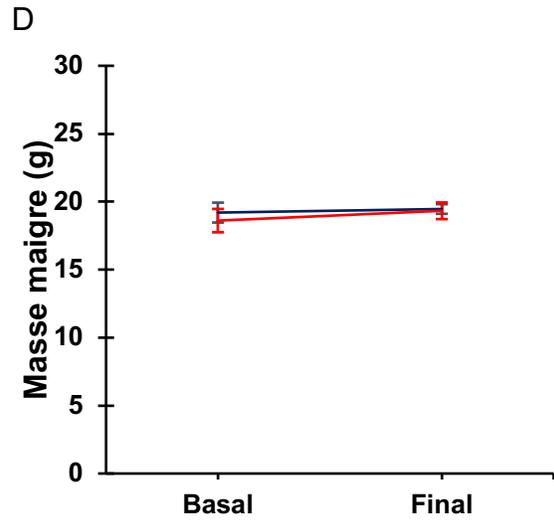
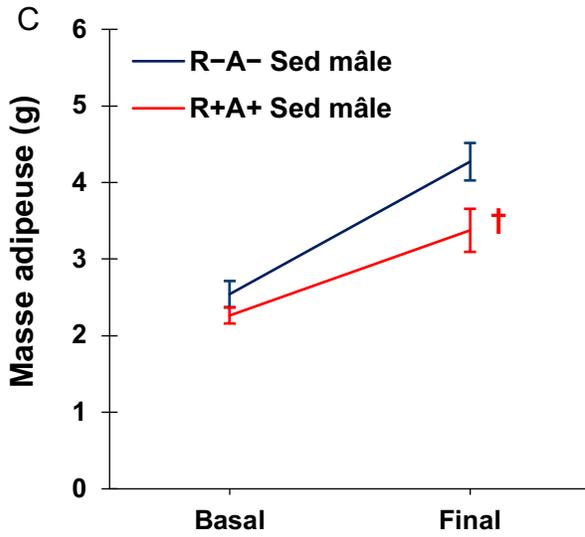
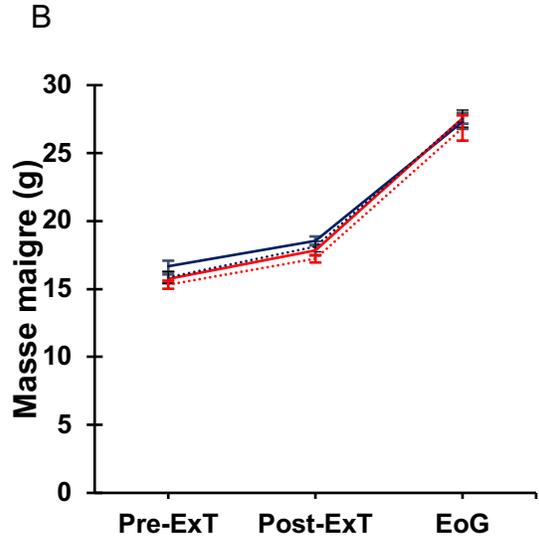
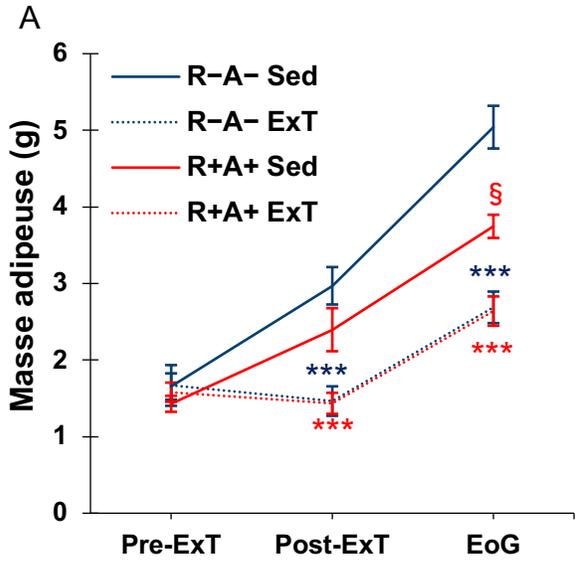
Cette figure présente nos données de masse corporelle (A et C) des souris mâles et femelles $R^{+}A^{+}$ ainsi que la consommation de nourriture (C) et d'eau (D) avant et pendant la gestation.

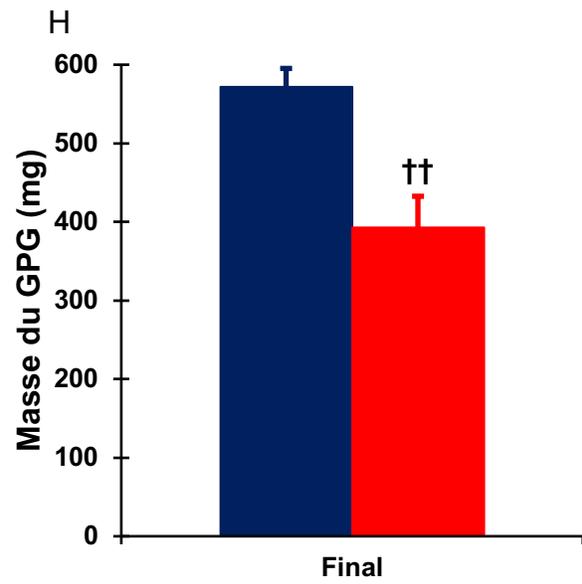
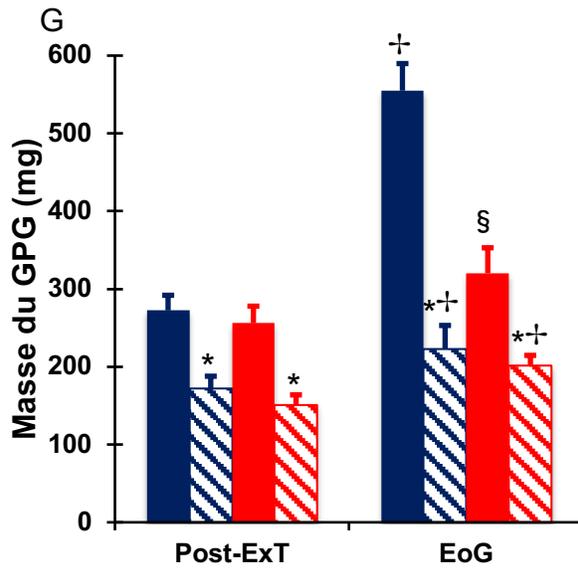
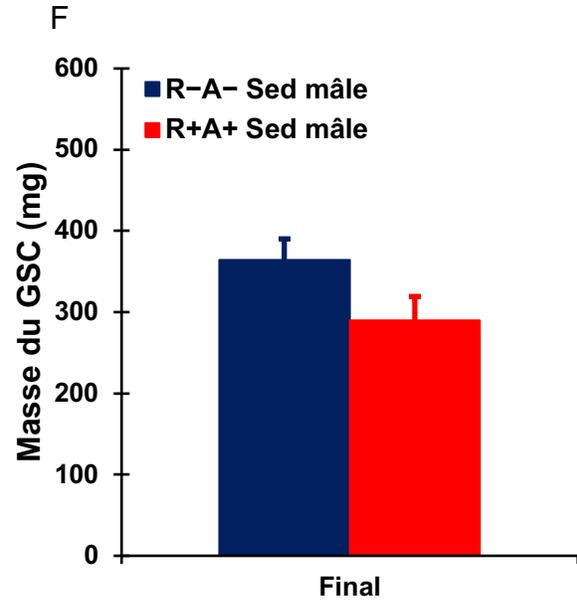
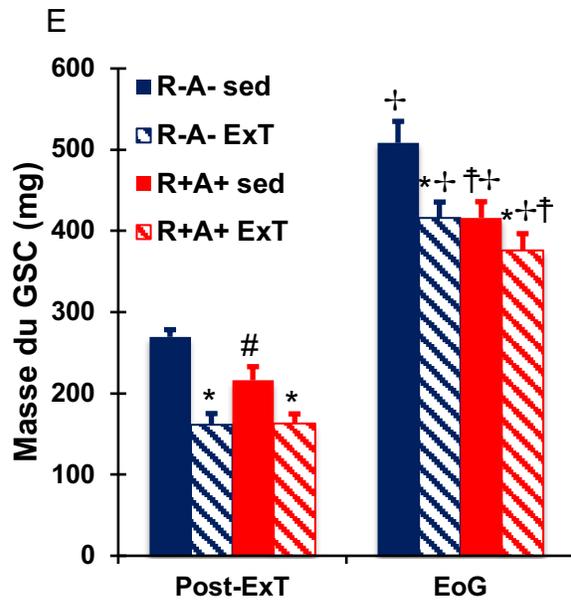
* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ comparé aux $R^{-}A^{-}$ sédentaires; † $p < 0,01$ comparé aux $R^{-}A^{-}$. EoG : Fin de la gestation ; ExT : Entraînement physique ; Sed : Sédentaire.

La distribution adipeuse chez les souris R⁺A⁺. Nous observons par EchoMRITM que les souris entraînées ont une masse adipeuse significativement inférieure à leurs consœurs sédentaires avant la gestation et cette différence est maintenue au fil de la gestation alors qu'aucune différence n'est notée pour la masse maigre (Figure 12 A et B ; post-ExT : $n = 8-10$; EoG : $n = 8-15$). Nous observons également, comme attendu, une augmentation de la masse grasse avec la gestation quoique cette masse soit moins grande chez les souris R⁺A⁺ sédentaires par rapport aux souris de type sauvage à la fin de la gestation. L'entraînement réduit principalement la masse du GSC, du GPG et du GPR alors que la gestation induit un gain de masse grasse dans tous les dépôts adipeux à l'exception du GPG chez les souris R⁺A⁺ sédentaires (Figure 12 E, G et I ; post-ExT : $n = 8-10$; EoG : $n = 8-15$). Aussi, les souris R⁺A⁺ sédentaires ont une masse de GPG inférieures à leurs consœurs R⁻A⁻ sédentaires seulement à la fin de la gestation. Les souris R⁺A⁺ ont une masse du GSC et GPR réduite à la fin de la gestation.

Le phénotype de masse adipeuse réduite est aussi présent chez les souris mâles R⁺A⁺ de même âge où nous notons une diminution de la masse adipeuse (Figure 12 C ; $n = 7-8$) et de la masse des dépôts adipeux viscéraux (GPG et GPR; Figure 12 H et J ; $n = 7-8$) et sans modification de la masse maigre (Figure 12D ; $n = 7-8$). Chez les mâles, la masse adipeuse augmente avec le temps ($p > 0,0001$) bien que cette différence ne soit pas montrée dans la Figure 12C. Ainsi, la réduction de masse adipeuse observée dans les souris R⁺A⁺ est présente dans les deux sexes.

Ces résultats suggèrent que le gain de masse adipeuse induite par la gestation est moins prononcé chez les souris R⁺A⁺ en conditions sédentaires et que l'ExT normaliserait l'effet du génotype sur la masse adipeuse.





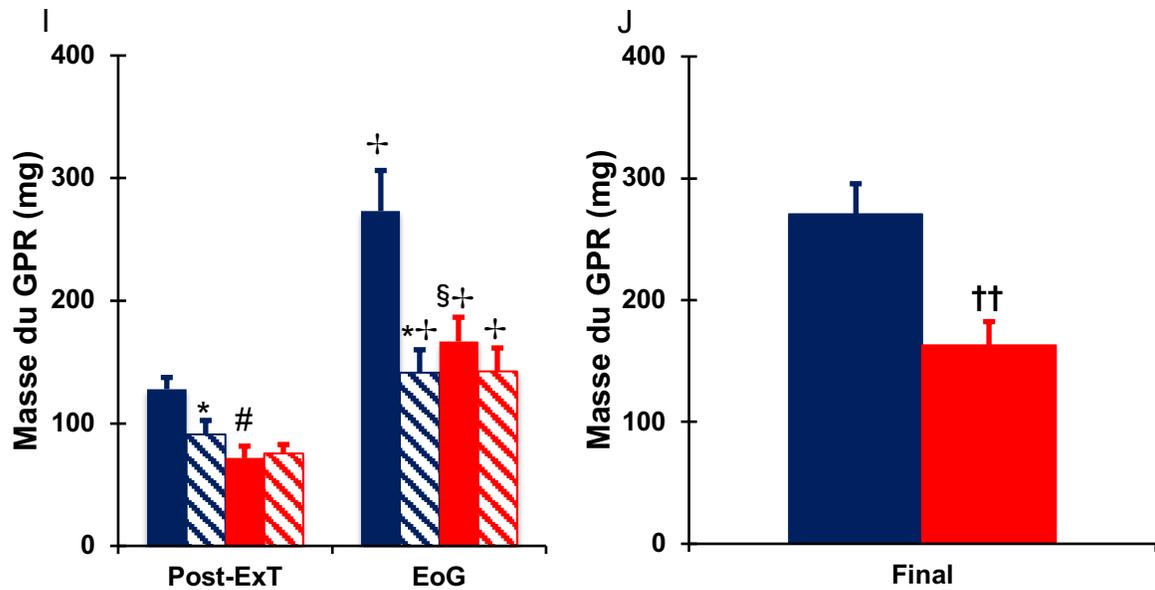


Figure 12 : Effets de la gestation et l'ExT sur la masse grasse et maigre ainsi que sur le gras sous-cutané, périgonadique et périrénal chez les souris R⁺A⁺.

*p<0,001 comparé aux sédentaires ; †p<0,05, ††p<0,01 comparé aux R⁻A⁻ ; ‡p<0,05 comparé aux R⁻A⁻ ; § p<0,001 comparé aux R⁻A⁻ ; # p<0,05, comparé aux R⁻A⁻ ; † p<0,001 comparé à post-ExT. La normalité est respectée avec la transformation logarithmique des données de masse adipeuse. EoG : Fin de la gestation ; ExT : Entraînement physique ; GPG : Gras périgonadique ; GPR : Gras périrénal ; GSC : Gras sous-cutané ; Sed : Sédentaire ; Post-ExT : À la fin des 4 semaines d'entraînement ou de cage sédentaire.

Niveaux d'expression protéiques de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et du récepteur Mas (MasR) dans le gras sous-cutané et périgonadique des souris R⁺A⁺. Avant la gestation, les souris R⁺A⁺ sédentaires expriment des niveaux inférieurs de ACE dans le GSC (Figure 13A ; n = 10-11) et le GPG (Figure 13B ; n = 8-9) en comparaison à leurs consœurs non transgéniques. De plus, la gestation réduit les niveaux de ACE dans ces deux tissus adipeux alors que l'ExT n'a aucun effet.

Avant la gestation, les souris R⁺A⁺ sédentaires expriment des niveaux supérieurs de MasR dans le GSC (Figure 14A ; n = 10-11), mais non dans le GPG (Figure 14B ; n = 8-9). À la fin de la gestation, les souris R⁺A⁺ ont des niveaux d'expression inférieurs de MasR dans le GPG par rapport à leurs consœurs R⁻A⁻. De plus, l'expression de MasR dans le GPG est augmentée avec l'ExT avant et à la fin de la gestation indépendamment du génotype. Les souris R⁺A⁺ sédentaires seulement ont des niveaux d'expression supérieurs de MasR dans le GSC par rapport aux souris témoins. Il est intéressant de noter que l'ExT normalise les niveaux d'expression de MasR chez les souris R⁺A⁺ à la fin de la gestation.

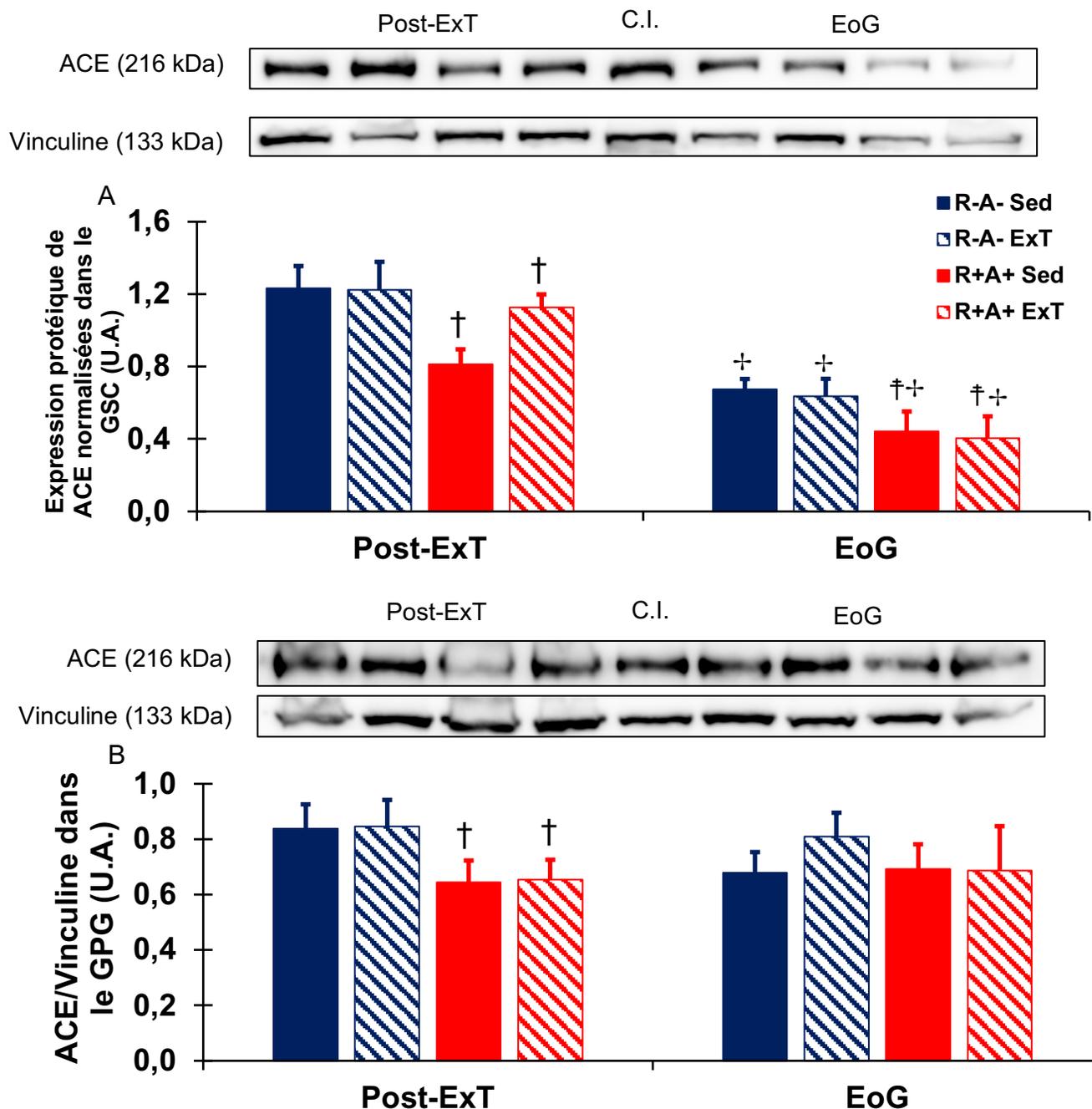


Figure 13 : Les profils d'expression protéiques de ACE dans le GSC et le GPG avant et à la fin de la gestation.

† $p < 0,05$ et †† $p < 0,0001$ comparé aux R⁻A⁻; †† $p < 0,001$ comparé à post-ExT. ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine ; C.I. : Contrôle interne ; EoG : Fin de la gestation ; ExT : Entraînement physique ; GPG : Gras périgonadique ; GSC : Gras sous-cutané ; Post-ExT : À la fin des 4 semaines d'entraînement ou de cage sédentaire ; U.A. : Unité arbitraire.

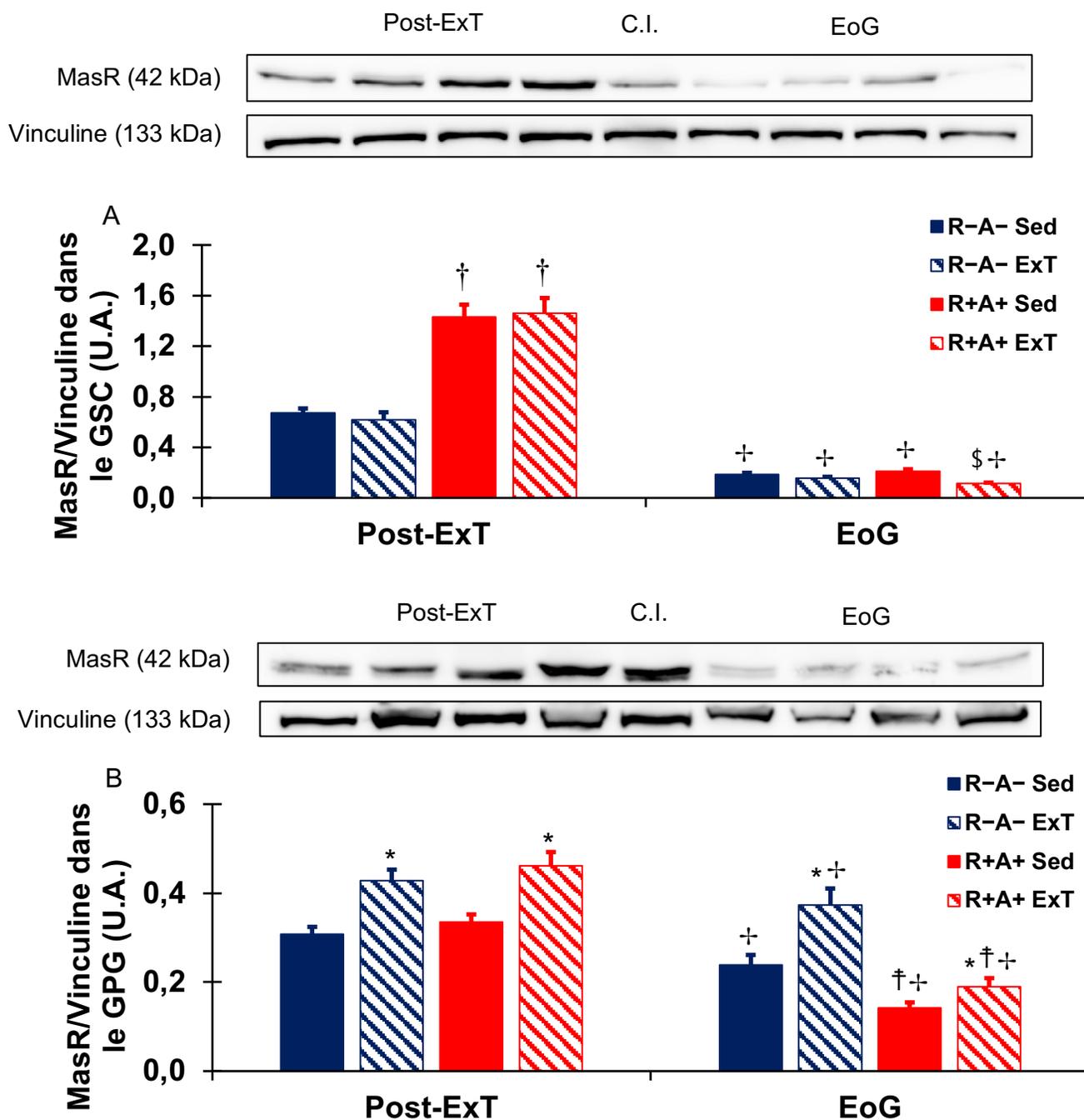


Figure 14 : Les profils d'expression de MasR dans le GSC et le GPG avant et à la fin de la gestation.

* $p < 0,001$ comparé aux sédentaires ; † $p < 0,05$, †† $p < 0,0001$, ††† $p < 0,0001$ comparé aux R⁻A⁻ ; †††† $p < 0,001$ comparé à post-ExT ; \$ $p < 0,01$ comparé aux R⁺A⁺. C.I. : Contrôle interne ; EoG : Fin de la gestation ; ExT : Entraînement physique ; GPG : Gras périgonadique ; GSC : Gras sous-cutané ; MasR : Récepteur Mas ; U.A. : Unité arbitraire.

ACE2 dans le GSC et GPG. On observe dans la Figure 15 les résultats négatifs qui suggèrent que l'expression de ACE2 n'est pas détectable dans les deux types de gras (échantillon groupé). Les résultats suggèrent que ACE2 est présent dans le rein, le cerveau et les testicules de souris au poids attendu, soit à 97 kDa, ainsi que dans le placenta humain, mais non détecté dans le gras sous-cutané, le gras périgonadique, le ventricule droit et le muscle gastrocnémien de souris. Par ailleurs, les niveaux d'expression génique de ACE2 n'ont pas pu être détecté ce qui appuie l'absence de ACE2 dans le GSC et le GPG en dépit d'un contrôle positif et négatif (données non montrée).

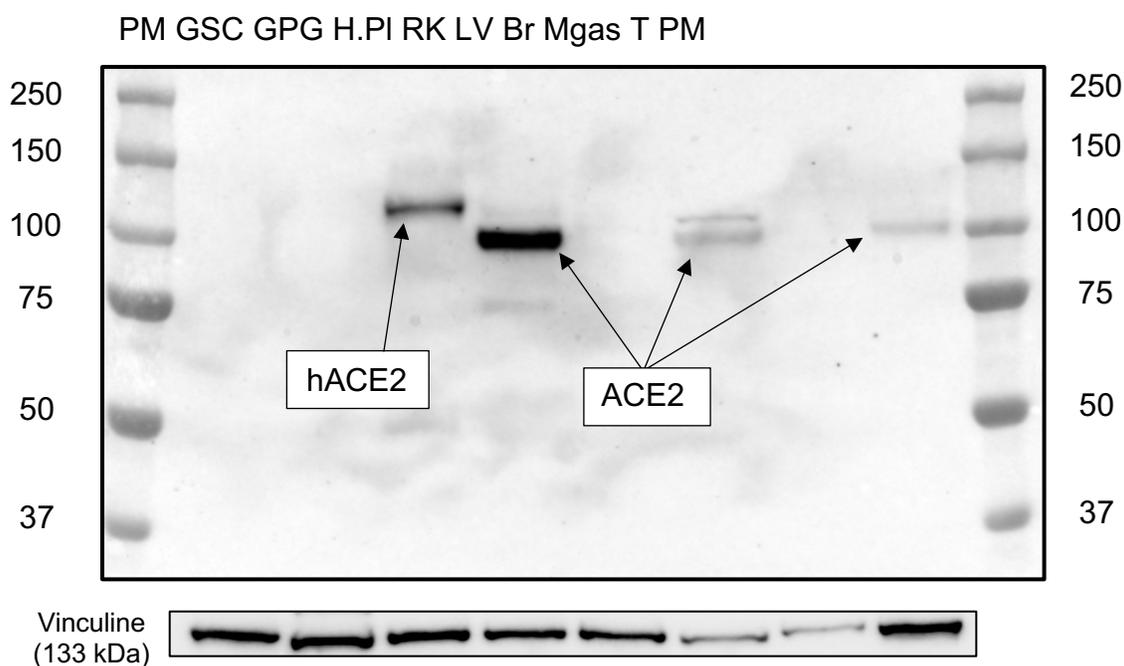


Figure 15 : Le profil d'expression de ACE2.

ACE2 : 1/1000 ab108252. Vinculine : 1/25 000 sc-73614. 30 μ g de lysat protéique ont été chargés. 10 μ L de poids moléculaire All-Blue™ ont été chargés dont le poids moléculaire est exprimé en kDa. GSC : gras sous-cutané (échantillon groupé) ; GPG : gras périgonadique (échantillon groupé) ; H.PI : Placenta humain (échantillon groupé) ; RK : rein droit ; LV : Ventricule gauche ; Br : Cerveau ; Mgas : muscle gastrocnémien ; T : testicules ; PM : poids moléculaire.

Expression génique de AT1Ra. Nous avons observé une augmentation significative des niveaux d'AT1Ra avec la gestation dans le GPG (Figure 16; $n = 5-7$) alors qu'aucun effet du génotype et de l'ExT n'est présent. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de AT1Ra est importante durant la gestation possiblement pour inhiber la lipolyse et favoriser un gain de masse grasse dans le GPG.

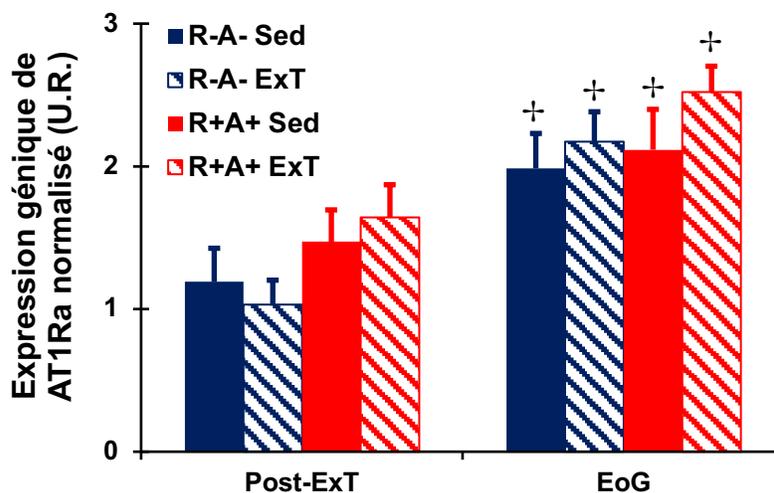


Figure 16 : Le profil d'expression de AT1Ra dans le GPG avant et à la fin de la gestation.

+ $p < 0,01$ significativement différent du post-ExT. $n = 5-7$. AT1Ra : Récepteur de l'angiotensine II type Ia ; EoG : Fin de la gestation ; ExT : entraînement physique ; Sed : Sédentaire ; U.R. : Unité relative.

Expression de Mest/Peg1. Mest/Peg1 est un biomarqueur de corrélation positive avec la taille des adipocytes utilisé en qPCR [175]. Nos résultats suggèrent que la lipogenèse induite par la gestation pourrait favoriser une augmentation de la taille des adipocytes. En effet, la gestation induit une forte augmentation de Mest/Peg1 indépendamment du génotype et de l'état d'ExT dans le GPG (Figure 17; $n = 6-7$). De façon intéressante, l'expression génique de Mest/Peg1 diminue chez les souris entraînées par rapport aux souris sédentaires avant et à fin la gestation. Les souris R^+A^+ sédentaires en fin de gestation expriment significativement moins de Mest/Peg1 que les souris non transgéniques en fin de gestation. La réduction de Mest/Peg1 chez les souris R^+A^+ sédentaires à la fin de la gestation suggère une réduction de la taille des adipocytes alors que cet effet n'est pas présent dans les souris entraînées.

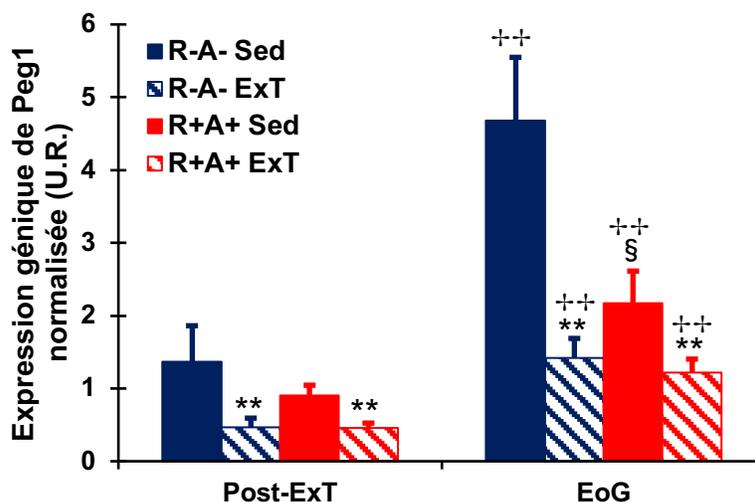


Figure 17 : Le profil d'expression de Mest/Peg1 dans le GPG avant et à la fin de la gestation.

** $p < 0,01$ comparé aux sédentaires; § $p < 0,01$ comparé aux R^-A^- ; †† $p < 0,001$ comparé à post-ExT. La normalité et l'équivalence des données sont respectées avec la transformation racine carrée de Mest/Peg1. $n = 6-7$. AT1Ra : Récepteur de l'angiotensine II type Ia ; EoG : Fin de la gestation ; ExT : entraînement physique ; Sed : Sédentaire ; U.R. : Unité relative.

Profil inflammatoire dans le GPG. Le profil d'expression génique de MCP-1 (Figure 18A ; $n = 5-7$), un marqueur de l'infiltration des macrophages, et de $TNF\alpha$ (Figure 18B ; $n = 5-7$), un marqueur proinflammatoire, n'est pas modulé dans le GPG.

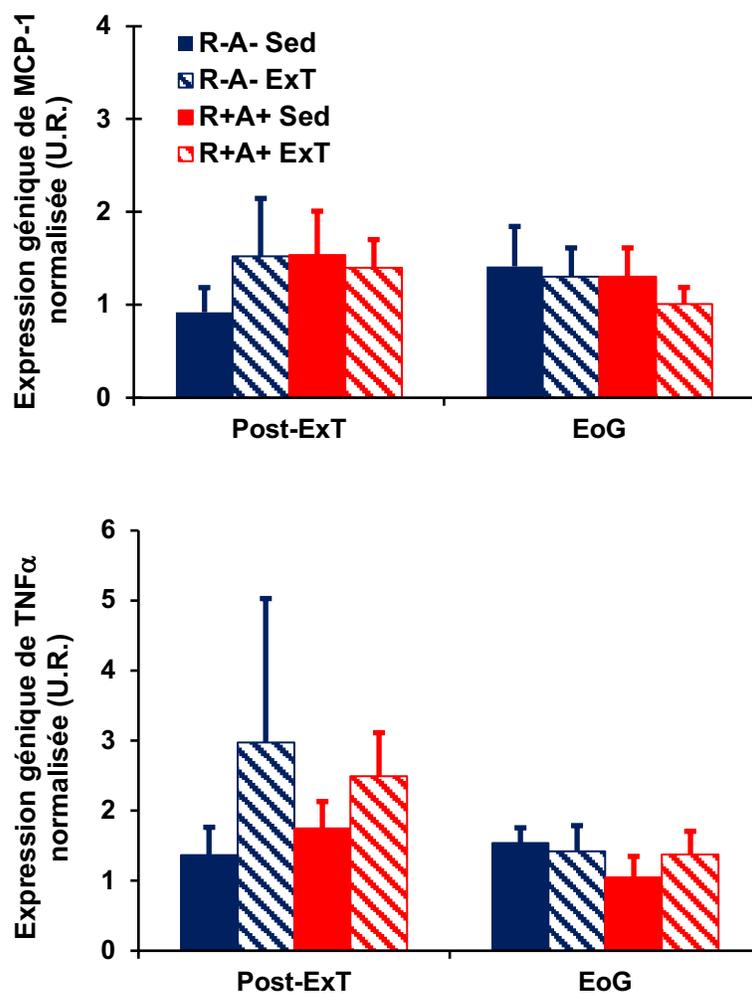


Figure 18 : Le profil d'expression de MCP-1 et de $TNF\alpha$ dans le GPG.

Aucune différence statistique. $TNF\alpha$ et \square MCP-1 : $n = 5-7$. La normalité et l'équivalence des données sont respectées avec la transformation en rang de MCP-1 et $TNF\alpha$.

Profil des adipokines en circulation à la fin de la gestation. À la fin de la gestation, les souris entraînées ont des niveaux circulants de leptine inférieurs et des niveaux de résistine, AgRP, VEGF et oncostatine supérieurs aux souris sédentaires indépendamment du génotype (Figure 19). Les souris R⁺A⁺ ont des niveaux plasmatiques significativement inférieurs de FGF-21 et fétuine A comparativement aux souris R⁻A⁻ en fin de gestation. Nous notons une tendance à l'augmentation de la pentraxine-3 chez les souris entraînées (p=0,0772) ainsi qu'une tendance à la diminution chez les souris R⁺A⁺ de l'endocan (p=0,0551) et de l'IL-10 (p=0,0640). Ces résultats suggèrent que les souris entraînées auraient possiblement une meilleure distribution du glucose et un potentiel angiogénique favorisant le développement fœtal approprié, alors que les souris R⁺A⁺ auraient des altérations au niveau du métabolisme énergétique et osseux (n = 5).

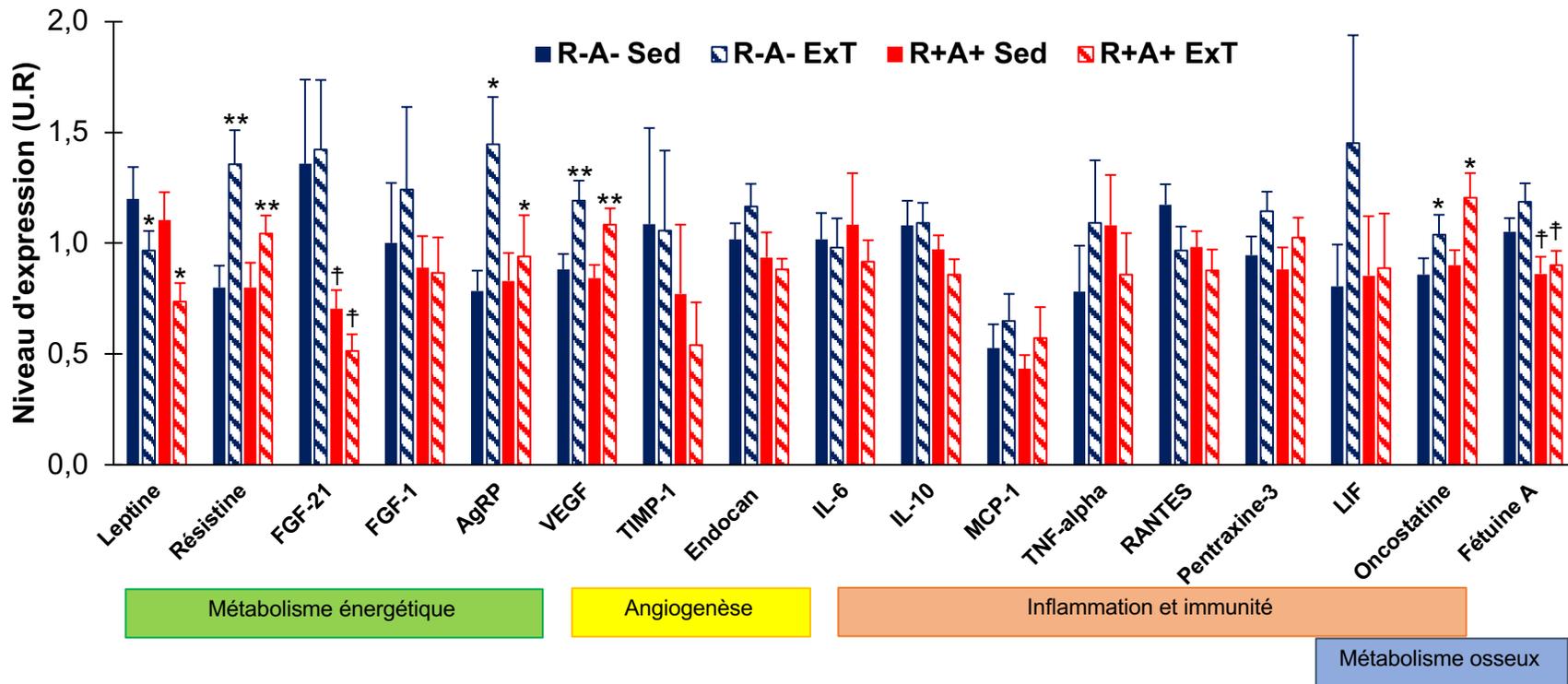


Figure 19 : Le profil d'expression des adipokines en circulation maternelle à la fin de la gestation.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparé aux sédentaires; † $p < 0,05$ comparé aux R⁻A⁻. $n = 5$. AgRP : *Agouti-related neuropeptide* ; ExT : Entraînement physique ; FGF : Facteur de croissance des fibroblastes ; IL : Interleukine ; LIF : *Leukemia inhibitory factor* ; MCP-1 : Chimiokine des monocytes type 1 ; RANTES : *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* ; Sed : Sédentaire ; TIMP-1 : Inhibiteur des métalloprotéinase tissulaires type 1 ; TNF α : Facteur de nécrose tumoral alpha ; U.R. : Unité relative ; VEGF : Facteur de croissance soluble de l'endothélium vasculaire.

Paramètres du débit utérin. Les souris R⁺A⁺ ont une diminution significative de la vitesse du sang de l'artère utérine en systole (PSV) et de la vitesse en diastole (LDV) accompagnée d'une diminution de la vitesse en fonction du temps (VTI) indépendamment de l'entraînement (Tableau 5). Les souris entraînées ont une augmentation du PSV et du LDV accompagné d'une augmentation du VTI indépendamment du génotype. Aucune différence de l'indice de résistance (RI) et de l'indice de pulsativité (PI) n'a été observée. Ces résultats suggèrent que le débit sanguin dans l'artère utérine est augmenté avec l'ExT à la fin de la gestation indépendamment du génotype et que les souris R⁺A⁺ ont un débit utérin inférieur aux souris R⁻A⁻ ce qui est caractéristique d'une gestation pathologique atténuée avec l'ExT.

Tableau 5 : Les effets bénéfiques de l'entraînement physique sur les paramètres de l'artère utérine chez les souris R⁺A⁺.

	Génotype maternel	N	Paramètres de l'artère utérine				
			Vitesse en diastole (mm*s ⁻¹)	Vitesse en systolique (mm*s ⁻¹)	Intégration de la vitesse (mm ³ *s ⁻¹)	Indice de résistance (U.A.)	Indice de pulsativité (U.A.)
Sédentaire	R ⁻ A ⁻	9	94,18±5,82	206,64±9,01	20,87±1,30	0,5440±0,0204	0,8000±0,0438
	R ⁺ A ⁺	15	79,30±5,66†	172,11±6,22†	17,11±0,79†	0,5317±0,0180	0,7656±0,0388
Entraînée	R ⁻ A ⁻	7	112,49±4,92*	233,23±15,72**	22,46±1,34*	0,5107±0,0235	0,7320±0,0497
	R ⁺ A ⁺	9	95,54±4,72*†	218,60±8,41***†	21,36±0,87*†	0,5625±0,0159	0,8215±0,0301

† p< 0,05 comparé aux R⁻A⁻ ; *p>0,05 et **p>0,01 comparé aux sédentaires. U.A. : Unité arbitraire

Discussion

Notre première hypothèse était que l'excès d'Ang-II altère le RAS dans le tissu adipeux et que les fonctions du tissu adipeux favorisent un profil d'adipokines insulino-résistants, proinflammatoires et anti-angiogéniques ce qui contribuerait au développement de la prééclampsie et pourrait être contré par l'ExT. Sachant que le modèle murin de prééclampsie présente des altérations du placenta, la seconde hypothèse était de caractériser les altérations de l'artère utérine, un biomarqueur de la prééclampsie, et de déterminer les effets bénéfiques de l'ExT avant et pendant la gestation. Nos études permettraient d'établir l'impact du tissu adipeux dans le développement de la prééclampsie et de déterminer les effets bénéfiques de l'ExT sur ce tissu.

Les souris parcourent une distance moyenne de 8km par jour avant la gestation. Il est intéressant de constater que la distance parcourue diminue de moitié dès le début de la gestation et que la distance journalière parcourue diminue au fil que la gestation progresse, et ce, indépendamment du génotype. Ces caractéristiques de l'ExT observées dans notre modèle animal mimique la situation dans laquelle la pratique régulière d'activité physique est réduite avec la progression de la gestation, comme on le verrait chez la femme. La roue d'exercice n'est pas équivalente à la course chez l'humain comme la roue peut continuer de tourner en l'absence de la souris.

Il est connu que les mécanismes impliqués dans le développement de la prééclampsie débutent bien avant l'apparition des symptômes. Bien que les souris diminuent leurs niveaux d'activité physique avec la progression de la gestation, les améliorations de la réactivité vasculaire et du développement placentaire, observés à la fin de la gestation, peuvent être un effet direct de l'ExT et peuvent être normalisées au début de la gestation quand les souris avaient un plus grand volume d'entraînement. De plus, les effets bénéfiques cardiovasculaires de l'ExT ne sont pas perdus instantanément quand l'ExT est arrêté. Pour cette raison, les souris entraînées maintiennent les protections cardiovasculaires acquises par l'ExT avant et pendant la gestation. En 2016, les lignes directrices du Collège américain des Obstétriciens et Gynécologues

suggéraient aux femmes enceintes sans complications obstétriques de pratiquer 150 minutes d'ExT aérobie d'intensité modérée à intense par semaine. L'hypertension artérielle incontrôlée est considérée comme une contrainte à faire de l'exercice. Il serait important d'investiguer un peu plus à ce sujet comme nous voyons des effets bénéfiques chez des souris avec l'hypertension incontrôlée.

Les résultats de composition corporelle suggèrent que les souris R⁺A⁺ sédentaires auraient une moins grande adiposité à la fin de la gestation. Nos résultats démontrent clairement que nous avons caractérisé que les souris hypertensives R⁺A⁺ ont une moins grande prise de poids avec la grossesse. Nos résultats montrent que l'expression de MasR est augmentée de 125% ($p > 0,0001$) et que celle de ACE est réduite ($p < 0,05$) chez les souris R⁺A⁺ dans le GSC avant la gestation. L'ExT ne suffit pas à normaliser l'expression de ACE et MasR, bien qu'on note une augmentation de 40% de MasR chez les souris R⁺A⁺ entraînées comparativement aux souris R⁺A⁺ sédentaires. Ces résultats suggèrent que, chez les souris R⁺A⁺ sédentaires, le GSC tente de contrebalancer les effets délétères des concentrations élevés d'Ang-II en favorisant l'effet de l'Ang-(1-7) en augmentant l'expression protéique de MasR et en réduisant l'expression protéique de ACE complémentirement, ainsi réduisant la production locale d'Ang-II dans des conditions non gestantes.

Nos résultats montrent que l'expression de MasR demeure élevée dans le GSC seulement chez les souris R⁺A⁺ sédentaires. Nous notons que la gestation normale s'accompagne d'une réduction de MasR dans le gras sous-cutané et le gras périgonadique. L'augmentation du récepteur de l'Ang-II avec la gestation normale dans le tissu adipeux peut contribuer au gain de poids avec la gestation normale. La gestation induit une réduction des composantes du RAS adipeux telles que le MasR dans le GSC et le GPG et ACE dans le GSC indépendamment de l'entraînement et du génotype. Les niveaux d'expression protéique de ACE dans le GPG sont identiques au début et à la fin de la gestation alors que l'expression génique de AT1a est augmentée dans ce tissu avec la gestation. Ces résultats suggèrent que la voie classique du RAS est potentiellement réduite dans le GSC, de par une moins grande abondance de ACE et de MasR chez les R⁺A⁺ avec lors de leur gestation.

Dans le GPG avant la gestation, nos résultats montrent que les souris entraînées présentent une augmentation de l'expression du MasR de 38% ($p > 0,001$) indépendamment du génotype alors que l'expression de ACE est significativement ($p < 0,05$) réduite chez les souris $R^{+}A^{+}$ indépendamment de l'ExT. Ces résultats suggèrent que l'ExT induit l'expression de MasR principalement dans le GPG ce qui pourrait favoriser la capture du glucose étant donné que MasR est impliqué dans la phosphorylation d'Akt1 essentielle à la croissance cellulaire. De plus, cela pourrait contribuer à l'inhibition des effets proinflammatoires de l'Ang-II dont la production locale serait inhibée par la sous-expression de ACE chez les souris $R^{+}A^{+}$ indépendamment de l'ExT. À l'inverse, les actions antiinflammatoires de MasR seraient médiées par la contre-régulation des voies de signalisation induites par l'Ang-II.

Les effets lipolytiques de l'Ang-(1-7) ont été étudiés dans les cultures primaires d'adipocytes chez le rat Sprague-Dawley. Une étude a montré que l'Ang-(1-7) augmente la relâche du glycérol *in vitro* de manière dose-dépendante ce qui stimule la lipolyse via la voie MasR/PI3K/eNOS [176]. Alternativement, la stimulation avec l'Ang-II via AT1R favoriserait l'expansion du nombre d'adipocytes matures et de préadipocytes différenciés dans le gras omental et périrénal humain [177]. L'Ang-II inhibe la lipolyse via AT1R dans le GSC humain de sujets obèses ($p > 0,001$) et normaux ($p = 0,04$) et cet effet est complètement aboli avec l'inhibition de AT1R ($p = 0,35$) [178]. Chez la souris, nos résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression d'AT1R augmente avec la grossesse normale dans le GSC. L'inhibition de la différenciation adipogénique par Ang-II et l'inhibition du AT1R est accompagnée par une diminution et une augmentation, respectivement, de PPAR γ et de l'acide gras synthase, des marqueurs de géniques de la différenciation des adipocytes [179]. Le phénotype de minceur associée aux souris $R^{+}A^{+}$ est présent uniquement en fin de gestation et chez les mâles à 12 semaines d'âge. Nos résultats montrent que l'ExT normalise le phénotype de minceurs par rapport aux souris entraînées de type sauvage. Les résultats de masse des tissus adipeux, de Mest/Pegl dans le gras périgonadique et la réduction de la leptine circulante maternelle suggèrent qu'il y aurait des réductions de la taille et du nombre d'adipocytes chez les souris $R^{+}A^{+}$. Par conséquent, il serait intéressant d'effectuer des coupes histologiques du GSC et du GPG avant et à la fin de la gestation afin de pouvoir confirmer ses données.

La diminution du RAS local a été rapportée lors de la gestation normale dans l'utérus chez les femmes. Celle-ci est accompagnée de changements marqués de l'expression génique de plusieurs composantes du RAS local, soit des réductions du AT1R (-8X), AT2R (-2000X), du MasR (-200X), de ACE (-8X) et de l'AGT (-8X) comparativement à des femmes non gestantes. Ces résultats étaient accompagnés d'une forte diminution des concentrations peptidiques utérins de l'Ang-II (-40X) avec la gestation normale sans changement des concentrations d'Ang-I et de l'Ang-(1-7). Il est intéressant de noter que l'expression génique des composantes de la voie classique du RAS est caractérisée par une augmentation de la rénine (10X), de ACE (3X) et du peptide de l'Ang-II (2X) avec la prééclampsie comparativement à la gestation normale dans l'utérus [180]. Cette diminution des composantes du RAS et de l'Ang-II avec la gestation normale peut contribuer à l'état vasodilatateur des artères spiralées permettant d'augmenter le débit placentaire vers l'utérus. À l'inverse, la voie classique est augmentée dans l'utérus avec la prééclampsie comparativement à la grossesse normale responsable des niveaux élevés d'Ang-II observés dans cet organe. Ces résultats supportent le fait que les patientes atteintes de prééclampsie ne seraient pas en mesure de réprimer le RAS localement. L'augmentation de l'Ang-II dans les artères spiralées contribuerait à la réduction de débit sanguin placentaire typiquement observé chez les femmes atteintes de prééclampsie telles que nous avons démontré dans le placenta dans notre modèle animal.

Il est intéressant de noter que l'ExT normalise, par rapport aux témoins ExT, les niveaux d'expression de MasR exagérés spécifiquement chez les souris avec prééclampsie. Ces résultats suggèrent que la production locale d'Ang-II, inhibée par la sous-expression de ACE, chez les souris $R^{+}A^{+}$ a lieu de façon indépendante de l'ExT combiné avec la normalisation de MasR avec l'ExT seraient associées à un gain de masse adipeuse induit par l'Ang-II avec la gestation. La mesure de la taille des adipocytes par histologie permettrait de mieux caractériser le phénotype. La prééclampsie est typiquement associée à une augmentation de l'Ang-II et la rénine circulant. Aussi, les souris $R^{+}A^{+}$ ont des niveaux circulants d'Ang-II environ 2 fois plus élevé ($334,7 \pm 4,7$; $141,4 \pm 2,6$ pg/mL chez les $R^{+}A^{+}$ comparés au $R^{-}A^{-}$; $p > 0,001$) [181]. Cependant, la séquence d'acide aminé de l'Ang-II se retrouve dans l'Ang-I, l'Ang-(1,9) et l'AGT ce qui complique le design d'un épitope spécifique dans le test ELISA utilisé. Les dosages

plasmatiques de l'Ang-I, -II, -(1-7) et -(1,9) par HPLC couplé à la spectrométrie de masse avant et à la fin de la gestation chez les souris R⁺A⁺ entraînées ou sédentaires permettront de déterminer les effets bénéfiques sur les peptides de la cascade du RAS.

Bien que la gestation normale soit caractérisée par une augmentation du RAS systémique, le gras sous-cutané diminuerait les niveaux d'expression de ACE et de MasR suggérant de nouvelles fonctions par le gras sous-cutané dans le métabolisme lipidique et du glucose. De plus, les niveaux circulants d'Ang-II sont augmentés accompagnés d'une diminution de la sensibilité endothéliale à l'Ang-II [182]. À la fin de la gestation chez les souris R⁺A⁺, la réduction de MasR dans le tissu adipeux comparativement à avant la gestation peut provenir d'une rétro-inhibition de l'Ang-II. De façon générale, il est difficile d'évaluer l'ensemble de la littérature des altérations du RAS dans le tissu adipeux puisque les anticorps contre le AT1R sont reconnus pour être non spécifiques. Étonnamment, nous n'avons pas été en mesure de détecter de l'expression protéique par immunobuvardage de type Western et génique par qPCR de ACE2 par les tissus adipeux de souris (voir Figure 15A et B) bien que plusieurs articles aient montré son expression en l'ARNm seulement chez la souris probablement due à la faible expression dans le tissu adipeux. La faible activité enzymatique de ACE2 mesurée par le clivage du 7-méthycoumarin fluorescent (R&D SystemsTM, Minneapolis, États-Unis) pourrait être dû à son clivage non spécifique par ACE2 retrouvée en circulation, la caspase-1 ou l'enzyme de conversion de l'interleukine [183].

Le poids réduit des souriceaux, suggérant la présence d'IUGR souvent associé à la prééclampsie, est probablement une conséquence des altérations placentaires observées dans notre modèle. En effet, nos études précédentes ont montré que les placentas des souris R⁺A⁺ sont nécrosés et présentent des structures anormales au niveau du labyrinthe, suggérant une mauvaise irrigation ainsi que des échanges inadéquats entre le fœtus et la mère, ce qui peut facilement expliquer le fait que les souriceaux aient une croissance restreinte [181]. La surexpression placentaire du facteur sFlt-1, un marqueur de l'hypoxie placentaire, peut également expliquer les défauts de vascularisation puisque ce facteur anti-angiogénique bloque les effets de VEGF. Aussi, il serait intéressant de vérifier les niveaux d'expression de sFlt-1 produit par

le tissu adipeux qui serait capable de contribuer aux altérations placentaires précoces contribuant aux symptômes maternels observés.

Nous avons trouvé que l'ExT réduit les niveaux de leptine accompagnés d'une augmentation de la résistine en circulation à la fin de la gestation. Ces résultats suggèrent que l'ExT est bénéfique puisqu'une diminution de la leptine augmente l'apport alimentaire et la résistine induirait une résistance à l'insuline du côté maternel favorisant ainsi l'apport nutritionnel fœtal. Nos résultats précédents montrent que l'ExT réduit significativement la glycémie de 8 et 11% à la fin de la gestation indépendamment du génotype [49]. À la fin de la gestation, la hausse marquée de la résistine circulante provient majoritairement par sa sécrétion par le placenta du côté maternel pour induire une résistance à l'insuline physiologique chez la mère pour redistribuer le glucose nécessaire à la croissance des souriceaux où il serait intéressant d'étudier la glycémie en continue par implant télémétrique [184].

Les mesures de l'artère utérine suggèrent un mécanisme de la présence d'IUGR chez les souris $R^{+}A^{+}$ indépendamment de l'ExT. De plus, nous sommes les premiers à montrer que l'ExT avant et pendant la gestation augmente le débit sanguin dans l'artère utérine autant avec la gestation non pathologique que chez les souris $R^{+}A^{+}$ qui ont de la IUGR. Nous notons une augmentation du débit utérin avec l'ExT et la diminution avec modèle murin de prééclampsie ne semble pas agir directement sur les paramètres vasculaires de l'artère utérine tel l'indice de résistance et de pulsatilité. Comme rapporté par notre laboratoire, nous observons que les souris $R^{+}A^{+}$ ont une hypertrophie cardiaque pathologique en fin de gestation qui n'est pas rétablie en entièreté par l'ExT [49]. De manière intéressante, nos études antérieures ont observé encore une augmentation de la masse de l'oreillette droite avec l'ExT en fin de gestation, alors que nous n'observons pas cette adaptation avant la gestation. Le peptide natriurétique du cerveau, un marqueur de la dysfonction du ventricule gauche, est réduit avec l'ExT, mais n'était pas augmenté chez les souris $R^{+}A^{+}$ bien qu'une tendance ait été observée par notre équipe [49]. Chez les femmes avec la prééclampsie précoce, les niveaux maternels circulants de BNP sont significativement élevés et corrèlent avec l'épaisseur relative de l'endocarde et l'indice de la masse du ventricule gauche [185]. Il aurait été intéressant de mesurer les niveaux d'expression

de BNP et EGR-1 en lien les effets préventifs de l'ExT chez un modèle murin hypertendu chroniquement avec une hypertrophie du ventricule gauche avant la gestation.

Les paramètres de l'artère utérine ont été étudiés chez les primates non humains, des singes, sous diète riche en gras pendant 4 ans. Au troisième trimestre, la diète riche en gras réduit le débit utérin comparativement avec le groupe sur diète normale. Cela suggère que le gain de masse adipeuse avant la gestation induit par la diète riche en gras peut favoriser l'ischémie placentaire.

Nous observons que 4 semaines d'ExT réduisent la masse corporelle en dépit du fait que les souris entraînées augmentent leur consommation alimentaire sur diète normale. Cette diminution de masse corporelle peut être principalement expliquée une diminution de la masse adipeuse en lien avec l'ExT. L'absence de changement de masse maigre est dû à la roue d'exercice qui est un type d'ExT non atrophique. D'ailleurs, on remarque que l'ExT augmente la consommation d'eau seulement chez les souris de type sauvage, alors que les souris $R^{+A^{+}}$ consomment plus d'eau autant en conditions sédentaires ou d'ExT. Il aurait été intéressant d'étudier l'effet de la diète riche en gras chez les souris $R^{+A^{+}}$ sur les altérations du profil inflammatoire du tissu adipeux ajouté à l'excès d'Ang-II systémique. Ajoutée au fait que les souris transgéniques présentent de la protéinurie avant la gestation accentuée avec la gestation, il y aurait des défauts importants au niveau de la fonction rénale et ainsi possiblement dans l'homéostasie des fluides et dans la réabsorption des sels qui pourraient être impliqués dans le développement de l'hypertension dans ce modèle.

Perspectives

Déterminer comment le tissu adipeux produirait de l'Ang-(1-7) en lien avec la surexpression de son récepteur mas.

La surexpression du MasR dans le tissu adipeux impliquerait un mécanisme de compensation de l'Ang-II médié par l'axe de l'Ang(1-7)/ACE2/MasR. Toutefois, la production locale d'Ang-(1-7) ne semblerait pas être médiée par ACE2 dans les tissus adipeux puisque nous n'avons pas été en mesure de détecter ACE2 par qPCR et par Western Blot. Toutefois, il existe des voies alternatives de production de l'Ang-(1-7) qui pourraient être impliquées tels la néprilysine, la thimet oligopeptidase ou la prolyl endopeptidase (Figure 3). Alternativement, les peptides dérivés de l'AGT tel l'Ang-I et -II, Ang-(1-7) aurait pu être quantifiés par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) et les niveaux d'expression des récepteurs AT1Ra et b, AT2R et MasR devraient être mesurés par qPCR pour appuyer nos résultats sachant que les anticorps pour ces récepteurs sont typiquement non spécifiques pour l'immunobuvardage de type Western.

Le tissu adipeux pourrait-il débalancer l'équilibre entre le VEGF et sFlt-1 pour justifier son implication dans la prééclampsie ?

Nos résultats montrent que les souris entrainées ont une augmentation de VEGF circulant et placentaire accompagné d'une diminution de sFlt-1 favoriserait l'angiogenèse placentaire et contribuent à atténuer les symptômes de la prééclampsie [49]. Alternativement, cette augmentation du VEGF pourrait aider à compenser l'augmentation du sFlt-1 stimulé par l'Ang-II associé avec notre modèle de PESCH. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que la prééclampsie est associée à une balance antiangiogénique où l'ExT permet de rétablir l'équilibre vers un milieu proangiogénique. Il serait intéressant d'impliquer le tissu adipeux dans cet équilibre angiogénique en mesurant les niveaux d'expression protéique de VEGF et sFlt-1 dans ce tissu.

Conclusion

L'impact de l'activité physique sur la santé humaine et les modèles murins a été largement étudié dans les années antérieures, mais à ce jour, personne n'a démontré l'effet bénéfique de l'ExT sur le développement de la prééclampsie. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'ExT sur le profil inflammatoire du tissu adipeux dans un contexte de la prééclampsie. Sous diète normale, le tissu adipeux contrebalance les effets induits par l'Ang-II par deux mécanismes différents. Le gras sous-cutané pourrait induire une réduction de l'enzyme principale de la production locale d'Ang-II indépendamment de l'ExT avant et à la fin de la gestation contrebalancée par une augmentation de l'axe de l'Ang-(1-7)/MasR avant la gestation. L'ExT favoriserait l'axe de l'Ang-(1-7)/MasR dans le gras périgonadique avant et à la fin de la gestation en normalisant les niveaux anormalement élevés de MasR dans le gras sous-cutané à la fin de la gestation en plus de normaliser le phénotype de minceur observé chez ce modèle murin de prééclampsie.

Nos résultats suggèrent que ces modifications du RAS local chez les souris R^+A^+ peuvent avoir altéré la différenciation des adipocytes favorisant une masse et une taille des adipocytes réduites à la fin de la gestation. Le tissu adipeux contribuerait ainsi au développement de la prééclampsie en sécrétant des facteurs anti-angiogéniques, comme le sFlt-1, et en exacerba la prise de masse grasse par l'augmentation de AT1Ra, la diminution de MasR et la résistance à l'insuline physiologique induite avec la gestation. À ce jour, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence la présence d'un profil proinflammatoire avec la sédentarité dans notre modèle murin R^+A^+ et les potentiels effets protecteurs de l'ExT sur ce profil. Ainsi, les implications du tissu adipeux dans le développement de la prééclampsie et l'effet bénéfique de l'ExT restent à déterminer.

Bibliographie

1. Canada, P.H.A., *Maternal Mortality in Canada*. Canada, Ottawa, 2013.
2. Allen, V.M., et al., *The effect of hypertensive disorders in pregnancy on small for gestational age and stillbirth: a population based study*. BMC Pregnancy Childbirth, 2004. **4**(1): p. 17.
3. Liu, A., et al., *Utilization of health care services of pregnant women complicated by preeclampsia in Ontario*. Hypertens Pregnancy, 2009. **28**(1): p. 76-84.
4. Kramer, M.S., et al., *Socio-economic disparities in pregnancy outcome: why do the poor fare so poorly?* Paediatr Perinat Epidemiol, 2000. **14**(3): p. 194-210.
5. Hall, M.E., et al., *Obesity, hypertension, and chronic kidney disease*. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2014. **7**: p. 75-88.
6. *2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension*. J Hypertens, 2013. **31**(10): p. 1925-38.
7. Mol, B.W.J., et al., *Pre-eclampsia*. Lancet, 2016. **387**(10022): p. 999-1011.
8. E, U., L. J., and M. E., [*In Process Citation*]. Mycotoxin Res, 2000. **16 Suppl 1**: p. 30-3.
9. Gynecologists., A.C.o.O.a. and H.i. pregnancy. *The most recent practice guidelines from the ACOG summarize the current body of research in the field and offer comprehensive recommendations*. 2013; Available from: <http://www.acog.org>.
10. Cooper, D.W., et al., *Genetic control of susceptibility to eclampsia and miscarriage*. Br J Obstet Gynaecol, 1988. **95**(7): p. 644-53.
11. Lain, K.Y. and J.M. Roberts, *Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia*. Jama, 2002. **287**(24): p. 3183-6.
12. Xiong, X., W.D. Fraser, and N.N. Demianczuk, *History of abortion, preterm, term birth, and risk of preeclampsia: a population-based study*. Am J Obstet Gynecol, 2002. **187**(4): p. 1013-8.
13. Esplin, M.S., et al., *Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia*. N Engl J Med, 2001. **344**(12): p. 867-72.
14. *About preeclampsia*. 2010; Available from: www.preeclampsia.org.
15. Sibai, B.M., et al., *Risk factors for preeclampsia, abruptio placentae, and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension*. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. N Engl J Med, 1998. **339**(10): p. 667-71.
16. Redman, C.W. and I.L. Sargent, *Latest advances in understanding preeclampsia*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1592-4.
17. Wang, B., et al., *High mobility group box 1 (HMGB1) levels in the placenta and in serum in preeclampsia*. Am J Reprod Immunol, 2011. **66**(2): p. 143-8.
18. Aouache, R., et al., *Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(5).

19. Burton, G.J. and E. Jauniaux, *Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia*. J Soc Gynecol Investig, 2004. **11**(6): p. 342-52.
20. Jauniaux, E., B. Gulbis, and G.J. Burton, *The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus--a review*. Placenta, 2003. **24 Suppl A**: p. S86-93.
21. Barker, D.J., *The fetal origins of adult hypertension*. J Hypertens Suppl, 1992. **10**(7): p. S39-44.
22. Chang, C.W., A.K. Wakeland, and M.M. Parast, *Trophoblast lineage specification, differentiation and their regulation by oxygen tension*. J Endocrinol, 2018. **236**(1): p. R43-r56.
23. Rodesch, F., et al., *Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy*. Obstet Gynecol, 1992. **80**(2): p. 283-5.
24. Patel, J., et al., *Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development*. Placenta, 2010. **31**(11): p. 951-7.
25. Hoffmann, P., J.J. Feige, and N. Alfaidy, *Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy*. Endocrinology, 2006. **147**(4): p. 1675-84.
26. Bass, K.E., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression is upregulated during human cytotrophoblast invasion in vitro*. Dev Genet, 1997. **21**(1): p. 61-7.
27. Burton, G.J. and E. Jauniaux, *Development of the Human Placenta and Fetal Heart: Synergic or Independent?* Front Physiol, 2018. **9**: p. 373.
28. Hight, A.R., et al., *Hypoxia induced HIF-1/HIF-2 activity alters trophoblast transcriptional regulation and promotes invasion*. Eur J Cell Biol, 2015. **94**(12): p. 589-602.
29. Caniggia, I., et al., *Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia*. Placenta, 2000. **21 Suppl A**: p. S25-30.
30. Nejabati, H.R., et al., *Placental growth factor (PlGF) as an angiogenic/inflammatory switcher: lesson from early pregnancy losses*. Gynecol Endocrinol, 2017. **33**(9): p. 668-674.
31. Haram, K., J.H. Mortensen, and B. Nagy, *Genetic Aspects of Preeclampsia and the HELLP Syndrome*. J Pregnancy, 2014. **2014**.
32. Karumanchi, S.A. and Y. Bdolah, *Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the "chicken-and-egg" question*. Endocrinology, 2004. **145**(11): p. 4835-7.
33. Maynard, S.E., 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. **111**(5): p. 649-58.
34. Foidart, J.M., et al., *Dysregulation of anti-angiogenic agents (sFlt-1, PLGF, and sEndoglin) in preeclampsia--a step forward but not the definitive answer*. J Reprod Immunol, 2009. **82**(2): p. 106-11.
35. Maynard, S.E., *Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia*. 2003. **111**(5): p. 649-58.

36. Grunewald, C., R. Hjertberg, and K. Kublickiene, [*Pre-eclampsia. A multi-organ disease which occurs in many pregnancies*]. *Lakartidningen*, 2006. **103**(32-33): p. 2296-300.
37. Spradley, F.T., A.C. Palei, and J.P. Granger, *Increased risk for the development of preeclampsia in obese pregnancies: weighing in on the mechanisms*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2015. **309**(11): p. R1326-43.
38. Durst, J.K., et al., *Degree of obesity at delivery and risk of preeclampsia with severe features*. *Am J Obstet Gynecol*, 2016. **214**(5): p. 651.e1-5.
39. Marchetti, T., P. de Moerloose, and J.C. Gris, *Antiphospholipid antibodies and the risk of severe and non-severe pre-eclampsia: the NOHA case-control study*. *J Thromb Haemost*, 2016. **14**(4): p. 675-84.
40. Zhu, L., et al., *HMGB1-RAGE signaling pathway in severe preeclampsia*. *Placenta*, 2015. **36**(10): p. 1148-52.
41. Jiang, R., et al., *Hypoxic trophoblast HMGB1 induces endothelial cell hyperpermeability via the TRL-4/caveolin-1 pathway*. *J Immunol*, 2014. **193**(10): p. 5000-12.
42. Chen, Q., et al., *Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) in the cytoplasm of placental syncytiotrophoblast from preeclamptic placentae*. *Cytokine*, 2016. **85**: p. 30-6.
43. Giacobbe, A., et al., *Association between maternal serum high mobility group box 1 levels and pregnancy complicated by gestational diabetes mellitus*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2016. **26**(5): p. 414-8.
44. Spradley, F.T., *Metabolic abnormalities and obesity's impact on the risk for developing preeclampsia*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2017. **312**(1): p. R5-r12.
45. Dielis, A.W., et al., *Changes in fibrinolytic activity after angiotensin II receptor blockade in therapy-resistant hypertensive patients*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(7): p. 1509-15.
46. Nakagawa, P. and C.D. Sigmund, *How Is the Brain Renin-Angiotensin System Regulated?* *Hypertension*, 2017. **70**(1): p. 10-18.
47. Agassandian, K., et al., *Evidence for intraventricular secretion of angiotensinogen and angiotensin by the subfornical organ using transgenic mice*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2017. **312**(6): p. R973-r981.
48. Ueki, N., et al., *The relevance of the Renin-Angiotensin system in the development of drugs to combat preeclampsia*. *Int J Endocrinol*, 2015. **2015**: p. 572713.
49. Genest, D.S., et al., *Novel role of the renin-angiotensin system in preeclampsia superimposed on chronic hypertension and the effects of exercise in a mouse model*. *Hypertension*, 2013. **62**(6): p. 1055-61.
50. Gironacci, M.M., et al., *Neuromodulatory role of angiotensin-(1-7) in the central nervous system*. *Clin Sci (Lond)*, 2013. **125**(2): p. 57-65.
51. Weir, R.J., et al., *A serial study in pregnancy of the plasma concentrations of renin, corticosteroids, electrolytes and proteins and of haematocrit and plasma volume*. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*, 1971. **78**(7): p. 590-602.
52. Brown, J.J., et al., *Plasma renin concentration in human hypertension . II. Renin in relation to aetiology*. *Br Med J*, 1965. **2**(5472): p. 1215-9.

53. Coutinho, D.C., et al., *Cardiovascular effects of angiotensin A: a novel peptide of the renin-angiotensin system*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2014. **15**(4): p. 480-6.
54. Irani, R.A. and Y. Xia, *The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia*. Placenta, 2008. **29**(9): p. 763-71.
55. Frigolet, M.E., N. Torres, and A.R. Tovar, *The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(12): p. 2003-15.
56. Zhou, C.C., et al., *Angiotensin receptor agonistic autoantibody-mediated tumor necrosis factor-alpha induction contributes to increased soluble endoglin production in preeclampsia*. Circulation, 2010. **121**(3): p. 436-44.
57. Daikha-Dahmane, F., et al., *Foetal kidney maldevelopment in maternal use of angiotensin II type I receptor antagonists*. Pediatr Nephrol, 2006. **21**(5): p. 729-32.
58. Zhou, C.C., et al., *Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble Fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated T-cells signaling*. Hypertension, 2008. **51**(4): p. 1010-9.
59. Bobst, S.M., et al., *Maternal autoantibodies from preeclamptic patients activate angiotensin receptors on human mesangial cells and induce interleukin-6 and plasminogen activator inhibitor-1 secretion*. Am J Hypertens, 2005. **18**(3): p. 330-6.
60. Xu, Y., et al., *Induction of urokinase receptor expression in nephrotoxic nephritis*. Exp Nephrol, 2001. **9**(6): p. 397-404.
61. Dechend, R., et al., *AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase*. Circulation, 2003. **107**(12): p. 1632-9.
62. Thway, T.M., et al., *Antibodies from preeclamptic patients stimulate increased intracellular Ca²⁺ mobilization through angiotensin receptor activation*. Circulation, 2004. **110**(12): p. 1612-9.
63. Dechend, R., et al., *AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2382-7.
64. Li, X., et al., *Cellular localization of AT1 receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction*. Angiotensin II stimulates the release of vasorelaxants. J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 442-54.
65. Shaw, K.J., et al., *Human decidua is a major source of renin*. J Clin Invest, 1989. **83**(6): p. 2085-92.
66. Massiera, F., et al., *Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity*. Endocrinology, 2001. **142**(12): p. 5220-5225.
67. Engeli, S., et al., *Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system*. Hypertension, 2005. **45**(3): p. 356-62.
68. Bays, H.E., et al., *Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2008. **6**(3): p. 343-68.
69. Umemura, S., et al., *Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients*. Am J Hypertens, 1997. **10**(6): p. 629-33.

70. Sharma, A.M., et al., *Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells*. Hypertension, 2002. **40**(5): p. 609-11.
71. Crandall, D.L., et al., *Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation*. Endocrinology, 1999. **140**(1): p. 154-8.
72. Darimont, C., et al., *Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II*. Endocrinology, 1994. **135**(5): p. 2030-2036.
73. Matsushita, K., et al., *Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes*. Hypertension, 2006. **48**(6): p. 1095-102.
74. Massiera, F., et al., *Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation*. Faseb j, 2001. **15**(14): p. 2727-9.
75. Carroll, W.X., et al., *Angiotensinogen gene silencing reduces markers of lipid accumulation and inflammation in cultured adipocytes*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 10.
76. Kouyama, R., et al., *Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor*. Endocrinology, 2005. **146**(8): p. 3481-3489.
77. Yvan-Charvet, L., et al., *Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 991-999.
78. Patel, V.B., R. Basu, and G.Y. Oudit, *ACE2/Ang 1-7 axis: A critical regulator of epicardial adipose tissue inflammation and cardiac dysfunction in obesity*. Adipocyte, 2016. **5**(3): p. 306-11.
79. Jackson, T.R., et al., *The mas oncogene encodes an angiotensin receptor*. Nature, 1988. **335**(6189): p. 437-40.
80. Santos, R.A. and A.J. Ferreira, *Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2007. **16**(2): p. 122-8.
81. Sampaio, W.O., et al., *Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells*. Hypertension, 2007. **50**(6): p. 1093-8.
82. Prokop, J.W., R.A. Santos, and A. Milsted, *Differential mechanisms of activation of the Ang peptide receptors AT1, AT2, and MAS: using in silico techniques to differentiate the three receptors*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65307.
83. De Souza, A.M., et al., *Angiotensin II and angiotensin-(1-7) inhibit the inner cortex Na⁺-ATPase activity through AT2 receptor*. Regul Pept, 2004. **120**(1-3): p. 167-75.
84. Walters, P.E., T.A. Gaspari, and R.E. Widdop, *Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats*. Hypertension, 2005. **45**(5): p. 960-6.
85. Gembardt, F., et al., *Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family*. Mol Cell Biochem, 2008. **319**(1-2): p. 115-23.
86. Verano-Braga, T., et al., *Time-resolved quantitative phosphoproteomics: new insights into Angiotensin-(1-7) signaling networks in human endothelial cells*. J Proteome Res, 2012. **11**(6): p. 3370-81.
87. Bader, M., et al., *MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(4): p. 1080-105.

88. Kostenis, E., et al., *G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor*. *Circulation*, 2005. **111**(14): p. 1806-13.
89. Jackson, T.R., et al., *The mas oncogene encodes an angiotensin receptor*. *Nature*, 1988. **335**: p. 437.
90. Wolf, G. and E.G. Neilson, *Angiotensin II as a renal growth factor*. *J Am Soc Nephrol*, 1993. **3**(9): p. 1531-40.
91. Santos, R.A., et al., *Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice*. *Hypertension*, 2006. **47**(5): p. 996-1002.
92. Santos, R.A., et al., *Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(14): p. 8258-63.
93. Sampaio, W.O., et al., *Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways*. *Hypertension*, 2007. **49**(1): p. 185-92.
94. Tallant, E.A., C.M. Ferrario, and P.E. Gallagher, *Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(4): p. H1560-6.
95. Iwata, M., et al., *Targeting the ACE2-Ang-(1-7) pathway in cardiac fibroblasts to treat cardiac remodeling and heart failure*. *J Mol Cell Cardiol*, 2011. **51**(4): p. 542-7.
96. Benter, I.F., et al., *Angiotensin-(1-7) prevents diabetes-induced cardiovascular dysfunction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(1): p. H666-72.
97. Giani, J.F., et al., *Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **296**(2): p. E262-71.
98. Hiroyama, M., et al., *Vasopressin promotes cardiomyocyte hypertrophy via the vasopressin V1A receptor in neonatal mice*. *Eur J Pharmacol*, 2007. **559**(2-3): p. 89-97.
99. Santos, R.A., *Angiotensin-(1-7)*. *Hypertension*, 2014. **63**(6): p. 1138-1147.
100. Chen, Z., et al., *Endothelin-1 downregulates Mas receptor expression in human cardiomyocytes*. *Mol Med Rep*, 2013. **8**(3): p. 871-6.
101. Rajapurohitam, V., et al., *Role of NF-kappaB and p38 MAPK activation in mediating angiotensin II and endothelin-1-induced stimulation in leptin production and cardiomyocyte hypertrophy*. *Mol Cell Biochem*, 2012. **366**(1-2): p. 287-97.
102. Santos, S.H., et al., *Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism*. *Diabetes*, 2008. **57**(2): p. 340-7.
103. Santos, S.H., et al., *Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7)*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(5): p. 953-61.
104. Liu, C., et al., *Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes*. *Acta Diabetol*, 2012. **49**(4): p. 291-9.
105. Leal, M.C., et al., *The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats*. *J Anat*, 2009. **214**(5): p. 736-43.
106. Reis, A.B., et al., *Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility*. *J Mol Histol*, 2010. **41**(1): p. 75-80.

107. Kilarkaje, N., et al., *Role of angiotensin II and angiotensin-(1-7) in diabetes-induced oxidative DNA damage in the corpus cavernosum*. Fertil Steril, 2013. **100**(1): p. 226-33.
108. Anton, L., et al., *Activation of local chorionic villi angiotensin II levels but not angiotensin (1-7) in preeclampsia*. Hypertension, 2008. **51**(4): p. 1066-72.
109. Kalupahana, N.S. and N. Moustaid-Moussa, *The adipose tissue renin-angiotensin system and metabolic disorders: a review of molecular mechanisms*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2012. **47**(4): p. 379-90.
110. Lara-Castro, C., et al., *Adiponectin Multimers and Metabolic Syndrome Traits: Relative Adiponectin Resistance in African Americans*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(12): p. 2616-23.
111. Engin, A., *The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation*. Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 221-245.
112. Yamauchi, T., et al., *Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects*. Nature, 2003. **423**(6941): p. 762-9.
113. Tie, W., et al., *Expressions of adiponectin receptors in placenta and their correlation with preeclampsia*. Reprod Sci, 2009. **16**(7): p. 676-84.
114. Liu, Y., et al., *Adiponectin corrects high-fat diet-induced disturbances in muscle metabolomic profile and whole-body glucose homeostasis*. Diabetes, 2013. **62**(3): p. 743-52.
115. Shibata, R., et al., *Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28670-4.
116. Shibata, R., et al., *Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart*. Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1384-9.
117. Hattori, Y., et al., *High molecular weight adiponectin activates AMPK and suppresses cytokine-induced NF-kappaB activation in vascular endothelial cells*. FEBS Lett, 2008. **582**(12): p. 1719-24.
118. Fruhbeck, G., *Intracellular signalling pathways activated by leptin*. Biochem J, 2006. **393**(Pt 1): p. 7-20.
119. Denroche, H.C., F.K. Huynh, and T.J. Kieffer, *The role of leptin in glucose homeostasis*. J Diabetes Investig, 2012. **3**(2): p. 115-29.
120. Harvey, J., et al., *Essential role of phosphoinositide 3-kinase in leptin-induced K(ATP) channel activation in the rat CRI-G1 insulinoma cell line*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4660-9.
121. Gruen, M.L., et al., *Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(5): p. C1481-8.
122. Porreca, E., et al., *Circulating leptin is associated with oxidized LDL in postmenopausal women*. Atherosclerosis, 2004. **175**(1): p. 139-43.
123. Zeidan, A., et al., *Leptin induces vascular smooth muscle cell hypertrophy through angiotensin II- and endothelin-1-dependent mechanisms and mediates stretch-induced hypertrophy*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(3): p. 1075-84.

124. Schram, K., et al., *Regulation of MT1-MMP and MMP-2 by leptin in cardiac fibroblasts involves Rho/ROCK-dependent actin cytoskeletal reorganization and leads to enhanced cell migration*. *Endocrinology*, 2011. **152**(5): p. 2037-47.
125. Hoggard, N., et al., *Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(20): p. 11073-8.
126. Masuzaki, H., et al., *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. *Nat Med*, 1997. **3**(9): p. 1029-33.
127. Mise, H., et al., *Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(9): p. 3225-9.
128. Bouret, S.G., *Nutritional programming of hypothalamic development: critical periods and windows of opportunity*. *Int J Obes Suppl*, 2012. **2**(Suppl 2): p. S19-24.
129. Guzik, T.J., et al., *The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue*. *Cardiovasc Res*, 2017. **113**(9): p. 1009-1023.
130. Kato, E., T. Yamamoto, and F. Chishima, *Effects of Cytokines and TLR Ligands on the Production of PlGF and sVEGFR1 in Primary Trophoblasts*. *Gynecol Obstet Invest*, 2017. **82**(1): p. 39-46.
131. Knöfler, M., et al., *TNF- α /TNFRI in Primary and Immortalized First Trimester Cytotrophoblasts*. *Placenta*, 2000. **21**(5): p. 525-535.
132. Kirwan, J.P., et al., *TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy*. *Diabetes*, 2002. **51**(7): p. 2207-13.
133. Badman, M.K., et al., *Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States*. *Cell Metabolism*, 2007. **5**(6): p. 426-437.
134. Adams, A.C., et al., *FGF21 requires betaklotho to act in vivo*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e49977.
135. Murata, Y., M. Konishi, and N. Itoh, *FGF21 as an Endocrine Regulator in Lipid Metabolism: From Molecular Evolution to Physiology and Pathophysiology*. *J Nutr Metab*, 2011. **2011**: p. 981315.
136. Fisher, F.M., et al., *FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis*. *Genes Dev*, 2012. **26**(3): p. 271-81.
137. Pan, X., et al., *FGF21 Prevents Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Dysfunction by Activation of ACE2/Angiotensin-(1-7) Axis in Mice*. *Cell Metab*, 2018. **27**(6): p. 1323-1337.e5.
138. Ombrellino, M., et al., *Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan*. *Shock*, 2001. **15**(3): p. 181-5.
139. Heiss, A., et al., *Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition*. *Biophys J*, 2010. **99**(12): p. 3986-95.
140. Sanhal, C.Y., et al., *Comparison of plasma fetuin A levels in patients with early-onset pre-eclampsia vs late-onset pre-eclampsia*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2016. **200**: p. 108-12.
141. Vatten, L.J. and R. Skjaerven, *Is pre-eclampsia more than one disease?* *Bjog*, 2004. **111**(4): p. 298-302.

142. Singh, M., et al., *Role of fetuin-A in atherosclerosis associated with diabetic patients.* J Pharm Pharmacol, 2012. **64**(12): p. 1703-8.
143. Song, A., et al., *Serum fetuin-A associates with type 2 diabetes and insulin resistance in Chinese adults.* PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19228.
144. Laughlin, G.A., et al., *The association of fetuin-A with cardiovascular disease mortality in older community-dwelling adults: the Rancho Bernardo study.* J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(19): p. 1688-96.
145. Kusnierz-Cabala, B., et al., *Serum fetuin A concentrations in patients with acute pancreatitis.* Clin Lab, 2010. **56**(5-6): p. 191-5.
146. Ketteler, M., et al., *Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study.* Lancet, 2003. **361**(9360): p. 827-33.
147. Saroha, A., et al., *Jacalin bound plasma O-glycoproteome and reduced sialylation of alpha 2-HS glycoprotein (A2HSG) in rheumatoid arthritis patients.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46374.
148. Li, W., et al., *A hepatic protein, fetuin-A, occupies a protective role in lethal systemic inflammation.* PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16945.
149. Sibai, B., G. Dekker, and M. Kupferminc, *Pre-eclampsia.* Lancet, 2005. **365**(9461): p. 785-99.
150. Podymow, T. and P. August, *New Evidence in the Management of Chronic Hypertension in Pregnancy.* Semin Nephrol, 2017. **37**(4): p. 398-403.
151. Montan, S., *Drugs used in hypertensive diseases in pregnancy.* Curr Opin Obstet Gynecol, 2004. **16**(2): p. 111-5.
152. Beaufils, M., et al., *Prevention of pre-eclampsia by early antiplatelet therapy.* Lancet, 1985. **1**(8433): p. 840-2.
153. Schiff, E., et al., *The use of aspirin to prevent pregnancy-induced hypertension and lower the ratio of thromboxane A2 to prostacyclin in relatively high risk pregnancies.* N Engl J Med, 1989. **321**(6): p. 351-6.
154. Caritis, S., et al., *Low-dose aspirin to prevent preeclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units.* N Engl J Med, 1998. **338**(11): p. 701-5.
155. Sakai, R.R., et al., *Intracerebroventricular administration of AT1 receptor antisense oligonucleotides inhibits the behavioral actions of angiotensin II.* J. Neurochem, 1994. **62**(5): p. 2053-2056.
156. Dumont, O., L. Loufrani, and D. Henrion, *Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 317-24.
157. Santoni, A., C. Carlino, and A. Gismondi, *Uterine NK cell development, migration and function.* Reprod Biomed Online, 2008. **16**(2): p. 202-10.
158. Ong, S.S., et al., *Remodeling of myometrial radial arteries in preeclampsia.* Am J Obstet Gynecol, 2005. **192**(2): p. 572-9.
159. Carranza-Lira, S., et al., *Brachial and uterine arteries Doppler in healthy women and with preeclampsia.* Rev Med Inst Mex Seguro Soc, 2018. **56**(4): p. 360-363.
160. Audette, M.C. and J.C. Kingdom, *Screening for fetal growth restriction and placental insufficiency.* Semin Fetal Neonatal Med, 2018. **23**(2): p. 119-125.

161. Whelton, S.P., et al., *Effect of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials*. Ann Intern Med, 2002. **136**(7): p. 493-503.
162. Fletcher, G.F., et al., *Statement on exercise: benefits and recommendations for physical activity programs for all Americans. A statement for health professionals by the Committee on Exercise and Cardiac Rehabilitation of the Council on Clinical Cardiology, American Heart Association*. Circulation, 1996. **94**(4): p. 857-62.
163. Aune, D., et al., *Physical activity and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review and dose-response meta-analysis of epidemiological studies*. Eur J Epidemiol, 2016. **31**(10): p. 967-997.
164. Warburton, D.E., C.W. Nicol, and S.S. Bredin, *Health benefits of physical activity: the evidence*. Cmaj, 2006. **174**(6): p. 801-9.
165. Falcao, S., et al., *Exercise training can attenuate preeclampsia-like features in an animal model*. J Hypertens, 2010. **28**(12): p. 2446-53.
166. Kojda, G. and R. Hambrecht, *Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy?* Cardiovasc Res, 2005. **67**(2): p. 187-97.
167. Daemen, S., N. van Polanen, and M.K.C. Hesselink, *The effect of diet and exercise on lipid droplet dynamics in human muscle tissue*. J Exp Biol, 2018. **221**(Pt Suppl 1).
168. Slamkova, M., S. Zorad, and K. Krskova, *Alternative renin-angiotensin system pathways in adipose tissue and their role in the pathogenesis of obesity*. Endocr Regul, 2016. **50**(4): p. 229-240.
169. Kanta, J., *Elastin in the Liver*. Front Physiol, 2016. **7**: p. 491.
170. Humalda, J.K., et al., *Response of fibroblast growth factor 23 to volume interventions in arterial hypertension and diabetic nephropathy*. Medicine (Baltimore), 2016. **95**(46): p. e5003.
171. Hayward, C.E., et al., *Placental Adaptation: What Can We Learn from Birthweight:Placental Weight Ratio?* Front Physiol, 2016. **7**: p. 28.
172. Taylor, S.C. and A. Posch, *The design of a quantitative western blot experiment*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 361590.
173. Tan, P., E. Pepin, and J.L. Lavoie, *Mouse Adipose Tissue Collection and Processing for RNA Analysis*. J Vis Exp, 2018(131).
174. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
175. Takahashi, M., Y. Kamei, and O. Ezaki, *Mest/Peg1 imprinted gene enlarges adipocytes and is a marker of adipocyte size*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(1): p. E117-24.
176. Oh, Y.B., et al., *Captopril intake decreases body weight gain via angiotensin-(1-7)*. Peptides, 2012. **37**(1): p. 79-85.
177. Sarzani, R., et al., *Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(2): p. 259-67.
178. Goossens, G.H., et al., *Angiotensin II: a hormone that affects lipid metabolism in adipose tissue*. Int J Obes (Lond), 2007. **31**(2): p. 382-4.
179. Janke, J., et al., *Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors*. Diabetes, 2002. **51**(6): p. 1699-707.
180. Anton, L., et al., *The uterine placental bed Renin-Angiotensin system in normal and preeclamptic pregnancy*. Endocrinology, 2009. **150**(9): p. 4316-25.

181. Falcao, S., et al., *Mice overexpressing both human angiotensinogen and human renin as a model of superimposed preeclampsia on chronic hypertension*. *Hypertension*, 2009. **54**(6): p. 1401-7.
182. Nakashima, H., et al., *Angiotensin II regulates vascular and endothelial dysfunction: recent topics of Angiotensin II type-1 receptor signaling in the vasculature*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2006. **4**(1): p. 67-78.
183. Gupte, M., et al., *Angiotensin converting enzyme 2 contributes to sex differences in the development of obesity hypertension in C57BL/6 mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(6): p. 1392-9.
184. Spanakis, E.K., et al., *The Effect of Continuous Glucose Monitoring in Preventing Inpatient Hypoglycemia in General Wards: The Glucose Telemetry System*. *J Diabetes Sci Technol*, 2018. **12**(1): p. 20-25.
185. Borges, V.T.M., et al., *Maternal left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide concentration in early- and late-onset pre-eclampsia*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018. **51**(4): p. 519-523.

