

Université de Montréal

Étude d'un inhibiteur de la protéine anti-angiogénique thrombospondine-1 comme traitement
de la prééclampsie chez la souris

Par

Casandra Marc

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de la maîtrise
en Sciences Biomédicales, option sciences cardiovasculaires

Septembre 2023

© Casandra Marc, 2024

Université de Montréal

Département de Sciences Biomédicales, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Étude d'un inhibiteur de la protéine anti-angiogénique thrombospondine-1 comme traitement de la prééclampsie chez la souris

Présenté par

Casandra Marc

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Denis de Blois

Président-rapporteur

Mariane Bertagnolli

Directeur de recherche

Stella Daskalopoulou

Membre du jury

Résumé

Introduction : La prééclampsie (PE) est un trouble hypertensif caractérisé par une tension artérielle au-dessus de 140/90 mmHg et touche 2 à 8% des grossesses globalement. À ce jour, la plupart des médicaments ne peuvent traiter ou prévenir la PE. La thrombospondine-1 (THBS1) est un facteur anti-angiogénique et un activateur principal du TGF- β , ce qui pourrait également être impliqué dans l'altération de l'angiogenèse dans les placentas prééclamptiques.

Objectif : Notre objectif est de décrire l'expression de la THBS1 et de tester l'effet d'un inhibiteur, le peptide LSKL, sur la vascularisation placentaire dans les placentas d'un modèle murin de PE (*in vivo*) et sur la capacité angiogénique des cellules endothéliales placentaires humaines (*in vitro*).

Méthodes : L'expression de THBS1 a été mesurée dans les placentas de souris par western blot et dans les placentas humains par immunohistochimie (IHC). Des cellules endothéliales placentaires (pECs) extraites de placentas humains et des souris enceintes hétérozygotes femelles surexprimant la rénine et l'angiotensinogène humaines (hR+A+) sont traitées avec LSKL, ou son peptide témoin SLLK (cellules : 30 μ mol/L pendant 24h ; animal 129 μ mol/mL s.c. au jour de gestation 14,5). Des pEC ont été soumises à des conditions contrôle (8% d'oxygène) ou hypoxie (0,5% d'oxygène) ou thrombine (10 unités/mL) pendant 24 h. L'angiogenèse cellulaire a été évaluée sur matrigel, les protéines évaluées par western blot et la localisation de la THBS1 ainsi que la vascularisation placentaire par IHC.

Résultats : Le traitement avec LSKL augmente le nombre de tubes formées dans les pECs exposées à la thrombine ou à l'hypoxie. L'inhibiteur de la voie canonique du TGF- β , ALK5/Smad2/3 (SB-505124, SB), n'a pas modifié la capacité de formation de tubes, contrairement à l'inhibiteur de la voie non canonique, TAK1/p38 ((5Z)-7-oxozeaenol, (OXO) qui a réduit la capacité angiogénique ($p < 0,05$). Chez le modèle de souris de PE, LSKL a significativement amélioré la vascularisation placentaire, évaluée par le contenu des cellules endothéliales CD31+ marquées par IHC ($p < 0,05$), qui s'est accompagnée d'une phosphorylation réduite de TAK1 et ERK dans ce tissu.

Conclusion : Nos résultats indiquent une augmentation de l'expression de la THBS1 dans les vaisseaux et cellules endothéliales placentaires des grossesses atteintes de PE, ainsi qu'un effet pro-angiogénique placentaire du LSKL par inhibition de la voie non-canonique du TGF- β . Ces résultats contribueront à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques capables d'améliorer la vascularisation placentaire dans PE.

Mots-clés : Prééclampsie, Hypertension, Angiogenèse, Vascularisation placentaire, Thrombospondine-1, TGF- β , Modèle animal, Cellules endothéliales placentaires

Abstract

Introduction: Pre-eclampsia (PE) is a hypertensive disorder characterized by blood pressure above 140/90 mmHg and affects 2% to 8% of pregnancies globally. To date, most drugs cannot treat or prevent PE. Thrombospondin-1 (THBS1) is an anti-angiogenic factor and a major activator of TGF- β , which may also be involved in impaired angiogenesis in pre-eclamptic placentas.

Objective: Our aim is to describe the expression of THBS1 and to test the effect of its inhibitor, LSKL peptide, on placental vascularization in placentas from a mouse model of PE (in vivo) and on the angiogenic capacity of human placental endothelial cells (in vitro).

Methods: THBS1 expression was measured in placentas of mouse by western blot and in human placentas by immunohistochemistry (IHC). Placental endothelial cells (pECs) extracted from human placentas and pregnant female heterozygous mice overexpressing human renin and angiotensinogen (hR+A+) were treated with LSKL or its control peptide SLLK (cells: 30 μ mol/L for 24h; animals: 129 μ mol/mL subcutaneously on gestation day 14.5). pECs were subjected to control conditions (8% oxygen) or hypoxia (0.5% oxygen) or thrombin (10 units/mL) for 24 hours. Cellular angiogenesis was assessed on Matrigel, proteins were evaluated by western blot, and the localization of THBS1 as well as placental vascularization were examined by immunohistochemistry (IHC).

Results: Treatment with LSKL increased the number of tubes formed in pECs exposed to thrombin or hypoxia. The inhibitor of the canonical TGF- β pathway, ALK5/Smad2/3 (SB-505124, SB), did not alter tube formation capacity, unlike the inhibitor of the non-canonical pathway, TAK1/p38 ((5Z)-7-oxozeaenol, (OXO)), which reduced angiogenic capacity. In the mouse model of PE, LSKL significantly improved placental vascularization, assessed by CD31+ endothelial cell content marked by IHC, which was accompanied by reduced phosphorylation of TAK1 and ERK in this tissue.

Conclusion: Our results indicate an increase in THBS1 expression in the vessels and placental endothelial cells of pregnancies affected by PE, as well as a pro-angiogenic effect of LSKL through the inhibition of the non-canonical TGF- β pathway. These findings contribute to identifying new therapeutic targets capable of improving placental vascularization in PE.

Keywords: Preeclampsia, Hypertension, Angiogenesis, Placental vasculature, Thrombospondin-1, TGF- β , Animal model, Placental endothelial cells

Table des matières

RÉSUMÉ	3
ABSTRACT	4
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	11
REMERCIEMENTS	16
CHAPITRE 1 – LA GROSSESSE	17
1.1 ACTUALITÉS SUR LA GROSSESSE	17
1.2 PHYSIOLOGIE DE LA GROSSESSE	17
1.2.1 <i>Changements physiologiques chez la femme enceinte</i>	18
1.2.2 <i>Types de grossesses</i>	20
1.2.2.1 Grossesses simples versus multiples	20
1.2.2.2 Grossesses assistées	21
1.2.2 <i>Placenta</i>	22
1.2.2.1 Rôle et fonctions	22
1.2.2.2 Implantation	23
1.2.2.3 Formation des villosités	25
1.2.2.4 Placentation	26
1.2.2.5 Angiogenèse placentaire	27
1.2.2.5.1 Vascular Endothelial Growth Factor	28
1.2.2.5.2 Angiopoïétines	29
1.3 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA GROSSESSE	30
1.3.1 <i>Complications de grossesse</i>	30
1.3.1.1 Placenta prævia	31
1.3.1.2 Diabète gestationnel	32
1.3.1.3 Les troubles d’hypertension pendant la grossesse	33
CHAPITRE 2 – LA PRÉÉCLAMPSIE	34
2.1 ÉPIDÉMIOLOGIE	35
2.3 FACTEURS DE RISQUE	42
2.3.1 <i>Âge</i>	42

2.3.2 <i>Ethnicité</i>	42
2.3.3 <i>Obésité</i>	43
2.3.4 <i>Conditions pré-existantes</i>	45
2.4 TRAITEMENT.....	46
2.5 MODÈLES ANIMAUX.....	48
2.5.1 <i>Modèles murins</i>	48
2.5.2 <i>Autres modèles</i>	53
CHAPITRE 3 – LA THROMBOSPONDINE-1	54
3.1 ORIGINE ET FONCTIONS.....	54
3.2 STRUCTURE	54
3.3 MÉCANISMES DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES.....	55
3.4 RÔLE DE LA THBS1 DANS DIFFÉRENTES MALADIES	59
CHAPITRE 4 – TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA	61
4.1 ORIGINE ET FONCTIONS.....	61
4.2 ISOFORMES ET STRUCTURES.....	62
4.3 MÉCANISMES D’ACTION.....	63
4.3 INTERACTION AVEC LA THBS1	66
CHAPITRE 5 – PROJET DE RECHERCHE	67
5.1 JUSTIFICATION	67
5.2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	68
CHAPITRE 6 – MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	69
6.1 MODÈLE ANIMAL.....	69
6.2 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LE WESTERN BLOT	69
6.3 WESTERN BLOT	70
6.4 IMMUNOHISTOCHEMIE.....	71
6.5 EXTRACTION CELLULAIRE À PARTIR DES TISSUS PLACENTAIRES.....	72
6.5.1 <i>Extraction de cellules de placentas de souris</i>	72
6.5.2 <i>Extraction de cellules de placentas humains</i>	73
6.6 TRAITEMENT CELLULAIRE.....	74
6.7 HYPOXIE CELLULAIRE	74
6.8 CAPACITÉ DE FORMATION DE TUBES VASCULAIRES	75
6.9 IMMUNOFLUORESCENCE CELLULAIRE	75
6.10 ANALYSES STATISTIQUES	76

CHAPITRE 7 – RÉSULTATS	76
7.1 EXPRESSION ET LOCALISATION DE LA THBS1 DANS LE TISSU PLACENTAIRE	76
7.2 EFFET ANTI-ANGIOGÉNIQUE DE LA THBS1 DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES PLACENTAIRES	80
7.3 EXPRESSION PROTÉIQUE DE LA THBS1 ET SES RÉCEPTEURS CHEZ LA SOURIS	83
7.4 RÉSULTATS DU TRAITEMENT MATERNEL PAR LSKL	84
7.4.1 <i>Données sur la reproduction des souris</i>	84
7.4.2 <i>Vascularisation placentaire</i>	86
7.4.3 <i>Expression du TGF-β dans le placenta</i>	87
7.4.4 <i>Expression des voies de signalisation canonique du TGF-β</i>	88
7.4.5 <i>Expression des marqueurs de la voie non-canonique du TGF-β</i>	89
7.5 ÉVALUATION DE L'EFFET DE L'INHIBITEUR DE THBS1, LSKL, SUR LES VOIES DE SIGNALISATION DU TGF-B DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES PLACENTAIRES HUMAINES	91
CHAPITRE 8 – DISCUSSION ET CONCLUSION	93
CHAPITRE 9 – LIMITES DE L'ÉTUDE	104
CHAPITRE 10 – PERSPECTIVES DE RECHERCHE	105
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	106

Liste des figures

Figure 1. – Étapes de l'implantation du blastocyste. Image modifiée et copiée de l'article de revue James et al. (2022) ²⁶	24
Figure 2. – Formation des villosités choriales. Image modifiée et copiée du livre <i>Gray's Anatomy</i> (2021) page 181, version E-book. ²²	26
Figure 3. – Représentation de la vascularisation utérine dans différentes conditions ³⁵ Image modifiée et copiée du livre <i>Pathology of the Human Placenta</i> (2012), page 194. À Gauche : Vascularisation utérine chez une femme non enceinte dans un contexte hors grossesse vs après l'accouchement ; À droite : Vascularisation utérine chez une femme enceinte durant une grossesse normale vs durant une PE sévère.	38
Figure 4. – Représentation du modèle RUPP ¹¹⁵ . Image modifiée et copiée de l'article de revue de Sakowicz et al. (2022) ; A. Utérus de la rate sans modification; B. Modèle conventionnel : clips placés autour de l'artère utérine et sur les arcades bilatérales des artères ovariennes ; C. Nouveau modèle : clips placés sur les branches des artères et veines utérines de l'arcade vasculaire des vaisseaux ovariens ou utérins ; D. Modèle sélectif : clips placés sur les artères utérins et ovariens.....	51
Figure 5. – Schéma des mécanismes d'action anti-angiogénique de la THBS1. Les flèches rouges représentent les effets anti-angiogéniques et les flèches noires représentent les effets pro-angiogéniques	58
Figure 6. – Immunohistochimie de la THBS1 dans le placenta chez la souris. A. Image de la membrane, ou caduque basale, d'un placenta d'un modèle de souris contrôle ; B. Image de la membrane d'un placenta d'un modèle de souris de PE ; C. Image du labyrinthe, ou villosités, d'un placenta d'un modèle de souris contrôle ; D. Image du labyrinthe d'un placenta d'un modèle de souris de PE.....	77
Figure 7. – Immunohistochimie de la THBS1 dans le placenta chez l'humaine. A. Image d'un placenta contrôle à une grosseur de 20X, B. Image d'un placenta prééclampgique à une grosseur de 20X.....	78

Figure 8. – Immunofluorescence de l’expression de la THBS1 dans les cellules endothéliales placentaires d’un modèle de souris de PE. La THBS1 est exprimée en vert, l’actine en rouge et le DAPI en bleu.....	79
Figure 9. – Immunofluorescence de l’expression de la THBS1 dans les cellules endothéliales placentaires humaines. Les cellules sont exposées à une normoxie (8% d’O ₂), à une hypoxie sévère (0,5% d’O ₂) et à la thrombine (10 units/mL) pendant 4 heures. La THBS1 est exprimée en vert, l’actine en rouge et le DAPI en bleu.	80
Figure 10. – Capacité d'angiogenèse des cellules endothéliales placentaires de souris contrôle et souris pré-éclampsique (PE) traitée avec le peptide contrôle SLLK (peptide contrôle) ou le peptide actif LSKL (30 µM, 6 heures).	81
Figure 11. – Capacité anti-angiogénique de la THBS1 dans les cellules endothéliales placentaires humaines. A) Les cellules endothéliales placentaires ont été incubées avec différentes concentrations de THBS1 exogène (0,1 à 10 nM) pendant 4 heures. B) Les cellules endothéliales placentaires ont été prétraitées avec 10 nM de THBS1 pendant 2 heures, puis utilisées dans le test Matrigel sous différentes concentrations de LSKL (0 à 280 µM) pendant 4 heures.....	82
Figure 12. – Capacité angiogénique des cellules endothéliales placentaires humaines exposées à des conditions de stress similaires à l'environnement intra-utérin de la PE. Les cellules ont été exposées à l'hypoxie (0,5 % d'O ₂) ou à la thrombine (10 unités/mL) ou aux deux combinées et comparées aux cellules témoins (8 % d'O ₂), traitées avec du LSKL ou du peptide témoin SLLK (30 uM) pendant 4 heures. A, nombre de tubes formés sur matrigel par 15x10 ⁴ cellules et B, illustration représentative des tubes formés sur matrigel dans chaque condition de culture et traitement. ^a P<0.01 et ^b P<0.05 versus contrôle SLLK; ^c P<0.01, ^d P<0.05 et ^e P<0.001 versus le même groupe traité par SLLK.	83
Figure 13. – Expression protéique de la THBS1 et des récepteurs CD47, LRP1 et CD36 dans A) les placentas (n=8/groupe) et B) les cœurs fœtaux (n=4/groupe) de souris avec PE témoin ou spontanée. Test t indépendant, *P<0,05.....	84
Figure 14. – Données de grossesse après traitement par LSKL ou le peptide témoin SLLK (280 µM, s.c.) au JG 14 chez la grossesse témoin et PE chez la souris. A) Taille de la portée, B) mortalité	

foétale, C) poids du placenta, D) poids foétal et E) rapport poids foétal/poids du placenta. ANOVA bidirectionnelle suivie du test posthoc de Bonferroni. *P < 0,05 et **P < 0,01.....85

Figure 15. – Immunohistochimie de CD31+ des placentas chez la souris contrôle et PE après le traitement avec LSKL ou le peptide contrôle SLLK (280 µM, s.c.) au jour 14.5 de gestation. A) Images représentatives d’immunohistochimie du placenta des souris traitées avec le SLLK ou LSKL dans le modèle contrôle ou PE. B) Résultats de la quantification de l’immunohistochimie. Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc, *P < 0,05.87

Figure 16. – Expression du TGF-β dans les tissus placentaires de souris. A) Expression de la forme active et latente de l’isoforme TGF-β1. B) Représentation du TGF-β2 sur gel 15% SDS-PAGE. C) Expression de la forme active et latente de l’isoforme TGF-β2. Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc, *P < 0,05.88

Figure 17. – Expression du Smad2 phosphorylé (p-Smad2), un marqueur de la voie canonique dans les tissus placentaires chez la souris. Expression du p-Smad2 phosphorylé sur la tubuline par Western Blot. Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc, *P < 0,05.89

Figure 18. – Expression de TAK1 phosphorylé (pTAK1), un marqueur de la voie non-canonique du TGF-β. A) Représentation du TAK1 phosphorylé ainsi que de la tubuline sur gel 8% SDS-PAGE. B) Expression du TAK1 phosphorylé sur la tubuline. Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc, *P < 0,05.....90

Figure 19. – Expression de p38 et ERK dans les tissus placentaires de la souris. A) Expression du ratio p38 phosphorylé sur p38 total. B) Représentation du ERK phosphorylé et du ERK total sur gel 8% SDS-PAGE. C) Expression du ratio ERK phosphorylé sur ERK total. Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc, *P < 0,05.....91

Figure 20. – Effet des inhibiteurs des voies canoniques et non-canoniques du TGF-β sur la capacité d’angiogenèse des cellules placentaires humaines dans une condition d’hypoxie sévère. Effets du pré-traitement cellulaire avec le peptide contrôle SLLK (30 µM), LSKL (30 µM), le bloqueur d’ALK5/Smad2/3 SB-505124 (SB, 50 nM) ou le bloqueur de TAK1/p38 (5Z)-7-oxozeaenol (OXO, 10 nM) pendant 24 heures sur la capacité de formation de tubes des cellules sur matrigel pendant 1 heure d’exposition à l’hypoxie (0,5% O₂). ANOVA unidirectionnelle, test posthoc de Bonferroni. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.92

Figure 21. – Voie de signalisation de l’inhibition de TAK1 dans les cellules endothéliales placentaires. Les flèches rouges représentent les effets de l’inhibition de TAK1 par OXO.101

Figure 22. – Résumé de l’effet du LSKL sur la voie de signalisation du TGF- β dans les cellules endothéliales placentaires. Les flèches rouges représentent les effets de la THBS1 et les flèches vertes représentent les effets de l’inhibition de la THBS1 par LSKL.103

Liste des sigles et abréviations

A

AKT *Protéine kinase B*

AS *Artères spiralées*

ATF *Activating Transcription Factor*

C

CAL *Calréticuline*

cGMP *Guanosine monophosphate cyclique*

CML *Cellules musculaires lisses*

COX *Cyclooxygénase*

CTBs *Cytotrophoblastes*

CTEV : *cytotrophoblastes extra-villeux*

D

DG *Diabète gestationnel*

E

ECA *Enzyme de conversion de l'angiotensine*

EGF *Epidermal Growth Factor*

Eng *Endogline*

eNOS *Endothelial NO synthase*

ERK *Extracellular signal Regulated Kinases*

ET-1 *Endotheline-1*

F

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

Flt-1 *Fms Related Receptor Tyrosine Kinase*

H

hCG : *hormone chorionique gonadotrope*

HG *Hypertension gestationnelle*

HIF-1 α *Hypoxia Inducible Factor 1 alpha*

HLA-C *Humain Leukocyte Antigen-C*

hPL *Hormone lactogène placentaire*

HSPG : *protéoglycanes d'héparane de sulfate*

HTC *Hypertension chronique*

I

IAP *Integrin-associated protein*

IHC *Immunohistochimie*

IL *Interleukine*

IMC *Indice de masse corporelle*

J

JG *Jour de gestation*

JNK *c-Jun amino-terminal Kinase*

JPC : *Jours post-conception*

K

KRFK *Séquence Lysine-Arginine-Phenylalanine-Lysine*

L

LAP *Latency-associated peptide*

LRP1 *LDL receptor-related protein 1*

LSKL *Séquence Leucine-Serine-Lysine-Leucine*

M

MAPK *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MCH I : *complexe majeur d'histocompatibilité de classe I*

MEC : *matrice extracellulaire*

MMP : *Métalloprotéinases*

N

NF- κ B : *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK *Natural Killer cells*

NO : *oxyde nitrique*

NRP-1 : *neuropiline-1*

NRP-2 : *neuropiline-2*

O

OMS *Organisation mondiale de la santé*

OXO (5Z)-7-oxozeaenol

P

PAD *Pression artérielle diastolique*

PAS *Pression artérielle systolique*

PE *Prééclampsie*

PERK *Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*

PG *Prostaglandines*

PGE₂ *Prostaglandines E₂*

PGI₂ *Prostaglandines I₂*

PI3K *Phosphatidylinositol-3-Kinase*

PIGF : *Placental Growth Factor*

PP *Placenta Prævia*

R

RAAS *Renin-Angiotensin-Aldosteron system*

RGD *Séquence Arginine-Glycine-Aspartate*

Rh *Groupe Rhésus*

ROS *Reactive Oxygen Species*

RUPP *Reduced Uterine Perfusion Pressure model*

S

SB SB505124

sEng *Endogline soluble*

sFlt-1 *Flt-1 soluble*

STBs *Syncytiotrophoblastes*

T

TAK1 *TGF- β -activated kinase 1*

TAP-1 : *transporteurs associé au traitement des antigènes*

TBs *Trophoblastes*

TEM *Transition épithéliale-mésenchymateuse*

TGF- β *Transforming Growth Factor beta*

Th *Cellules T helper*

THBS1 *Thrombospondine-1*

THG *Troubles d'hypertension pendant la grossesse*

TIE *Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains*

TNF- α *Tumor Necrosis Factor alpha*

TRAF6 *Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6*

Tregs *Cellules T régulatrices*

TSR *Thrombospondin type 1 repeats*

TXA₂ *Thromboxane A₂*

T β R *Transforming Growth Factor beta Receptor*

V

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR-2 ou Flk-1/KDR : *VEGF receptor-2*

VEGFR-3 : *VEGF receptor-3*

Ce mémoire est dédié à ma famille, particulièrement à ma mère.

Remerciements

Ce projet de mémoire fut un long parcours. La pandémie du COVID-19 en 2020 a retardé le commencement de ce projet. Plusieurs embûches et problèmes ont été rencontrés durant ce long parcours, mais ce projet est finalement terminé. Cela n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien de plusieurs personnes.

Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire qui m'ont aidé pour ce projet de maîtrise. Tout d'abord, je tiens à remercier Lydia Hannou, ancienne assistante de recherche, qui a largement contribué à la partie de culture cellulaire et qui était à mes côtés durant mes nombreux *troubleshooting*. Ses encouragements et sa bonne humeur étaient vraiment appréciés. Je remercie énormément Geneviève Frégeau, assistante de recherche, qui a toujours été là pour moi et qui a été un pilier pour ce projet. Elle a été d'une aide précieuse pour mes expériences, pour la reproduction de souris ainsi que pour répondre à mes nombreuses questions. Elle m'a énormément soutenu tout au long de ma maîtrise, en m'encourageant, en me réconfortant et en m'apprenant de nouvelles techniques. C'est quelqu'un d'irremplaçable et je lui suis très reconnaissante. Je voudrais remercier les étudiants qui sont venus pour le stage et qui m'ont aussi appuyé et aidé durant ce projet : un grand merci à Nayara, Allahnah et Tamires.

Ce projet de maîtrise n'aurait pas pu être complété sans ma directrice de recherche, Dre Mariane Bertagnolli. Elle m'a accueilli dans son laboratoire pour un stage de baccalauréat. Depuis, j'ai toujours travaillé dans son laboratoire. C'est une personne intelligente, attentionnée et toujours présente pour nous aider. Je lui suis éternellement reconnaissante pour tout ce qu'elle a fait pour moi. Mille merci à vous, Mariane !

Finalement, je remercie ma famille, mon frère, ma sœur et ma mère, qui ont su m'encourager quand les périodes étaient difficiles. Jamais je n'ai pensé à abandonner et c'est ce soutien familial qui m'a poussé à compléter ma maîtrise.

Un gros merci à tous !

Chapitre 1 – La grossesse

La grossesse est un processus du développement d'un ou plusieurs fœtus dans l'utérus d'une femme. La durée d'une grossesse normale est généralement de 40 semaines ou de neuf mois. Il y a différents stades, que l'on surnomme des trimestres. Le premier est jusqu'à la 12^e semaine. C'est durant cette période que le zygote, l'ovaire fertilisée, se rend vers l'utérus, pour la formation du fœtus et du placenta. Lors du second trimestre, il est possible de détecter le sexe du fœtus via une échographie. C'est aussi à ce moment que le fœtus commence à développer ses membres. Ce stade se termine à la 28^e semaine. Finalement, au troisième trimestre, les organes internes finissent par se développer et la femme entre la 39^e et 40^e semaine de grossesse. Un enfant qui naît avant la 37^e semaine est considéré comme prématuré. ¹

1.1 Actualités sur la grossesse

Les grossesses ont toujours été importantes pour le maintien d'une espèce vivante. Toutefois, au fil des années, le taux de naissance a grandement diminué. Au Canada dans les années 50, le taux de natalité était de 27 naissances pour 1000 personnes. Cependant, à partir des années 60, on voit une baisse importante du taux de naissance de 24 naissances pour 1000 personnes, à 17 naissances pour 1000 personnes. Soit. Par la suite. On a vu une légère baisse jusqu'aux années 90. Finalement, à partir des années 2000, le taux de naissance est resté stable, soit 10 naissances par 1000 personnes.² En observant le taux de fertilité au Canada. On remarque que, dans les années 60, le taux de fertilité était de 3,8 naissances par femme, mais on voit une baisse de ce taux à partir des années 80 où le taux est en bas de 2. Durant la pandémie de COVID-19, qui a émergé en 2020, on a enregistré un taux record de fertilité faible, soit de 1,4 naissance par femme. ³

1.2 Physiologie de la grossesse

Durant la grossesse, plusieurs changements anatomiques et métaboliques se passent. Ces changements sont nécessaires afin de veiller au bon développement du fœtus. Des changements physiques ont lieu pour adapter le corps à l'arrivée du fœtus, mais il y a aussi des changements métaboliques pour contrôler l'homéostasie de la grossesse.

1.2.1 Changements physiologiques chez la femme enceinte

Lors de l'implantation du zygote dans l'utérus, des cellules immunitaires vont induire la sécrétion de facteurs de croissances par les glandes endométriales. Ceux-ci vont permettre la formation de petites protrusions, des pinopodes, ainsi que des molécules d'adhésion cellulaire, au niveau de la surface épithéliale. Lorsque le blastocyste entre en contact avec l'endomètre, il y aura une interaction avec les pinopodes et les trophoblastes (TBs) pour l'implantation.⁴ Une fois le blastocyste implanté dans l'endomètre, cela forme la caduque déciduale, à la suite de la différenciation cellulaire de l'endomètre, appelé réaction déciduale. Au début de la grossesse, il y a trois parties de la caduque : basale, ovulaire et pariétale. L'implantation du zygote se fait sur la première partie. Un espace reste présent entre la caduque ovulaire et pariétale jusqu'au début du premier trimestre. Les deux couches vont se fusionner lorsque le sac amniotique va prendre l'expansion. Tous ces changements au niveau de l'endomètre déclenchent l'étirement de l'utérus en largeur et en diamètre, à mesure que les semaines de grossesse passent.⁵

Les fibres musculaires utérines, ou myomètre, subissent de l'hyperplasie et de l'hypertrophie durant une grossesse normale. L'hyperplasie de l'endomètre est caractérisée par une réduction de la prolifération des glandes endométriales⁶ tandis que l'hypertrophie est caractérisée par un épaissement anormal de la muqueuse endométriale.⁷ Proche de l'accouchement, on distingue trois couches du myomètre. La partie supérieure du myomètre est celle qui est contractée pour l'expulsion du fœtus. La deuxième, celle du milieu du myomètre, est la plus épaisse. C'est dans cette couche que traversent les vaisseaux utérins.⁸ Les artères arquées qui sont parallèles au myomètre vont devenir droites afin d'irriguer celui-ci en sang maternel riche en nutriments. Ces artères vont croître vers l'endomètre jusqu'à devenir spiralées.⁹ Les contractions qui y sont déclenchés permettent le contrôle du saignement lors de la troisième phase de l'accouchement, en bloquant la lumière artérielle. Finalement, la dernière couche agit comme sphincter pour maintenir le col utérin fermé pendant la grossesse.⁸

Bien que les changements physiologiques au niveau utérin soient les plus importants durant la grossesse, d'autres changements dans les divers systèmes du corps de la femme se passent. Au niveau musculosquelettique, la sécrétion de progestérone et de relaxine affecte le cartilage, les joints sacro-iliaques et le pubis symphyse. Cela affecte la posture, mais aussi la démarche chez la

femme enceinte. La présence de récepteur de progestérone et d'œstrogène au niveau de la paroi des vaisseaux des ligaments augmente et la synthèse du collagène diminue en présence d'une hausse de relaxine. En effet, celle-ci va remodeler les fibres collagéniques et réduire leur diamètre, augmentant le risque de blessure aux ligaments et de crampes musculaires. Le développement du fœtus engendre une compression de la colonne vertébrale, ce qui affecte les muscles et les ligaments du dos. ¹⁰

Des changements cardiovasculaires importants se déclenchent au début de la grossesse. Le volume sanguin augmente jusqu'à 50%, atteignant son maximum à la 32^e semaine. Pareillement pour le débit cardiaque dont le maximum de 5 000 à 6 000 mL est atteint vers la fin du second trimestre. Les battements cardiaques augmentent de 10 battements par minute.⁴ Une diminution significative de la résistance vasculaire se produit secondairement à la vasodilatation induite par la progestérone. Cette diminution ainsi que les compressions de la veine cave utérine causent l'œdème et des varicosités lors du troisième trimestre. Au niveau hématologique, les facteurs coagulants, I, II, VII, VIII, IX et XII, augmentent durant la grossesse et ils sont abondants dans le plasma tandis que les niveaux de facteurs anticoagulants tels que les protéines S et C chutent. Ces changements ont un effet protecteur, en minimisant le risque d'hémorragies lors de l'accouchement. Toutefois, cela rend susceptible aux thrombo-embolies veineuses. Un autre changement hématologique est la baisse du niveau de fer. En effet, l'hématocrite et le taux d'hémoglobine diminuent considérablement en fin du second trimestre. L'absorption fœtale peut épuiser les réserves de fer maternelles, bien que l'absorption ferrique augmente grandement durant le second et le dernier trimestre. ⁴

Durant la grossesse, le volume courant, volume d'air qui entre dans les poumons, augmente de 30% à 40%. Certaines femmes vont développer une hyperventilation ou une alcalose respiratoire pour améliorer le transfert de dioxyde de carbone du fœtus à la circulation maternelle.⁴ Les changements au niveau du système gastro-intestinal sont causés, entre autres, par l'élargissement de l'utérus, qui comprime les intestins et l'estomac et par l'effet de la progestérone qui réduit la motilité gastrique et le temps de vidange gastrique. Il est connu que le volume urinaire des femmes enceintes augmente significativement. Cela est dû à l'augmentation du flux sanguin rénal

et du débit de filtration glomérulaire.⁴ En bref, tous ces changements physiologiques sont importants pour le développement du fœtus, mais ils comprennent aussi une demande plus élevée au système cardiovasculaire.

1.2.2 Types de grossesses

En général, les femmes ont des grossesses simples (une portée). Cependant, les taux des grossesses multiples (gémellaires) atteignent 2 à 3% de toutes les grossesses au Canada et aux États-Unis. Différents scénarios sont possibles lors d'une grossesse gémellaire.

1.2.2.1 Grossesses simples versus multiples

Durant la période de fertilité d'une femme, l'ovule est relâché dans la trompe de Fallope. Lorsque l'ovule est fertilisé, les cils, revêtant les trompes, poussent le zygote vers l'utérus. Pendant ce temps, la division cellulaire mitotique débute. Dans un premier temps, il y a une première division qui forme deux cellules dans les premiers 24 heures. Douze heures plus tard, une autre augmentation de la division cellulaire est entamée. Cette nouvelle boule de cellules, la morula, atteint la cavité utérine, quatre jours après la fécondation. À la cinquième journée, la morula devient un blastocyste. L'adhésion de celui-ci à la paroi endométriale enclenche la réaction déciduale pour la formation du placenta, tel que décrit au point 1.2.1.¹¹ Généralement, toutes ces étapes aboutissent à une naissance simple.

Dans le cas d'une grossesse multiple, elle résulte de la fertilisation de deux ovules ou de la division d'un ovule. Dans le premier cas, deux ovules sont sécrétés par les ovaires dans les trompes de Fallope. Ainsi, les deux ovocytes peuvent être fertilisés et se rendre dans l'utérus. Cela donne une grossesse de type bichoriale biamniotique, c'est-à-dire que chaque fœtus possède son propre sac amniotique et son propre placenta. Les enfants résultant de ce type de grossesse sont appelés jumeaux dizygotes ou, plus communément, fraternels. Dans les cas de gestations multiples monozygotes, on retrouve trois types de grossesse. La première est obtenue après une division spontanée de zéro à quatre jours après la fertilisation de la morula avant de devenir un blastocyste.¹² Les deux blastocystes nouvellement formés vont, par la suite, fusionner avec la surface endothéliale, pour former une grossesse similaire à celle dizygote. Ce type représente 25-30% des jumeaux monozygotes. Il arrive que la morula ne se divise pas, mais que le blastomère est formé.

Une division est possible quatre à huit jours après la fertilisation, après que le chorion est formé. Cela donne une grossesse monochoriale biamniotique, représentant la majorité des gestations multiples (70-75%). Les jumeaux de grossesse monochoriale monoamniotique sont rares (1-2%) et arrivent lorsque la division spontanée se passe entre neuf à deux jours après la fertilisation. Après plus de treize jours, il y a un risque que la division ne soit pas complète, ce qui donne des jumeaux dits siamois. Les jumeaux identiques sont de même sexe, étant donné qu'ils partagent le même bagage génétique. ¹³

1.2.2.2 Grossesses assistées

L'infertilité est un énorme obstacle auquel plusieurs femmes font face. Ce diagnostic s'applique lorsqu'une femme ne peut tomber enceinte, après plus de douze mois d'essais. ¹⁴ L'infertilité est définie comme une difficulté d'enfanter ou de procréer. On retrouve deux types d'infertilité : l'infertilité primaire et l'infertilité secondaire. La première correspond à l'incapacité de donner naissance tandis que le second correspond à la difficulté de donner naissance une nouvelle fois sur une période de cinq ans. ¹⁵ Plusieurs causes peuvent expliquer cette incapacité à concevoir, tels que l'âge de la femme (35 ans et plus), un problème d'ovulation ou les comorbidités. Pour aider les couples à réaliser leur rêve d'avoir un enfant, différentes technologies ont été développées. Elles vont, non seulement, aider ces couples qui ont des problèmes d'infertilité, mais elles vont pouvoir aussi aider les couples du même sexe, des femmes en âge avancé ou, bien même, des personnes sans partenaire qui veulent des enfants. Les grossesses assistées les plus communes sont la fécondation *in vitro* et la grossesse pour autrui. Il existe d'autres méthodes pour avoir des enfants, qui passent par le don d'ovule ou de sperme pour l'insémination artificielle.

La fécondation *in vitro* (FIV) a été une grande découverte vers la fin des années 70 par le chercheur Bob Edwards et le gynécologue Patrick Steptoe. En effet, le premier bébé conçu, à l'aide de cette technologie, a vu le jour le 25 juillet 1978 au Royaume-Uni. ¹⁶ Durant les cycles de FIV, on donne des injections d'hormone chorionique gonadotrope (hCG) et d'hormone de stimulation folliculaire (FSH) à la femme pour le développement folliculaire des ovaires. Ensuite, les ovules sont collectés par échographie endovaginale. Environ 5 à 15 ovocytes sont inséminés avec du

sperme pendant la nuit pour la fertilisation. Après quelques jours, les embryons dont la fertilisation est la mieux réussie sont transférés dans l'utérus de la femme tandis que les autres sont conservés et congelés pour d'autres tentatives futures. ¹⁷

La gestation pour autrui (GPA) est une autre méthode pour avoir un enfant. Elle est caractérisée par la portée d'un enfant pour autrui par une femme volontaire afin de donner l'enfant à la naissance. On parle donc d'une mère porteuse. Cette méthode est principalement utilisée par les couples de même sexe, un couple qui ne peut concevoir un enfant ou pour une femme ou un homme célibataire qui désire avoir un enfant. ¹⁸

1.2.2 Placenta

Le placenta est l'organe le plus essentiel durant la grossesse, en assurant le bon développement du fœtus. Il s'agit d'un organe fœtal et non maternel, comme on le pense souvent. En effet, il est composé de cellules fœtales et est formé à partir des membranes annexes extra-embryonnaires. Il possède des fonctions endocrines, immunitaires et physiologiques. ¹⁹

1.2.2.1 Rôle et fonctions

Le placenta est un organe très important durant la grossesse. Son rôle ultime est d'assurer le développement du fœtus en le protégeant et en assurant les échanges materno-fœtaux. Comme mentionné plus haut, cet organe possède des fonctions-clés. Tout d'abord, il est important pour les apports nutritifs et gazeux du fœtus et, aussi, pour le transport des déchets métaboliques du côté fœtal vers le côté maternel pour être excrétés. ¹⁹ Au niveau de l'aspect immunologique, le placenta va empêcher la pénétration de bactéries dans le fœtus et aussi protège aussi celui-ci contre le système immunitaire maternel qui pourrait l'attaquer. En effet, des macrophages se retrouvent dans le stroma des villosités choriales et des leucocytes dans la caduque de l'endomètre. Finalement, plusieurs hormones sont sécrétées à partir du placenta pour préparer l'environnement de grossesse pour le fœtus. Le facteur de croissance placentaire ou *Placental Growth Factor* (PIGF) prépare le corps de la femme pour la grossesse en terme cardiovasculaire et favorise la croissance fœtale. Son expression augmente au deuxième trimestre de la grossesse, c'est-à-dire entre 16 et 18 semaines de gestation. À partir de la 25^e semaine, le PIGF va induire une angiogenèse qui est dite non ramifiée, ce qui permet la formation d'un réseau capillaire placentaire

à faible résistance.²⁰ D'autre part, l'hormone lactogène placentaire (hPL) va promouvoir la lactation mammaire et va altérer le métabolisme maternel. En effet, elle va réduire la sensibilité à l'insuline pour augmenter l'apport en glucose pour le fœtus.²¹

1.2.2.2 Implantation

L'implantation est l'étape la plus importante pour la viabilité du blastocyste, mais aussi, pour la formation du placenta. Comme montre la Figure 1, il consiste en la liaison de la paroi trophoblastique du blastocyste à la paroi épithéliale de l'endomètre pour déclencher la réaction déciduale pour la formation de la caduque basale ou la décidue, couche nécessaire pour la placentation. Les TBs du blastocyste sont divisés en trois types cellulaires : les syncytiotrophoblastes (STBs), les cytotrophoblastes (CTBs) villositaires et les cytotrophoblastes extra-villositaires (CTEV). Les premiers recouvrent les villosités chorales, les seconds vont proliférer tout au long de la grossesse et les derniers vont pénétrer dans l'endomètre.²²

Tout d'abord, il y a l'étape de pré-implantation. L'embryon va produire des métalloprotéinases (MMP) pour médier la pénétration des STBs dans la paroi épithéliale de l'endomètre. Par la suite, ils vont se développer vers la couche interne endométriale, ce qui crée des jonctions partagées et serrées avec les cellules épithéliales maternelles.²² Ensuite, il y a le stade pré lacunaire qui se produit 7 à 8 jours post-conception (JPC). Avant l'implantation dans la caduque basale ou la décidue, les cellules du blastocyste vont se différencier en deux couches épithéliales qui forment le disque embryonnaire didermique : une couche externe appelée épiblaste et une couche interne appelée hypoblaste. Rendu au 8^e JPC, la cavité amniotique va se former au niveau de l'épiblaste. Une mince membrane composée de cellules épiblastiques va se former entre la cavité et les CTBs pour former l'amnios.²³ Le blastocyste est intégré dans la caduque basale. Cette fusion déclenche la différenciation en trophoblaste. À partir de ce moment, on retrouve deux types de couches : la couche externe cytotrophoblastique qui est du côté fœtal et la couche interne syncytiotrophoblastique qui est du côté maternel.²⁴ La première permet la formation de nouvelles cellules syncytiales, des villosités chorales et du sac amniotique. La seconde couche permet l'ancrage du blastocyste dans l'endomètre. Ce sont les STBs qui sécrètent des hormones, telles que la hCG, l'œstrogène, la progestérone et la hPL.¹⁰ Finalement, la dernière étape est le stade lacunaire au 8^e et 9^e JPC. Après l'implantation complète, la cavité amniotique se dilate et devient la vésicule

ombilicale primaire. De plus, cette dilatation cause la migration des cellules hypoblastique pour former la membrane de Heuser, qui entoure la vésicule, et, simultanément, le mésoderme extra-embryonnaire.²³ Les STBs vont générer des espacements dans la couche syncytiotrophoblastique pour former de larges lacunes que l'on appelle les trabécules syncytiales. Ces lacunes sont les précurseurs de l'espace intervilleux. À mesure que l'endomètre s'érode lors de l'implantation, les trabécules vont se remplir de sang maternel.²⁵ Le mésoderme extra-embryonnaire se divise en deux, ayant une couche qui tapisse la membrane de Heuser et une qui tapisse la couche externe cytotrophoblastique. Cela crée un espace entre les deux couches, nommée cavité chorionique. Une seconde vague migratoire de cellules hypoblastiques se produit, scindant la vésicule ombilicale primaire pour devenir la vésicule ombilicale définitive. La vésicule primaire est fragmentée en résidus de petites vésicules en amont du mésoderme du côté de la couche cytotrophoblastique externe.²³ C'est au 12e JPC que se termine l'implantation. L'embryon est intégré dans la caduque basale avec ses tissus extra-embryonnaires et les STBs maternels vont entourer les CTBs embryonnaire pour générer une couche mésenchymateuse, ce qui forme le chorion.²⁴

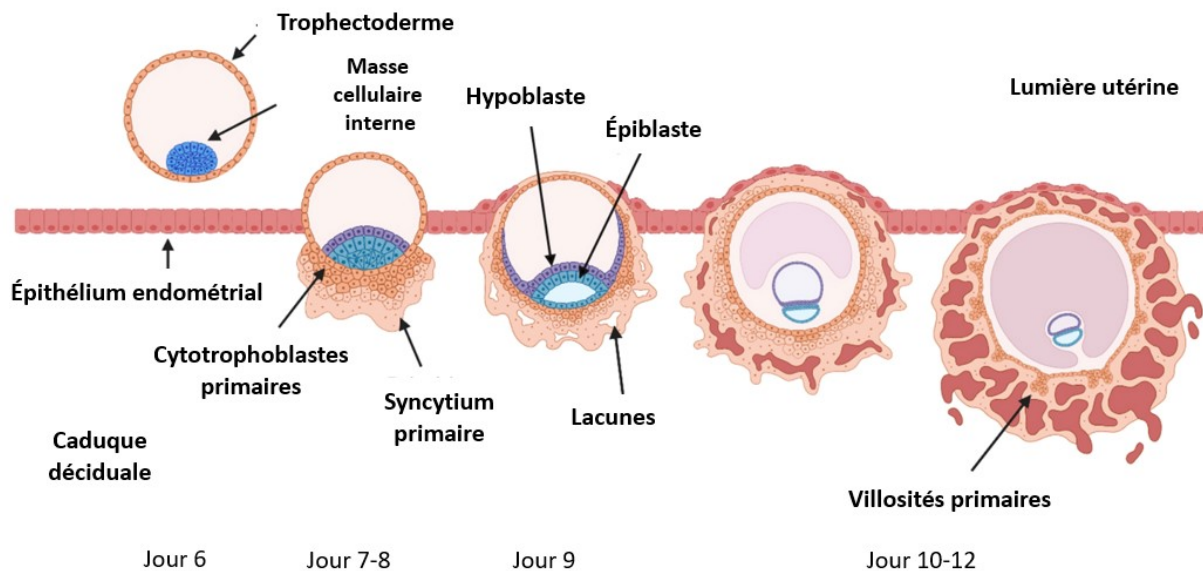


Figure 1. – Étapes de l'implantation du blastocyste. Image modifiée et copiée de l'article de revue James et al. (2022)²⁶

1.2.2.3 Formation des villosités

Ensuite, il y a le stade vilieux précoce qui commence (Figure 2). La prolifération cytotrophoblastique vilieux va permettre leur pénétration dans les trabécules syncytiales, espacements présents dans le lit syncytiotrophoblastique du côté maternel, étirant celles-ci. Ceci résulte au développement des branches syncytiales remplies de CTBs. C'est ainsi que se forment les villosités primaires. Par la suite, les cellules mésenchymateuses choriales vont aussi envahir les trabécules et les villosités primaires pour former des villosités secondaires ou intermédiaires au noyau mésenchymateux.²⁴ Après la formation des villosités secondaires, quelques CTBs vont former des colonnes qui vont pénétrer complètement dans la couche syncytiale jusqu'à atteindre la caduque basale. Ils vont, par la suite, se propager parallèlement entre le tissu décidual et la couche syncytiale, remplaçant celle-ci pour former une coquille trophoblastique. Ces colonnes cytotrophoblastiques vont pénétrer le syncytium plus tard pour développer des villosités d'ancrage du placenta.²⁷

Du 19^e au 21^e JPC, la vasculogénèse débute, pour former les premiers capillaires fœtaux. Celle-ci est la formation d'un réseau vasculaire primitif à partir de la différenciation des cellules endothéliales provenant de précurseurs mésenchymateux.²⁸ C'est à ce moment, à environ deux semaines de grossesse, que la circulation utéro-placentaire se développe. Les cellules endothéliales dérivent des cellules souches hémangioblastiques provenant du mésenchyme. Ces cellules progénitrices peuvent se différencier pour donner des cellules souches hématopoïétiques entourées par l'endothélium précoce et positionnées dans les capillaires primitifs.²⁹ Les premiers capillaires fœtaux apparaissent, ce qui indique le développement des premières villosités tertiaires ou mésenchymateuses, et de la vascularisation fœtale des villosités. La formation des capillaires est due à la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, tels que le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) et *Fibroblast Growth Factor* (FGF). L'allantoïde, enveloppe amniotique recouvrant et protégeant le fœtus, est aussi vascularisée et va fusionner avec la plaque choriale. Les vaisseaux vont se développer dans cette plaque et vont entrer en contact avec des segments capillaires intervilloux. Ce processus sera répété jusqu'à la 5^e semaine de grossesse pour former un lit capillaire adéquat.³⁰

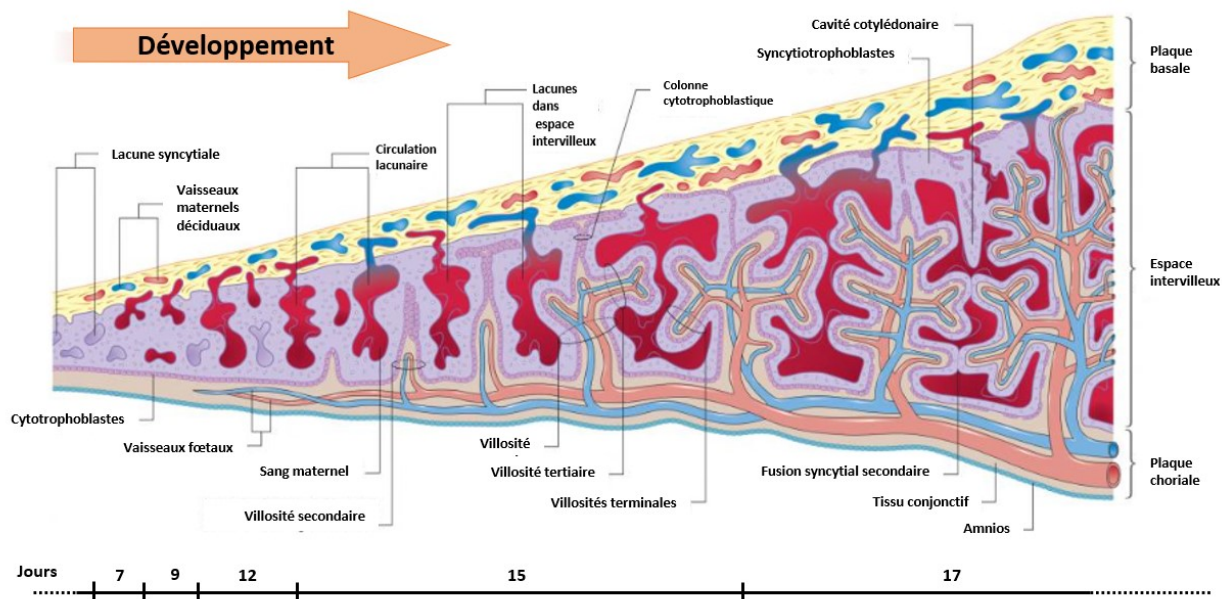


Figure 2. – Formation des villosités choriales. Image modifiée et copiée du livre *Gray's Anatomy* (2021) page 181, version E-book.²²

1.2.2.4 Placentation

La réaction déciduale permet le remodelage de la matrice extracellulaire en régulant la sécrétion de collagène, des protéoglycanes et des glycoprotéines. La réaction est médiée par les MMP et les plasminogènes. La caduque basale protège l'endomètre et le myomètre d'une invasion trophoblastique incontrôlable dans les artères spiralées (AS) maternelles, en produisant des cytokines qui favorisent l'adhésion des TBs au lieu de l'invasion. La décidue se divise en trois sections : caduque réfléchie ou ovulaire, caduque basale et caduque pariétale. La première entoure l'embryon et disparaît au fur et à mesure que le chorion se forme. La seconde est l'endroit où le placenta va se former. Finalement, la dernière recouvre le reste de la cavité utérine et va se fusionner avec la caduque réfléchie, vers la 18^e semaine de grossesse.¹⁰

Rappelons que les STBs provenant du blastocyste envahissent le stroma endométrial et que des trabécules syncytiales apparaissent à environ 8 à 9 JPC. Quelques jours plus tard, les villosités primaires et secondaires se forment jusqu'au 20^e JPC. L'apparition des premiers capillaires fœtaux

indique la formation des villosités tertiaires, soient les vaisseaux placentaires. Ces villosités vont s'allonger jusqu'aux trabécules syncytiales pour leur remplissage après dix semaines de grossesse. À la neuvième semaine de grossesse, les villosités mésoenchymateuses terminales se forment, sous forme de bourgeons syncytiotrophoblastiques, après l'allongement des villosités tertiaires. Ces bourgeons se nomment les villosités intermédiaires immatures et elles atteignent leur longueur maximale à 16 semaines de grossesse. À 20 semaines de grossesse, les villosités mésoenchymateuses vont former des arbres vilieux pour donner des villosités intermédiaires matures. À 32 semaines de grossesse, ces villosités arrêtent de croître et vont produire des villosités terminales, ce qui met fin à la formation de l'arbre vilieux placentaire.²³

À environ deux mois de grossesse, les villosités dégénèrent dans la caduque réfléchie, ce qui forme le chorion lisse et les villosités maintenues dans la caduque basale forment le chorion vilieux. De quatre à cinq mois de grossesse, les septa placentaires, parois de l'endothélium décidual, vont s'accroître pour former des groupes de villosités, créant les cotylédons. La formation de ceux-ci permet la circulation du sang maternel.²³

1.2.2.5 Angiogenèse placentaire

La régulation de la circulation placentaire est très importante durant la grossesse. À partir du 32^e JPC, les capillaires fœtaux vont se connecter entre eux pour former un réseau capillaire primitif. Après la vasculogénèse, soit la formation des villosités et des capillaires fœtaux, se produit l'angiogenèse placentaire. Celle-ci permet d'accroître le système vasculaire vilieux jusqu'à la fin de la grossesse. Ce processus est la formation d'un réseau vasculaire à partir d'un réseau préexistant.³¹ La vascularisation placentaire est sujette à du remodelage pour assurer un équilibre dans les échanges de nutriments, de gaz et de déchets.

Lors de l'implantation, il y a une différenciation des TBs en STBs et CTEV. Ceux-ci vont contribuer à l'invasion trophoblastique pour le remodelage des AS utérines pour la vascularisation placentaire. Les villosités d'ancrage du placenta dérivées de l'invasion de CTBs dans la couche syncytiales sont maintenues ancrées dans la caduque à l'aide de molécules d'adhésion et des jonction intercellulaires communicantes. Au départ, les CTEV avaient un phénotype épithélial, mais elles vont développer un phénotype interstitiel après leur invasion dans la caduque. Elles sont d'abord de

petites cellules fusiformes, puis deviennent des cellules géantes multinucléées.³² Des CTEV endovasculaires vont envahir les AS en remplaçant l'épithélium. Cette invasion cause la destruction du tissu musculaire et élastique. Alors, la paroi vasculaire sera remplacée par une substance fibroïde, dérivée de la fibrine du sang maternel et des molécules sécrétées par les TBs. Ce remplacement affaiblit les AS, ce qui favorise la dilatation des vaisseaux, dû à la pression du sang maternel.²⁵ Des facteurs pro-angiogéniques sont sécrétés par les CTEV pour l'invasion trophoblastique, notamment les VEGF et les angiopoïétines.

1.2.2.5.1 Vascular Endothelial Growth Factor

La famille de facteurs pro-angiogéniques VEGF est composée de cinq membres, soient VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF. VEGF-A est le facteur le plus important dans l'angiogenèse placentaire parce qu'il induit la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules hémangioblastiques.³¹ VEGF-B semble être exprimé dans le placenta, mais sa fonction est toujours inconnue. VEGF-C a un effet protecteur cellulaire en induisant l'expression des transporteurs associés au traitement des antigènes (TAP-1) et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MCH I), deux gènes nécessaires pour la fonction immunologique placentaire. VEGF-D va stimuler la croissance des cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques. Finalement, l'isoforme PlGF contrôle la croissance et la différenciation trophoblastique. Les récepteurs des VEGF sont des récepteurs de type tyrosine kinase et on en retrouve trois, soient *VEGF receptor-1* (VEGFR-1 ou Flt-1), *VEGF receptor-2* (VEGFR-2 ou Flk-1/KDR) et *VEGF receptor-3* (VEGFR-3). Les VEGF peuvent aussi se lier à des co-récepteurs, la neuropiline-1 (NRP-1) et neuropiline-2 (NRP-2).³¹ Les VEGFs sont importants pour la régulation positive de l'angiogenèse, en médiant l'invasion trophoblastique.³³ De plus, ils assurent la survie des capillaires formés et ont un effet anti-apoptotique pour la conservation de la vascularisation placentaire.³⁴

VEGF-A est l'isoforme la plus abondante dans le placenta. Il stimule l'expression de protéases par les cellules endothéliales, comme les urokinases, ou des activateurs de plasminogène. La sécrétion de ces protéases va permettre la destruction de la matrice extracellulaire (MEC), libérant les cellules endothéliales enfouies dans les villosités d'ancrage pour leur migration et leur prolifération. Le VEGF-A permet la production de l'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales des vaisseaux placentaires pour leur vasodilatation.³⁴ Durant le premier trimestre, le VEGF va se lier

aux récepteurs Flt-1 et VEGFR-2. Le premier récepteur est exprimé au niveau des STBs et des CTBs, mais aussi au niveau des cellules endothéliales, des macrophages et à certains endroits sur les villosités. En revanche, le récepteur VEGFR-2 n'est seulement exprimé qu'au niveau des cellules endothéliales. Pendant les deux derniers trimestres, l'activité du VEGF-A est observée seulement dans les STBs et CTBs. La présence du Flt-1 est faible dans les TBs villex et dans les cellules endothéliales et le VEGFR-2 est complètement absent. Cela suggère que le récepteur VEGFR-2 est impliqué seulement dans la vasculogénèse tandis le récepteur Flt-1 serait également impliqué ainsi que durant l'angiogénèse³⁵ Au troisième trimestre de grossesse, les cotylédons fœtaux et maternels, l'amnios et les chorions expriment fortement le VEGF-A.³⁴

Le PlGF est l'autre membre de la famille des VEGFs le plus important pour la vascularisation placentaire. Il existe deux isoformes de PlGF, soit PlGF-1 et PlGF-2. La différence entre les deux est que la seconde forme contient une région supplémentaire avec un motif de liaison au sulfate d'héparine de 21 acides aminés à la partie C-terminale. Les deux formes vont se lier à Flt-1, tandis que PlGF-2 va se lier aux co-récepteurs NRP-1 et NRP-2, mais, également, aux protéoglycanes sulfate d'héparane (HSPG). PlGF est localisé au niveau des TBs et des cellules endothéliales au noyau villex. De plus, on le retrouve dans les cellules géantes multinucléées. La sécrétion de PlGF par celles-ci pourrait enclencher la vascularisation dans la caduque basale et du placenta lors de l'implantation. PlGF travaille de concert avec VEGF-A pour favoriser l'angiogénèse. En effet, il va se lier aux récepteurs Flt-1, augmentant ainsi la liaison du VEGF-A aux récepteurs VEGFR-2. VEGF-A et PlGF peuvent également former un hétérodimère, donnant un mitogène endothéliale puissant. La synergie entre ces deux membres de la famille des VEGFs est très importante. Une anomalie dans le gène du PlGF pourrait réduire la réponse cellulaire au VEGF-A, affectant la vascularisation placentaire.³¹ On remarque que l'expression de VEGF-A s'accroît tout au long de la grossesse, tandis que celle de PlGF croît entre 28 et 32 semaines de grossesse.³⁵

1.2.2.5.2 Angiopoïétines

Les angiopoïétines sont des cytokines essentielles à la maturation des vaisseaux sanguins lors de l'angiogénèse.³³ Quatre ligands font parties de cette famille, soient angiopoïétine-1, angiopoïétine-2, angiopoïétine-3 et angiopoïétine-4. Ces ligands peuvent se lier à deux récepteurs *Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains* (TIE)-1 et 2. Bien qu'il y ait deux types de

récepteurs, seulement le récepteur TIE-2 joue un rôle dans la vascularisation placentaire.³¹ Le récepteur TIE-2 est localisé dans les hémangioblastes, dans les cellules endothéliales et dans les TBs des villosités.^{36; 37} La liaison des angiopoïétines au TIE-2 médient la survie des cellules endothéliales ainsi que la maturation vasculaire placentaire. De plus, ce système joue un rôle important dans l'interaction entre l'endothélium placentaire, la MEC et les tissus mésenchymateux.³¹ L'Ang-1 est produit majoritairement par les péricytes des vaisseaux, des cellules périvasculaires entourant les capillaires sanguins et qui sont impliquées dans la vasoconstriction.³⁸ Sa sécrétion induit le remodelage et la maturation vasculaire en se liant à TIE-2. Cependant, l'Ang-2 a plutôt un effet antagoniste en se liant au TIE-2, empêchant la liaison d'Ang-1.³⁹ En inhibant la phosphorylation du TIE-2, cela permet de déstabiliser les vaisseaux, les rendant plus sensibles aux stimulus du VEGF-A et autres facteurs de croissance. De plus, Ang-2 facilite la formation de bourgeonnement de nouveaux vaisseaux au début de l'angiogenèse placentaire. Alors, on peut dire que l'Ang-2 a un effet pro-angiogénique et a un impact très important dans l'angiogenèse placentaire.³³ Ang-1 se trouve principalement dans les STBs et CTBs durant le premier trimestre et dans les grosses artères en fin de grossesse. Ang-2 est aussi localisé dans les STBs et les CTBs, mais son expression augmente en fin de grossesse dans les capillaires des villosités terminales.³⁵

1.3 Physiopathologie de la grossesse

Les grossesses à risques sont une source d'inquiétude importante pour la survie de la mère et de l'enfant, autant dans les pays développés que les pays en développement. La physiopathologie gestationnelle est affectée par plusieurs facteurs, que ce soit environnemental, génétique ou épigénétique.⁴⁰ Ces multiples facteurs peuvent contribuer au développement de complications durant ou après la grossesse, ce qui cause le décès de milliers de femmes et d'enfants à travers le monde chaque année.

1.3.1 Complications de grossesse

Des complications peuvent se développer en début, au milieu ou en fin de grossesse. Chacune de ses complications peut avoir un impact sur la santé de la mère et du fœtus. Elles peuvent être causées par une dysfonction dans le métabolisme de la femme enceinte ou au moment de la

placentation. Les plus répandues sont le placenta prævia, le diabète gestationnel et les troubles hypertensifs.

1.3.1.1 Placenta prævia

La placentation est l'une des étapes les plus importantes pour le bon développement du fœtus, mais aussi pour la santé de la mère. Une des complications les plus dangereuses est le placenta prævia (PP). Celle-ci est définie par l'implantation du placenta dans la partie inférieure de l'utérus. De plus, en cas de PP, le placenta recouvre complètement ou en partie le col de l'utérus. Le PP a une incidence de 0,3 à 0,5 %.⁴¹ Il est généralement diagnostiqué aux deux derniers trimestres. La physiopathologie de cette condition est idiopathique. Toutefois, une hypothèse serait que l'implantation du blastocyste se ferait dans la partie inférieure de l'utérus ou que l'ancrage du placenta se ferait plus bas que la normale.^{42; 43} Lorsqu'une femme est atteinte du PP, elle peut avoir des saignements indolores durant le premier, le second ou le troisième trimestre. Ces saignements peuvent déclencher des contractions, causant de la douleur. Étant donné que le col de l'utérus est obstrué, un accouchement naturel est à éviter, au risque d'avoir une hémorragie lors de la délivrance^{43; 44}

Bien que la cause du PP soit encore inconnue, plusieurs facteurs de risque pourraient expliquer cette complication, comme l'âge, la consommation de drogues, le tabagisme ou, encore, les grossesses multiples. Le facteur de risque majeur est la présence de cicatrices de césarienne. En effet, il a été démontré que le risque de développer un PP augmente de cinq fois lors d'une naissance précédente faite par césarienne. Ce taux augmente de plus en plus lorsque la femme a subi plus d'une naissance par césarienne.⁴⁵ Des complications peuvent survenir lors de l'accouchement en cas de PP. Pour la mère, les risques sont une hémorragie *ante partum*, lors de l'accouchement et/ou *post-partum*. En cas d'hémorragie *ante partum* avant 34 semaines de grossesse, une césarienne d'urgence est nécessaire. Les complications fœtales possibles sont l'anémie, la détresse respiratoire, l'hémorragie intraventriculaire et parfois même la mort. Les femmes atteintes de PP sont suivies étroitement et subissent plusieurs échographies pour examiner le placenta et le col de l'utérus. De plus, un repos pelvien *antepartum* est recommandé pour diminuer les chances d'avoir des contractions.^{46; 47}

1.3.1.2 Diabète gestationnel

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le diabète gestationnel (DG) est défini comme « *un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué. Pour la première fois pendant la grossesse, quelle que soit le traitement nécessaire et l'évolution dans le post-partum.* ». ⁴⁸ Il touche 3 à 20% des femmes enceintes. ⁴⁹ Il ne faut pas le confondre avec le diabète pré-gestationnel, qui est présent avant la grossesse. Le diabète peut toutefois être latent, c'est-à-dire qu'il est révélé durant la grossesse et se poursuit après l'accouchement. Toutefois, le DG peut se dissiper en après l'accouchement, en *post-partum*. ⁵⁰ Toutefois, dans 20 à 50% des cas, le DG ne disparaît pas après l'accouchement, et les patientes développent du diabète de type 2. ⁵¹ Lorsque la glycémie est élevée durant la grossesse, il y a un risque d'effets indésirables. Elle peut mener à des malformations au niveau du fœtus ou affecter sa croissance. De plus, il y a un risque de macrosomie et de complications métaboliques à la naissance. Il est donc important de contrôler le taux d'insuline et la glycémie pendant la grossesse, pour ne pas mettre en danger la vie de la mère et de l'enfant. ⁵²

Durant la grossesse, la femme va subir des changements métaboliques et hormonaux pour favoriser la mise en réserve de glycogène et de lipide qui seront nécessaires à la croissance du fœtus. En temps normal, l'œstrogène sécrété va contribuer à l'augmentation de la sécrétion de l'insuline. Celle-ci est une hormone qui est sécrétée par cellules β pancréatiques et elle régule le taux de sucre dans le sang. ⁵³ Au second trimestre, la progestérone et le cortisol sécrétés par le placenta induisent une insulino-résistance maternelle modérée. Cela permet d'augmenter la quantité de glucose sanguin, augmentant la disponibilité des substrats énergétiques pour la croissance fœtale. Alors, pour compenser ce manque, la sécrétion d'insuline va augmenter grandement durant le dernier trimestre. ^{54; 55} Toutefois, si les cellules β du pancréas n'arrivent plus à sécréter l'insuline, il y aura l'apparition d'une hyperglycémie et on parle donc de DG. Lorsque cette hyperglycémie augmente, il y a le développement d'une hyperglycémie fœtale, qui va apparaître aussi, ce qui risque d'entraîner une macrosomie, une hypoxie circulatoire ou un retard de croissance. ⁵⁰

Il existe plusieurs facteurs de risques qui expliqueraient pourquoi certaines femmes développent du DG. Les principaux facteurs sont l'indice de masse corporelle (IMC) supérieur ou égal à 25 kg/m² avant la grossesse, l'âge supérieur ou égal 35 ans, un antécédent de DG et des antécédents

de diabète de type 2. Lorsqu'un de ses critères est répondu, un dépistage de la glycémie à jeun est réalisé dès le premier trimestre de grossesse.⁵⁰ Si la femme enceinte développe un DG, elle peut développer des complications maternelles, tels que l'hypertension, un accouchement prématuré ou une rupture prématuré des membranes avant l'accouchement. De plus, elle risque de développer le diabète de type 2 après la délivrance.⁵⁶

1.3.1.3 Les troubles d'hypertension pendant la grossesse

Les troubles d'hypertension pendant la grossesse (THG) sont parmi des complications les plus fréquentes durant la grossesse et peut se développer de novo. Ils affectent environ 10% des grossesses.⁵⁷

La prévalence de l'hypertension augmente à chaque année et peut se développer en hypertension chronique qui affecte environ 5% des grossesses.⁵⁷ La prévalence de l'hypertension varie selon le pays. En Amérique latine et dans les pays caribéens, le taux de mortalité maternelle peut atteindre 26%, tandis que dans les pays d'Asie ou d'Afrique, ce taux peut atteindre à 35%. Généralement, les pays en développement ont un taux de mortalité maternelle plus élevé que les pays plus développés, mais ce n'est pas le cas pour les THG. En effet, ce taux peut atteindre 16% dans des pays comme les États-Unis, ce qui est plus élevé que la moyenne mondiale. Les facteurs de risque de THG sont les antécédents d'hypertension, l'obésité, le diabète et l'âge maternel.⁵⁷ Globalement, les personnes atteintes d'hypertension ont une dysfonction dans la paroi de leurs vaisseaux, au niveau des composantes sanguines ou par rapport au flux sanguin.⁵⁸ Les THG sont divisés en quatre catégories : l'hypertension chronique, l'hypertension gestationnelle, la prééclampsie/éclampsie et l'hypertension chronique superposée à la prééclampsie.⁵⁹

L'hypertension chronique (HTC) est définie par la présence d'hypertension avant la grossesse, avant 20 semaines d'âge gestationnel ou 12 semaines après l'accouchement. L'hypertension est caractérisée par une pression artérielle systolique (PAS) ≥ 130 mmHg et une pression artérielle diastolique (PAD) ≥ 80 mmHg. On parle d'hypertension légère lorsque la PAS est entre 140 et 159 mmHg et la PAD est entre 90 et 109 mmHg. Dans le cas d'une hypertension sévère, la PAS est ≥ 160 mmHg et la PAD est ≥ 110 mmHg. L'obésité et l'âge maternel augmentent les risques de

développer l'HTC durant la grossesse. Il peut être difficile de distinguer l'HTC à cause des changements physiologiques du corps de la femme pour la vascularisation placentaire. En effet, à 16 semaines de grossesse, le tonus vasculaire des artères maternelles est diminué, ce qui conduit à la réduction de la résistance vasculaire périphérique et à la baisse de la pression sanguine pour l'augmentation du flux sanguin. Des lectures en-dessous du seuil de diagnostique d'hypertension peuvent masquer le diagnostic de l'HTC.⁵⁹ Souvent, l'HTC est confondu avec l'hypertension gestationnelle. Cependant, ce sont deux cas de THG différents.

L'hypertension gestationnelle (HG) est caractérisée par une PAS d'au moins 140 mmHg et d'une PAD d'au moins 90 mmHg à deux occasions, entre 4h et 6h d'intervalles, à partir de 20 semaines de grossesse.⁶⁰ Si l'hypertension se maintient trois mois après l'accouchement, cela devient une HC. Le risque de développer l'HG peut aller jusqu'à 17% chez les femmes qui n'ont jamais eu d'enfant précédemment et jusqu'à 4% chez les femmes qui ont déjà accouché auparavant. Si l'hypertension devient sévère, c'est-à-dire une PAS au-dessus de 160 mmHg et une PAD au-dessus de 110 mmHg, cela peut déclencher un autre THG, la prééclampsie (PE).⁵⁹ Celle-ci est une condition qui peut mettre la vie de la mère et de l'enfant en danger lors de l'accouchement. Le mécanisme d'action étant toujours inconnu à ce jour, il n'existe pas de traitement pour ce THG.

Chapitre 2 – La prééclampsie

La prééclampsie (PE) est un THG et une des causes majeures de morbidité et de mortalité périnatales et maternelles.⁶¹ Elle est caractérisée par HG sévère ($\geq 140/90$ mmHg) à partir de la 20^e semaine de grossesse et par une protéinurie, perte de protéines dans l'urine. Lors d'une grossesse normale, il y a une invasion trophoblastique dans les AS, augmentant ainsi le flux sanguin pour les échanges materno-fœtaux.⁶¹ La physiopathologie de cette condition est toujours inconnue jusqu'à ce jour. En revanche, il semblerait que la cause principale du développement de la PE soit une dysfonction dans l'invasion trophoblastique des AS lors de la placentation. On retrouve deux sous-types de la PE. Le premier est la PE précoce, ou de type placentaire, qui représente environ 20% des cas et survient avant la 34^e semaine de grossesse. Elle est liée à la restriction de croissance fœtale, à une ischémie placentaire et à un stress oxydatif. Le deuxième type, la PE tardive

ou de sous-type maternel, représente la majorité des cas (80%) et survient après la 34^e semaine de grossesse. Les femmes développant ce type de PE ont une prédisposition de développer des maladies cardiovasculaires et métaboliques et/ou une inflammation chronique systémique placentaire superposée à un déséquilibre du système sanguin. Le mécanisme physiopathologique de la PE est toujours incompris. Toutefois, il est clair que ce THG est causé par une dysfonction de l'invasion trophoblastique des AS.⁶² Lorsque la PE n'est pas traitée, elle peut causer plusieurs complications de grossesses. Les cas les plus sévères sont l'éclampsie et le syndrome HELLP. La première est caractérisée par le début de convulsions, une forte agitation et/ou une perte de conscience chez la mère. L'éclampsie peut survenir durant, tout de suite après ou jusqu'à six semaines après l'accouchement. Si elle n'est pas traitée le plus tôt possible, la mère risque de développer le syndrome HELLP (*Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets*)^{63;64}, condition caractérisée par une hémolyse, une élévation des enzymes hépatiques et un taux faible des plaquettes. Les patientes atteintes de ce syndrome peuvent présenter des douleurs épigastriques et des douleurs aiguës abdominale et avoir des symptômes qui y sont associés, tels que des nausées, des vomissements et de la fatigue. De plus, il y a un risque d'une rupture hépatique qui peut mettre en danger la mère et le fœtus.^{65;66} Si ce syndrome n'est pas traité à temps chez la patiente, celle-ci peut développer une éclampsie. Il existe plusieurs méthodes de prévention pour diminuer les risques de développer la PE ou pour tenter de la contrôler. En revanche, il n'existe toujours pas de thérapies capables d'améliorer la vascularisation placentaire. Ce travail de maîtrise vise justement à tenter de trouver une cible thérapeutique pour contrer le dysfonctionnement trophoblastique et améliorer l'angiogenèse placentaire.

2.1 Épidémiologie

La PE est une condition assez complexe qui peut entraîner des complications maternelles et fœtales résultant au décès. D'après les données de l'OMS, en 2019, l'incidence des THG variaient entre 4 à 25% et 2 à 8% des grossesses sont touchées par la PE, dépendamment du pays en question. Les THG sont une des trois causes principales de la morbidité et de la mortalité maternelles.⁶⁷ Dans les pays développés, les THG représentent jusqu'à 16% des décès maternels, tandis que dans les pays en développement, le taux est plus élevé. Au Canada, en 2010-2011, le taux de THG était de 46,3 pour 1000 accouchements.⁶⁸ Les mortalités maternelles des femmes atteintes de PE

sont principalement causées par l'éclampsie plutôt de la PE. Au cours des dernières décennies, cette mortalité a grandement diminué dans les pays développés. Au Canada, le taux était de 1,5 pour 1000 accouchements en 2004-2005, mais il a diminué en 2010-2011 à 0,5 pour 1000 accouchements.⁶⁸ Dans les pays en développement, le taux de mortalité causée par l'éclampsie tout de même élevée.⁶⁹ La PE est responsable de 15 à 20% des naissances prématurées globalement et la PE cause un quart des décès à la naissance et néonataux dans les pays en développement.⁷⁰ Outre la différence économique entre les pays, d'autres facteurs peuvent expliquer l'incidence de la PE, autant les pays développés que dans les pays en développement.

2.2 Physiopathologie

Au niveau de l'utérus, on retrouve deux artères utérines de chaque côté. Ces artères sont liées avec les artères ovariennes. Celles-ci sont des branches directes de l'aorte abdominale et elles acheminent le sang dans l'utérus. Lorsque les artères utérines atteignent le myomètre, couche lisse de l'utérus, elles vont se ramifier pour devenir des artères arquées, qui vont irriguer les parois antérieure et postérieure de l'utérus.⁷¹ Par la suite, les artères arquées vont se ramifier pour devenir des artères radiales, puis des artères basales. Ces dernières alimentent la partie basale de l'endomètre pour sa régénération après les menstruations. Finalement, les artères basales vont se prolonger jusqu'à la surface de l'endomètre pour devenir les artères importantes pour la circulation materno-fœtale : les artères spiralées (AS).⁷² Les AS vont irriguer le sang dans l'endomètre, la caduque basale et le placenta. Avant et durant la période de menstruation, ces artères sont moins visibles. La sécrétion de l'œstrogène lors de la période proliférative, soit la période entre les menstruations et l'ovulation, vont induire l'augmentation de la taille et du nombre de vaisseaux, augmentant, par le fait même, le flux sanguin.⁷¹ Durant la grossesse, les AS vont former un réseau capillaire sous-épithélial dans la zone basale de l'endomètre et elles vont irriguer l'espace intervilloux du placenta et ainsi maintenir la perfusion de l'échange materno-fœtal. Le débit sanguin augmentera, passant de 45 mL/min à 750 mL/min pour assurer la croissance fœtale.⁷³

Le remodelage des AS correspond au changement de leur anatomie pour assurer le bon fonctionnement de la grossesse et des échanges materno-fœtaux. Au premier trimestre de grossesse, les CTEV vont migrer au niveau des villosités choriales. Par la suite, ils vont entrer dans la caduque basale afin d'envahir les AS pour former un bouchon trophoblastique extravilloux.⁷⁴ Celui-ci ser-

vira de barrière pour contrôler l'entrée du sang maternel dans les chambres intervilleux et il permet le maintien d'une hypoxie physiologique pour la placentation, favorisant la prolifération des CTBs. Les AS sont originalement sous forme spiralée, ce qui augmente la résistance vasculaire utérine. À partir de la 9^e semaine, il y a un remodelage des AS qui se fait en cinq étapes. Premièrement, il y a une vacuolisation, c'est-à-dire l'apparition de vacuoles, au niveau des cellules musculaires lisses (CML), causant un gonflement de ces cellules. Par la suite, des CTEV interstitiels, TBs libres, vont induire une désorganisation des cellules musculaires lisses en les remplaçant par une couche de fibrinoïde, diminuant l'élasticité artérielle. Les cellules endothéliales de la paroi vasculaire sont remplacées par les CTEV endovasculaires, TBs adoptant un phénotype et elles vont envahir les AS, en exprimant des facteurs angiogéniques et leurs récepteurs : VEGF-A, VEGF-C, PlGF, VEGFR-1 et VEGFR-3. Elles vont par la suite s'incorporer dans la paroi vasculaire (pseudovasculogénèse).⁷⁵ La perte des CML par l'envahissement par les CTEV endovasculaires va augmenter l'élasticité des vaisseaux, favorisant la vasodilatation et diminue la résistance vasculaire.

73; 76

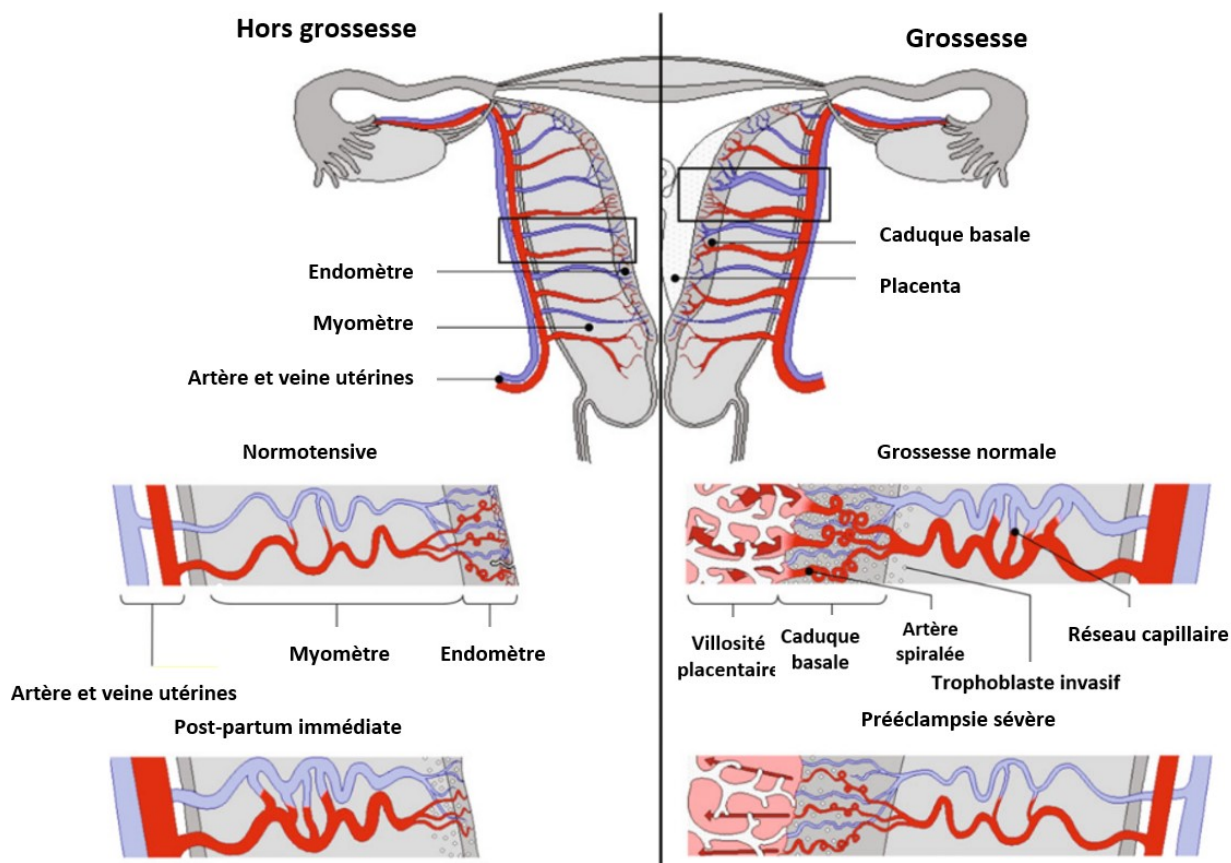


Figure 3. – Représentation de la vascularisation utérine dans différentes conditions³⁵ Image modifiée et copiée du livre *Pathology of the Human Placenta* (2012), page 194. À Gauche : Vascularisation utérine chez une femme non enceinte dans un contexte hors grossesse vs après l'accouchement ; À droite : Vascularisation utérine chez une femme enceinte durant une grossesse normale vs durant une PE sévère.

La PE est causée par l'incapacité des TBs à adopter un phénotype endothélial pour remplacer les CML, causant un remodelage artériel incomplet. Ainsi, le diamètre des AS devient inadéquat pour l'échange materno-fœtal, entraînant une mauvaise perfusion et une ischémie placentaire.⁷⁷ La physiopathologie de la PE correspond à la placentation anormale et le dysfonctionnement trophoblastique et par la surexpression des facteurs anti-angiogéniques. Une vasculopathie déciduale, lésion causée par des complications liées à l'insuffisance placentaire, est caractérisée par

un endothélium œdémateux et une hypertrophie vasculaire placentaire, ainsi que par la présence de CML. Ces observations indiquent l'absence de l'invasion trophoblastique.⁷⁸

Par la suite, l'ischémie physiologique peut avoir un impact sur le remodelage des AS. En effet, comme mentionné plus haut, un bouchon trophoblastique est formé dans les AS avant la 10^e semaine de grossesse. Cela permet de former un milieu ischémique, essentiel pour la prolifération trophoblastique. Les TBs prolifératifs vont exprimer des marqueurs hypoxiques, soit le facteur HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor 1 alpha*), pour changer leur phénotype prolifératif en phénotype invasifs. HIF-1 α est un facteur de transcription pour les gènes oxygène-dépendent qui encodent pour l'angiogenèse et le métabolisme cellulaire. Il est composé de deux sous-unités dimérique, α et β , la première s'activant dans des conditions d'hypoxie, tandis que l'autre s'active de façon constitutive. De plus, l'expression de HIF-1 α lors d'une grossesse normale va générer un environnement hypoxique, favorisant le recrutement des facteurs pro-angiogénique pour favoriser l'angiogenèse.⁷⁹ Dans une situation de PE, il y a un dysfonctionnement de cette voie de signalisation, causant la surexpression de HIF-1 α et la libération des espèces réactives oxygénées ROS (*reactive oxygen species*). Celles-ci vont inhiber la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, voie qui favorise l'invasion trophoblastique. Un autre inconvénient de l'ischémie placentaire est le stress oxydatif du réticulum endoplasmique. Cette lésion va induire la transcription des facteurs de transcription pro-apoptotiques via la kinase transmembranaire PERK (*Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*). De plus, une transcription en aval de PERK avec les facteurs de transcription ATF (*Activating Transcription Factor*)⁴ et ATF6 va réguler négativement la transcription du facteur pro-angiogénique PlGF.⁸⁰

L'ischémie placentaire peut causer un débalancement dans le système inflammatoire. Les cytokines anti-inflammatoires, telles que l'interleukine (IL)-10 et 4 (IL-4) vont réguler la réponse immunitaire durant la grossesse.⁸¹ Physiologiquement, l'IL-10 va stimuler la différenciation des cellules T naïves en cellules T régulatrices (Tregs) et inhiber la sécrétion des cytokines inflammatoires liées au stress oxydatif, tout en favorisant la relaxation vasculaire.⁸² IL-4 va stimuler la production d'anticorps des immunoglobulines E et G1 et, tout comme IL-10, inhiber les cytokines pro-inflammatoires.⁸³ Dans une situation pathologique, les cytokines pro-inflammatoires les plus communes sont le facteur TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*), l'IL-6 et l'IL-17. Elles sont sécrétées

par les cellules T *helper* (Th) 1 et 17 et leur sécrétion engendre des réponses inflammatoires et cytotoxiques. Cependant, durant la PE, seules TNF- α et IL-6 sont normalement sécrétées. L'augmentation de leur sécrétion dans la circulation et dans les TBs placentaire cause l'inhibition des cytokines anti-inflammatoires et entraîne un déséquilibre du système inflammatoire, compliquant la grossesse.^{81; 82} TNF- α est impliqué dans la pathologie de plusieurs maladies inflammatoires et il est impliqué dans la régulation des gènes essentiels à la différenciation et à la fonction cellulaire. Durant la grossesse, TNF- α est impliqué dans la régulation de la synthèse des hormones, la placentation et le développement fœtal. Or, durant la PE, son expression est augmentée. Durant la grossesse, il est important de maintenir un équilibre entre le système immunitaire maternel et le système inflammatoire placentaire pour le bon développement de la grossesse. L'homéostasie entre les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par Th1 (ex : TNF-1 α) et les cytokines anti-inflammatoire sécrétées par Th2 (ex : IL-10) permet d'avoir une implantation embryonnaire réussie. Les Th1 vont stimuler la formation de vaisseaux sanguins pour l'implantation. Cependant, une forte expression des Th1 peut déclencher une réponse immunitaire affectant le cycle cellulaire, augmentant les chances d'une fausse couche.⁸⁴

Le système immunitaire est un autre élément important pour une grossesse réussie. Les CTEV expriment l'antigène leucocytaire humain de type C, HLA-C (*Human Leukocyte Antigen-C*), ce qui déclenche des réponses immunitaires des cellules tueuses déciduals NK (*Natural Killer cells*) et des cellules T, soient les Tregs et les cellules T effectrices. Les premières servent de cellules de mémoire pour l'immunité adaptative de la grossesse.⁷³ Les secondes sont nécessaires pour la tolérance immunitaire materno-fœtale pour assurer la placentation. Autrement dit, elles régulent les autres cellules immunitaires, les changements vasculaires par les cellules NK et favorisent un environnement anti-inflammatoire pour éviter le rejet de l'embryon par le système immunitaire de la mère.⁸⁵ Les cellules T effectrices ont une fonction pro-inflammatoire. Lorsque le taux de cellules T effectrices est plus élevé que celui des Tregs, cela déclenche une inflammation qui affecte la placentation.⁸⁶ De plus, l'adaptation vasculaire maternelle est perturbée et le risque de complications durant la grossesse augmente. Pour un remodelage adéquat, il faut une interaction réussie entre les HLA-C fœtaux et les récepteurs de type immunoglobuline (KIR) des cellules NK. De plus, s'il y a une incompatibilité des HLA-C entre la mère et le fœtus, la fonction des Tregs peut

être altérée, causant des troubles de reproduction, un échec d'implantation, une fausse couche, une mauvaise perfusion placentaire ou la PE.⁷³

Ainsi, le diamètre des AS devient inadéquat pour l'échange materno-foetal, entraînant une ischémie placentaire. Physiologiquement, dans un état hypoxique, les TBs vont sécréter le marqueur hypoxique HIF-1 α , qui va causer l'augmentation de l'expression de l'ARNm du TGF- β . Cela permet le déclenchement de l'angiogenèse pour réduire l'hypoxie placentaire. Or, lorsque l'état hypoxique est maintenu, l'expression de TGF- β continue d'augmenter et engendre un effet anti-angiogénique en inhibant de la différenciation trophoblastique.⁸⁷ Ce facteur de croissance va inhiber la différenciation trophoblastique. De plus, il induit la production de l'endogline/CD105 (Eng). C'est un co-récepteur du TGF- β 1 qui n'a aucun lien direct avec la signalisation du facteur de croissance, mais il médie les réponses de signalisation, c'est-à-dire dans la signalisation TGF- β -indépendant. C'est un co-récepteur homodimérique, composé d'un domaine C-terminal, d'un domaine extracellulaire Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) et d'un domaine transmembranaire hydrophobe. Il est principalement exprimé au niveau des cellules endothéliales. Eng ne peut lier ses ligands s'il n'est pas sous sa forme hétérodimérique avec le récepteur T β RII (*Transforming Growth Factor beta Receptor 2*).^{88; 89} Il peut être retrouvé sous sa forme soluble (sEng) qui est exprimé par les CTBs invasifs. Cette forme compétitionne pour le TGF- β libre, empêchant sa liaison aux récepteurs transmembranaires pour l'activation de sa fonction. Ainsi, la production du NO, essentiel pour la vasodilatation vasculaire et l'action anti-inflammatoire sont inhibées.⁹⁰ Des études cliniques ont remarqué une hausse du taux de sEng en cas de protéinurie, mais il n'y a présentement aucune étude qui permet d'expliquer cette corrélation positive.^{39; 91; 92} Un autre marqueur observé durant la PE est le taux de du récepteur VEGFR-1/Flt-1 soluble (sFlt-1). Rappelons qu'il s'agit d'un récepteur du VEGF et du PlGF, qui, lorsque lié à son ligand, induit une réaction angiogénique. Dans sa forme transmembranaire, Flt-1 est composé de sept domaines de type immunoglobuline, un domaine tyrosine kinase cytoplasmique et membranaire. Or, dans sa forme soluble, il ne contient pas les domaines cytoplasmique et membranaire. sFlt-1 compétitionne pour le VEGF et PlGF libre, inhibant leur fonction angiogénique, nécessaire pour la placentation. Son augmentation sérique cause une dysfonction placentaire, ce qui est associée à l'hypertension

et à une protéinurie lors d'une PE. Lorsque sFlt-1 et sEng sont en libre circulation, une exacerbation peut survenir et les femmes développent la forme de PE la plus sévère, pouvant développer le syndrome de HELLP.³⁹

2.2 Facteurs de risque

La PE est une condition qui affecte grandement les grossesses. Cependant, des facteurs cliniques peuvent jouer un grand rôle. Ces différents facteurs de risque peuvent mener à de graves complications. Ces facteurs peuvent être attribués à des causes génétiques, biologiques ou environnementales.

Les points suivants vont décrire les différents facteurs qui augmentent le risque de développer une PE.

2.2.1 Âge

L'âge maternel peut avoir un impact important. En effet, lorsque la mère est rendue à un âge avancé (>35 ans) ou est à l'adolescence (<18 ans), le risque d'avoir une PE augmente exponentiellement. Une grossesse à 35 ans et plus comporte un risque de développer des dysfonctionnements métaboliques, dus à des maladies préexistantes, entre autres.⁹³ Les femmes qui sont enceintes à un âge avancé ont deux fois plus de chance de développer une PE durant leur grossesse, surtout s'il ne s'agit pas de leur première grossesse.⁹³ En revanche, les jeunes adolescentes, c'est-à-dire 18 ans et moins, ont un risque d'avoir des complications liées à la PE. En effet, une adolescente est toujours en période de croissance, ce qui signifie que son système reproducteur subit des changements jusqu'à sa maturation. Ainsi, elle ne peut pas avoir un cycle menstruel régulier ou son utérus n'a pas fini sa maturation, ce qui peut entraîner un dysfonctionnement de la placentation, impactant le remodelage des AS.⁹⁴ La PE tardive est plus courante chez les jeunes mères qui ont moins de 20 ans.⁹³

2.2.2 Ethnicité

Plusieurs études ont démontré que le risque de PE varie en fonction de l'ethnicité. La conclusion générale est que les femmes afro-américaines d'aucune origine hispanique ont un risque deux fois plus élevé que les femmes blanches de développer la PE. De plus, ce risque augmente jusqu'à

3,5 fois dans le cas d'une PE précoce, comparé à une PE tardive, où le risque est jusqu'à 2,5 fois.⁹³ Cependant, ces études n'ont pas considéré l'incidence importante de l'hypertension artérielle chronique chez les personnes noires. Souvent, ces femmes ne sont pas suivies étroitement, sachant que la disposition de développer un trouble hypertensif est élevée. Alors, elles peuvent être atteinte d'hypertension chronique sans le savoir et l'avoir depuis le début de leur grossesse, ce qui peut expliquer pourquoi le risque d'une PE précoce est élevé. Un autre élément qui expliquerait cette prévalence est le statut socio-économique. Les personnes noires généralement un statut économique plus faible par rapport à d'autres ethnies, ce qui réduit leurs accès à des soins médicaux appropriés, surtout dans les pays où les services de santé ne sont pas gratuits et aux aliments sains dont le prix peut être trop élevé. De plus, ce groupe vit une marginalisation sociale qui peut causer un stress chronique pouvant augmenter leur pression artérielle et augmenter les risques de maladies cardiovasculaires.⁹⁵ Outre les femmes noires, les femmes d'origine hispaniques et sud-asiatiques sont plus prédisposées à développer la PE durant leur grossesse comparées aux femmes blanches. Toutefois, les femmes provenant de l'est de l'Asie ont un risque égal ou légèrement plus faible que les femmes caucasiennes.⁹⁶

2.2.3 Obésité

L'obésité est un syndrome métabolique qui cause plusieurs comorbidités, pouvant mettre la vie de la personne en danger. Elle peut être déterminé en calculant l'indice de masse corporelle (IMC), en divisant le poids en kilogramme par le mètre carré de la taille (kg/m^2). Un poids idéal correspond à un IMC entre 18,5 et 24,9, un léger surpoids entre 25 et 29,9, une obésité modérée entre 30 et 34,8, une obésité sévère entre 35 et 39,9 et une obésité morbide au-dessus de 40.⁹⁷ Au cours des dernières décennies, le taux d'augmentation de l'obésité a augmenté de 70% en Amérique. Cette prévalence est plus faible dans certains pays de divers continents. L'obésité durant la grossesse peut représenter un danger important pour la femme, car elle peut amener à de l'infertilité, des fausses couches, du diabète gestationnel, des naissances prématurées ou à la mort du fœtus.⁷⁰ Une femme enceinte et obèse qui possède un IMC supérieur à $25 \text{ kg}/\text{m}^2$ a deux fois plus de risque de PE et ce risque se triple lorsque l'IMC est au-dessus de $30 \text{ kg}/\text{m}^2$. Cependant, ce risque n'est pas affecté en fonction de l'ethnicité.⁹⁸

Chez les patients obèses, on retrouve une plus grande présence de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF-1 α et l'IL-6. De plus, le taux d'adiponectine sérique est diminué et le taux de leptine, un pro-inflammatoire, sérique est augmenté en cas d'obésité. Ces deux hormones sont produites par les cellules adipeuses. L'adiponectine est une hormone qui est exclusivement sécrétée par les tissus adipeux. Elle favorise l'équilibre métabolique et elle favorise la sensibilité de l'insuline. La leptine est une hormone produite par les tissus adipeux, ainsi que d'autres tissus non adipeux, tel que le placenta. Elle est impliquée dans plusieurs voies de transduction et elle peut avoir un effet pro-inflammatoire en activant la voie de signalisation de TNF-1 α .⁹⁹ La majorité des personnes obèses vont développer une résistance à l'insuline. Cette résistance cause le développement du diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires. La résistance à l'insuline est connue sous trois types. Le premier, type A, correspond à un dysfonctionnement des récepteurs à insuline, ce qui cause une résistance sévère à l'insuline.^{100; 101} Le second, type B, est caractérisé par la formation d'anticorps contre les récepteurs à insuline.¹⁰¹ Finalement, le type C ou post-récepteur serait dû à une altération de l'activité de la tyrosine kinase des récepteurs de l'insuline. Toutefois, le mécanisme de cette altération est toujours inconnu.¹⁰² Durant la grossesse, on retrouve une résistance de type post-récepteur. L'augmentation de la leptine sérique va induire la sécrétion de TNF-1 α . Celui-ci va affecter la voie de signalisation de l'insuline en induisant la sécrétion des sphingomyélinases et des céramides qui interfèrent dans l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline 1. L'inflammation croissante lors d'une résistance d'insuline cause une ischémie placentaire et un stress oxydatif dans le placenta, augmentant le risque de PE.¹⁰³

Le stress oxydatif engendre un déséquilibre dans le système du NO. En effet, l'obésité réduit l'effet de vasodilatation et l'expression de la synthase endothéliale de l'oxyde nitrique eNOS (*endothelial NO synthase*), réduisant par le fait même la production de NO endothéliale. L'augmentation de la sécrétion de leptine va induire l'activation de la NADPH oxydase, qui va stimuler la production de l'anion superoxyde que dégrade le NO, favorisant la vasoconstriction. Ainsi, un dysfonctionnement endothélial est induit, ce qui impacte la placentation et le remodelage adéquat des AS pour l'échange materno-fœtal. D'un autre côté, l'endothéline 1 (ET-1), un peptide produite par les cellules endothéliales et un vasoconstricteur, a un taux plus élevé chez les personnes obèses. Des études ont démontré qu'il y aurait un lien entre NO et l'ET-1. En effet, elles

ont démontré que lorsque la production de NO diminue, la synthèse de l'ET-1 augmente, ce qui favorise l'effet vasoconstricteur et hypertenseur. Bien que cette information semble intéressante, il n'empêche qu'il n'y ait pas assez de données qui prouvent que le taux d'ET-1 soit plus élevé chez les femmes enceintes obèses atteintes de PE.⁹⁸

2.2.4 Conditions pré-existantes

Outre l'obésité, l'âge avancé et l'ethnicité, un autre facteur de risque important à considérer est l'historique médical de la patiente. Certaines conditions préexistantes peuvent augmenter les risques de développer des THG, voire la PE. En ayant connaissance du dossier médical complet de la patiente, sa prise en charge pour prévenir une complication sera plus rapide et efficace. Les femmes qui avaient une HC avant la grossesse ont jusqu'à cinq fois plus de chances de PE, particulièrement s'il n'est pas contrôlé avec des antihypertenseurs. Une HC non contrôlée risque de créer un stress métabolique et vasculaire important. Ceci augmente les chances de développer d'autres maladies cardiovasculaires durant ou après la grossesse.^{93; 96}

Le diabète est une autre condition qui peut causer la PE. Comme mentionné plus haut, l'obésité peut entraîner une résistance à l'insuline, qui est souvent caractérisée de diabète de type 2. Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune. Les patientes qui ont un diabète de type 1 ont 15 à 20% de risque de PE, alors que celles qui sont atteintes du type 2 ont entre 10 à 14% de chance.¹⁰⁴ Lorsque ces types de diabètes ne sont pas traités adéquatement, il y a un risque d'avoir des complications micro et macrovasculaires, endommageant les reins. De plus, cette condition peut altérer le système inflammatoire, oxydatif et le fonctionnement endothélial.⁹³ Le DG est également un facteur de risque indépendant à la PE.¹⁰⁴

La parité peut être un enjeu important. Lors d'une première grossesse, le système immunitaire maternel n'est pas encore adapté à la venue d'un embryon. Ainsi, une réaction allo-immune maternelle peut avoir lieu. Celle-ci, connue aussi sous le nom d'allo-immunisation maternelle, est une réaction en réponse de la présence de l'antigène D sur les globules rouges du fœtus. Lorsque la mère est d'un groupe Rhésus (Rh) négatif a un enfant avec un homme Rh+, il y a 50% de chance que l'enfant soit Rh+. Ainsi, les globules rouges du fœtus possèdent un antigène D. Le système

immunitaire maternel va produire des anticorps pour contrer les antigènes D. Ces anticorps peuvent facilement traverser le placenta et vont attaquer les globules rouges fœtaux, déclenchant le système inflammatoire par l'activation des macrophages. Cette attaque va causer une hémolyse et une anémie qui risque de mettre la vie du fœtus en danger. La réponse allo-immune est fortement active durant la première grossesse, augmentant les risques de PE. Une femme multipare, c'est-à-dire qui a déjà eu un accouchement précédemment, a un effet protecteur face à cette réponse. Cependant, elle l'est seulement si elle a un enfant avec le même père.¹⁰⁵ Dans le même sens, les grossesses multiples représentent un risque de PE. Les femmes qui portent plusieurs enfants ont un risque significativement plus élevé de développer la PE, comparativement aux femmes qui ont une grossesse simple. De plus, le risque augmente avec le nombre de fœtus. En revanche, il n'y a aucune association avec la chorionicité et la zygosité.

2.3 Traitement

En observant la prévalence grandissante de la PE au cours des dernières décennies, les efforts pour trouver un traitement se sont multipliés. Or, jusqu'à maintenant, il n'existe toujours pas de traitement qui soit assez efficace pour ne pas mettre la vie de la mère ainsi que du fœtus en danger. Donc, des traitements ont été mis en place pour aider la prise en charge ou la prévention de la PE. Parmi ces préventions, on en retrouve de type pharmacologique et non pharmacologique.

Une des méthodes pharmaceutiques les plus utilisées est l'administration d'aspirine. En effet, c'est le seul médicament pour lequel plusieurs études démontrent les bienfaits chez les patientes atteintes de PE sévère. L'aspirine est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS). Lors d'une réponse inflammatoire, des prostaglandines (PG) sont formées par la conversion de l'acide arachidonique, un acide gras entreposé dans les cellules, par la cyclooxygénase (COX). Les PG jouent un rôle clé dans la réponse inflammatoire. Elles sont impliquées dans l'homéostasie de l'inflammation dans plusieurs systèmes physiologiques et elles agissent comme médiateurs pro- et anti-inflammatoire. Leurs actions peuvent être autocrine ou paracrine et peuvent avoir des effets positifs ou négatifs.¹⁰⁶ La fonction des PG dépend de leur liaison au récepteur COX. En effet, on en retrouve deux isoformes, soient COX-1 et COX-2. Lorsque les PG se lient à la première, elles auront

une fonction homéostasique. Autrement dit, elles vont médier la sécrétion des molécules plaquettaires via la thromboxane A₂ (TXA₂), un vasoconstricteur, contrôler le débit sanguin rénal et créer un effet protecteur de l'estomac via la prostaglandines E₂ (PGE₂). COX-1 est majoritairement présente dans les tissus. En revanche, une conversion faite par la COX-2 aura un impact sur des fonctions physiologiques, telles que la prolifération et la survie cellulaire, l'angiogenèse et l'apoptose. COX-2 est principalement associé à l'inflammation et sa synthèse est stimulée par les cytokines inflammatoires.^{107; 108} Durant une grossesse normale, il y a un équilibre entre TXA₂ et la prostaglandine I₂ (PGI₂) endothéliale, un vasodilatateur, pour le maintien d'un flux sanguin materno-fœtal adéquat. Or, en cas de PE, il y a une dysfonction des cellules endothéliales, causant une peroxydation des lipides. Cela va permettre l'activation de l'enzyme COX, favorisant la production de TXA₂ via COX-1 et son effet vasoconstricteur. L'aspirine à faible dose va inhiber COX-1 pour induire un effet antiplaquettaire. Le blocage de l'activité enzymatique de COX-1 inhibera la production de TXA₂ et favorisera la production de PGI₂, pour un effet vasodilatateur.¹⁰⁹ C'est pour cette raison que l'on prescrit de faible dose pour les femmes atteintes de PE, soit entre 75 et 150 mg par jour, de la 12^e semaine de grossesse jusqu'à l'accouchement.¹¹⁰ En revanche, une grande quantité d'aspirine risque d'inhiber les deux enzymes, soient COX-1 et COX-2, affectant le système inflammatoire. De plus, l'aspirine peut traverser la barrière placentaire et affecter le fœtus.¹¹¹

Un autre traitement pharmaceutique est l'administration d'anti-hypertenseurs. Ceux-ci contrôlent la pression artérielle pour les femmes avec un risque de PE ou celles atteintes avec un cas sévère. Cependant, le type de médication donné va dépendre de la sévérité de l'hypertension. Un des antihypertenseurs que l'on donne est le Methyldopa. Cette substance va agir au niveau des récepteurs α -adrénergiques en émettant un faux neurotransmetteur, α -méthylnorépinephrine, diminuant l'action de la norépinephrine. Des études ont démontré que ce médicament donnait de bons résultats sur l'hypertension artérielle durant la grossesse, en plus d'être sécuritaire pour le fœtus. Toutefois, le désavantage avec la Methyldopa est qu'il a un effet modéré avec un début de réaction lent (3h à 6h). Donc, cela prendra trop de temps avant que l'hypertension soit contrôlée. Un autre médicament utilisé est le Labetalol. Celui-ci agit en bloquant les récepteurs α et β adrénergiques. Contrairement au Methyldopa, son début de réaction est plus rapide

(2h). De plus, cette substance n'affecte pas le flux sanguin materno-foetal. Cependant, le Labetalol peut causer une toxicité au niveau hépatique maternel et peut causer des symptômes similaires au syndrome HELLP.¹¹² La Nifedipine est un bloqueur des canaux calciques. Il a souvent été utilisé pour traiter l'hypertension durant la grossesse. La Nifedipine a un mécanisme d'action très rapide, mais des comprimés à libération prolongée.¹¹³ C'est cette dernière que l'on administre aux patientes. Lorsque ce médicament est administré avec la version à action rapide, il y a un risque que la pression artérielle de la patiente chute drastiquement, ce qui va réduire la perfusion placentaire. Pour éviter cette complication, on donne de faibles doses de Nifedipine (30-90 mg) à action lente aux patientes.¹¹² En dernier lieu, un autre traitement pour l'hypertension est l'utilisation de l'Hydralazine. Il s'agit d'un vasodilatateur artériel qui peut être administré par voie intraveineuse ou orale. Bien que ce médicament soit administré dans les cas d'hypertension associée à la PE, il donne des effets secondaires tels que l'œdème des membres inférieurs et une tachycardie.¹¹²

2.4 Modèles animaux

Comme mentionné plutôt, plusieurs méthodes thérapeutiques et de prévention ont été tentés afin de contrôler ou éviter la PE. Cependant, aucune de ces méthodes ne permettent d'expliquer la cause exacte de la PE. Ainsi, des modèles animaux ont été générés au courant des dernières années afin de pouvoir mieux comprendre la physiopathologie de la PE. Les modèles les plus utilisés sont les modèles murins, particulièrement la souris et le rat. En revanche, les changements génétiques induits vont générer certains aspects de la PE. Autrement dit, certains modèles vont permettre de comprendre le dysfonctionnement trophoblastique, tandis que d'autres vont plutôt permettre d'étudier le problème de perfusion placentaire. Ces divers champs de recherche vont permettre d'avoir une compréhension plus large des divers mécanismes pathologiques de la PE.

2.4.1 Modèles murins

Les modèles murins principalement utilisés pour étudier la PE sont la souris et le rat. En revanche, il est à noter que la physiologie de grossesse des souris diffère de celle de l'humain. En effet, un mauvais remodelage des AS chez la souris n'aura aucun impact sur la placentation ou sur la pression artérielle. Une autre différence est l'invasion trophoblastique. Chez l'humain, celle-ci débute tôt dans la grossesse. À huit semaines de gestation, les TBs ont envahi la partie interne de la

caduque basale. Chez le murin, les artères ne sont pas complètement envahies par les TBs et cette invasion ne se rend pas jusqu'au myomètre.¹¹⁴ Malgré ces différences, le modèle murin reste le modèle de choix pour étudier les maladies humaines. Il est possible de reproduire une simulation de ces maladies en modifiant génétiquement l'animal ou par croisement répétées. Ces modifications vont permettre de recréer un aspect d'une maladie humaine. C'est le cas dans les nombreux modèles de PE, dans lesquels des changements génétiques ont été faits pour reproduire les altérations physiologiques causées par la PE.¹¹⁵ D'autres modèles ne subissent aucun changement génétique, mais des substances sont injectées dans leur circulation ou subissent des chirurgies pour altérer le système voulu.

Tout d'abord, on retrouve des modèles pour la dysfonction trophoblastique. Bien que la PE soit causée par une dysfonction de l'invasion trophoblastique, le mécanisme d'action derrière cette dysfonction reste encore incompris. Un modèle de rat par croisement répétées utilisés pour l'étude de la dysfonction trophoblastique est le *stroke-prone spontaneously hypertensive rats* (SHRSP). Celui-ci va développer une hypertension chronique sévère avant la grossesse. De plus, ils vont subir une altération de l'invasion trophoblastique et un changement dans la structure des vaisseaux materno-fœtaux.¹¹⁵ Le modèle similaire chez la souris est le BPH/5 (*Blood pressure high subline 5*). Celui-ci est un modèle de la PE précoce. Avant la grossesse, la souris développe une hypertension et une obésité légères superposées. En début de grossesse, elles vont avoir un dysfonctionnement placentaire, qui impactera la circulation materno-fœtale. De plus, le système inflammatoire est grandement activé au niveau du site d'implantation, donnant une portée inférieure et un poids de souriceaux plus bas que la moyenne.^{115; 116}

Une des caractéristiques principales de la PE est l'ischémie placentaire. Le modèle le plus utilisée pour l'étude de ce mécanisme physiopathologique est le rat RUPP (*Reduced uterine perfusion pressure*). Il ne s'agit pas d'un modèle obtenu génétiquement, mais chirurgicalement. Cette procédure chirurgicale se fait chez des rats Sprague-Dawley, un rat albinos, au jour de gestation (JG) 14. Pour ce faire, une occlusion vasculaire est obtenue en plaçant des clips sur des aortes ou des artères cibles. Cette occlusion réduit la perfusion utérine d'environ 40%. Lorsque le clip est placé autour de l'aorte au-dessus de la bifurcation iliaque ainsi qu'au niveau des arcades bilatérales utérines des ovaires, on parle d'un modèle RUPP conventionnel. Les rats vont développer des

dysfonctions angiogéniques, placentaires et endothéliales. Leur taux de sFlt-1 est élevé tandis que les taux de VEGF et PlGF sont faibles durant la grossesse. ¹¹⁵ Dans le cas d'un nouveau modèle RUPP, les clips sont placés autour des branches des artères et des veines utérines de l'arcade vasculaire des vaisseaux ovariens ou utérins. ¹¹⁷ Ce modèle présente des changements dans l'expression des gènes placentaires. Finalement, la modèle RUPP sélectif est obtenu en plaçant des clips directement sur les artères utérins et ovariens. ¹¹⁸ Ce modèle va développer de l'hypertension et perdre des fœtus durant la grossesse. Toutefois, contrairement aux deux premiers modèles, il ne démontre pas de protéinurie, une restriction de croissance fœtale ou une dysfonction vasculaire. ¹¹⁹ Bien que le rat RUPP démontre plusieurs similarités avec les femmes prééclamptiques, on y retrouve des désavantages. Ce modèle ne permet de comprendre la pathophysiologie de la PE avant la chirurgie, autrement dit, en début de grossesse. Ensuite, l'insertion de clips autour des vaisseaux utérins et ovariens causent non seulement une occlusion au niveau de ceux-ci, mais peut entraver la circulation sanguine des autres organes. Finalement, l'essai de thérapie pour améliorer la circulation sanguin placentaire ne sera pas efficace dans ce modèle. ¹¹⁵

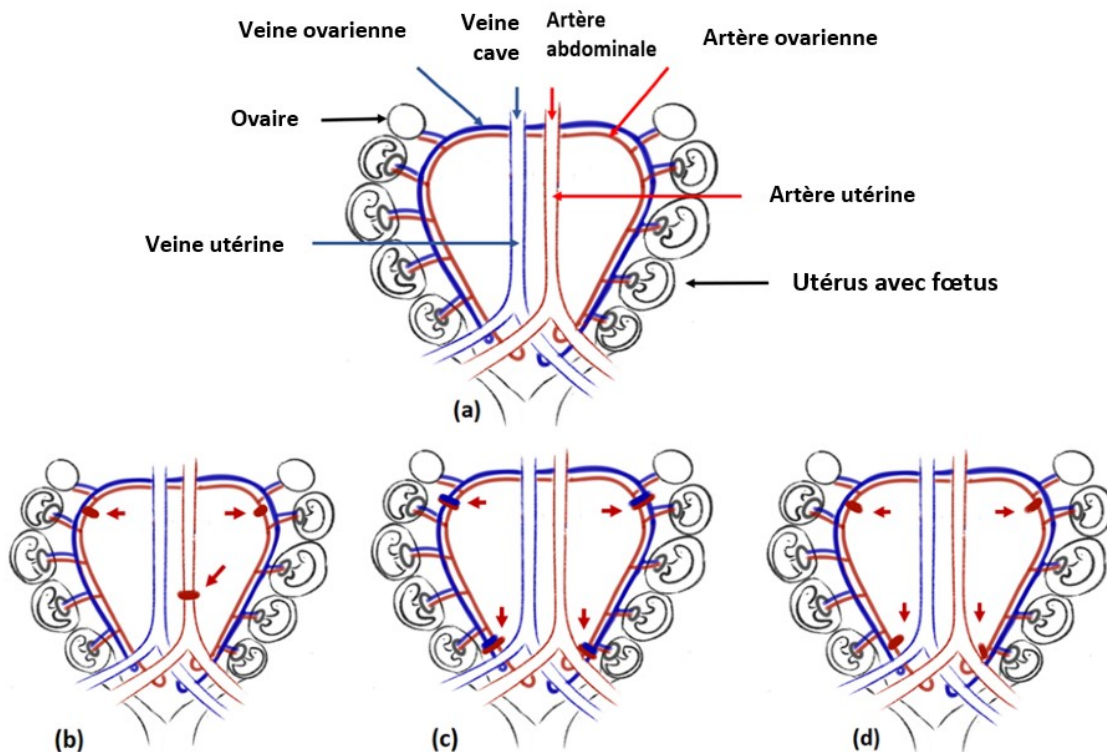


Figure 4. – Représentation du modèle RUPP¹¹⁵. Image modifiée et copiée de l'article de revue de Sakowicz et al. (2022) ; A. Utérus de la rate sans modification; B. Modèle conventionnel : clips placés autour de l'artère utérine et sur les arcades bilatérales des artères ovariennes ; C. Nouveau modèle : clips placés sur les branches des artères et veines utérines de l'arcade vasculaire des vaisseaux ovariens ou utérins ; D. Modèle sélectif : clips placés sur les artères utérins et ovariens.

La dysfonction endothéliale est une autre caractéristique de la PE. Physiologique, la sécrétion de NO par les cellules endothéliales va causer une vasodilatation. Cette substance est produite lorsque eNOS métabolise la L-arginine. L'inhibition de la production de NO va non seulement empêcher la vasodilatation des vaisseaux, mais des études ont démontré que l'inhibition de NO chez des modèles animaux cause une hypertension avant et durant la grossesse, une protéinurie vers la fin et une hypoxie placentaire. Ainsi, un modèle animal a été créé en injectant un inhibiteur compétitif de l'enzyme NO synthase endothéliale (eNOS), soit l'ester méthylique de nitro-L-arginine (L-NAME). Cette substance est injectée dans l'animal entre les de JG 9 et 11, autrement dit, en début de grossesse. L-NAME peut être injecté soit dans les souris C57Bl/6 ou les rats Sprague-Dawley. Son effet est présent dès le JG 13 avec une hypertension élevée. Celle-ci est présente jusqu'au JG 16 et elle est accompagnée d'une protéinurie et d'une dysfonction glomérulaire. De plus, le poids à la naissance des fœtus et le poids du placenta sont significativement plus petit que la normale. Bien que ce modèle présente des signes cliniques de la PE semblables que chez la femme, il n'empêche que ce n'est pas un modèle de choix pour l'étude la physiopathologie de la PE. La raison pour cela est que le dysfonctionnement de la synthèse de NO dans la PE semble se produire localement dans les AS et non dans le placenta, et les mécanismes de production et de dégradation dans ce tissu n'étant pas encore bien connus.¹¹⁵

Finalement, le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) a beaucoup été étudié pour comprendre la physiopathologie de la PE. Qu'est-ce que le RAAS ? Il s'agit d'un système de régulation de la pression artérielle, des fluides et de l'homéostasie des électrolytes. Pour ce faire, le foie va

sécréter la substance précurseur, soit l'angiotensinogène (AGT). Par la suite, les reins vont sécréter la rénine afin de cliver l'AGT en angiotensine (Ang)-1. Celui-ci sera ensuite converti en Ang2 via l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA).¹²⁰ L'Ang2 est par la suite convertie en Ang1-7 à l'aide de ECA2. L'Ang1-7 peut être obtenu aussi par la conversion de Ang1 en Ang1-9 via ECA2. Ensuite, Ang1-9 est converti en Ang1-7 par ECA.¹²¹ RAAS a deux voies de signalisation : la voie classique et la voie alternative. Les substrats d'angiotensine vont se lier à trois récepteurs couplés à la protéine G : AT1-R, AT2-R et MAS1. Dans la voie classique, AT1-R est principalement localisé au niveau des reins, des muscles vasculaires lisses, des poumons et du foie. L'Ang2 va s'y lier pour favoriser la vasoconstriction, la fibrose et l'inflammation. En revanche. Dans la voie alternative, Ang1-7 va se lier au récepteur MAS1. Celui-ci se retrouve principalement sur l'endothélium des vaisseaux sanguins. La liaison de l'Ang1-7 à MAS1 va favoriser la baisse de la pression artérielle en stimulant la sécrétion de NO, comme dans la voie classique, pour la vasodilatation. De plus, cette voie va stimuler la production des PG anti-inflammatoires et réguler le transport sodique.¹²² Le modèle animal utilisé dans le cadre de ce mémoire a été fourni par Dre Julie Lavoie, chercheuse au centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM). Ses collègues et elle ont développé ce modèle il y a une dizaine d'années. Il s'agit d'une souris de PE obtenu par l'accouplement d'une souris femelle surexprimant l'angiotensinogène humaine (A+) et une souris mâle surexprimant la rénine humaine (R+). La progéniture qui en résulte à la suite de cet accouplement peuvent être de quatre génotypes différents : A-R-, A+R-, A-R+ et A+R+. Ce dernier est le modèle qui va développer une PE superposée à une hypertension chronique durant la grossesse. Cela est causé par le relâchement de la rénine par le placenta dans la circulation sanguine de la mère, déclenchant des symptômes de PE. De plus, la souris A+R+ développe une HC (≥ 50 mmHg) avant la grossesse et une concentration élevée sérique d'Ang2, créant une dysfonction endothéliale. Des études ont démontré des résultats cliniques similaires à la PE chez l'humain, tels que la baisse de PIGF, l'augmentation de l'expression ARNm du sFlt-1 dans le placenta, une pression artérielle moyenne plus élevée que la normale et une protéinurie sévère durant la grossesse.^{123; 124}

2.4.2 Autres modèles

Bien que les modèles murins soient les plus utilisés pour l'étude de la PE, d'autres modèles non conventionnels sont disponibles. Des études ont été effectuées chez le singe, particulièrement chez le singe vert d'Afrique. Celui-ci est connu pour développer de l'hypertension durant l'âge adulte. Très peu d'études ont été effectuées en utilisant ce modèle. Toutefois, Weaver et al. ont démontré que quelques-uns de ce modèle développent une hypertension et ont une restriction de croissance fœtale durant la grossesse, des caractéristiques similaires à la PE.¹²⁵ D'autres études ont été réalisées chez le singe rhésus. Les résultats ont démontré que lorsque la pression de perfusion placentaire est réduite, la pression artérielle augmente chez les primates enceintes. En revanche, une autre équipe de recherche ont trouvé qu'il y a une invasion profonde des TBs durant la grossesse, ce qui correspond à l'inverse de ce qu'il a été prouvé chez l'humaine chez laquelle on retrouve une invasion peu profonde des TBs, limitant la dilatation des AS. Chez le babouin olive, la réduction du débit aortique a permis d'augmenter la pression artérielle. Certaines femelles ont développé une protéinurie et un retard de croissance fœtale. Il est possible de réduire le flux sanguin utérin en plaçant des clips sur les artères utérines, comme chez le modèle RUPP pour augmenter la pression artérielle.¹²⁶ L'utilisation des primates pour l'étude de la PE est très intéressante, puisque l'humain et le singe ont une très grande similarité. Cependant, les inconvénients sont la longue période de gestation, les naissances simples et les dépenses très coûteuses pour maintenir un environnement adéquat pour ces primates.¹¹⁴

Chapitre 3 – La thrombospondine-1

3.1 Origine et fonctions

La thrombospondine-1 (THBS1) est une glycoprotéine comprenant trois chaînes de hydrate de carbone, pesant environ 450 kDa. Elle a été isolée dans les granules α des plaquettes sanguines humaines en 1990. C'est le premier facteur endogène inhibiteur de l'angiogenèse qui a été découverte.^{127; 128} La THBS1 inhibe l'adhésion, la migration, la motilité et la survie des cellules endothéliales. Elle peut induire l'apoptose s'il y a un nombre limité de facteurs pro-apoptotiques.¹²⁹ La THBS1 fait partie du groupe A de la famille des thrombospondines qui est composée de cinq membres. Le groupe A représente les thrombospondines qui ont des sous-unités trimériques. Le rôle principal de la THBS1 est la régulation de la matrice extracellulaire. De plus, la THBS1 dirige la formation des complexes multiprotéiques qui vont déterminer le phénotype cellulaire.¹³⁰ C'est une protéine endogène inhibitrice de l'angiogenèse. Ainsi, elle inhibe la migration des cellules endothéliales ainsi que la néovascularisation. Les effets de la THBS1 sur la croissance tumorale sont bien décrits. Elle est une cible thérapeutique potentielle pour inhiber cette croissance puisqu'il s'agit d'une protéine endogène anti-angiogénique. En plus d'inhiber l'angiogenèse, la THBS1 inhibe aussi l'activité du VEGF qui est un facteur important pour la migration cellulaire endothéliale. Elle va se lier avec le VEGF ce qui causera sa clairance dans la matrice extracellulaire. De plus, elle induit l'apoptose des cellules endothéliales et supprime la signalisation du NO.¹²⁷

3.2 Structure

La THBS1 possède plusieurs domaines qui vont se lier à différents récepteurs. Parmi ceux-ci, on retrouve le récepteur LRP1 (low-density receptor-related protein) qui va lier la THBS1 via une liaison glycosaminoglycane-dépendante. La THBS1 possède trois domaines de répétition TSRs qui peuvent inhiber le signal de transduction du VEGF. De plus, ces domaines vont diminuer la phos-

phorylation du récepteur VEGFR2 qui joue un rôle important dans la perméabilité du VEGF à travers les membranes cellulaires. Cette phosphorylation peut être aussi diminuée par la THBS1 s'il y a une association entre les récepteurs CD36 et l'intégrine $\beta 1$ ¹²⁷

Le premier domaine est le N-terminal qui a comme fonction de contribuer au désassemblage de l'adhésion focale ainsi qu'à l'endocytose ou la clairance de la THBS1. Ce domaine interagit seulement avec les protéines qui se trouvent au niveau de la matrice extracellulaire ainsi que celles qui sont en surface cellulaire. On y retrouve des sites de liaisons pour la calréticuline (CAL), LRP1, les intégrines et l'héparine entre autres.¹³¹

Le deuxième domaine est procollagénique, une séquence répétée, aussi connu sous le nom du domaine facteur von Willebrand de type C. Il est impliqué dans l'activité anti-angiogénique mais son mécanisme est encore inconnu. Par la suite, on retrouve deux autres séquences répétées TSR 1 et 2 (*Thrombospondin type 1 repeats*). Le premier est aussi impliqué dans l'activité anti-angiogénique de la THBS1, mais elle permet l'activation du TGF- β qui est latent. Le récepteur principal associé à ce domaine est le CD36. La deuxième séquence est composée de trois modules EGF (*Epidermal Growth Factor*) qui vont activer indirectement le récepteur EGFR. Cela sera utile à l'adhésion cellulaire. L'avant dernier domaine, TSR3, a comme fonction de lier le calcium. Finalement, le domaine C-terminal va interagir avec le récepteur CD47 qui est un récepteur extrêmement important pour l'activité anti-angiogénique de la THBS1. De plus, le CD47 joue un rôle dans la vascularisation du tissu musculaire lisse, mais aussi dans la modulation des cellules T.¹³¹

3.3 Mécanismes dans les cellules endothéliales

La THBS1 peut se lier à plusieurs récepteurs via ses domaines pour ses diverses fonctions. Elle va se lier aux récepteurs CD36, CD47, LRP1 (*LDL receptor-related protein 1*) et aux intégrines. Les récepteurs CD36, CD47 et LRP1 sont ceux qui sont importants pour l'action anti-angiogénique de la THBS1. Premièrement, lorsqu'elle se lie à CD36, cela permet l'inhibition de la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Le CD36 est une glycoprotéine transmembranaire plaquettaire d'environ 88 kDa, qui fait partie de la famille des récepteurs scavenger de classe B. Il est le récepteur de la THBS1, THBS2 et le collagène.^{132; 133} CD36 est impliqué dans les mécanismes d'inflammation, des lipides, de l'immunité et d'angiogenèse. CD36 est exprimé dans plusieurs

cellules mammifères, telles que les cellules endothéliales, les microglies, les macrophages, les plaquettes et les adipocytes^{133; 134}. Ce récepteur est composé d'un domaine extracellulaire, de deux domaines transmembranaires et de courtes chaînes cytoplasmiques.¹³⁵ CD36 va induire l'apoptose des cellules endothéliales en se liant au domaine TSR1 de la THBS1. Cette liaison va recruter Fyn, un proto-oncogène tyrosine kinase, ce qui déclenchera l'activation de la cascade des MAPK via p38. Cela va activer la production des protéases caspase 3-like, précisément la caspase 3 et causer la mort cellulaire des cellules endothéliales.^{127; 136} Par ailleurs, le complexe THBS1-CD36 peut s'associer au récepteur VEGFR2 pour former un complexe en recrutant la phosphatase SHP1. Chul et al. ont démontré que SHP1 va déphosphoryler VEGFR2, inhibant la phosphorylation de ce récepteur par sa liaison au VEGF. Ainsi, la voie pro-angiogénique est inhibée et son effet anti-angiogénique domine.¹³⁷

LRP1, ou CD91, est un récepteur d'environ 600 kDa faisant partie de la famille des récepteurs LDL.¹³⁸ Cette famille de récepteur sont des récepteurs endocytaires, autrement dit, ils régulent la concentration des ligands extracellulaires en internalisant les ligands dans des vésicules intracellulaires recouverts de clathrine.¹³⁹ LRP1 s'exprime particulièrement dans les hépatocytes, les neurones et dans les syncytiotrophoblastes du placenta.¹⁴⁰ LRP1 est composé de deux chaînes matures formés par des endoprotéases furin-like à partir d'un compartiment du trans-Golgi. La chaîne extracellulaire α pèse 515 kDa et comporte quatre clusters de séquences répétées complement-like (CCRs) qui servent de sites de liaisons. Les CCRs sont séparés par une séquence répétée EGF. La chaîne transmembranaire β pèse 85 kDa et elle est reliée de façon non covalente à sa chaîne homologue.¹⁴¹ LRP1 contient une protéine chaperonne RAP (*receptor-associated protein*), d'environ 39 kDa¹⁴². Lorsque LRP1 se lie à la THBS1 via le domaine N-terminale, il induit le désassemblage de l'adhésion focale. Pour ce faire, la liaison THBS1-LRP1 va se recruter la CAL pour former un complexe, ce qui active une cascade de signalisation des MAPK. Ainsi, cela cause la phosphorylation de Src et FAK et active PI3K et ERK. Cela induit désassemblage de l'adhésion focale cellulaire. Lorsque LRP1 n'est pas relié à la CAL, il va se lier à la THBS1 via le domaine N-terminal également, mais cela va déclencher l'endocytose dans la cellule endothéliale à l'aide des HSPG¹⁴³. Cette internalisation crée la dégradation de la THBS1 et élimine ainsi ses fonctions. LRP1 peut aussi induire la clairance du VEGF. En effet, le complexe THBS1-LRP1 vont capturer le VEGF

et déclencher l'internalisation du complexe, causant la clairance du VEGF. ¹³⁹ De plus, LRP1 peut causer l'internalisation du récepteur de VEGF, VEGFR2. Lorsque celui-ci se lie au VEGF, LRP1 va se lier au récepteur, causant l'internalisation du complexe nouvellement formé dans la cellule. Cette internalisation peut être inhibée en utilisant un antagoniste de RAP pour compétitionner pour la liaison au LRP1. ¹⁴⁴

CD47, connu aussi sous le nom de IAP (*integrin-associated protein*) est une protéine associée à une intégrine d'environ 50 kDa ¹⁴⁵ Il fait partie de la superfamille des immunoglobulines qui possède un domaine N-terminal extracellulaire IgV. ¹⁴⁶ Il contient un domaine extracellulaire globulaire, cinq domaines transmembranaires et un domaine cytoplasmique à épissage variable. CD47 va se lier à la THBS1 via son domaine C-terminal. Cette liaison va moduler la production de NO, causant une vasoconstriction des vaisseaux. ^{147; 148} Premièrement, la production de NO sera régulée par l'inhibition de la signalisation du VEGF. Physiologiquement, dans les cellules endothéliales, CD47 va se lier au VEGFR2. Lorsque CD47 se lie à la THBS1 dans les cellules endothéliales, il va s'associer au récepteur VEGFR2, ce qui va déclencher son autophosphorylation par le recrutement de la phospholipase C γ (PLC γ), de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et la kinase Src. Cela permet d'activer eNOS pour la production de NO, molécule essentielle pour la perméabilité vasculaire. ¹⁴⁹ Cependant, la liaison de CD47 à la THBS1 augmente les ROS. Ce complexe va inhiber la production de la guanylate cyclase soluble (sGC), médiée par le NO endogène et exogène, qui produit la guanosine monophosphate cyclique (cGMP). De plus, le complexe va inhiber la production de la cGMP kinase I (cGK-I), obtenu par la conversion du cGMP. Ainsi, la perméabilité vasculaire est perdue et cela impacte l'angiogenèse. Une augmentation d'entrée de calcium dans la cellule endothéliale augmente aussi l'expression d'eNOS. ¹⁵⁰

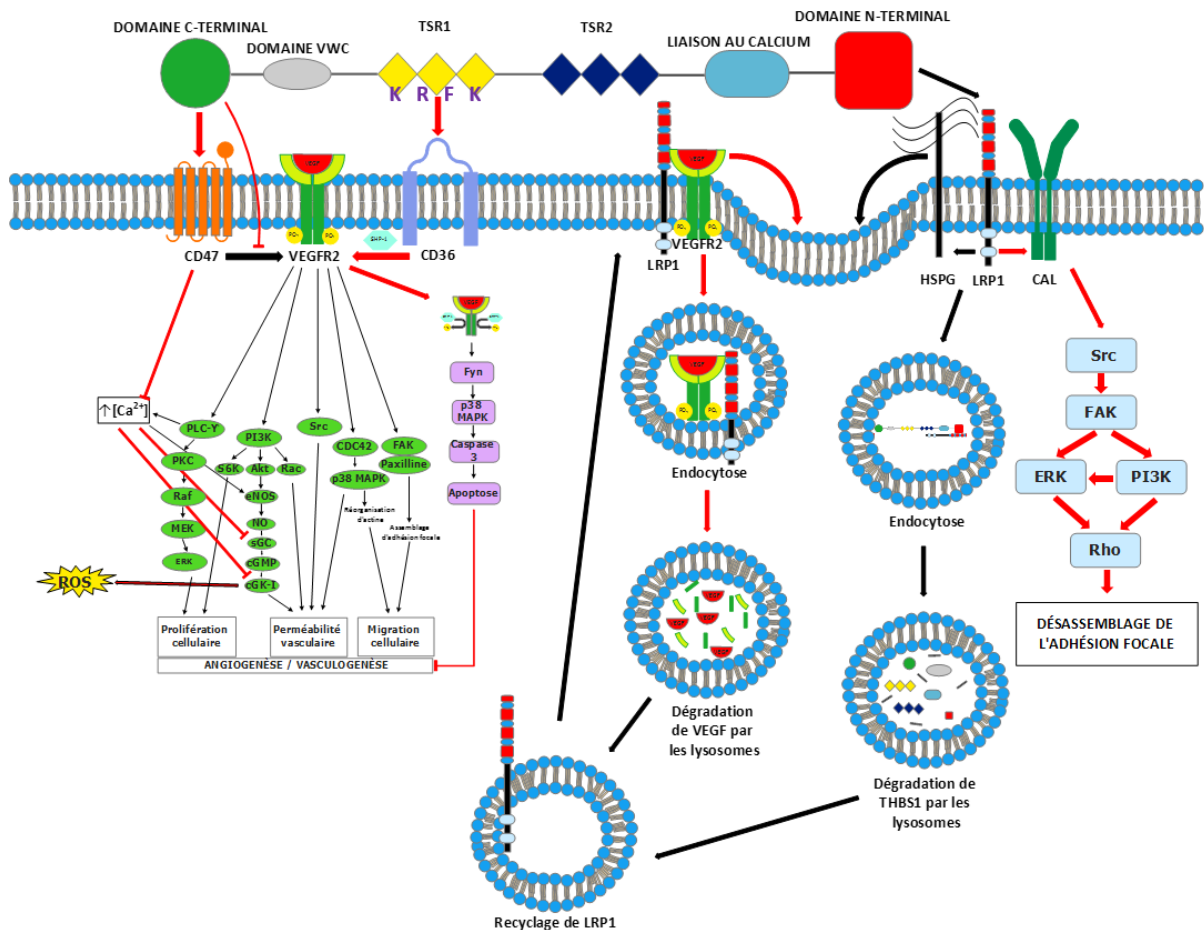


Figure 5. – Schéma des mécanismes d’action anti-angiogénique de la THBS1. Les flèches rouges représentent les effets anti-angiogéniques et les flèches noires représentent les effets pro-angiogéniques

Finalement, la THBS1 va se lier aussi aux intégrines. Celles-ci sont des glycoprotéines de surface cellulaire et elles sont impliquées dans les interactions entre les cellules et la MEC ainsi que dans l’adhésion cellule-cellule. Elles possèdent des hétérodimères de sous-unités α et β . Chacune de ces sous-unités contient une protéine transmembranaire de multidomains extracellulaires, un domaine transmembranaire à passage unique et une queue cytoplasmique courte.^{151; 152} La THBS1 va se lier aux intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$ et $\alpha3\beta1$ sur différents types de cellules.¹⁵³ Elle va interagir principalement avec $\alpha\beta3$ via la séquence RGD du domaine TSR3 par une réduction

partielle des ponts disulfures.¹³³ Certaines intégrines auront différentes fonctions lorsqu'elles se lient à la THBS1, pro ou anti-angiogénique, dépendamment du domaine sur lequel elles se lieront.

3.4 Rôle de la THBS1 dans différentes maladies

La THBS1 est une molécule que l'on retrouve dans les plaquettes sanguines. Malgré son effet anti-angiogénique, la THBS1 présent dans les plaquettes peut conférer un rôle protecteur dans certaines maladies cardiovasculaires (MCV). La THBS1 peut aussi inhiber la formation de thrombus.¹⁵⁴ Le facteur VWF est une glycoprotéine sécrétée par les cellules endothéliales. Son rôle est important dans l'adhésion plaquettaire et dans la formation de thrombus.¹⁵⁵ Ce facteur circule dans le sang sous forme de multimères, composés d'homodimères liés par des ponts disulfures. Ces multimères peuvent être clivés, mécanisme connu sous le nom de cisaillement de monomère, par la métalloprotéinase ADAMTS13 (*α disintegrin-like and metalloproteinase 13*) par hydrolyse ou par la THBS1 en clivant les ponts disulfures. Lorsque le taux de cisaillement augmente, l'agrégation plaquettaire augmente aussi et le thrombus devient de plus en plus gros, augmentant les risques d'un blocage artériel. La THBS1 peut cliver les ponts disulfures des monomères, réduisant la taille de ce thrombus.¹⁵⁶ Donc, la THBS1 aurait un effet protecteur sur la thrombose vasculaire.

L'expression de THBS1 dans les cellules endothéliales est largement régulée positivement par la thrombine via l'activation du récepteur 1 activé par les protéases (PAR-1) dans ces cellules.¹⁵⁷ Ceci est important car il a été démontré que les taux de thrombine dans le sang ainsi que l'expression de PAR-1 dans le placenta sont augmentés dans la PE.^{158; 159}

Par ailleurs, la THBS1 peut aussi avoir des effets dévastateurs comme dans le cancer. Elle est un des facteurs employés par les cellules cancéreuses pour leur croissance cellulaire. L'adhésion de ces cellules est médiée par la liaison de la THBS1 à différentes intégrines, dépendamment du type de cancer. De plus, la THBS1 semble aussi jouer un rôle dans la circulation des métastases. La sécrétion de THBS1 par les cellules cancéreuses leur permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte afin d'éviter leur destruction. Le récepteur CD47 est présent sur la surface des cellules immunitaires, soit les macrophages, les cellules (NK) et les cellules T CD8⁺ et la THBS1 va s'y lier. Cette interaction va inhiber la réponse immunitaire. De plus, le récepteur CD47 présent sur les cellules cancéreuses va interagir avec SIRPα sur les macrophages pour induire une signalisation «

Ne me mangez pas », empêchant la destruction phagocytaire des cellules cancéreuses.¹⁶⁰ Par la suite, elle va diminuer l'adhésion des cellules cancéreuses en augmentant l'activateur de l'urokinases du plasminogène (uPA) circulant et le récepteur de l'uPA (uPAR) au niveau de leur surface cellulaire. La liaison de l'uPa avec son récepteur va permettre la production de plasmine à partir de plasminogène. La production de plasmine va activer des protéases, MMP particulièrement, et causer la dégradation de la MEC. Cette dégradation va engendrer de l'inflammation, causant l'infiltration des leucocytes dans les cellules tumorales et favoriser la circulation des métastases.¹⁶¹ De plus, la production de plasmine va causer l'activation des facteurs de croissance latent. Ceux-ci auront une action paracrine sur les cellules tumorales, stimulant leur croissance cellulaire et leur invasion.¹⁶² Une des approches thérapeutiques en développement et encore testée pour le traitement de certaines tumeurs est l'utilisation d'un inhibiteur de la THBS1. Cette inhibition peut se faire via la voie du TGF- β .

Chapitre 4 – Transforming growth factor-beta

4.1 Origine et fonctions

La superfamille des (TGF- β) est un groupe de régulateur, composée de plus de 30 membres. On retrouve, entre autres, les TGF- β , les activines, les inhibines, les *bone morphogenetic proteins* (BMP), les *growth and differentiation factors* (GDF) et les *glial-derived neurotrophic factors* (GDNF).¹⁶³ La cytokine TGF- β a été découverte pour la première fois dans des fibroblastes de foie de rat dans les années 80¹⁶⁴. Les TGF- β chez les mammifères sont sécrétés par les fibroblastes et les cellules épithéliales et trois isoformes ont été découvert : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Il s'agit d'une cytokine dite pléiotrope, autrement dit, elle a plusieurs fonctions.¹⁶⁵ Initialement, il a été découvert que la fonction principale de ce facteur de croissance était d'induire la croissance des fibroblastes et la production de collagène.¹⁶⁴ Quelques années plus tard, des études supplémentaires ont permis de déterminer que le TGF- β avait d'autres fonctions. Il possède des effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs. En effet, il est impliqué dans la différenciation des cellules Treg par la présence de l'IL-2. En revanche, si la présence d'Il-6 est prédominante, la différenciation cellulaire devient de type inflammatoire. De plus, TGF- β a un effet chimiotactique en recrutant les monocytes au site de lésion.¹⁶⁶ Cette cytokine est connue pour jouer un rôle important dans la fibrose en activant le programme fibrotique. Physiologiquement, TGF- β va contribuer au renouvellement et à l'homéostasie des tissus. Toutefois, dans des conditions pathologiques, il va réguler l'inflammation et la cicatrisation et induire le dépôt de la MEC.¹⁶⁷ Finalement, TGF- β est un régulateur important pour la croissance tumorale. En effet, au début de la formation de la tumeur, TGF- β va avoir une fonction apoptotique et suppresseur de tumeur, ce qui inhibe l'inflammation excessive pour le développement d'une tolérance tumorale. Pendant la progression du cancer, TGF- β va induire l'exclusion des lymphocytes T, la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM), la migration, l'invasion et la progression des cellules cancéreuses.¹⁶⁷

4.2 Isoformes et Structures

Comme mentionné plus tôt, trois isoformes de la cytokine TGF- β ont été découverts. Ces trois isoformes ont un poids moléculaire de 25 kDa. Le premier, TGF- β 1, est la forme la plus abondante et majoritairement sécrétée chez les mammifères. Il est localisé principalement dans les cartilages, l'endochondrale et dans la partie intermembranaire des os et de la peau.¹⁶⁸ Par la suite, TGF- β 2 a été découvert dans des cellules glioblastome humain. Cet isoforme peut inhiber la croissance dépendante de l'interleukine-2 des lymphocytes T. TGF- β 2 est exprimé par les astrocytes ainsi que les neurones dans le système nerveux embryonnaire. Finalement, le troisième isoforme, TGF- β 3, a été isolé à partir d'une lignée de cellules d'un rhabdomyosarcome. Ce dernier isoforme semblerait avoir un effet anti-cicatrisant, contrairement aux deux premiers, mais sa fonction ainsi que son mécanisme restent toujours incompris.¹⁶⁹

TGF- β 1 à 3 sont initialement synthétisés sous forme de monomère, le pré-pro-TGF- β , c'est-à-dire, ils contiennent une séquence de peptide signal N-terminal, une région appelée le *latency-associated peptide* (LAP) et une séquence C-terminal qui représente la forme active.¹⁶⁸ Les trois isoformes sont très homologues avec une identité de séquence pour les régions actives de 71 à 79%. Cependant, les régions LAP diffèrent avec une identité de 36 à 51%.¹⁷⁰ L'enzyme disulfure isomérase (PDI) va créer une liaison entre deux monomères pour former le pro-TGF- β composé de deux séquences LAP et deux séquences C-terminal. Par la suite, une autre enzyme, la furine, causant une protéolyse. Celle-ci mène à la création d'un petit complexe latent de TGF- β qui est maintenu par des liaisons non covalents. Ce nouveau complexe va maintenir le TGF- β sous une forme inactive, l'empêchant de se lier à ses récepteurs.¹⁶³ La section LAP du petit complexe latent va se lier de manière covalente à une grande protéine latente de liaison pour former un grand complexe latent. Celui-ci est important pour la fonction du TGF- β 1. Seuls les TGF- β 1 et 3 contiennent la séquence de reconnaissance d'intégrine RGD, leur permettant de se lier à certaines intégrines. Le nouveau grand complexe va interagir avec des composants de la MEC pour s'y lier via les intégrines. Cette liaison permettra la libération du TGF- β mature, qui est possible par l'effet et la présence de molécules, telles que des métalloprotéinases matricielles, les plasmines, les ROS ou la THBS1.¹⁷¹

4.3 Mécanismes d'action

Lorsque le TGF- β est activé par la libération de sa séquence LAP, il va se lier au complexe récepteur du TGF- β pour déclencher sa signalisation. C'est un complexe récepteur hétérotétramère composé de deux sous-unités de type I, T β RI, et deux de type II T β RII. Ces sous-unités sont des glycoprotéines transmembranaires qui contiennent un domaine N-terminal extracellulaire qui va se lier au ligand, une section transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire qui a une activité sérine-thréonine protéine kinase.¹⁶³ Dans un premier temps, TGF- β va se rapprocher des sous-unités T β RII, ce qui va causer leur autophosphorylation. Par la suite, il y a la phosphorylation des résidus sérines/thréonine du domaine GS, qui contient une séquence riche en glycérine et sérine, de la sous-unité T β RI, déclenchant l'activité kinase de celui-ci.¹⁷² Dans le cas du TGF- β 2, un autre récepteur est essentiel, la β -glycane ou T β RIII, pour une liaison adéquate au T β RII.¹⁷⁰ Les sous-unités de type III ne peuvent transmettre de signal dû à l'absence d'un domaine possédant une activité sérine/thréonine.¹⁶⁸ Cette sous-unité peut lier deux ligands de TGF- β via une liaison covalente, ce qui augmente la concentration de TGF- β sur la surface cellulaire. Cette augmentation de concentration permet de maximiser les interactions entre le TGF- β et les sous-unité I et II.¹⁷³

La phosphorylation de T β RI par T β RII va induire la phosphorylation des protéines Smads, la voie canonique du TGF- β . Les Smads sont des facteurs de transcription cytoplasmique latents. Ces protéines sont divisées en trois groupes : les *receptor-regulated* Smads ou R-Smads (Smad 1, 2, 3, 5 et 8), les communs ou co-Smads (Smad 4) et les inhibiteurs ou I-Smads (Smad 6 et 7). Le récepteur T β RI va phosphoryler les sérines des Smad 2 et Smad 3 sur leur partie C-terminale. Le complexe Smad 2/3 va recruter le Smad4 pour former un trimère et celui-ci sera transloqué vers le noyau pour la régulation de la transcription génique cible du TGF- β .¹⁶⁴ Le T β RI va phosphoryler les Smads 1, 5 et 8 pour la signalisation du BMP.¹⁷⁴ Lorsque le complexe Smad 2/3/4 est transloqué dans le noyau, il va former un complexe nucléaire avec d'autres facteurs de transcription et réguler la transcription des gènes cibles.¹⁷³

Une autre voie de signalisation des ligands de TGF- β peut être activée : la voie non canonique. La voie via TAK1 est la voie non-canonique dominante pour la fonction du TGF- β .¹⁷⁵ Cette voie permet l'activation des GTPase Rho, des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), des ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), du JNK (*c-Jun amino-terminal Kinase*), de la MAPK p38, de la PI3K et du p53.^{176; 177} Trois de ces voies sont importants pour la régulation cellulaire. Tout d'abord, le TGF- β peut activer les ERK1/2. La liaison du ligand sur le complexe T β RI/T β RII va entraîner une phosphorylation des tyrosines des récepteurs. Cela va permettre la phosphorylation de la protéine d'échafaudage ShcA par le T β RI et le recrutement des protéines de liaison Grb2 (*Growth factor receptor binding protein 2*) et Sos (*Son of sevenless*) pour la formation d'un complexe. Celui-ci va activer la GTPase Ras pour ensuite activer Raf, MEK et finalement ERK1/2. Cette MAPK-ci peut phosphoryler les Smads. Cette voie favorise la survie et la prolifération cellulaire et la TEM.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰

Ensuite, la liaison du ligand au complexe récepteur peut activer la voie PI3K par l'autoubiquitylation de TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*). Par la suite, TRAF6 va ubiquitiner à son tour la sous-unité p85 de PI3K, conduisant à son activation et au recrutement de la protéine kinase B AKT. L'activation de PI3K par les récepteurs de TGF- β permet aussi d'activer le mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*), qui par la suite peut phosphosphoryler AKT pour son activation.¹⁷⁹ Cela induit l'activation de mTORC1 et la kinase S6 (S6K). Cette voie interagit avec la voie des Smads pour la transcription génique. AKT peut réguler l'activité de Smad3 en inhibant sa phosphorylation ou en empêchant sa dégradation. De plus, AKT peut réguler l'apoptose et la TEM. Cette voie va induire l'augmentation de la synthèse protéique et réguler la motilité, la taille et l'invasion cellulaire.¹⁸¹

La voie RhoA est impliquée dans la régulation de la formation du cytosquelette dans la motilité cellulaire. Les GTPases RhoA sont activées lors de leur phosphorylation par le complexe récepteur.¹⁷⁹ Cela permet d'activer ROCK (*Rho-associated protein kinase*) et induire la formation de fibres de stress durant l'TEM. Cette voie peut aussi conduire à la dissociation des jonctions serrées par le recrutement de Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*) et Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), ce qui active la signalisation de la protéine PAK (*p21-activated kinase*).¹⁸¹

Finalement, la dernière voie est la voie de signalisation via TAK1 (*TGF-β-activated kinase 1*) pour la cascade de signalisation de JNK et p38 MAPK. Cette voie est impliquée dans la régulation de divers processus, tels que l'inflammation, la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose. Le complexe TβRI/TβRII va recruter TRAF6, causant l'autoubiquitylation de celui-ci. Cela facilite la liaison du TAK1 au complexe lors de sa polyubiquitylation à sa lysine 63. Par la suite, TAK1 va agir en MAPK kinase kinase (MAPKKK) pour déclencher une cascade des MAPK. Autrement dit, son activation va causer l'activation des MAPKK, MKK4 et MKK3/6, pour l'activation de JNK et p38 MAPK respectivement. La polyubiquitylation de TAK1 est possible à l'aide de ligase E3 TRAF4 pour l'activation de la signalisation de p38 MAPK.^{179; 181} TAK1 peut aussi activer le NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) via la kinase IKK (*IkappaB kinase*). Cette voie de signalisation peut agir avec les Smads, en les phosphorylant, pour la régulation de l'apoptose et de l'EMT via un contrôle de l'activité des facteurs de transcription.¹⁷⁹⁻¹⁸¹

TGF-β est un régulateur de l'activation des cellules endothéliales via deux récepteurs de type I, soient ALK1 et ALK5. Ce dernier est exprimé dans la quasi-totalité des tissus, mais ALK1 est exprimé principalement au niveau des cellules endothéliales et durant l'embryogenèse. Bien que plusieurs études ont démontré le mécanisme d'action du TGF-β dans l'angiogenèse, leurs résultats sont contradictoires. En effet, certaines équipes de recherche mentionnent que lorsque le TGF-β se lie à ALK5, cela active la voie de signalisation canonique via Smad2/3 et induit l'expression de PAI-1 (VOIR ABBRÉVIATION) et de la fibronectine, causant l'inhibition de la prolifération et la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes. À l'inverse, lorsque le TGF-β se lie au récepteur ALK1, cela active la voie de signalisation des Smad1/5, favorisant la prolifération et la migration cellulaire endothéliale.^{182; 183} En revanche, d'autres équipes pensent que l'interaction TGF-β/ALK5 aurait plutôt un effet pro-angiogénique en promouvant la phase d'activation de l'angiogenèse et que l'interaction TGF-β/ALK1 a plutôt un effet anti-angiogénique.^{184; 185} Cependant, tous les écrits sont d'accord sur un aspect : il est important de maintenir un équilibre entre ALK1 et ALK5 afin de contrôler les effets du TGF-β sur l'endothélium.¹⁸⁶

4.3 Interaction avec la THBS1

Comme mentionné plus tôt, le TGF- β contient une séquence LAP qui est reliée à sa partie C-terminale, ce qui représente la séquence active du TGF- β . Une conformation complète avec la séquence LAP constitue la forme inactive du TGF- β . Toutefois, le TGF- β peut se lier à d'autres molécules pour son activation. C'est le cas, entre autres, de la THBS1. Sur le peptide LAP se trouve une séquence conservée leucine-serine-lysine-leucine (LSKL) qui va se lier à la séquence lysine-arginine-phénylalanine-lysine (KRFK) du domaine TSR1 de la THBS1. L'interaction entre les deux séquences induit un changement de conformation du TGF- β , lui permettant de se lier à ses récepteurs.

La liaison de la THBS1 à la séquence LSKL du TGF- β est devenue une cible thérapeutique intéressante. En effet, le peptide LSKL exogène est un antagoniste compétitif qui va inhiber l'activation du TGF- β par la THBS1 via une interaction compétitive de la séquence KRFK de la THBS1 et le LAP du TGF- β latent.¹⁸⁷ Le peptide LSKL a été testé pour le traitement de diverses conditions. À la suite d'une hépatectomie, l'administration du peptide LSKL chez la souris va induire la progression du cycle cellulaire, ce qui accélère la production d'hépatocytes et permet une rapide régénération du foie.¹⁸⁸ Dans un cas de sclérodermie chez la souris, le peptide LSKL permet de réduire l'activation des MAPK ERK, réduit, par le fait même, l'expression des protéines fibrinogènes. De plus, l'inhibition de la THBS1 va inhiber la contraction des fibroblastes sclérotiques.¹⁸⁹ Finalement, le peptide LSKL a été efficace dans le traitement des cicatrices hypertrophiques. Son administration permet de réduire considérablement l'épaississement de ces cicatrices, tout en baissant l'expression du collagène I et de l'actine alpha des muscles lisses, α -SMA (*alpha smooth muscle actin*). Le LSKL activerait la voie PI3K/AKT/mTOR afin de réduire l'épaississement des cicatrices hypertrophiques.¹⁹⁰

Concernant l'angiogenèse, la majorité des études sur l'effet du LSKL sur la vascularisation se concentre sur les maladies tumorales. Aucune étude n'a encore été effectuée pour évaluer l'effet du peptide LSKL sur l'angiogenèse par la voie du TGF- β . Sachant que la THBS1 est un facteur anti-

angiogénique, il serait intéressant d'évaluer l'effet de son inhibition ciblée sur la fonction d'activation du TGF- β latent, particulièrement au niveau des problèmes de vascularisation, telle que la PE.

Chapitre 5 – Projet de recherche

5.1 Justification

Les mécanismes provoquant des altérations vasculaires lors d'une grossesse prééclampsique ne sont pas encore bien compris. Bien que les mécanismes angiogéniques classiques, notamment le VEGF et le PlGF, puissent être dysfonctionnels et que des facteurs anti-angiogéniques tels que s-Flt1 et sEng soient connus pour prévaloir pendant la grossesse, les origines des altérations vasculaires et les mécanismes soutenant les déficiences vasculaires dues aux grossesses prééclampsiques sont largement inconnus et devraient être mieux compris. De telles connaissances sont importantes pour accélérer la découverte, le développement et les tests de nouveaux médicaments permettant de normaliser la vascularisation placentaire et de prévenir ou traiter le dysfonctionnement placentaire, qui est au cœur de la progression de la PE. Nous reconnaissons qu'il est difficile de trouver une cible thérapeutique suffisamment sûre pour la mère ainsi que pour le fœtus.

Le THBS1 est un facteur anti-angiogénique bien reconnu qui a été largement étudié dans certains cancers et plus récemment associé à certaines maladies cardiovasculaires. Ses multiples voies anti-angiogéniques peuvent être liées à la physiopathologie de la prééclampsie sous de nombreux aspects, par exemple la régulation des effets du VEGF et du VEGFR, la production de NO, la mobilité et la maturation cellulaire. Ses multiples mécanismes en aval impliquant l'activation des récepteurs CD47, CD36 et LRP1, ainsi que l'activation directe du TGF- β sont essentiels pour générer les effets anti-angiogéniques de la THBS1 dans différents types de cellules et dans différentes conditions de stress. On ne sait toujours pas si la THBS1 peut être un mécanisme régulant l'angiogénèse dans le placenta, et plus spécifiquement activé au cours de la PE. De telles connaissances pourraient aider à l'identification de thérapies spécifiques ciblant des domaines et composants

clés liées à la THBS1 dans une condition de PE, en tant qu'un outil ciblé pour améliorer la vascularisation placentaire, avec un bénéfice étendu pour les circulations maternelles et fœtales.

L'identification d'un inhibiteur ciblé de l'activation du TGF- β par la THBS1, LSKL, est également une justification pour poursuivre davantage d'études sur ce peptide et ses mécanismes, ainsi que sur l'effet potentiel qu'il peut avoir sur la fibrose et vascularisation placentaire. Il est important de dire que le LSKL n'a jamais été testé pendant la grossesse et en cas de PE, et que ses mécanismes moléculaires ne sont pas encore complètement connus sur le système cardiovasculaire.

Donc, ce mémoire décrira des études visant à combler ces lacunes, à étudier un nouveau mécanisme anti-angiogénique potentiel dans la PE et à tester les effets d'une nouvelle petite molécule, le LSKL, sur cet effet et cette condition spécifique.

5.2 Hypothèse et objectifs

L'hypothèse de l'étude est que l'expression de la THBS1 est régulée positivement dans les placentas des grossesses prééclamptiques et que le traitement par LSKL peut améliorer l'angiogénèse et la vascularisation placentaire dans cette condition.

L'objectif principal est de décrire l'expression de la THBS1 dans les placentas d'un modèle murin de grossesse prééclamptique et de tester les effets du LSKL *in vivo* sur la vascularisation placentaire et *in vitro*, sur la capacité angiogénique des cellules endothéliales placentaires humaines. Plus spécifiquement, cette étude visait à :

- 1) Décrire l'expression de la THBS1 et ses récepteurs principaux dans un modèle de grossesse prééclamptique chez la souris.
- 2) Évaluer les effets du LSKL exogène *in vivo* sur la vascularisation placentaire chez la souris développant une PE spontanée.
- 3) Évaluer les effets du LSKL *in vitro* sur la capacité angiogénique des cellules endothéliales placentaires humaines qui sont exposées à des conditions de stress similaires à la PE.

Chapitre 6 – Matériels et méthodes

6.1 Modèle animal

Des souris femelles transgéniques (total 22 souris avec 8-10 semaines d'âge) surexprimant la rénine humaine (souche Ren9) et l'angiotensinogène humaine (souche 204/1) sont fournies par le laboratoire du Dre Julie Lavoie (Centre de Recherche du CHUM, Montréal, Canada). Les souris sont accouplées avec des mâles C57BL/6 (souche 27, Charles River, Canada) en fin de journée. Une sonde est insérée dans le vagin de la souris au jour de gestation (JG) 0,5 afin de vérifier la présence d'un bouchon vaginal, signe d'un accouplement réussi. Les souris enceintes sont pesées aux JG 10,5, JG 14,5 et JG 18,5 pour le suivi de leur grossesse. Le peptide LSKL et son peptide contrôle SLLK (280 μ M) sont injectés sous cutané dans la zone dorsale au JG 14,5 chez les souris de PEs et contrôle (n=4-7/groupe). Au JG 18,5, l'isoflurane (4 :1% d'oxygène) est utilisé comme anesthésie et les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Les placentas et les fœtus sont collectés et pesés. Une partie des placentas collectés par portées a été congelée par l'azote liquide et l'autre partie est fixée dans du formaldéhyde. Les queues des fœtus sont collectées pour le génotypage de la progéniture. Les cœurs fœtaux ont été collectés à l'aide d'un stéréomicroscope et regroupés par portée. Les tubes contenant les cœurs fœtaux ont été conservés dans de l'azote liquide pendant le prélèvement de tissus. Tous les échantillons congelés ont été conservés au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le Comité d'Éthique en Expérimentation Animale du CIUSSS du Nord-de-l'île-de-Montréal (#BERM01 et #BERM03) et ont suivi les lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux.

6.2 Préparation des échantillons pour le Western blot

Les cœurs fœtaux et les placentas collectés sont découpés sur de la glace sèche et mis dans un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma-Aldrich, P2714) et de tampon de lyse Ripa (ThermoFisher, 89901). Les tissus sont broyés par sonication. Par la suite, le lysat est mélangé et centrifugé

à 13 000 RPM dans une température environnante de 4°C. Le surnageant est collecté et la solution-mère est conservée à -80°C. La quantification des protéines est réalisée en utilisant des concentrations de BSA (*Bovine serum albumin*) entre 0 et 2 000 µg/mL pour la courbe de standardisation sur microplaque. Des triplicatas de chaque échantillon ont été chargés dans la microplaque. La quantification des protéines a été effectuée par la méthode de Lowry en utilisant le kit de dosage protéique (Bio-Rad, 5000116). La concentration est déterminée à une longueur d'onde de 750 nm et à une température de 25°C, à l'aide de l'appareil *Enspire* (PerkinElmer). Finalement, les concentrations des solution-mères de chaque échantillon sont calculées pour obtenir une concentration finale de 5 µg/µL pour un volume final de 200 µL.

6.3 Western blot

Les échantillons et le marqueur du poids moléculaire (1610373, Bio-Rad) sont chargés sur un gel SDS-PAGE variant de 8% à 15%, dépendamment du poids moléculaire de la protéine recherchée. Après le transfert, les membranes de nitrocellulose sont bloquées par un tampon de blocage de BSA (1% BSA, TBS 1X, 0,2% Tween) pour les protéines phosphorylées ou un tampon prêt à être utilisé (927-70001, Licor). Par la suite, les membranes sont incubées durant la nuit à 4°C ou à température ambiante pendant 15 minutes avec l'anticorps primaire de dilution de CD36 (1 :1000, Abcam), CD47 (1 :1000, Abcam) TGF-β1 (1 :1000, ab215715, Abcam), de TGF-β2 (1 :1000, ab36495, Abcam), de p-Smad2 (1 :1000, 18338S, Cell Signaling), de p-TAK1 (1 :1000, 9339S, Cell Signaling), de p-p38 (1 :1000, 9211S, Cell Signaling), de p38 (1 :1000, 9212, Cell Signaling), de ERK (1 :1000, 9102S, Cell Signaling) ou de p-ERK (1 :1000, 9101S, Cell Signaling). Finalement, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire conjugué à des colorants pour la fluorescence goat anti-mouse IRDye® 800CW (1 :10000, 925-32210, Licor) et goat anti-rabbit IRDye® 680RD (1 :5000 à 1 :10000, 926-68071, Licor). La quantification des protéines se fait en utilisant un anticorps d'une protéine de ménage, la tubuline (1 :500, T9026, Sigma-Aldrich). La révélation des bandes se fait à l'aide de l'appareil *Odyssey* (Licor). Le logiciel ImageJ a été utilisé pour l'analyse et la quantification des protéines.

6.4 Immunohistochimie

Les échantillons de placenta murins sont conservés 48 heures dans du Tissufix (Chaptec, CHPT500) puis nettoyé et transféré dans du PBS à 4°C jusqu'à utilisation. Les placentas humains sont conservés dans du Tissufix jusqu'à l'obtention du consentement de la patiente pour participer à l'étude. Ils sont ensuite nettoyés et conservés dans du PBS également.

Les échantillons sont placés dans des cassettes puis sont déshydratés, infiltrés et enrobés de paraffine avec le processeur de tissu automatisé Leica JUNG TP1050. Les cassettes sont plongées dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante (70% à 100%) puis dans du xylène et finalement, de la paraffine. Ce processus d'environ 10 heures est fait sous vide afin de faire pénétrer la paraffine dans le tissu. Les tissus sont ensuite placés dans un moule et enrobés de paraffine. Les échantillons placentaires sont coupés avec un microtome (Reichert Jung, Modèle 2030) à 5 µm d'épaisseur puis placés sur une lame histologique.

Après la préparation des lames, celles-ci sont placées dans un four à une température de 47°C durant la nuit afin de faire fondre la paraffine. L'immunohistochimie (IHC) est débutée 24h après la fonte. Une étape de déparaffinisation et de réhydratation est effectuée pour enlever l'excès de paraffine. Ceci consiste à incuber les lames dans un bain de xylène puis dans des bains d'éthanol de concentration décroissante allant de 100% à 50% pendant 3 minutes chaque. La réhydratation est complétée par 2 bains d'eau distillée de 5 minutes chaque. Les lames sont ensuite chauffées au micro-onde ou dans un bain-marie à 95°C pendant 10-15 minutes dans une solution TRIS-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,05% Tween) de pH 9,0 pour la récupération d'antigène. Les lames sont par la suite rincées et les tissus sont bloqués avec une solution de BSA (1% BSA, 0,1% Tween) durant 30 minutes. Une fois le blocage terminé, les échantillons sont recouverts d'une solution d'anticorps primaire de THBS1 (1 :100, ab263905, Abcam) ou de CD31 (1 :50, ab28364, Abcam) dilués dans un tampon de dilution, *signal stain* (8112L, Cell signaling) durant la nuit dans une chambre noire et humide à 4°C. Le lendemain, après avoir rincé les lames avec du PBS, les tissus sont recouverts d'un anticorps secondaire (1 :500, ab6721, Abcam) dilué dans du PBS pendant 30 minutes. Les lames sont de nouveau rincées et recouvertes d'une solution de DAB 5X pendant 10 minutes, protégées de la lumière. L'ajout de l'hématoxyline permet une meilleure visualisation

de la morphologie du tissu. Finalement, l'étape de déshydratation et le montage des lames avec une lamelle à l'aide de Permount (Sigma) finalisent l'immunohistochimie.

L'image avec le plus de marquage DAB spécifique (coloration brune) par section a été analysée à l'aide du logiciel Fiji. Premièrement, l'aire totale occupée par le tissu sur l'image a été déterminée en nombre de pixel. Par la suite, l'image a été traitée en ajustant automatiquement la luminosité et le contraste avant d'effectuer la déconvolution des couleurs afin que seul le brun reste sur l'image. La luminosité et le contraste ont été ajustés manuellement afin de mieux visualiser les structures des vaisseaux et réduire le marquage brun non-spécifique. L'image a été convertie en image binaire noire et blanche et le nombre de pixels blancs, correspondant à l'aire brune spécifique marquée par le DAB, a été mesuré. Le nombre de pixel blanc a été divisé par l'aire totale de tissu sur l'image afin d'obtenir un pourcentage représentatif de la quantité de brun sur la section. Pour chacune des lames, un pourcentage a été obtenu pour chacune des sections, soit deux pourcentages par lame. Les pourcentages obtenus entre deux sections d'un même échantillon sont relativement semblables. La moyenne des deux pourcentages obtenus pour chacune des lames a été calculée afin d'obtenir un seul pourcentage représentatif de l'échantillon. Cependant, dans le cas où l'IHC aurait mal fonctionné sur une des sections, deux images d'une même section ont été analysées. Dans un tel cas, les nombres de pixels blancs des deux images ont été additionnés puis divisés par la somme des deux aires totales.

6.5 Extraction cellulaire à partir des tissus placentaires

6.5.1 Extraction de cellules de placentas de souris

Chez la souris, immédiatement après la collecte, les placentas de chaque souris enceinte au JG 18,5 sont collectés et lavés dans du tampon PBS, regroupés par portées et placés dans des tubes contenant des milieux DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Les tissus du placenta ont été hachés manuellement et sont suspendus dans une solution de digestion (collagénase 0,1 U et dispase 0,8 U/mL) sous agitation pendant une heure à une température de 37°C. Les tissus digérés sont filtrés à l'aide de filtres cellulaires, lavés avec du DMEM + 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) et centrifugés. L'isolement des cellules endothéliales CD31+ se fait en utilisant des Dynabeads

marqués à la streptavidine (Invitrogen) prétraités avec un anticorps anti-mouse CD31 biotinylé (Invitrogen) et un séparateur magnétique. La culture cellulaire se fait dans une plaque à 6 puits (10^5 cellules/puits) revêtue de collagène de type I et elle est conservée avec un milieu EndoMax (Wisent) à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules qui n'ont pas adhéré au collagène après 24 heures sont aspirées et celles qui sont adhérentes sont lavées et cultivées avec de l'EndoMax. Le changement du milieu se fait à chaque 2-3 jours durant 14 jours, à la suite de la formation de groupe de colonies de cellules endothéliales. Après 14 jours, les colonies individuelles sont marquées et isolées. Des cylindres de clonage et de la trypsine à 0,25% sont utilisés afin d'améliorer la pureté des colonies et celles-ci sont cultivées dans des flacons de culture tissulaire T25. Lorsque la confluence atteint 80-90%, les cellules sont stockées ou utilisées pour une évaluation fonctionnelle.

6.5.2 Extraction de cellules de placentas humains

Des cellules endothéliales placentaires humaines ont été extraites à partir de placentas provenant de grossesses saines à l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal. Un protocole a été préalablement approuvé par le Comité d'Éthique de Recherche Clinique du CIUSSS Nord-de-l'Île-de-Montréal (#2019-1654). Les placentas ont été collectés et immédiatement transférés dans un récipient contenant une solution froide (1/1) de DMEM-High-Glucose (Wisent Inc, Canada) et une solution saline (Baxter Corp, Canada) avec 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent Inc, Canada). Les placentas ont été conservés au réfrigérateur jusqu'à leur transport quelques heures (maximum 6 heures) après le prélèvement. Les placentas ont été lavés avec une solution saline. De petits blocs du placenta, d'environ 1 cm³, du côté maternel et du côté fœtal ont été sectionnés des quadrants du placenta, hachés et les zones fibreuses ont été retirées avant la digestion du tissu avec une solution de 1 mg/mL de collagénase/dispase (Roche™) dans du DMEM et incubées dans rotateur de résolveur de tube à 37°C pendant 2 à 4 heures.

Les suspensions digérées ont été filtrées à l'aide de tamis cellulaires (BD Falcon) de 100 µm puis de 70 µm. Les suspensions cellulaires filtrées ont été lavées avec du DMEM+10% FBS (Gibco) pour arrêter la réaction enzymatique et centrifugées à 3 500 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont été remises en suspension dans PBS (*Phosphate Buffered Saline*) + 0,1% FBS (Wisent Inc., Canada). Ensuite, les suspensions cellulaires ont été incubées avec streptavidine

Dynabeads™ M-280 (Invitrogen, ThermoFisher) prétraitée avec un anticorps anti-CD31 humain biotinylé (Invitrogen). Postérieurement, les cellules endothéliales (CD31+) ont été isolées du pool cellulaire à l'aide d'une colonne magnétique DynaMag-5™ (Invitrogen, ThermoFisher), lavées avec PBS+0,1% FBS et remises en suspension dans Endomax (Wisent Inc., Canada). Les cellules endothéliales ont été étalées dans des plaques à 6 puits recouvertes de collagène de queue de rat de type I (Corning) à une densité de 2×10^5 cellules/puits et maintenues dans des conditions de culture cellulaire standard (chambre humidifiée, maintenue à 37°C avec 5% CO₂), en utilisant un milieu EndoMax complété par des suppléments EndoMax-2 (Wisent Inc., Canada) pour la croissance des cellules endothéliales et 1% de pénicilline/streptomycine (Wisent Inc, Canada). Les milieux ont été changés tous les 2 à 3 jours, la culture cellulaire a été lavée avec du PBS pour éliminer les débris cellulaires et les billes restantes si nécessaire. Les cultures de cellules endothéliales ont été observées quotidiennement au microscope pour suivre la croissance des colonies de cellules endothéliales. Lorsqu'elles ont atteint une confluence de 85%, les cellules endothéliales ont été passées et développées davantage dans des conditions similaires.

6.6 Traitement cellulaire

Les molécules suivantes ont été utilisées dans des expériences cellulaires: SLLK (HY-P0301A, MedChemExpress), LSKL (HY-P0299A, MedChemExpress), human recombinant THBS1 (ECM002-50, Sigma-Aldrich), thrombin from human plasma (605206-100U, Sigma-Aldrich), SB-505124 (SB, S4696-5MG, Sigma-Aldrich) et (5z)-7-oxozeaenol (OXO, 499610-1MG, Sigma-Aldrich). Les solutions mères de SLLK, LSKL et THBS1 sont préparées avec de l'eau, tandis que les solutions mères de SB et OXO ont été préparées dans une solution aqueuse avec DMSO (10 mg/mL). Les concentrations et conception de chaque expérience cellulaire sont détaillés lorsque les résultats sont décrits.

6.7 Hypoxie cellulaire

Dans toutes les expériences d'hypoxie décrites dans cette étude, les cellules sont exposées à l'hypoxie ou normoxie pendant la durée estimée pour chaque test de formation de tube, qui variait de 1 à 6 heures selon le protocole utilisé. Les cellules en culture ou en formation de tubes ont été

conservées à 8% d'oxygène (O₂, normoxie) ou à 0,5% d'O₂ dans des chambres hypoxiques (Stem-Cell Technologies) placées dans des incubateurs pour le contrôle de la température et avec une mesure continue des gaz dans chaque chambre.

6.8 Capacité de formation de tubes vasculaires

La capacité de formation de tubes vasculaires a été évaluée en étalant des cellules sur une matrice de membrane basale à facteur de croissance réduit Matrigel (Corning). Les cellules purifiées à une densité de 1.5×10^4 cellules dans 150 μ L de milieu ENdoMax avec traitement respectif ont été étalées dans une plaque à 96 puits pré-recouverte de Matrigel. Les cellules ont été incubées sur Matrigel pendant 2-6 heures (dépendamment de l'expérience), dans des conditions de culture cellulaire standard. Les tests ont été effectués en utilisant des cellules du 2^{ème} au 4^{ème} passage en triplicata pour chaque condition de traitement. Un microscope inversé avec fond clair (Axio Imager M2, Zeiss) a été utilisé pour prendre trois photos de chaque puits (objective 10x). Les images ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (National Institute of Health, Bethesda) par une personne formée (non en aveugle) et revues par deux autres personnes formées (en aveugle), nous avons évalué le nombre de branches formées (ne formant pas nécessairement des tubes fermés). Le nombre de tubes fermés a été utilisé comme paramètres pour indiquer la capacité d'angiogenèse.

6.9 Immunofluorescence cellulaire

Les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde à 4 %, bloquées avec un tampon de blocage PBS + 10 % FBS pendant 30 minutes à température ambiante, perméabilisées avec 0,2% Triton-X-100 pendant 5 minutes à température ambiante, et incubé avec des anticorps primaires anti-THBS1 (1:200, Invitrogen) pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire (1:200, Abcam) approprié et les noyaux ont été colorés avec de DAPI (1:500, Sigma-Aldrich) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules lavées ont été montées dans un support antifade SlowFade Gold (Thermo Fisher Scientific) et visualisées à l'aide d'un microscope Zeiss Axio Imager.

6.10 Analyses statistiques

La normalité des données et les variances ont été testées par les tests de Shapiro-Wilk. Le logiciel GraphPad Prism version 8.00 pour Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) a été utilisé pour tous les tests effectués. Le niveau de signification a été établi à $P < 0,05$. Les résultats ont été comparés entre les groupes contrôle et PE par le test t indépendant. Les groupes traités et les expériences cellulaires ont été comparés par one-way ANOVA ou two-way ANOVA suivi du test post hoc de Bonferroni. Les résultats sont présentés dans les graphiques et le texte sous la forme de moyenne \pm écart-type.

Chapitre 7 – Résultats

7.1 Expression et localisation de la THBS1 dans le tissu placentaire

La présence de la THBS1 dans le tissu du placenta a été déterminée par immunohistochimie et western blot. Une lame d'une souris contrôle et PE ont été utilisées pour évaluer la présence de la THBS1. Les Figures 6A-B montrent la membrane ou la caduque basale du placenta chez la souris. Dans la Figure 6A, la THBS1 est principalement concentrée dans la membrane du placenta. Cependant, chez la souris de PE (Figure 6B), la présence de brun se retrouve plus dans le labyrinthe et peu dans la membrane. Les Figures 6C et 6D montrent une image plus claire du labyrinthe. En effet, dans le modèle contrôle, le brun est présent, mais en bordure des villosités. En revanche, la Figure 6D indique la présence de brun partout dans le labyrinthe. Ces résultats signifient que la THBS1 est présente dans le placenta des souris et sa localisation diffère entre les deux modèles.

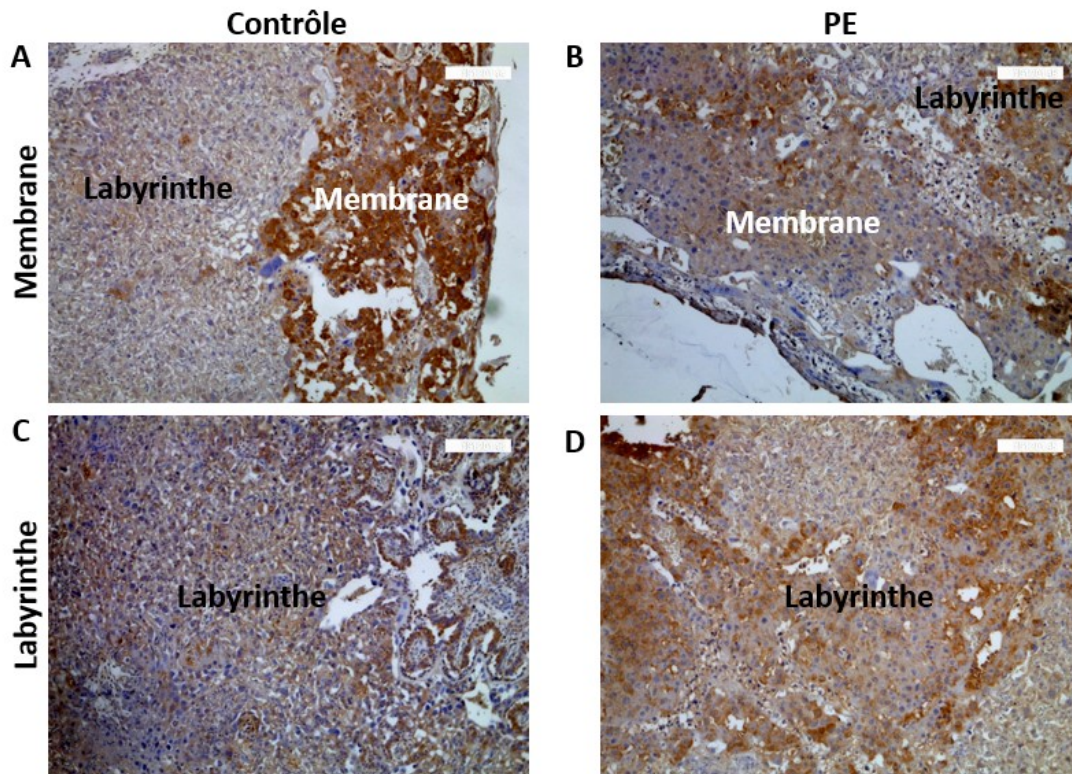


Figure 6. – Immunohistochimie de la THBS1 dans le placenta chez la souris. A. Image de la membrane, ou caduque basale, d'un placenta d'un modèle de souris contrôle ; B. Image de la membrane d'un placenta d'un modèle de souris de PE ; C. Image du labyrinthe, ou villosités, d'un placenta d'un modèle de souris contrôle ; D. Image du labyrinthe d'un placenta d'un modèle de souris de PE.

La même technique d'immunohistochimie a été employée dans les tissus de placenta chez l'humaine. Dans la Figure 7A, similairement à la souris contrôle, chez la femme contrôle, la THBS1 est présente dans les bordures des villosités et dans les vaisseaux, alors que dans le placenta avec PE, on observe une expression plus significative au sein des villosités et dans les vaisseaux. Donc, tout comme la souris, l'expression de la THBS1 semble changer de localisation dans le placenta de grossesse prééclampsique.

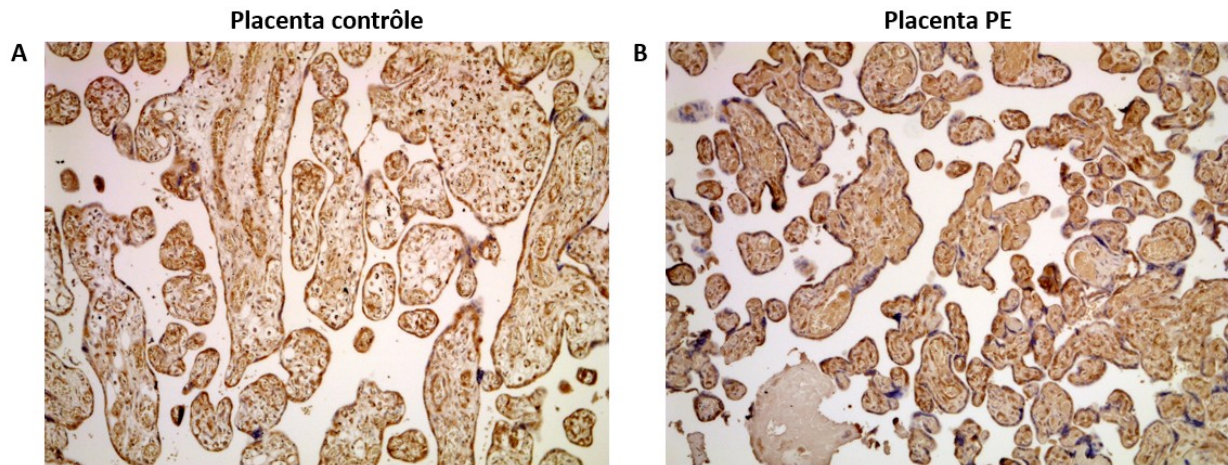


Figure 7. – Immunohistochimie de la THBS1 dans le placenta chez l’humaine. A. Image d’un placenta contrôle à une grosseur de 20X, B. Image d’un placenta prééclamptique à une grosseur de 20X.

La présence de THBS1 a été déterminée également par l’immunofluorescence dans les cellules endothéliales placentaires de souris et humaines. La Figure 8 montre l’expression de la THBS1 dans la membrane et le réticulum endoplasmique de la cellule endothéliale placentaire de souris avec une grossesse PE.

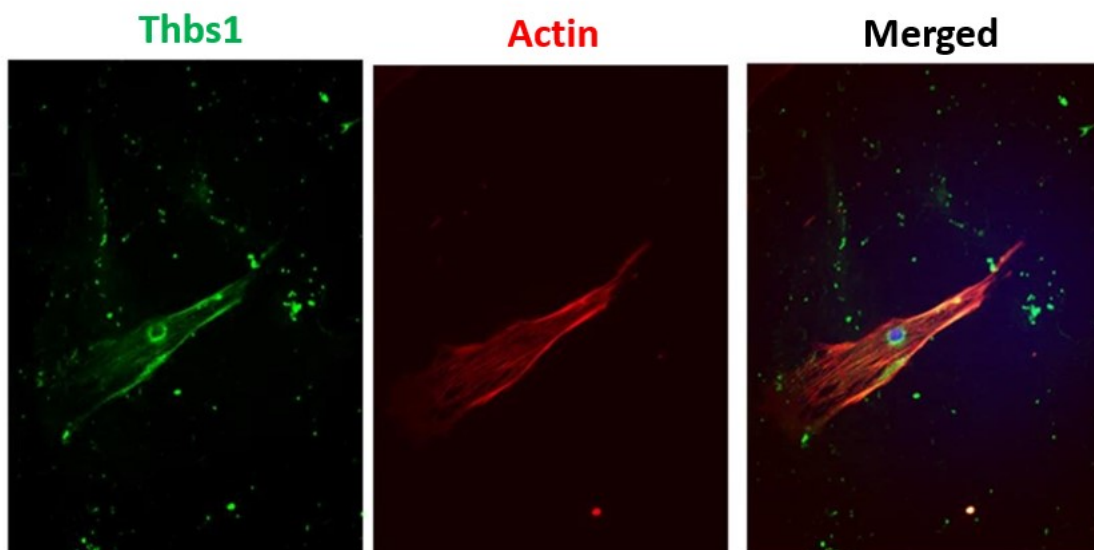


Figure 8. – Immunofluorescence de l'expression de la THBS1 dans les cellules endothéliales placentaires d'un modèle de souris de PE. La THBS1 est exprimée en vert, l'actine en rouge et le DAPI en bleu.

Étant donné que les cellules endothéliales placentaires humaines ont été isolées uniquement de placentas sains, nous avons exposé ces cellules à un environnement stressant similaire à la condition intra-utérine au cours d'une grossesse prééclampsique. Les cellules endothéliales ont été incubées sous hypoxie (0,5% d'O₂) par rapport aux conditions témoins (8% d'O₂), ainsi que sous thrombine (10 unités/mL) pendant 4 heures. Un environnement hypoxique de 8% d'oxygène a été utilisé pour cette expérience pour mimer l'environnement physiologique dans le placenta. La Figure 9 montre de façon préliminaire que dans une condition contrôle, la THBS1 est peu exprimée dans les cellules endothéliales placentaires. Cependant, dans des conditions de stress, nous avons observé différents comportements d'expression de la THBS1. Sous thrombine uniquement, la THBS1 était exprimée dans la zone périnucléaire et du réticulum endoplasmique, tandis que sous hypoxie sévère, la THBS1 était davantage exprimée dans la membrane cellulaire. Il est intéressant de noter que la combinaison des deux facteurs a stimulé une augmentation significative de la THBS1 dans tous ces compartiments cellulaires.

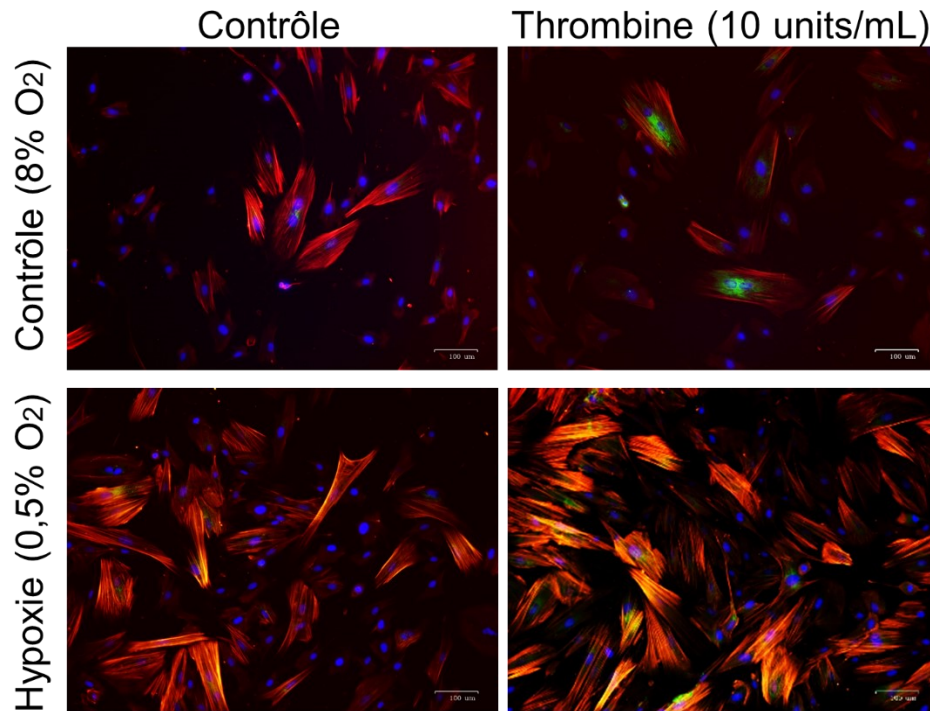


Figure 9. – Immunofluorescence de l’expression de la THBS1 dans les cellules endothéliales placentaires humaines. Les cellules sont exposées à une normoxie (8% d’O₂), à une hypoxie sévère (0,5% d’O₂) et à la thrombine (10 units/mL) pendant 4 heures. La THBS1 est exprimée en vert, l’actine en rouge et le DAPI en bleu.

7.2 Effet anti-angiogénique de la THBS1 dans les cellules endothéliales placentaires

Dans les cellules endothéliales placentaires de souris, l’effet anti-angiogénique de la séquence KFFK de la THBS1 a été testé en traitant les cellules avec du LSKL (Figure 10). Dans un essai, des cellules endothéliales dysfonctionnelles obtenus à partir des placentas de grossesse pré-éclampsique chez la souris ont été traitées avec 30 μ M LSKL ou SLLK, un petit peptide témoin, pendant 6 heures. Nos résultats préliminaires montrent une augmentation du nombre de tubes fermés dans les cellules traitées avec LSKL par rapport au peptide contrôle, confirmant l’effet anti-angiogénique de la THBS1 dans les cellules murines.

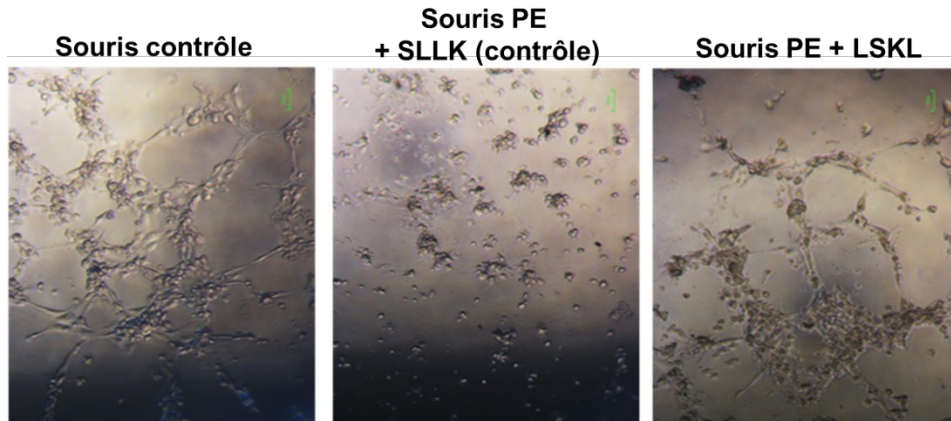


Figure 10. – Capacité d'angiogenèse des cellules endothéliales placentaires de souris contrôle et souris pré-éclampsique (PE) traitée avec le peptide contrôle SLLK (peptide contrôle) ou le peptide actif LSKL (30 μ M, 6 heures).

Dans les cellules endothéliales placentaires humaines, nous avons testé de façon préliminaire si la capacité angiogénique des cellules issues de grossesses saines était altérée par différentes concentrations de THBS1 exogène. Les images de la Figure 11 illustrent une capacité réduite de ramification et de formation de tubes des cellules traitées avec une concentration de THBS1 de 10 nM par rapport au contrôle, 0,1 et 1 nM. Dans une autre expérience, des cellules prétraitées avec 10 nM de THBS1 exogène pendant 2 heures ont été placées sur Matrigel et traitées avec un milieu témoin avec le peptide contrôle ou des concentrations progressivement augmentées de LSKL (0,56 à 280 μ M). Les résultats de la Figure 11B démontrent une capacité progressivement accrue de formation de tubes jusqu'à 56 μ M, un effet toxique possible à des concentrations plus élevées de LSKL (280 μ M).

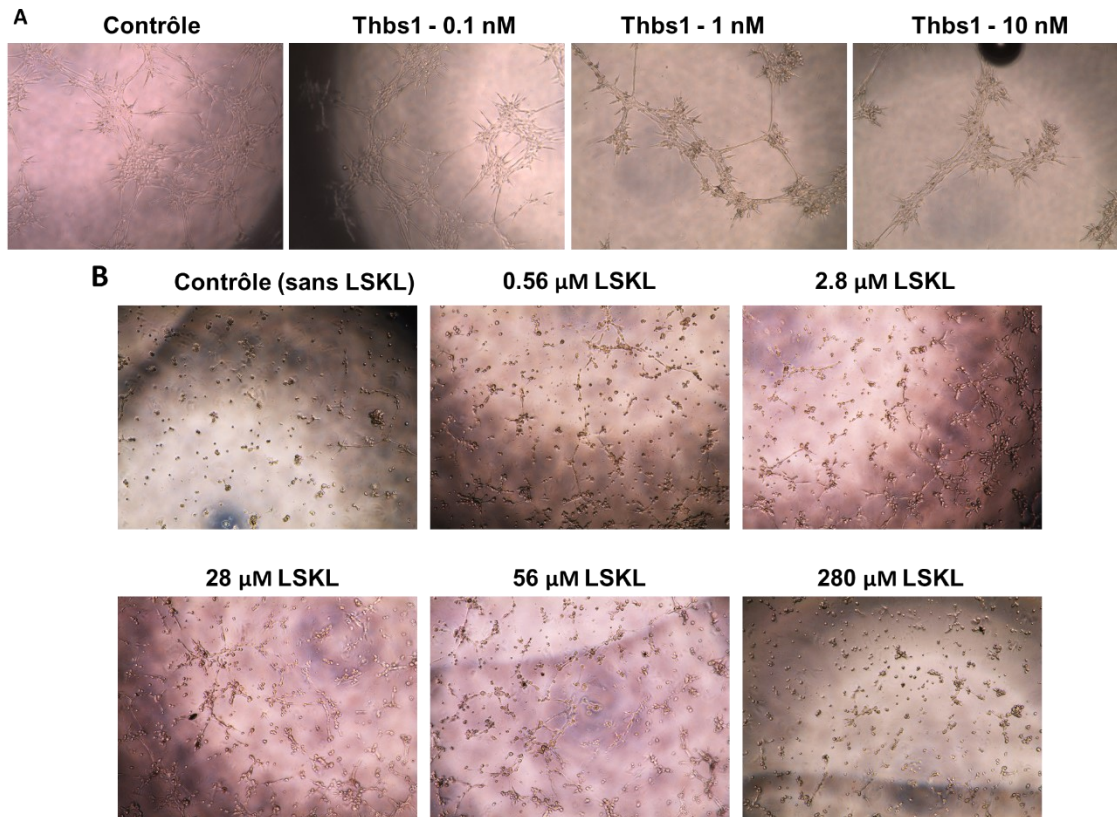


Figure 11. – Capacité anti-angiogénique de la THBS1 dans les cellules endothéliales placentaires humaines. A) Les cellules endothéliales placentaires ont été incubées avec différentes concentrations de THBS1 exogène (0,1 à 10 nM) pendant 4 heures. B) Les cellules endothéliales placentaires ont été prétraitées avec 10 nM de THBS1 pendant 2 heures, puis utilisées dans le test Matrigel sous différentes concentrations de LSKL (0 à 280 μ M) pendant 4 heures.

Dans une autre série d'expériences utilisant des cellules endothéliales placentaires humaines, des cellules exposées à des conditions de stress similaires à l'environnement intra-utérin de la PE ont été traitées avec du LSKL ou un peptide témoin. Les résultats de la Figure 12 montrent une altération similaire de la capacité de formation de tubes dans les cellules exposées soit à l'hypoxie (0,5 % d' O_2), soit à la thrombine (10 unités/mL) ou les deux combinées pendant 4 heures. Le LSKL (30 μ M) a pu améliorer leur capacité angiogénique dans les deux conditions, lorsqu'il est isolé ou combiné.

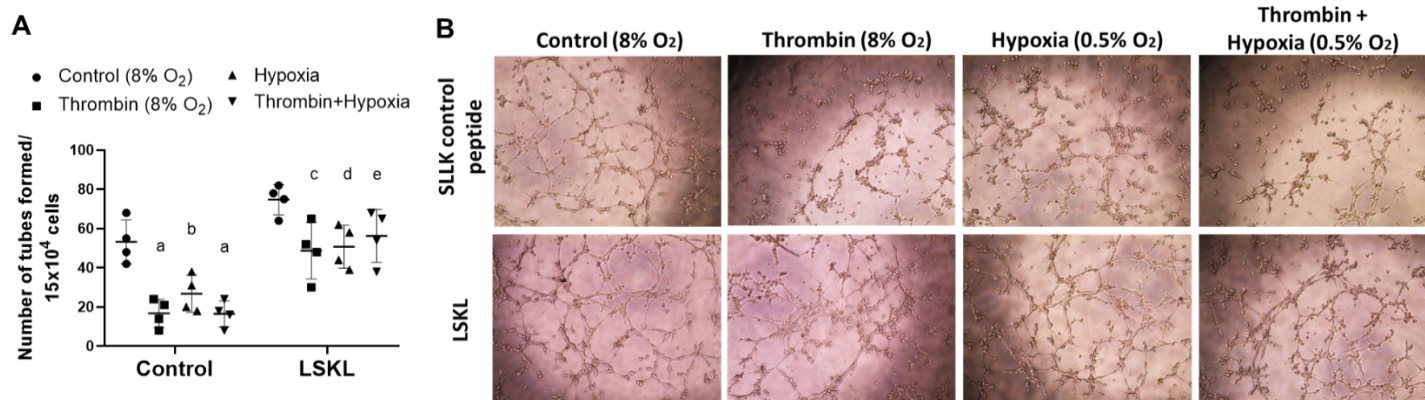
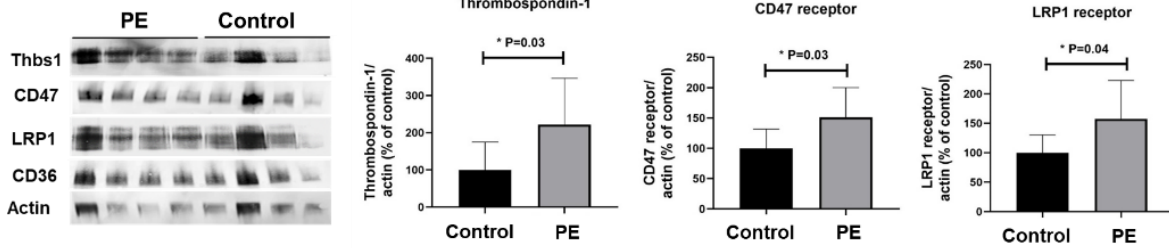


Figure 12. – Capacité angiogénique des cellules endothéliales placentaires humaines exposées à des conditions de stress similaires à l'environnement intra-utérin de la PE. Les cellules ont été exposées à l'hypoxie (0,5 % d'O₂) ou à la thrombine (10 unités/mL) ou aux deux combinées et comparées aux cellules témoins (8 % d'O₂), traitées avec du LSKL ou du peptide témoin SLLK (30 uM) pendant 4 heures. A, nombre de tubes formés sur matrigel par 15x10⁴ cellules et B, illustration représentative des tubes formés sur matrigel dans chaque condition de culture et traitement. ^aP<0.01 et ^bP<0.05 versus contrôle SLLK; ^cP<0.01, ^dP<0.05 et ^eP<0.001 versus le même groupe traité par SLLK.

7.3 Expression protéique de la THBS1 et ses récepteurs chez la souris

L'expression protéique de la THBS1 et de ses principaux récepteurs CD47, CD36 et LRP1 a été mesurée dans les placentas et les cœurs fœtaux prélevés des souris témoins et des souris développant une PE spontanée. Dans les placentas, l'expression de la THBS1 et des récepteurs CD47 et LRP1 était significativement augmentée dans les placentas de souris présentant une PE spontanée (Figure 13A). Dans les cœurs fœtaux, seuls THBS1 et CD47 étaient régulés positivement dans les cœurs de fœtus de souris présentant une PE spontanée (Figure 13B).

A) Placenta



A) Coeur foetal

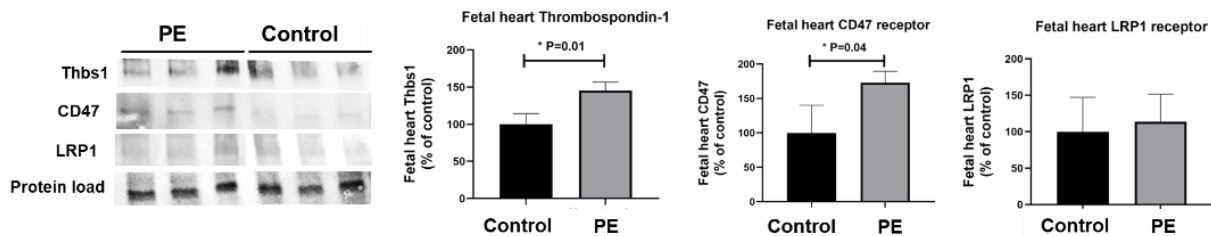


Figure 13. – Expression protéique de la THBS1 et des récepteurs CD47, LRP1 et CD36 dans A) les placentas (n=8/groupe) et B) les cœurs foetaux (n=4/groupe) de souris avec PE témoin ou spontanée. Test t indépendant, *P<0,05.

7.4 Résultats du traitement maternel par LSKL

7.4.1 Données sur la reproduction des souris

Des données sur la taille de la portée, la mortalité foetale et les poids placentaires et foetales ont été recueillies durant toute la période de reproduction. La Figure 14 représente les données statistiques de cette cohorte (n=4/groupe). La Figure 14A représente la taille de la portée. Il n'y a aucune différence significative entre les groupes. Or, la portée semble être plus petite dans le groupe de PE traité avec SLLK et le traitement avec LSKL augmente sa taille. De plus, la Figure 14B indique une tendance à une mortalité plus élevée dans le groupe PE traité avec le peptide témoin. Cet effet n'a pas été remarqué dans le groupe PE traité avec LSKL, ce qui présente un nombre de mortalité foetale similaire à celui des groupes contrôle sans PE. La Figure 14C indique une augmentation significative du poids placentaire dans le groupe PE traité avec le peptide contrôle SLLK par rapport aux deux groupes contrôle sans PE. Le groupe PE traité avec LSKL n'a pas montré la même différence. L'augmentation du poids placentaire dans le groupe PE peut refléter le fait que

ce groupe possède un plus petit nombre de fœtus viables, ce qui peut contribuer à augmenter la taille du placenta pendant la grossesse chez les souris survivantes.

La Figure 14D montre le poids fœtal. Il est possible d'observer qu'il n'y a pas de changement du poids fœtal. Finalement, dans la Figure 14E, un ratio du poids fœtal sur le poids du placenta a été calculé. Aucun résultat significatif n'a été observé entre les modèles et le traitement au LSKL n'a aucun impact. Le ratio, lorsqu'il est réduit, indique un retard de croissance fœtale par rapport au placenta. Le traitement par LSKL n'a pas modifié significativement cette ratio dans les deux groupes même si nous avons observé une différence statistiquement significative entre le groupe contrôle traité avec LSKL versus le groupe PE traité avec le peptide contrôle SLLK, ce dernier ayant un ratio plus faible.

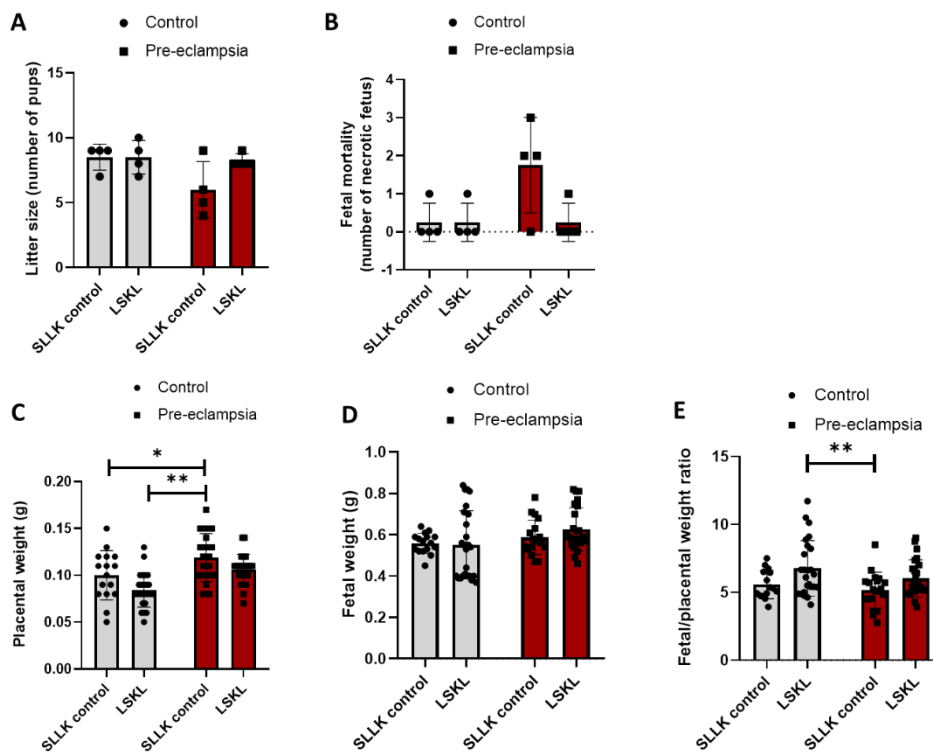


Figure 14. – Données de grossesse après traitement par LSKL ou le peptide témoin SLLK (280 μ M, s.c.) au JG 14 chez la grossesse témoin et PE chez la souris. A) Taille de la portée, B) mortalité fœtale, C) poids du placenta, D) poids fœtal et E) rapport poids fœtal/poids du

placenta. ANOVA bidirectionnelle suivie du test posthoc de Bonferroni. *P < 0,05 et **P < 0,01.

7.4.2 Vascularisation placentaire

L'immunohistochimie du CD31+ a été réalisée afin d'évaluer la vascularisation placentaire. La Figure 15A présente les images prises des lames au microscope. Le brun indique la présence de cellules endothéliales CD31+. Le signal DAB dans l'image de la lame du modèle contrôle traité avec le peptide contrôle SLLK indique une quantité augmentée de vaisseaux dans le placenta. En revanche, la quantité de DAB est significativement diminuée dans le placenta du modèle de PE traité avec ce même peptide contrôle. Lorsque le peptide LSKL est injecté dans le modèle contrôle, il n'y a pas de grande différence comparé au traitement au SLLK. Toutefois, la quantité de DAB est augmentée lors du traitement avec LSKL dans le modèle de PE par rapport au traitement au peptide contrôle SLLK. La Figure 15B représente le graphique de la quantification de CD31+. Il y a une différence significative de la vascularisation placentaire entre les modèles. Aucune différence n'a été observée entre le traitement au LSKL entre les deux modèles. En revanche, l'effet du traitement dans le modèle de PE montre une différence importante et significative.

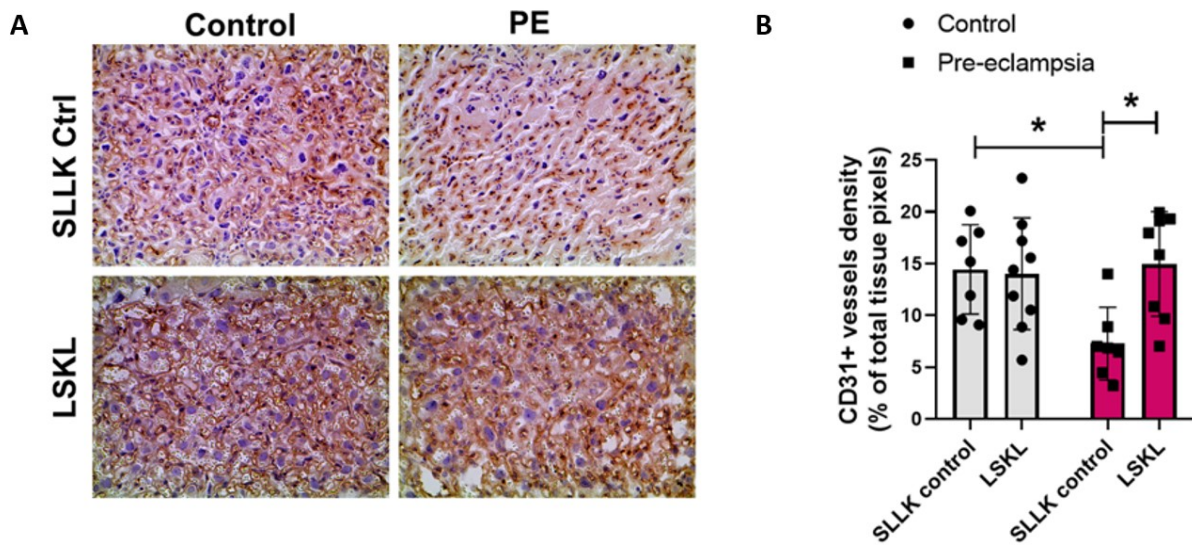


Figure 15. – Immunohistochimie de CD31+ des placentas chez la souris contrôle et PE après le traitement avec LSKL ou le peptide contrôle SLLK (280 μ M, s.c.) au jour 14.5 de gestation.

A) Images représentatives d'immunohistochimie du placenta des souris traitées avec le SLLK ou LSKL dans le modèle contrôle ou PE. B) Résultats de la quantification de l'immunohistochimie. Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc, *P < 0,05.

7.4.3 Expression du TGF- β dans le placenta

Deux isoformes du TGF- β ont été évalués, soit TGF- β 1 et TGF- β 2. Deux bandes ont été observées, chacune correspond à une forme du TGF- β , soit active et latente. Le premier graphique de la Figure 16A montre les résultats statistiques de la forme latente. Il n'y a aucune différence d'expression entre les deux modèles (contrôle avec SLLK vs de PE avec SLLK). Toutefois, l'expression du TGF- β 1 est légèrement diminuée lors de l'administration du LSKL exogène. Cette baisse n'est cependant pas significative. En ce qui concerne la forme active du TGF- β 1, elle est légèrement plus élevée dans le modèle de PE comparé au modèle contrôle. Cependant, l'administration du LSKL ne change quasiment pas l'expression du TGF- β 1 actif. Les résultats pour TGF- β 2 ont une tendance différente (Figure 16B). En effet, il y a une différence significative entre les deux modèles, l'expression du TGF- β 2 latente étant beaucoup plus élevée dans le modèle de PE. L'administration de LSKL chez les contrôles ne change pas l'expression de TGF- β 2, mais elle change significativement chez les souris de PE. Pour la forme active, il n'y a pas de différence significative entre les modèles, le traitements ou l'effet du traitement.

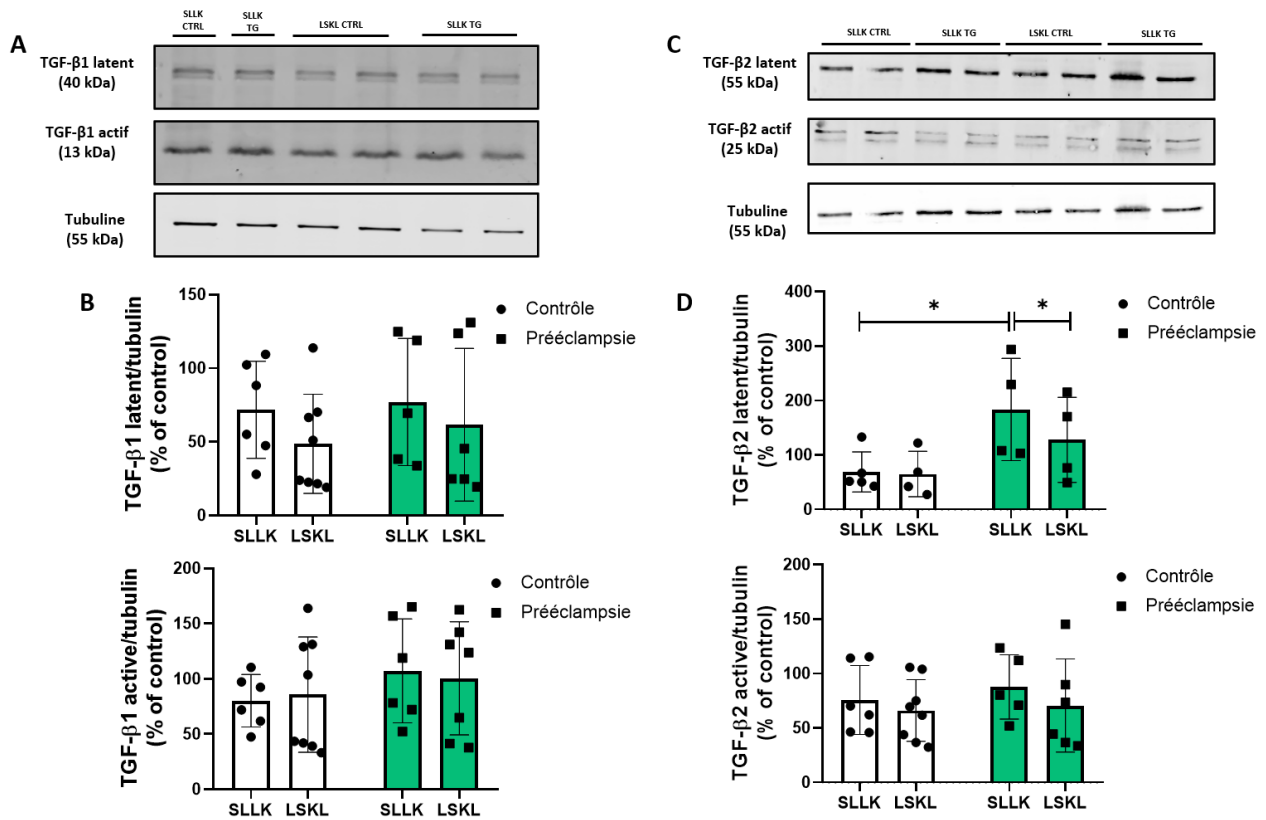


Figure 16. – Expression du TGF- β dans les tissus placentaires de souris. A) Expression de la forme active et latente de l'isoforme TGF- β 1. B) Représentation du TGF- β 2 sur gel 15% SDS-PAGE. C) Expression de la forme active et latente de l'isoforme TGF- β 2. Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc, *P < 0,05.

7.4.4 Expression des voies de signalisation canonique du TGF- β

L'expression des Smads, marqueurs de la voie canonique, a été évaluée. Dans ce cas-ci, seulement l'expression du Smad2 phosphorylé (p-Smad2) a été effectuée (Figure 17). Son expression ne diffère pas statistiquement entre les placentas de souris contrôles par rapport à ceux avec la PE. Le traitement avec le LSKL ne change pas l'expression de p-Smad2 dans le modèle de PE ou contrôle.

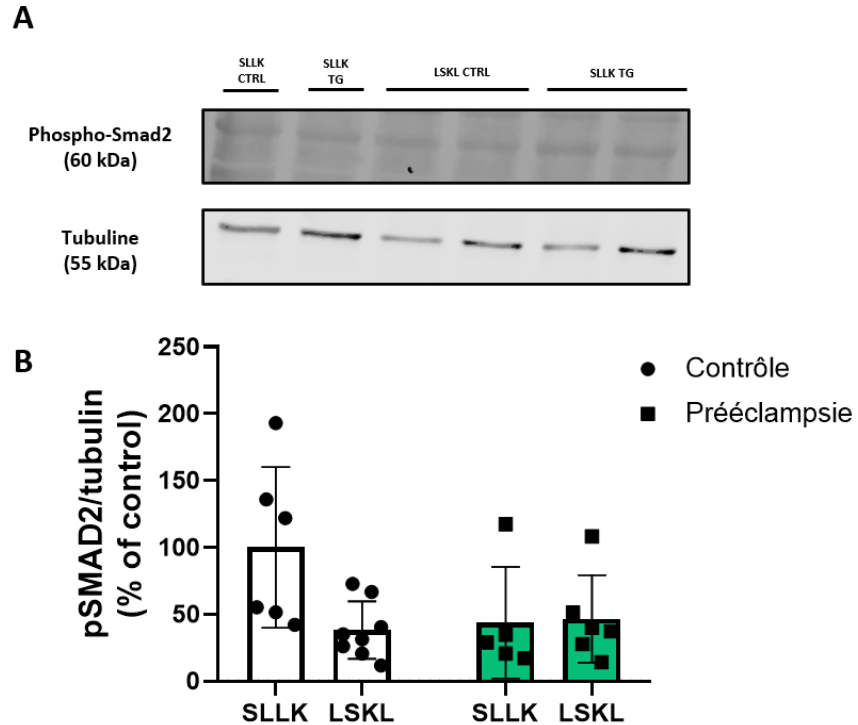


Figure 17. – Expression du Smad2 phosphorylé (p-Smad2), un marqueur de la voie canonique dans les tissus placentaires chez la souris. Expression du p-Smad2 phosphorylé sur la tubuline par Western Blot. Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc, *P < 0,05.

7.4.5 Expression des marqueurs de la voie non-canonique du TGF- β

Ensuite, l'expression des marqueurs de la voie non-canonique a été évaluée. Les résultats de la Figure 18 représentent les données pour le TAK1 phosphorylé (p-TAK1). Il n'y a pas de différence significative entre les modèles traités avec le peptide contrôle. Le traitement avec le LSKL ne change pas l'expression de p-TAK1 dans le modèle contrôle, mais diminue son expression dans le modèle de PE.

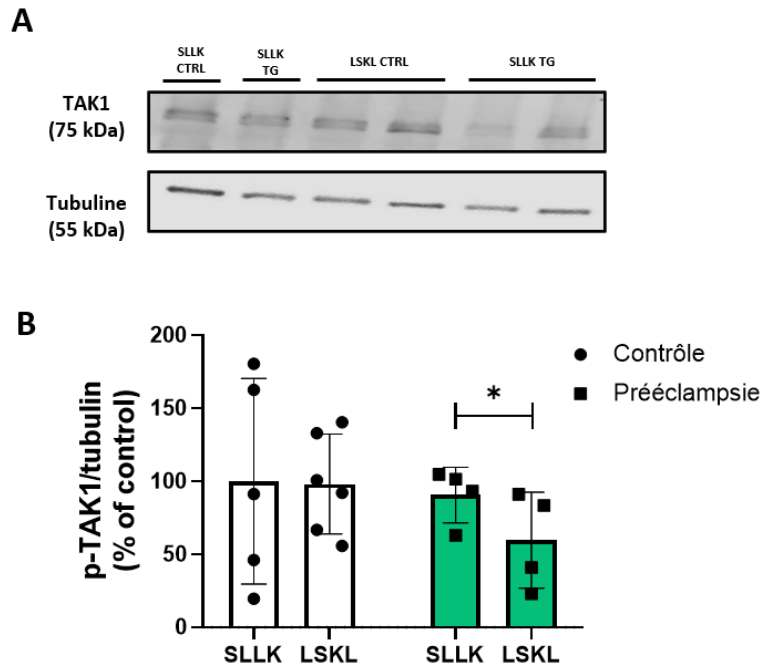


Figure 18. – Expression de TAK1 phosphorylé (pTAK1), un marqueur de la voie non-canonique du TGF- β . A) Représentation du TAK1 phosphorylé ainsi que de la tubuline sur gel 8% SDS-PAGE. B) Expression du TAK1 phosphorylé sur la tubuline. Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc, *P < 0,05.

Finalement, deux MAPK impliqués dans la voie non-canonique ont été évalués. Dans la Figure 19B, l'expression de p38 a été évaluée en faisant un ratio de p38 phosphorylé sur p38 total. En observant la Figure 19A, il n'y a aucun changement entre les modèles, entre le traitement ou par rapport à l'effet du traitement. Une légère baisse est observée dans le groupe de souris de PE traité au LSKL, mais elle n'est pas significative. L'autre MAPK quantifiée, ERK, montre des résultats significatifs (Figure 19B). En effet, son expression est significativement plus faible dans le modèle de PE comparativement au modèle contrôle. Le traitement avec LSKL n'a pas changé l'expression d'ERK dans les placentas de souris contrôles et PE.

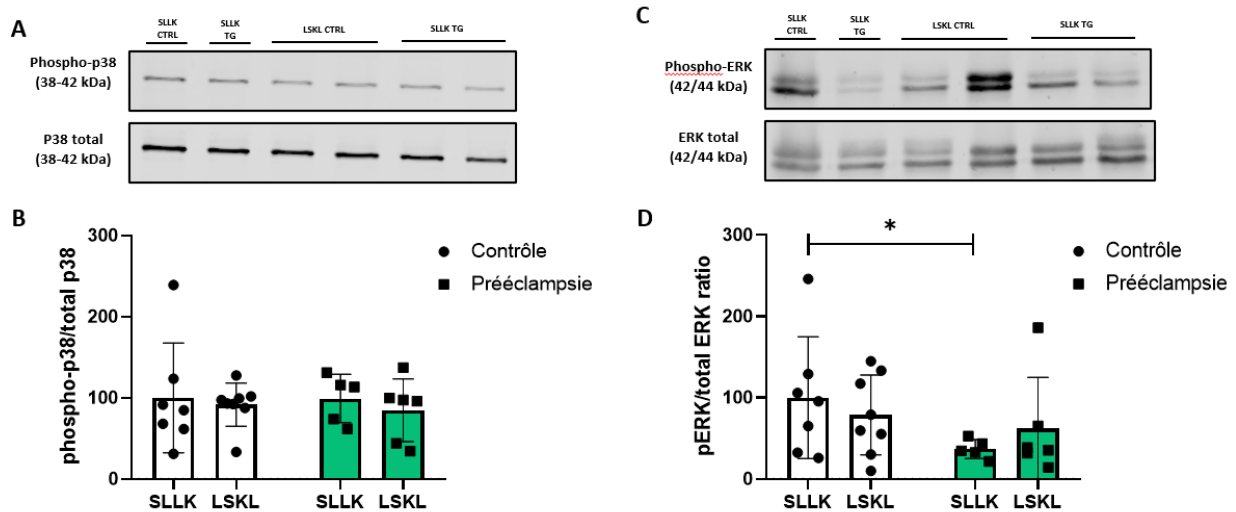


Figure 19. – Expression de p38 et ERK dans les tissus placentaires de la souris. A) Expression du ratio p38 phosphorylé sur p38 total. B) Représentation du ERK phosphorylé et du ERK total sur gel 8% SDS-PAGE. C) Expression du ratio ERK phosphorylé sur ERK total. Two-way ANOVA, Bonferroni post hoc, *P < 0,05.

7.5 Évaluation de l'effet de l'inhibiteur de THBS1, LSKL, sur les voies de signalisation du TGF- β dans les cellules endothéliales placentaires humaines

Les expériences effectuées sur les cellules endothéliales placentaires est l'évaluation des effets des inhibiteurs spécifiques de chaque voie canonique et non-canonique du TGF- β dans un environnement d'hypoxie sévère (Figure 20). Pour ces expériences, nous avons choisi d'utiliser une courte période de temps pour le test de formation de tubes afin de pouvoir détecter un effet précoce de chaque inhibiteur sur l'angiogenèse cellulaire. En bref, les cellules ont été prétraitées avec le peptide témoin SLLK (30 μ M), le LSKL (30 μ M), le bloqueur ALK5/Smad2/3 SB-505124 (SB, 50 nM) ou le bloqueur TAK1/p38 (5Z)-7-oxozeaenol (OXO, 10 nM) pendant 24 heures puis exposé à une hypoxie (0,5% O₂) sur matrigel pendant 1 heure.

L'analyse des quadruplicatas pour chaque condition nous ont montré que l'inhibiteur d'ALK5/Smad2/3 n'a pas eu d'effet significative sur la capacité de formation de vaisseaux sur le matrigel dans une condition d'hypoxie sévère. Par contre, le LSKL et le bloqueur de TAK1/p38 ont augmenté significativement la capacité de formation des tubes des cellules hypoxiques. Toutefois, la combinaison de l'inhibiteur d'ALK5/Smad2/3 avec l'inhibiteur de TAK1/p38 donne une régénération de l'angiogenèse très importante et significative par rapport au contrôle SLLK.

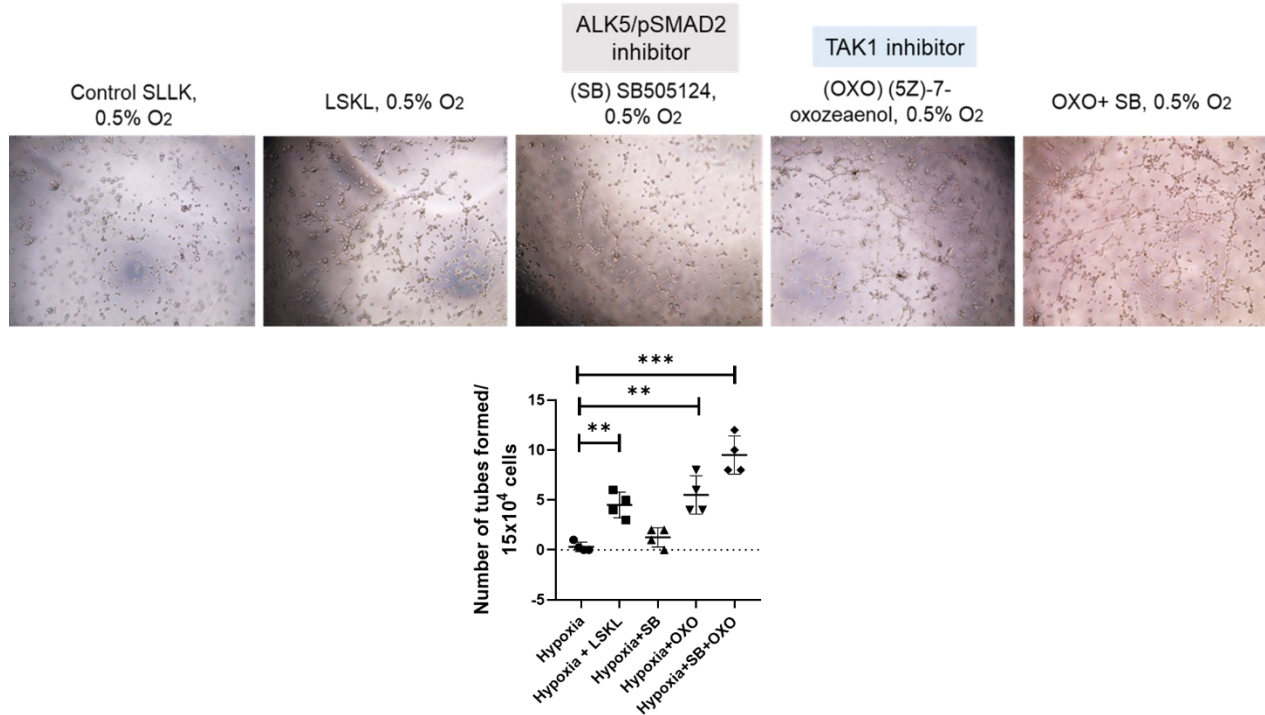


Figure 20. – Effet des inhibiteurs des voies canoniques et non-canoniques du TGF- β sur la capacité d'angiogenèse des cellules placentaires humaines dans une condition d'hypoxie sévère. Effets du pré-traitement cellulaire avec le peptide contrôle SLLK (30 μ M), LSKL (30 μ M), le bloqueur d'ALK5/Smad2/3 SB-505124 (SB, 50 nM) ou le bloqueur de TAK1/p38 (5Z)-7-oxozeaenol (OXO, 10 nM) pendant 24 heures sur la capacité de formation de tubes des cellules sur matrigel pendant 1 heure d'exposition à l'hypoxie (0,5% O₂). ANOVA unidirectionnelle, test posthoc de Bonferroni. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Chapitre 8 – Discussion et conclusion

Les thérapies améliorant l'angiogenèse ne sont pas encore connues pour le traitement de la PE. L'objectif principal était de décrire l'expression de la THBS1 dans les placentas d'un modèle murin de grossesse prééclampsique et de tester les effets du LSKL, un inhibiteur d'activation de la voie TGF- β par la THBS1, *in vivo* sur la vascularisation placentaire et *in vitro*, sur la capacité angiogénique des cellules endothéliales placentaires humaines. Sur la base de nos résultats, nous avons observé qu'inhiber certains effets de la THBS1 pourrait constituer une approche thérapeutique prometteuse pour améliorer la vascularisation placentaire lors d'une grossesse pré-éclampsique. Ceci est étayé par nos résultats principaux montrant l'effet anti-angiogénique de la THBS1 et du TGF- β démontré *in vivo* et *in vitro* après un traitement avec LSKL, un inhibiteur de l'activation du TGF- β par la THBS1. Il est bien connu dans la littérature que THBS1 est une protéine multifonctionnelle et que cette caractéristique est attribuée à ses multiples domaines actifs, ses nombreux récepteurs de liaison et sa régulation directe des principaux facteurs de croissance. On sait également qu'à ce jour, aucune molécule n'est capable de bloquer simultanément tous ces effets de la THBS1. Dans cette étude, nous avons choisi de tester l'effet de la petite molécule LSKL en raison de son inhibition spécifique d'un site de liaison dans la THBS1 qui active le TGF- β . De plus, LSKL a été testé sur des modèles de maladies hépatiques et rénales, ce qui pourrait soutenir son efficacité et accélérant les tests précliniques de cette molécule dans d'autres conditions pathologiques connexes. En effet, les résultats présentés dans cette étude soutiennent un effet pro-angiogénique significatif du LSKL lorsqu'il est appliqué pendant la grossesse dans un modèle de PE. La reproduction de ces effets pro-angiogéniques et moléculaires dans les cellules endothéliales placentaires humaines soutient un potentiel de traduction clinique élevé de cette molécule. Les résultats montrent que le traitement maternel par LSKL pendant la « phase clinique » chez la souris, c'est-à-dire lorsque la pression artérielle et la protéinurie commencent à augmenter dans ce modèle animal, a été efficace pour améliorer la vascularisation placentaire sans effets indésirables détectables sur l'issue de la grossesse (taille de la portée, taux foetal et poids placentaire). Également, c'est intéressant de noter que les mécanismes moléculaires potentiellement à l'origine de l'effet pro-angiogénique du LSKL provoqué par étaient similaires *in vivo* chez la souris et *in vitro*

dans les cellules humaines, impliquant principalement l'inhibition des voies non canoniques TAK1 liées au TGF- β .

Tout d'abord, la localisation de la THBS1 dans les placentas de souris et humaines avec PE ont montré des similarités. Même si le mécanisme de développement placentaire et sa structure présentent des différences particulières entre les humains et les rongeurs, notre étude montre que le modèle de localisation de THBS1 dans les placentas humains et murins des grossesses saines et PE est très similaire. La présence de THBS1 principalement dans les vaisseaux placentaires humains et murins avec une PE constitue également une découverte intéressante. Une étude a démontré que physiologiquement, l'expression de la THBS1 et de l'ARNm du gène de la THBS1 possède un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse pour la maturation du placenta. Les macrophages placentaires vont initier ce processus par la sécrétion du facteur pro-angiogénique VEGF en début de grossesse et vont par la suite sécréter la THBS1 en fin de grossesse, pour induire l'apoptose des cellules endothéliales et achever l'angiogenèse pour la stabilisation d'un lit vasculaire. Cependant, durant une gestose ou hypertension gravidique (>140/90 mmHg), il y a une surexpression de la THBS1 ainsi que l'ARNm du gène de la THBS1 dans les villosités terminales et dans les vaisseaux vilieux. Cette surexpression déclenche une réaction inflammatoire et augmente la présence des lymphocytes des macrophages dans le stroma vilieux, affectant la maturation et les ramifications des villosités placentaires.¹⁹¹ De plus, une autre étude a démontré que la THBS1 peut inhiber, via son récepteur CD36, la voie de signalisation AMPc/PKA des TBs, voie essentielle pour la formation des STBs. Cette inhibition causerait une altération placentaire et favoriserait le développement de la PE.^{192; 193} De tels résultats motivent une meilleure connaissance du rôle de THBS1 au cours des différentes étapes de la vascularisation placentaire, mais mettent en évidence ce mécanisme comme une cible potentielle pour améliorer la vascularisation placentaire pendant une grossesse pré-éclampsique.

L'expérience dans les cellules endothéliales placentaires humaines montre des résultats similaires sur l'augmentation de l'expression et mobilité de la THBS1 à l'intérieur des cellules dans des conditions de stress similaires à l'environnement intra-utérin pendant une grossesse pré-éclampsique. Le fait que nous ayons observé que différents facteurs tels que l'hypoxie et la thrombine

peuvent réguler différemment la THBS1 mais que lorsqu'ils sont combinés, ces régulations peuvent être potentialisées, soutient également que THBS1 peut être la cible de multiples facteurs pathologiques impliqués dans la physiopathologie de la PE.

Les études au cours des dernières années ont démontré qu'il y a trois types d'isoformes du TGF- β . Étant donné que l'isoforme TGF- β 3 est très peu étudié, seuls l'expression de TGF- β 1 et TGF- β 2 a été quantifiée dans la présente étude. Sur les gels SDS-PAGE réduits utilisant des échantillons des placentas murins, deux bandes ont été visualisées, chacune correspond à la forme active ou la forme latente. Pour la forme latente, le poids moléculaire se situe à 40 kDa, correspondant au peptide LAP, pour TGF- β 1¹⁹⁴ et à 55 kDa pour TGF- β 2. Le poids moléculaire à 40 kDa correspond au peptide LAP tandis que le poids moléculaire à 55 kDa correspond au pré-pro-TGF- β . Pour la forme active, le poids moléculaire de la forme active monomérique se situe à 13 kDa pour TGF- β 1 et la forme active homodimérique à 25 kDa pour TGF- β 2.^{163; 194} Nos résultats indiquent que l'expression de la forme latente du TGF- β 1 est similaire dans les placentas contrôle et PE, tandis que l'expression du TGF- β 2 latent est plus élevée dans les placentas de PE. La description du TGF- β 2 dans le placenta reste encore mal connue dans la littérature. Bien que la présence de TGF- β 1, β 2 et β 3 ait été décrite dans les placentas, une première étude a montré que le TGF- β 2 était plus exprimé dans les trophoblastes extravilleux de placentas sains, mais non détecté dans les placentas de grossesse PE.¹⁹⁵ Par contre, une autre étude plus récente a décrit une expression plus élevée de TGF- β 2 dans les placentas des grossesses PE par IHC.¹⁹⁶ Il est important de souligner que ces études ont utilisé uniquement des placentas humains et que l'expression et la régulation de tout TGF- β dans les placentas de modèles animaux de PE sont encore largement inconnues.

Selon la littérature, les isoformes de TGF- β sont sécrétés sous forme d'homodimère et ont un poids moléculaire de 25 kDa.¹⁹⁷ Cependant, le TGF- β 1 possède une bande qui représente un monomère. Lorsque le TGF- β est dans sa conformation « fermée », l'alignement de ses deux monomères forme un homodimère, tandis qu'une conformation ouverte expose les monomères individuellement.¹⁹⁷ Cela signifie que le TGF- β 1 s'activerait dans une conformation ouverte, tandis que le TGF- β 2 actif est dans une conformation fermée. Donc, durant la PE, il semblerait que l'isoforme majoritairement sécrété est le TGF- β 2, un indicateur important pour comprendre la physiopathologie de cette condition.

Nous avons observé que le traitement des souris gravides avec LSKL n'a pas modifié l'expression du TGF- β 1 latent, mais a réduit l'expression du TGF- β 2 à des valeurs similaires à celles du groupe témoin dans les tissus collectés au JG 18,5, c.à.d. quatre jours après le traitement au JG 14,5. De tels résultats indiquent que LSKL aurait pu augmenter l'activation du TGF- β 2 ou provoquer une régulation négative de sa forme latente. Les résultats d'expression du TGF- β 2 actif ne soutiennent pas la première hypothèse et montrent un niveau similaire de TGF- β 2 actif dans tous les groupes. Par conséquent, nos résultats peuvent indiquer un rôle régulateur du LSKL sur la transcription du TGF- β 2 latent. Ceci est intéressant car quelques études ont maintenant décrit la régulation positive des micro-ARN (miR) tels que le miR-145-5p¹⁹⁸ et le miR-218-5p¹⁹⁸ dans le placenta de PE et que leurs effets sont médiés principalement par la voie du TGF- β 2, en augmentant son expression. Notre étude n'a pas testé si le LSKL peut moduler ces miRs, mais nos résultats inspirent de futures recherches ciblant ces miRs pour expliquer des mécanismes de régulation induits par le traitement sur les différents types de TGF- β .

Ensuite, l'expression des marqueurs de la voie de signalisation du TGF- β a été analysée. Lors de l'activation de TGF- β , deux voies peuvent être activées pour son mécanisme d'action : la voie canonique et la voie non-canonique. Dans la première, la phosphorylation des Smads 2 et 3 permet l'activation des gènes cibles du TGF- β . Pour ce projet, seul l'expression du Smad2 phosphorylé a été quantifiée, puisque la détection et quantification de Smad3 ainsi que du Smad2 total n'était pas possible dans le tissu placentaire de souris. Malgré ces problèmes techniques, nos résultats n'ont pas montré de différence significative dans l'expression de phospho-Smad2 entre les groupes ni de changement significatif provoqué par LSKL. Un fait intéressant, lorsque nous avons testé l'effet *in vitro* d'un bloqueur d'ALK5/Smad2/3 sur la capacité angiogénique des cellules endothéliales placentaires humaines, nous avons observé que l'effet de cette voie canonique sur l'angiogenèse n'était pas important dans des conditions d'hypoxie. Le résultat suggère que l'effet angiogénique positif du LSKL n'aurait pas pu être médié par l'inhibition de cette voie, mais d'une autre voie liée au TGF- β .

Néanmoins, nous avons constaté une activation plus faible de la voie non canonique dans les placentas de souris atteintes de PE traitées avec le LSKL. La voie non-canonique a été analysée en quantifiant l'expression de phospho-TAK1, une MAPKKK qui va déclencher la cascade des MAPK.

Les ratios de d'autres MAPK aussi liées à l'activation des récepteurs du TGF- β , tels que ERK et p38, ont été évalués dans les placentas de souris. Nos résultats montrent une réduction significative de l'expression de phospho-TAK1 dans les placentas de souris atteintes de PE traitées avec LSKL. Cependant, l'effet du LSKL sur ERK et p38 n'était pas significatif dans le même groupe. Ces résultats suggèrent que d'autres voies en aval liées à TAK1 pourraient être impliquées.

TAK1 est impliqué dans l'activation de la voie de signalisation canonique du NF- κ B., ce qui engendre divers effets sur les cellules endothéliales, influençant les réponses cellulaires impliquées dans l'inflammation, l'apoptose et l'angiogenèse. Tout d'abord, l'activation de NF- κ B peut conduire à l'expression de gènes pro-inflammatoires, notamment des cytokines, des chimiokines et des molécules d'adhésion.¹⁹⁹ Dans les cellules endothéliales, cela peut entraîner une augmentation de l'adhésion et du recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation. L'activation de NF- κ B via la voie TAK1 peut également influencer la production et le remodelage des composants de la matrice extracellulaire, affectant ainsi le comportement des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse et du remodelage tissulaire. Néanmoins, l'activation de NF- κ B peut favoriser la survie cellulaire en induisant l'expression de gènes anti-apoptotiques. L'expression de TAK1 protège les cellules endothéliales de l'apoptose qui est induit par la sécrétion du TNF- α .²⁰⁰ Celui-ci va se lier à son récepteur TNFR1 et recruter les molécules adaptatrices TRADD (*TNFRSF1a Associated via Death Domain*), TRAF et cIAP (*Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein*) et RIPK1 (*Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1*). Celui-ci va acquérir une chaîne de polyubiquitine. TAK1 va se lier à cette chaîne à l'aide de TAB pour son activation. Cela permet de déclencher la cascade des MAPK, p38, JNK et ERK, pour la production des gènes de survie cellulaire, tels que NF- κ B et AP-1. Ainsi, la sécrétion de caspase 8 est inhibée et l'apoptose l'est aussi. Toutefois, lorsque TAK1 est inhibé, cela peut augmenter l'inflammation, la fibrose et la destruction des cellules endothéliales.²⁰¹ Ceci est important pour maintenir l'intégrité et la stabilité des vaisseaux sanguins, notamment dans des conditions de stress ou d'inflammation.

Par la suite, l'activation de la voie de signalisation de p38 MAPK cause des effets anti- ou pro-angiogéniques dans les cellules endothéliales en fonction des conditions cellulaires.²⁰² Les effets pro-angiogéniques dans les cellules endothéliales sont la migration, la prolifération et la formation de tubes. Cela peut contribuer à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, processus clé

de l'angiogenèse.²⁰³ En revanche, l'activation de la voie de signalisation de p38 MAPK peut avoir un effet anti-angiogénique par le déclenchement de l'apoptose en activant les caspases 3, 6 et 7 par la voie extrinsèque ou par la voie intrinsèque par l'activation des protéines de la famille *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2).²⁰⁴

L'efficacité du LSKL a été évaluée également sur la capacité angiogénique des cellules endothéliales de placentas humains. Dans cette étude, nous avons utilisé des cellules endothéliales de culture primaire extraites de placentas de grossesses saines et initialement cultivées et développées dans des conditions normales. Pour la culture cellulaire, nous avons utilisé un milieu approprié pour la culture de cellules endothéliales qui inclut le VEGF entre autres facteurs et maintenu sous normoxie (21% d'O₂) jusqu'au deuxième passage, lorsque toutes les cellules ont été congelées dans des conditions similaires. Après une série d'expériences dans notre laboratoire, nous avons identifié que la condition idéale d'oxygène pour les cellules endothéliales extraites du côté maternel du placenta est entre 8-12% d'O₂, avec des signes d'activation du stress du réticulum endoplasmique à 21% d'O₂ (données non montrées). Nos résultats sont en accord avec ceux de Lee et al. et Yang et al., qui ont démontré qu'une concentration de 20% d'O₂ cause un stress oxydatif important sur le développement embryonnaire et induit des dommages irréversibles au blastocyste par la libération excessive des ROS.^{205; 206} En conséquence, les cellules utilisées dans ces expériences ont été décongelées et cultivées sous 8% d'O₂ et utilisées entre le deuxième et le quatrième passage dans toutes les expériences. Nous avons également observé que l'expression de THBS1 était peu présente dans les cellules endothéliales maintenues à 8% d'O₂, alors qu'elle était largement exprimée dans la membranaire cellulaire à 0,5 % d'O₂, indiquant une expression et une mobilisation plus élevées vers la membrane dans ces conditions.

De plus, comme les cellules primaires utilisées dans nos expériences proviennent de grossesses saines, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de conditions de stress imitant l'environnement intra-utérin pendant une grossesse avec PE. Dans notre étude, nous avons utilisé l'hypoxie et la thrombine. La thrombine est l'un des principaux facteurs stimulant la transcription du gène de la THBS1 via l'activation du récepteur PAR-1 de la thrombine. Celle-ci va augmenter l'expression de la THBS1 dans les cellules endothéliales.²⁰⁷ De plus, des études ont montré des taux plus élevés

de thrombine lors d'une grossesse PE.^{158; 159; 208; 209} Nous avons donc décidé d'évaluer si la thrombine pouvait avoir un effet négatif sur l'angiogenèse médiée par la THBS1. Nos résultats cellulaires ont confirmé cette hypothèse, montrant que la thrombine seule peut réduire le nombre de tubes formés sur le matrigel à des niveaux similaires à ceux sous hypoxie, et que LSKL était capable de récupérer la capacité angiogénique de ces cellules. De plus, lorsque la thrombine est combinée avec l'hypoxie, elle potentialise l'effet anti-angiogénique, et cet effet s'accompagne d'une régulation positive largement répandue de THBS1 dans de nombreux compartiments cellulaires.

Les résultats obtenus avec la thrombine étaient surprenants en raison de la vaste littérature montrant les effets pro-angiogéniques de la thrombine par l'activation du récepteur PAR-1 dans les cellules endothéliales. Plus précisément, il a été démontré que l'activation de PAR-1 stimule la production de VEGF et de facteur de croissance des fibroblastes, impliqués dans les processus d'angiogenèse.²¹⁰ De plus, la thrombine peut induire la production de divers facteurs angiogéniques par les plaquettes et d'autres cellules, tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), contribuant à la réponse angiogénique.²¹¹ Le fait que dans notre protocole nous ayons utilisé de la thrombine exogène d'origine humaine directement sur les cellules endothéliales aurait pu éviter l'effet pro-angiogénique indirect de la thrombine par l'activation des plaquettes ou d'autres types de récepteurs PAR dans le placenta. Dans ce cas, l'activation directe des récepteurs PAR-1 par la thrombine exogène pourrait déclencher différentes voies et mécanismes cellulaires, impliquant probablement la traduction du gène THBS1 et ses effets anti-angiogéniques.

Dans une autre série d'expériences cellulaires, nous avons voulu étudier quelle voie du TGF- β pourrait provoquer un effet anti-angiogénique dans les cellules endothéliales sous hypoxie. Pour inhiber la voie ALK5/Smad2/3, nous avons utilisé le SB505124 (SB), qui est un inhibiteur de l'activité kinase de ALK5/T β RI et la phosphorylation des Smads.^{212; 213} L'autre inhibiteur utilisé est le (5Z)-7-oxozeaenol (OXO) qui va inhiber le TAK1. Une amélioration de l'angiogenèse est observée seulement par le traitement au OXO, aussi efficacement que le LSKL. En revanche, en combinant les inhibiteurs SB et OXO, l'amélioration est beaucoup plus remarquée et la différence est hautement significative. En se fiant à ces résultats, il est possible de suggérer que dans une situation d'hypoxie sévère, l'angiogenèse peut être affectée par la voie non-canonique du TGF- β et que

l'inhibition de cette voie pourrait contribuer à améliorer la vascularisation placentaire. Le blocage complet de la voie de signalisation du TGF- β donne des résultats très positifs, mais peut être aussi létal à cause de ses effets régulateurs de la survie cellulaire.^{200; 214; 215} L'inhibition de TAK1 entraîne la liaison de RIPK1 au complexe FADD (*FAS-Associated Death Domain*)/Caspase 8. Ce nouveau complexe va causer le clivage de la caspase 8 pour former la caspase 3, déclenchant l'apoptose cellulaire. La molécule RIPK3 peut s'ajouter au complexe RIPK1-FADD-Caspase 8 pour le déclenchement de la nécrose.²⁰¹ L'utilisation de OXO peut causer la mort de l'embryon, par l'activation de la nécrose dû à l'inhibition de TAK1.²¹⁶ Ces raisons nous indiquent qu'il n'est pas convenable d'utiliser l'OXO durant la grossesse, étant donné les risques pour le fœtus. Cela justifie l'utilisation des autres options pharmacologiques comme le LSKL qui pourront avoir un effet régulateur des voies liées au TGF- β mais sans inhiber totalement ces effets physiologiques sur la croissance fœtale et placentaire.

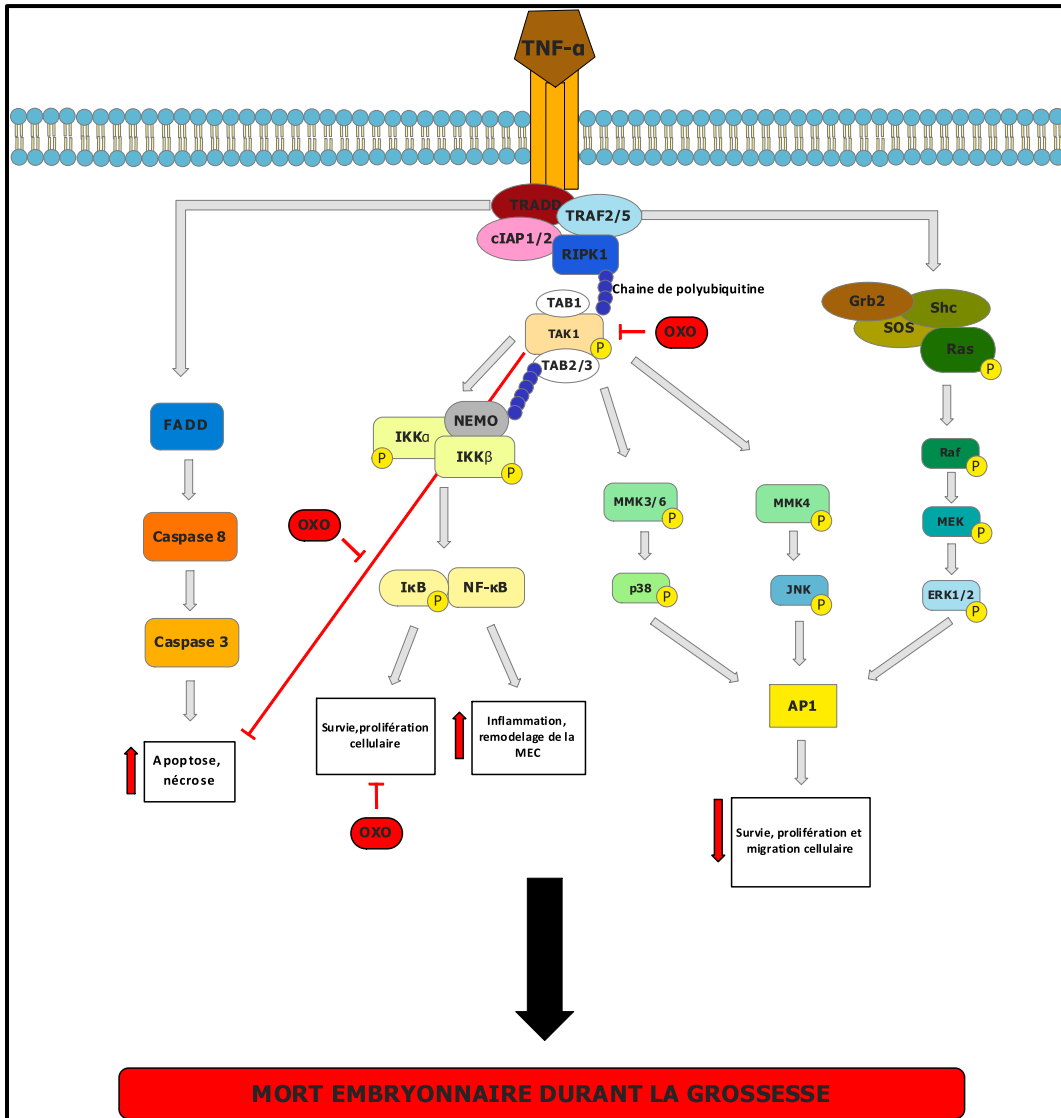


Figure 21. – Voie de signalisation de l'inhibition de TAK1 dans les cellules endothéliales placentaires. Les flèches rouges représentent les effets de l'inhibition de TAK1 par OXO.

L'absence d'effet létal et adverse du LSKL sur le développement fœtal a été confirmée dans notre étude lors de l'évaluation des données de grossesse. La taille de la portée n'était pas changée dans les groupes traités avec LSKL. Or, aucun effet indésirable significatif n'a été observé concernant le nombre de décès fœtaux, ainsi que le poids placentaire et fœtal. Ou encore, il a été possible d'observer un effet protecteur du LSKL sur la taille des portées et la mortalité fœtale dans le

groupe PE. Un autre fait intéressant est que chez le groupe de PE, le poids placentaire est significativement plus élevé que chez le groupe contrôle. Des études ont démontré que les femmes qui développent la PE ont un poids de placenta plus élevé, à cause de l'épaississement du placenta.²¹⁷⁻²¹⁹ Cet épaississement peut augmenter le risque de mortalité fœtal. Par conséquent, LSKL semble avoir un effet protecteur lors d'une grossesse PE sans aucun effet indésirable apparent sur la mère et le fœtus.

En conclusion, les résultats de cette mémoire supportent l'hypothèse que l'inhibition de la séquence KRFK de la THBS1 par l'utilisation du LSKL améliore l'angiogenèse, ce qui peut contribuer à l'amélioration de la vascularisation placentaire. En effet, nous avons montré que la THBS1 est exprimée au sein des villosités des placentas humains et murins des grossesses PE et dans les cellules endothéliales placentaires exposées à des facteurs de stress également présents lors d'insuffisance placentaire et PE. Les résultats ont démontré que l'effet angiogénique de la THBS1 peut être médié par le TGF- β chez la souris, probablement via la voie non-canonique du TAK1, ce qui était aussi régulé négativement par le LSKL *in vivo* et *in vitro*. En résumé, les thérapies ciblant THBS1 pourraient avoir un grand potentiel pour améliorer la vascularisation placentaire dans des conditions pathologiques et des facteurs liés à la PE.

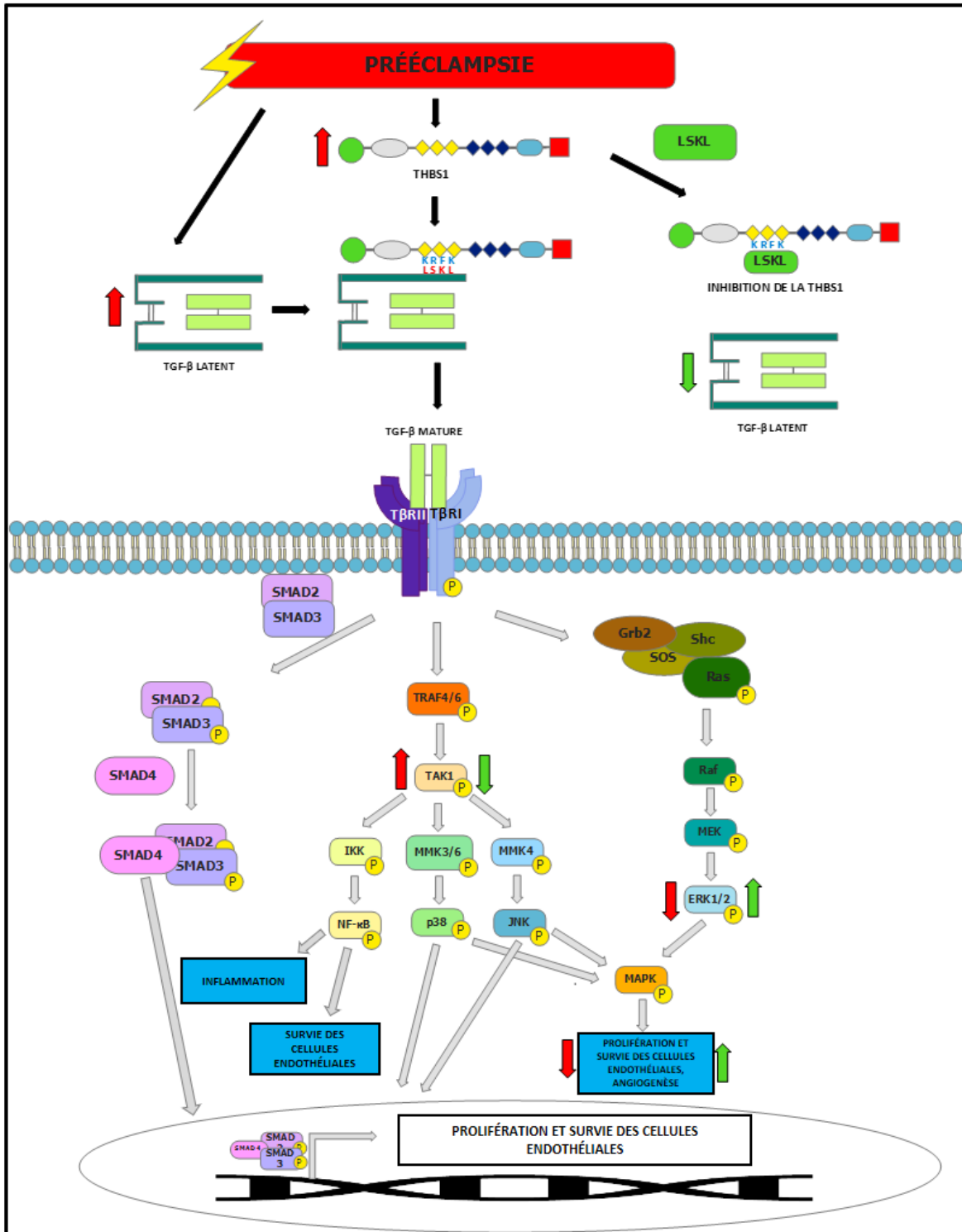


Figure 22. – Résumé de l'effet du LSKL sur la voie de signalisation du TGF-β dans les cellules endothéliales placentaires. Les flèches rouges représentent les effets de la THBS1 et les flèches vertes représentent les effets de l'inhibition de la THBS1 par LSKL.

Chapitre 9 – Limites de l'étude

Quelques limites sont abordées dans notre étude. Premièrement, notre modèle murin est basé sur une régulation positive du système rénine-angiotensine lors de la grossesse PE, à laquelle est confrontée par la littérature montrant que cliniquement, ce système semble être régulé négativement dans la circulation des grossesses PE. Nous pensons toujours que ce n'est pas un problème dans la mesure où le modèle a été bien décrit pour induire une PE spontanée d'une manière très similaire à celle décrite chez l'humain. En outre, même si les études cliniques montrent des taux plus faibles d'angiotensine II et d'autres composants circulants du système rénine-angiotensine dans le sang périphérique de grossesses PE, un nombre croissant d'études ont montré que dans le placenta, ce système est régulé positivement dans une condition de dysfonction placentaire.

Notre étude n'a pas exclu les fœtus et placentas double transgène. Ces fœtus correspondent à 5-10% dans ce modèle animal. Des études antérieures de Dre Lavoie n'ont remarqué aucune différence dans le poids du placenta et la croissance fœtale entre les placentas des fœtus double ou unique transgènes, et même les doubles négatifs.¹²³ Notre laboratoire effectue actuellement le génotype de tous les fœtus de nos expériences et sera en mesure de déterminer si le génotype pourrait avoir un impact sur les résultats observés dans notre modèle animal et le traitement.

Des problèmes techniques, principalement lors du Western Blot, ont limité l'évaluation d'autres composants des voies du TGF- β . Nous ne savons toujours pas si ces problèmes ont été causés par des changements dans la collecte ou la préparation des échantillons (même si le même protocole a été utilisé dans toutes les expériences) ou si les protéines ciblées peuvent avoir une conformation structurelle différente dans le placenta. Des investigations plus approfondies dans notre laboratoire aideront à élucider ce problème particulier.

Ce projet de maîtrise comporte d'autres limitations. L'effet du peptide LSKL sur la pression artérielle n'a pu être évaluée. Il aurait été intéressant de savoir si l'amélioration de la vascularisation placentaire diminue l'augmentation de la pression artérielle. Des retards ont été causés par la pandémie et l'accès au système de télémétrie qui permet l'enregistrement tout au long de la

grossesse. Ces mesures sont en cours au laboratoire de Dre Bertagnolli et permettront de déterminer si le traitement pourrait avoir un effet bénéfique supplémentaire en réduisant l'hypertension associée à la PE dans notre modèle animal.

Finalement, la demi-vie ainsi que le taux d'absorption du peptide LSKL n'ont pu être évalués. Ces éléments seront importants à évaluer, afin de comprendre si le LSKL peut traverser la barrière placentaire et avoir des effets aussi directement sur le system cardiovasculaire des fœtus.

Chapitre 10 – Perspectives de recherche

Comme perspectives de recherche, des expériences vont être menés prochainement en procédant à un suivi de l'hypertension artérielle durant la grossesse chez les souris avant et après le traitement au LSKL. Cette expérience permettra de déterminer si l'injection de LSKL a un impact positif sur l'hypertension artérielle. De plus, le traitement par le peptide LSKL sera testés dans différentes temps de gestation au JG 1,5 ainsi que 7,5 afin de déterminer son effet sur différentes phases de formation et remodelage des vaisseaux placentaires. Une autre perspective de recherche serait d'étudier les mécanismes d'inhibition du VEGF médiés par la THBS1 dans ces modèles animal et *in vitro* de PE. D'après la littérature, l'internalisation du VEGF peut être induite par la THBS1 via sa liaison au LRP1 et la fonction pro-angiogénique du VEGF peut être altérée par la liaison de la THBS1 à ses récepteurs CD36 et CD47. Cette perspective de recherche permettra de mieux comprendre les mécanismes principaux régulateurs de l'activité anti-angiogénique de la THBS1 dans les vaisseaux placentaires.

Références bibliographiques

1. *About Pregnancy*. (2023). <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/pregnancy/conditioninfo>
2. *Canada Birth Rate 1950-2023 | MacroTrends*.
<https://www.macrotrends.net/countries/CAN/canada/birth-rate>
3. Liu, A., Mosher, D. F., Murphy-Ullrich, J. E., & Goldblum, S. E. (2009). The counteradhesive proteins, thrombospondin 1 and SPARC/osteonectin, open the tyrosine phosphorylation-responsive paracellular pathway in pulmonary vascular endothelia. *Microvascular research*, 77(1), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.08.008>
4. King, T. L., Brucker, M. C., Kriebs, J. M., & Fahey, J. O. (2013). Varney's Midwifery. In (pp. 600, 619-620). Jones & Bartlett Learning. <https://books.google.ca/books?id=dbaNAQAAQBAJ>
5. Padubidri, V. (2018). Textbook of Obstetrics. In (pp. 22). Repro Books Limited.
<https://books.google.ca/books?id=SzjvDwAAQBAJ>
6. Singh, G., & Puckett, Y. (2023). Endometrial Hyperplasia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
7. Blanc, B., Sultan, C., & Jamin, C. (2004). Traité de gynécologie médicale. In (pp. 595). Springer Paris. <https://books.google.ca/books?id=sU3vIAVNGzwC>
8. Padubidri, V., & Anand, E. (2006). Textbook of Obstetrics. In (pp. 41). B.I. Publications Pvt. Limited. <https://books.google.ca/books?id=4rE1x-vbGg8C>
9. Martal, J. (2002). L'embryon chez l'homme et l'animal. In (pp. 224). Quae.
<https://books.google.ca/books?id=cwh3uMyo0B8C>
10. Blackburn, S. T. (2007). Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology: A Clinical Perspective. In (pp. 88-91, 543). Saunders Elsevier. <https://books.google.ca/books?id=2y6zOSQcn14C>
11. Salhan, S. (2016). Textbook of Obstetrics. In (pp. 54-55). Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Limited. <https://books.google.ca/books?id=RXSJDAAAQBAJ>

12. Group, T. E. C. W. (2000). Multiple gestation pregnancy. *Human Reproduction*, 15(8), 1856-1864. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.8.1856>
13. Mandefro Yilma, A. (2022). Multiple Gestation. In S. A. Hassan (Ed.), *Multiple Pregnancy* (pp. Ch. 4). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104836>
14. Vaamonde, D., Hackney, A. C., & Garcia-Manso, J. M. (2022). Fertility, Pregnancy, and Wellness. In (pp. 163). Elsevier Science. <https://books.google.ca/books?id=xugGEAAAQBAJ>
15. Batias, C. (2018). Les risques de l'assistance médicale à la procréation: pourquoi tant de mystères ? In (pp. 98). Connaissances et savoirs. <https://books.google.ca/books?id=KSxjDwAAQBAJ>
16. Jauniaux, E., & Rizk, B. (2012). Pregnancy After Assisted Reproductive Technology. In (pp. 2). Cambridge University Press. <https://books.google.ca/books?id=ZJnghvsEhIYC>
17. Bedford, S., & Goulty, C. (2020). *IVF: All You Need To Know*. Blink Publishing. <https://books.google.ca/books?id=6y8DwAAQBAJ>
18. DAVID Georges, H. R. (2011). La gestation pour autrui. In (pp. 7). Lavoisier. <https://books.google.ca/books?id=YoB9PAv4-RcC>
19. Power, M. L., & Schulkin, J. (2012). The Evolution of the Human Placenta. In (pp. 5). Johns Hopkins University Press. <https://books.google.ca/books?id=xfffGC3hjPoC>
20. Creswell, L., O'Gorman, N., Palmer, K. R., da Silva Costa, F., & Rolnik, D. L. (2023). Perspectives on the Use of Placental Growth Factor (PIGF) in the Prediction and Diagnosis of Pre-Eclampsia: Recent Insights and Future Steps. *Int J Womens Health*, 15, 255-271. <https://doi.org/10.2147/ijwh.S368454>
21. Kapila, V., & Chaudhry, K. (2022). Physiology, Placenta. In *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.
22. Standring, S. (2021). Gray's Anatomy E-Book: The Anatomical Basis of Clinical Practice. In (pp. 181). Elsevier Health Sciences. <https://books.google.ca/books?id=qlgAEAAAQBAJ>

23. Larsen, W., Brauer, P. R., Schoenwolf, G. C., Francis-West, P., Milaire, J., & Alexandre, H. (2017). Embryologie humaine. In (pp. 43-48 ; 136-138). De Boeck supérieur.
<https://books.google.ca/books?id=4F3hDgAAQBAJ>
24. Edmonds, K., Lees, C., & Bourne, T. (2018). Dewhurst's Textbook of Obstetrics & Gynaecology. In (pp. 20-21). Wiley. <https://books.google.ca/books?id=yD5tDwAAQBAJ>
25. Bennett, P., & Williamson, C. (2014). Basic Science in Obstetrics and Gynaecology E-Book: A Textbook for MRCOG Part 1. In (pp. 40-41). Elsevier Health Sciences.
<https://books.google.ca/books?id=5dpfDwAAQBAJ>
26. James, J. L., Lissaman, A., Nursalim, Y. N. S., & Chamley, L. W. (2022). Modelling human placental villous development: designing cultures that reflect anatomy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(7), 384. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04407-x>
27. Duttaroy, A. K., & Basak, S. (2015). Human Placental Trophoblasts: Impact of Maternal Nutrition. In (pp. 5-6). CRC Press. <https://books.google.ca/books?id=QyzSCgAAQBAJ>
28. Risau, W., & Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11, 73-91.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.000445>
29. Baergen, R. N., Burton, G. J., & Kaplan, C. G. (2021). Benirschke's Pathology of the Human Placenta. In (pp. 45). Springer International Publishing.
<https://books.google.ca/books?id=f6xTEAAQBAJ>
30. Benirschke, K., & Kaufmann, P. D. P. (2013). Pathology of the Human Placenta. In (pp. 46). Springer New York. <https://books.google.ca/books?id=uZW-BwAAQBAJ>
31. Wang, Y., Granger, D. N., & Granger, J. P. (2017). Vascular Biology of the Placenta: Second Edition. In (pp. 35-41). Biota Publishing.
<https://books.google.ca/books?id=GhQqDwAAQBAJ>
32. Trévoux, R. (2009). L'endomètre présent et avenir. In (pp. 192). John Libbey Eurotext.
<https://books.google.ca/books?id=a7QPBAQBAJ>

33. Pepper, M. (2000). Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique. *médecine/sciences*, 16, 1378.
<https://doi.org/10.4267/10608/1593>
34. Chen, D. B., & Zheng, J. (2014). Regulation of placental angiogenesis. *Microcirculation*, 21(1), 15-25. <https://doi.org/10.1111/micc.12093>
35. Benirschke, K., Burton, G. J., & Baergen, R. N. (2012). Pathology of the Human Placenta. In (pp. 124-125, 194). Springer Berlin Heidelberg.
<https://books.google.ca/books?id=NxvikswRnOIC>
36. Roberts, J. M., Cunningham, G. F., & Lindheimer, M. D. (2009). Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy. In (pp. 91). Elsevier Science.
<https://books.google.ca/books?id=MC8VChQ-5PcC>
37. Hamaguchi, I., Morisada, T., Azuma, M., Murakami, K., Kuramitsu, M., Mizukami, T., Ohbo, K., Yamaguchi, K., Oike, Y., Dumont, D. J., & Suda, T. (2006). Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival. *Blood*, 107(3), 1207-1213. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-1823>
38. Bergers, G., & Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*, 7(4), 452-464. <https://doi.org/10.1215/s1152851705000232>
39. McManus, L. M., & Mitchell, R. (2014). Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms. In (pp. 405, 2782). Elsevier Science.
<https://books.google.ca/books?id=uQB0AwAAQBAJ>
40. Yasmin, H. N. (2018). Gestational Age and Pregnancy Outcomes. In W. Wei (Ed.), *Pregnancy and Birth Outcomes* (pp. Ch. 2). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72419>
41. Kollmann, M., Gaulhofer, J., Lang, U., & Klaritsch, P. (2016). Placenta praevia: incidence, risk factors and outcome. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 29(9), 1395-1398. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1049152>
42. Daftary, S. N. (2011). Manual Of Obstretics. In (pp. 214). Elsevier (A Division of Reed Elsevier India Pvt. Limited). <https://books.google.ca/books?id=bPMJ8RsXvdoC>

43. Meserve, E. E., Parast, M. M., & Boyd, T. K. (2018). Chapter 33 - Gestational Diseases and the Placenta. In C. P. Crum, M. R. Nucci, B. E. Howitt, S. R. Granter, M. M. Parast, & T. K. Boyd (Eds.), *Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology (Third Edition)* (pp. 1219-1249). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44732-4.00033-9>
44. Permezel, M., Walker, S., & Kyprianou, K. (2015). Beischer & MacKay's Obstetrics, Gynaecology and the Newborn - Inkling. In (pp. 86-87). Elsevier Health Sciences. <https://books.google.ca/books?id=eR9uDQAAQBAJ>
45. Kayem, G., & Keita, H. (2014). Prise en charge des placenta praevia et accreta. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 43(10), 1142-1160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2014.10.007>
46. Merriam, A., & D'Alton, M. E. (2018). 106 - Placenta Previa. In J. A. Copel, M. E. D'Alton, H. Feltovich, E. Gratacós, D. Krakow, A. O. Odibo, L. D. Platt, & B. Tutschek (Eds.), *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care (Second Edition)* (pp. 455-458.e451). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44548-1.00106-6>
47. Callahan, T., & Caughey, A. B. (2013). Blueprints Obstetrics and Gynecology. In (pp. 66). Lippincott Williams & Wilkins. <https://books.google.ca/books?id=eKC1B3BhlxUC>
48. [Record #335 is using a reference type undefined in this output style.]
49. [Record #334 is using a reference type undefined in this output style.]
50. Fougere, É. (2019). Le diabète gestationnel. *Actualités Pharmaceutiques*, 58(586), 57-59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actpha.2019.03.023>
51. Chalem, L. (2008). Thrive with Diabetes. In (pp. 34). Booksurge Publishing. <https://books.google.ca/books?id=GFwiq6zdmvYC>
52. Thompson, D., Berger, H., Feig, D., Gagnon, R., Kader, T., Keely, E., Kozak, S., Ryan, E., Sermer, M., & Vinokuroff, C. (2013). Diabète et grossesse. *Canadian Journal of Diabetes*, 37, S548-S566. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.icid.2013.07.040>
53. Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, 26(2), 19-39.

54. Galtier, F., Brunet, C., & Bringer, J. (2019). Chapitre 21 - Diabète et grossesse. In L. Monnier (Ed.), *Diabetologie (Troisième Édition)* (pp. 429-439). Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-2-294-75889-8.00021-X>
55. Ivester, T. S. (2011). 116 - Diabète durant la grossesse. In M. S. Runge & M. A. Greganti (Eds.), *Médecine interne de Netter* (pp. 891-898). Elsevier Masson.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-2-294-70951-7.00116-X>
56. Pandey, H. D. (2021). High Risk Pregnancy & Delivery. In (pp. 55). Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Limited. <https://books.google.ca/books?id=Xr5dEAAAQBAJ>
57. Reece, E. A., Leguizamón, G. F., Macones, G. A., & Wiznitzer, A. (2021). Clinical Obstetrics: The Fetus & Mother. In. Wolters Kluwer Health.
<https://books.google.ca/books?id=iLkIEAAAQBAJ>
58. Heazell, A., Norwitz, E. R., Kenny, L. C., & Baker, P. N. (2010). Hypertension in Pregnancy. In (pp. 19). Cambridge University Press. <https://books.google.ca/books?id=deP1Xz-Q334C>
59. Borhart, J., & Bavolek, R. (2019). Obstetric and Gynecologic Emergencies, An Issue of Emergency Medicine Clinics of North America. In (pp. 301-304). Elsevier Health Sciences.
<https://books.google.ca/books?id=njeQDwAAQBAJ>
60. Queenan, J. T., Spong, C. Y., & Lockwood, C. J. (2011). Queenan's Management of High-Risk Pregnancy: An Evidence-Based Approach. In (pp. 280). Wiley.
<https://books.google.ca/books?id=yBY72ZYDQE4C>
61. Ives Christopher, W., Sinkey, R., Rajapreyar, I., Tita Alan, T. N., & Oparil, S. (2020). Preeclampsia—Pathophysiology and Clinical Presentations. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(14), 1690-1702. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.08.014>
62. Parada-Niño, L., Castillo-León, L. F., & Morel, A. (2022). Preeclampsia, Natural History, Genes, and miRNAs Associated with the Syndrome. *Journal of Pregnancy*, 2022, 3851225. <https://doi.org/10.1155/2022/3851225>
63. Magley, M., & Hinson, M. R. (2023). Eclampsia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.

64. Akre, S., Sharma, K., Chakole, S., & Wanjari, M. B. (2022). Eclampsia and Its Treatment Modalities: A Review Article. *Cureus*, *14*(9), e29080.
<https://doi.org/10.7759/cureus.29080>

65. Khalid, F., Mahendraker, N., & Tonismae, T. (2023). HELLP Syndrome. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.

66. Baker, P. N., McEwan, A. S., Arulkumaran, S., Datta, S. T., Mahmood, T. A., Reid, F., Shafi, M. I., & Aiken, C. (2015). *Obstetrics: Prepare for the MRCOG: Key articles from the Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine journal*. Elsevier Health Sciences.
<https://books.google.ca/books?id=DcqqCgAAQBAJ>

67. Wang, W., Xie, X., Yuan, T., Wang, Y., Zhao, F., Zhou, Z., & Zhang, H. (2021). Epidemiological trends of maternal hypertensive disorders of pregnancy at the global, regional, and national levels: a population-based study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, *21*(1), 364.
<https://doi.org/10.1186/s12884-021-03809-2>

68. [Record #389 is using a reference type undefined in this output style.]

69. Martin, R. J., Fanaroff, A. A., & Walsh, M. C. (2019). Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant. In (pp. 290). Elsevier Health Sciences.
<https://books.google.ca/books?id=fwOSDwAAQBAJ>

70. Jeyabalan, A. (2013). Epidemiology of preeclampsia: impact of obesity. *Nutr Rev*, *71 Suppl 1*(0 1), S18-25. <https://doi.org/10.1111/nure.12055>

71. Chaudhry, R., & Chaudhry, K. (2023). Anatomy, Abdomen and Pelvis: Uterine Arteries. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.

72. Espinoza, J., Romero, R., Mee Kim, Y., Kusanovic, J. P., Hassan, S., Erez, O., Gotsch, F., Than, N. G., Papp, Z., & Jai Kim, C. (2006). Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med*, *34*(6), 447-458.
<https://doi.org/10.1515/jpm.2006.089>

73. Staff, A. C., Fjeldstad, H. E., Fosheim, I. K., Moe, K., Turowski, G., Johnsen, G. M., Alnaes-Katjavivi, P., & Sugulle, M. (2022). Failure of physiological transformation and spiral

- artery atherosclerosis: their roles in preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 226(2, Supplement), S895-S906.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.09.026>
74. Zamir, M., Nelson, D. M., & Ginosar, Y. (2020). Hemodynamic consequences of incomplete uterine spiral artery transformation in human pregnancy, with implications for placental dysfunction and preeclampsia. *Journal of Applied Physiology*, 130(2), 457-465.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00504.2020>
75. Hod, T., Cerdeira, A. S., & Karumanchi, S. A. (2015). Molecular Mechanisms of Preeclampsia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(10).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023473>
76. Cartwright, J. E., Fraser, R., Leslie, K., Wallace, A. E., & James, J. L. (2010). Remodelling at the maternal–fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction*, 140(6), 803-813. <https://doi.org/10.1530/rep-10-0294>
77. Ives, C. W., Sinkey, R., Rajapreyar, I., Tita, A. T. N., & Oparil, S. (2020). Preeclampsia—Pathophysiology and Clinical Presentations: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(14), 1690-1702.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.08.014>
78. Rana, S., Lemoine, E., Granger, J. P., & Karumanchi, S. A. (2019). Preeclampsia. *Circulation Research*, 124(7), 1094-1112. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313276>
79. Rath, G., Aggarwal, R., Jawanjal, P., Tripathi, R., & Batra, A. (2016). HIF-1 Alpha and Placental Growth Factor in Pregnancies Complicated With Preeclampsia: A Qualitative and Quantitative Analysis. *J Clin Lab Anal*, 30(1), 75-83. <https://doi.org/10.1002/jcla.21819>
80. Roberts, J. M., & Gammill, H. S. (2005). Preeclampsia. *Hypertension*, 46(6), 1243-1249.
<https://doi.org/doi:10.1161/01.HYP.0000188408.49896.c5>
81. Harmon, A. C., Cornelius, D. C., Amaral, L. M., Faulkner, J. L., Cunningham, M. W., Jr., Wallace, K., & LaMarca, B. (2016). The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin Sci (Lond)*, 130(6), 409-419. <https://doi.org/10.1042/cs20150702>
82. Cornelius, D. C. (2018). Preeclampsia: From Inflammation to Immunoregulation. *Clin Med Insights Blood Disord*, 11, 1179545x17752325.
<https://doi.org/10.1177/1179545x17752325>

83. Chatterjee, P., Chiasson, V. L., Seerangan, G., Tobin, R. P., Kopriva, S. E., Newell-Rogers, M. K., & Mitchell, B. M. (2015). Cotreatment with interleukin 4 and interleukin 10 modulates immune cells and prevents hypertension in pregnant mice. *Am J Hypertens*, *28*(1), 135-142. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu100>
84. Romanowska-Próchnicka, K., Felis-Giemza, A., Olesińska, M., Wojdasiewicz, P., Paradowska-Gorycka, A., & Szukiewicz, D. (2021). The Role of TNF- α and Anti-TNF- α Agents during Preconception, Pregnancy, and Breastfeeding. *Int J Mol Sci*, *22*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22062922>
85. Huang, N., Chi, H., & Qiao, J. (2020). Role of Regulatory T Cells in Regulating Fetal-Maternal Immune Tolerance in Healthy Pregnancies and Reproductive Diseases. *Front Immunol*, *11*, 1023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01023>
86. Redman, C. W. G., Robertson, S. A., & Taylor, R. N. (2022). Chapter 7 - The Immunology of Preeclampsia. In R. N. Taylor, K. P. Conrad, S. T. Davidge, A. C. Staff, & J. M. Roberts (Eds.), *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy (Fifth Edition)* (pp. 131-153). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818417-2.00021-X>
87. Prijanti, A. R., Oktavia, N. T., Iswanti, F. C., Mudjihartini, N., & Purwosunu, Y. (2023). Increase in transforming growth factor- β didnot affect trombospondin1 in preeclampsia placentas. *Turk J Obstet Gynecol*, *20*(1), 22-28. <https://doi.org/10.4274/tjod.galenos.2023.82529>
88. ten Dijke, P., Goumans, M.-J., & Pardali, E. (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*, *11*(1), 79-89. <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9101-9>
89. Kopczyńska, E., & Makarewicz, R. (2012). Endoglin - a marker of vascular endothelial cell proliferation in cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*, *16*(1), 68-71. <https://doi.org/10.5114/wo.2012.27340>
90. Armaly, Z., Jadaon, J. E., Jabbour, A., & Abassi, Z. A. (2018). Preeclampsia: Novel Mechanisms and Potential Therapeutic Approaches [Review]. *Frontiers in Physiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00973>
91. Ohkuchi, A., Hirashima, C., Matsubara, S., Suzuki, H., Takahashi, K., Usui, R., & Suzuki, M. (2009). Serum sFlt1:PIGF Ratio, PIGF, and Soluble Endoglin Levels in Gestational Proteinuria. *Hypertension in Pregnancy*, *28*(1), 95-108. <https://doi.org/10.1080/10641950802419895>

92. Leaños-Miranda, A., Navarro-Romero, C. S., Sillas-Pardo, L. J., Ramírez-Valenzuela, K. L., Isordia-Salas, I., & Jiménez-Trejo, L. M. (2019). Soluble Endoglin As a Marker for Preeclampsia, Its Severity, and the Occurrence of Adverse Outcomes. *Hypertension*, 74(4), 991-997. <https://doi.org/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13348>
93. Dimitriadis, E., Rolnik, D. L., Zhou, W., Estrada-Gutierrez, G., Koga, K., Francisco, R. P. V., Whitehead, C., Hyett, J., da Silva Costa, F., Nicolaides, K., & Menkhorst, E. (2023). Pre-eclampsia. *Nature Reviews Disease Primers*, 9(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00417-6>
94. Maheshwari, M. V., Khalid, N., Patel, P. D., Alghareeb, R., & Hussain, A. (2022). Maternal and Neonatal Outcomes of Adolescent Pregnancy: A Narrative Review. *Cureus*, 14(6), e25921. <https://doi.org/10.7759/cureus.25921>
95. Johnson, J. D., & Louis, J. M. (2022). Does race or ethnicity play a role in the origin, pathophysiology, and outcomes of preeclampsia? An expert review of the literature. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 226(2, Supplement), S876-S885. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.07.038>
96. Lee, K., Brayboy, L., & Tripathi, A. (2022). Pre-eclampsia: a Scoping Review of Risk Factors and Suggestions for Future Research Direction. *Regen Eng Transl Med*, 8(3), 394-406. <https://doi.org/10.1007/s40883-021-00243-w>
97. Després, J. P. (2007). L'obésité abdominale, une maladie métabolique. In (pp. 6). John Libbey Eurotext. <https://books.google.ca/books?id=Lw7GwyHMiaQC>
98. Lopez-Jaramillo, P., Barajas, J., Rueda-Quijano, S. M., Lopez-Lopez, C., & Felix, C. (2018). Obesity and Preeclampsia: Common Pathophysiological Mechanisms. *Front Physiol*, 9, 1838. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01838>
99. Zlibut, A., Agoston-Coldea, L., Mocan, T., Bocsan, I. C., & Mocan, L. (2019). Biomarkers in Metabolic Syndrome. In. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79427>
100. Chen, Y. H., Chen, Q. Q., & Wang, C. L. (2022). Treatment and five-year follow-up of type A insulin resistance syndrome: A case report. *World J Clin Cases*, 10(8), 2522-2528. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i8.2522>

101. Willard, D. L., Stevenson, M., & Steenkamp, D. (2016). Type B insulin resistance syndrome. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 23(4), 318-323. <https://doi.org/10.1097/med.0000000000000263>
102. Hong, J. H., Kim, H. J., Park, K. S., & Ku, B. J. (2018). Paradigm shift in the management of type B insulin resistance. *Annals of Translational Medicine*, S98. <https://atm.amegroups.org/article/view/22506>
103. Catalano, P. M. (2010). Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome. *Reproduction*, 140(3), 365-371. <https://doi.org/10.1530/rep-10-0088>
104. Weissgerber, T. L., & Mudd, L. M. (2015). Preeclampsia and diabetes. *Curr Diab Rep*, 15(3), 9. <https://doi.org/10.1007/s11892-015-0579-4>
105. Souabni, S. A., Habib, B. E., Oubahha, I., Baqali, J. E., Aboufalah, A., & Soummani, A. (2021). [Severe neonatal thrombocytopenia due to maternal alloimmunization: case report and literature review]. *Pan Afr Med J*, 38, 67. <https://doi.org/10.11604/pamj.2021.38.67.26353> (Allo-immunisation foeto-maternelle sévère: à propos d'un cas et revue de la littérature.)
106. Malki, S., Declosmenil, F., Farhat, A., Moniot, B., Poulat, F., & Boizet-Bonhoure, B. (2008). [Prostaglandin D2: new roles in the embryonic and pathological gonad]. *Med Sci (Paris)*, 24(2), 177-183. <https://doi.org/10.1051/medsci/2008242177> (La prostaglandine D2: nouveaux rôles dans la gonade embryonnaire et pathologique.)
107. Bouhassira, D., & Calvino, B. (2009). *Douleurs : physiologie, physiopathologie et pharmacologie*. Wolters Kluwer France. <https://books.google.ca/books?id=6n1uBAAAQBAJ>
108. Gandhi, J., Khera, L., Gaur, N., Paul, C., & Kaul, R. (2017). Role of Modulator of Inflammation Cyclooxygenase-2 in Gammaherpesvirus Mediated Tumorigenesis. *Front Microbiol*, 8, 538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00538>
109. Rolnik, D. L., Nicolaides, K. H., & Poon, L. C. (2022). Prevention of preeclampsia with aspirin. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 226(2, Supplement), S1108-S1119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.08.045>

110. Ren, Y., Zhao, Y., Yang, X., Shen, C., & Luo, H. (2023). Application of low dose aspirin in pre-eclampsia [Review]. *Frontiers in Medicine*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1111371>
111. Atallah, A., Lecarpentier, E., Goffinet, F., Doret-Dion, M., Gaucherand, P., & Tsatsaris, V. (2017). Aspirin for Prevention of Preeclampsia. *Drugs*, 77(17), 1819-1831. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0823-0>
112. Odigboegwu, O., Pan, L. J., & Chatterjee, P. (2018). Use of Antihypertensive Drugs During Preeclampsia. *Front Cardiovasc Med*, 5, 50. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00050>
113. Khan, K. M., Patel, J. B., & Schaefer, T. J. (2023). Nifedipine. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
114. Chau, K., Welsh, M., Makris, A., & Hennessy, A. (2022). Progress in preeclampsia: the contribution of animal models. *Journal of Human Hypertension*, 36(8), 705-710. <https://doi.org/10.1038/s41371-021-00637-x>
115. Sakowicz, A., Bralewska, M., Kamola, P., & Pietrucha, T. (2022). Reliability of Rodent and Rabbit Models in Preeclampsia Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14344. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/22/14344>
116. Johnston, A. N., Batts, T. L., Langohr, I. M., Moeller, C., Liu, C.-C., & Sones, J. L. (2021). The BPH/5 Mouse Model of Superimposed Preeclampsia Is Not a Model of HELLP Syndrome. *Biology*, 10(11), 1179. <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/11/1179>
117. Fushima, T., Sekimoto, A., Minato, T., Ito, T., Oe, Y., Kisu, K., Sato, E., Funamoto, K., Hayase, T., Kimura, Y., Ito, S., Sato, H., & Takahashi, N. (2016). Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) Model of Preeclampsia in Mice. *PLoS One*, 11(5), e0155426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155426>
118. Morton, J. S., Levasseur, J., Ganguly, E., Quon, A., Kirschenman, R., Dyck, J. R. B., Fraser, G. M., & Davidge, S. T. (2019). Characterisation of the Selective Reduced Uteroplacental Perfusion (sRUPP) Model of Preeclampsia. *Scientific Reports*, 9(1), 9565. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45959-6>

119. Gatford, K. L., Andraweera, P. H., Roberts, C. T., & Care, A. S. (2020). Animal Models of Preeclampsia. *Hypertension*, 75(6), 1363-1381.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14598>
120. Tolekova, A. (2017). Renin-Angiotensin System: Past, Present and Future. In (pp. 15-16). IntechOpen. <https://books.google.ca/books?id=4vSODwAAQBAJ>
121. Mascolo, A., Scavone, C., Rafaniello, C., De Angelis, A., Urbanek, K., di Mauro, G., Cappetta, D., Berrino, L., Rossi, F., & Capuano, A. (2021). The Role of Renin-Angiotensin-Aldosterone System in the Heart and Lung: Focus on COVID-19 [Review]. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.667254>
122. Martyniak, A., & Tomasik, P. J. (2023). A New Perspective on the Renin-Angiotensin System. *Diagnostics*, 13(1), 16. <https://www.mdpi.com/2075-4418/13/1/16>
123. Falcao, S., Stoyanova, E., Cloutier, G., Maurice, R. L., Gutkowska, J., & Lavoie, J. L. (2009). Mice Overexpressing Both Human Angiotensinogen and Human Renin as a Model of Superimposed Preeclampsia on Chronic Hypertension. *Hypertension*, 54(6), 1401-1407.
<https://doi.org/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.137356>
124. Falcao, S., Bisotto, S., Michel, C., Lacasse, A.-A., Vaillancourt, C., Gutkowska, J., & Lavoie, J. L. (2010). Exercise training can attenuate preeclampsia-like features in an animal model. *Journal of Hypertension*, 28(12), 2446-2453.
<https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833e97d0>
125. Bakrania, B. A., George, E. M., & Granger, J. P. (2022). Animal models of preeclampsia: investigating pathophysiology and therapeutic targets. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 226(2, Supplement), S973-S987.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.10.025>
126. Podjarny, E., Losonczy, G., & Baylis, C. (2004). Animal models of preeclampsia. *Semin Nephrol*, 24(6), 596-606. [https://doi.org/10.1016/s0270-9295\(04\)00131-7](https://doi.org/10.1016/s0270-9295(04)00131-7)
127. Lawler, P. R., & Lawler, J. (2012). Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(5), a006627-a006627. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006627>
128. Lawler, J., & Hynes, R. O. (1986). The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different

- proteins. *The Journal of cell biology*, 103(5), 1635-1648.
<https://doi.org/10.1083/jcb.103.5.1635>
129. Isenberg, J. S., Frazier, W. A., & Roberts, D. D. (2008). Thrombospondin-1: a physiological regulator of nitric oxide signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(5), 728-742. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7488-x>
130. Lawler, J. (2000). The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol*, 12(5), 634-640. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(00\)00143-5](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00143-5)
131. Soto-Pantoja, D. R., & Roberts, D. D. (2012). Thrombospondin-1. In S. Choi (Ed.), *Encyclopedia of Signaling Molecules* (pp. 1846-1852). Springer New York.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0461-4_637
132. Cho, S. (2012). CD36 as a therapeutic target for endothelial dysfunction in stroke. *Current pharmaceutical design*, 18(25), 3721-3730.
<https://doi.org/10.2174/138161212802002760>
133. Morandi, V., Petrik, J., & Lawler, J. (2021). Endothelial Cell Behavior Is Determined by Receptor Clustering Induced by Thrombospondin-1 [Mini Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.664696>
134. Yang, J., Park, K. W., & Cho, S. (2018). Inhibition of the CD36 receptor reduces visceral fat accumulation and improves insulin resistance in obese mice carrying the BDNF-Val66Met variant. *J Biol Chem*, 293(34), 13338-13348. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002405>
135. Tao, N., Wagner, S. J., & Lublin, D. M. (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem*, 271(37), 22315-22320.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.37.22315>
136. Osz, K., Ross, M., & Petrik, J. (2014). The thrombospondin-1 receptor CD36 is an important mediator of ovarian angiogenesis and folliculogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*, 12, 21.
<https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-21>
137. Chu, L.-Y., Ramakrishnan, D. P., & Silverstein, R. L. (2013). Thrombospondin-1 modulates VEGF signaling via CD36 by recruiting SHP-1 to VEGFR2 complex in microvascular endothelial cells. *Blood*, 122(10), 1822-1832. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-482315>

138. Talme, T., Bergdahl, E., & Sundqvist, K.-G. (2014). Regulation of T-lymphocyte motility, adhesion and de-adhesion by a cell surface mechanism directed by low density lipoprotein receptor-related protein 1 and endogenous thrombospondin-1. *Immunology*, 142(2), 176-192. <https://doi.org/10.1111/imm.12229>
139. Greenaway, J., Lawler, J., Moorehead, R., Bornstein, P., Lamarre, J., & Petrik, J. (2007). Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *Journal of cellular physiology*, 210(3), 807-818. <https://doi.org/10.1002/jcp.20904>
140. Semenkovich, C. F., Goldberg, A. C., & Goldberg, I. J. (2016). Chapter 37 - Disorders of Lipid Metabolism. In S. Melmed, K. S. Polonsky, P. R. Larsen, & H. M. Kronenberg (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition)* (pp. 1660-1700). Content Repository Only! <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29738-7.00037-X>
141. Potere, N., Del Buono, M. G., Mauro, A. G., Abbate, A., & Toldo, S. (2019). Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 in Cardiac Inflammation and Infarct Healing. *Front Cardiovasc Med*, 6, 51. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00051>
142. Prasad, J. M., Migliorini, M., Galisteo, R., & Strickland, D. K. (2015). Generation of a Potent Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1) Antagonist by Engineering a Stable Form of the Receptor-associated Protein (RAP) D3 Domain. *J Biol Chem*, 290(28), 17262-17268. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.660084>
143. Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E., & Strickland, D. K. (2008). LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev*, 88(3), 887-918. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2007>
144. He, Z., Wang, G., Wu, J., Tang, Z., & Luo, M. (2021). The molecular mechanism of LRP1 in physiological vascular homeostasis and signal transduction pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111667. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111667>
145. Brown, E. J., & Frazier, W. A. (2001). Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in Cell Biology*, 11(3), 130-135. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01906-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01906-1)

146. Soto-Pantoja, D. R., Kaur, S., & Roberts, D. D. (2015). CD47 signaling pathways controlling cellular differentiation and responses to stress. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 50(3), 212-230. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1014024>
147. Rogers, N. M., Sharifi-Sanjani, M., Csányi, G., Pagano, P. J., & Isenberg, J. S. (2014). Thrombospondin-1 and CD47 regulation of cardiac, pulmonary and vascular responses in health and disease. *Matrix Biology*, 37, 92-101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.01.002>
148. Roberts, D. D., & Isenberg, J. S. (2021). CD47 and thrombospondin-1 regulation of mitochondria, metabolism, and diabetes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 321(2), C201-C213. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00175.2021>
149. Roberts, D. D., Miller, T. W., Rogers, N. M., Yao, M., & Isenberg, J. S. (2012). The matricellular protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47. *Matrix Biology*, 31(3), 162-169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.01.005>
150. Cau, S. B., Carneiro, F. S., & Tostes, R. C. (2012). Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. *Front Physiol*, 3, 218. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00218>
151. Kadry, Y. A., & Calderwood, D. A. (2020). Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(5), 183206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183206>
152. Huang, T., Sun, L., Yuan, X., & Qiu, H. (2017). Thrombospondin-1 is a multifaceted player in tumor progression. *Oncotarget*, 8(48), 84546-84558. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19165>
153. Li, Z., Calzada, M. J., Sipes, J. M., Cashel, J. A., Krutzsch, H. C., Annis, D. S., Mosher, D. F., & Roberts, D. D. (2002). Interactions of thrombospondins with alpha4beta1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *The Journal of cell biology*, 157(3), 509-519. <https://doi.org/10.1083/jcb.200109098>
154. Krishna, S. M., & Golledge, J. (2013). The role of thrombospondin-1 in cardiovascular health and pathology. *International Journal of Cardiology*, 168(2), 692-706. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.04.139>

155. Prakash, P., Kulkarni, P. P., & Chauhan, A. K. (2015). Thrombospondin 1 requires von Willebrand factor to modulate arterial thrombosis in mice. *Blood*, *125*(2), 399-406. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-581942>
156. Pimanda, J. E., Ganderton, T., Maekawa, A., Yap, C. L., Lawler, J., Kershaw, G., Chesterman, C. N., & Hogg, P. J. (2004). Role of thrombospondin-1 in control of von Willebrand factor multimer size in mice. *J Biol Chem*, *279*(20), 21439-21448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313560200>
157. McLaughlin, J. N., Mazzoni, M. R., Cleator, J. H., Earls, L., Perdigoto, A. L., Brooks, J. D., Muldowney, J. A., 3rd, Vaughan, D. E., & Hamm, H. E. (2005). Thrombin modulates the expression of a set of genes including thrombospondin-1 in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, *280*(23), 22172-22180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500721200>
158. Erez, O., Romero, R., Kim, S. S., Kim, J. S., Kim, Y. M., Wildman, D. E., Than, N. G., Mazaki-Tovi, S., Gotsch, F., Pineles, B., Kusanovic, J. P., Espinoza, J., Mittal, P., Mazor, M., Hassan, S. S., & Kim, C. J. (2008). Over-expression of the thrombin receptor (PAR-1) in the placenta in preeclampsia: a mechanism for the intersection of coagulation and inflammation. *J Matern Fetal Neonatal Med*, *21*(6), 345-355. <https://doi.org/10.1080/14767050802034859>
159. Chaiworapongsa, T., Yoshimatsu, J., Espinoza, J., Kim, Y. M., Berman, S., Edwin, S., Yoon, B. H., & Romero, R. (2002). Evidence of in vivo generation of thrombin in patients with small-for-gestational-age fetuses and pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, *11*(6), 362-367. <https://doi.org/10.1080/jmf.11.6.362.367>
160. Kaur, S., Bronson, S. M., Pal-Nath, D., Miller, T. W., Soto-Pantoja, D. R., & Roberts, D. D. (2021). Functions of Thrombospondin-1 in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*, *22*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094570>
161. Bharadwaj, A. G., Holloway, R. W., Miller, V. A., & Waisman, D. M. (2021). Plasmin and Plasminogen System in the Tumor Microenvironment: Implications for Cancer Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Cancers*, *13*(8), 1838. <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/8/1838>
162. Albo, D., Rothman, V. L., Roberts, D. D., & Tuszynski, G. P. (2000). Tumour cell thrombospondin-1 regulates tumour cell adhesion and invasion through the urokinase plasminogen activator receptor. *Br J Cancer*, *83*(3), 298-306. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1268>

163. Poniatowski Ł, A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., & Szukiewicz, D. (2015). Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm*, 2015, 137823. <https://doi.org/10.1155/2015/137823>
164. Kubiczikova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., & Sevcikova, S. (2012). TGF- β – an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 183. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-183>
165. Chaudhury, A., & Howe, P. H. (2009). The tale of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: a soigné enigma. *IUBMB Life*, 61(10), 929-939. <https://doi.org/10.1002/iub.239>
166. Prud'homme, G. J. (2007). Pathobiology of transforming growth factor β in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Laboratory Investigation*, 87(11), 1077-1091. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700669>
167. Tie, Y., Tang, F., Peng, D., Zhang, Y., & Shi, H. (2022). TGF-beta signal transduction: biology, function and therapy for diseases. *Molecular Biomedicine*, 3(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00109-9>
168. Poniatowski, Ł. A., Wojdasiewicz, P., Gasik, R., & Szukiewicz, D. (2015). Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications. *Mediators of Inflammation*, 2015, 137823. <https://doi.org/10.1155/2015/137823>
169. Shah, M., Foreman, D. M., & Ferguson, M. W. (1995). Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of Cell Science*, 108(3), 985-1002. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.3.985>
170. Travis, M. A., & Sheppard, D. (2014). TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*, 32, 51-82. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120257>
171. Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021873>

172. Yan, X., Xiong, X., & Chen, Y.-G. (2018). Feedback regulation of TGF- β signaling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(1), 37-50. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmx129>
173. Fleisch, M. C., Maxwell, C. A., & Barcellos-Hoff, M.-H. (2006). The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs. *Endocrine-Related Cancer Endocr Relat Cancer*, 13(2), 379-400. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01112>
174. Huang, F., & Chen, Y.-G. (2012). Regulation of TGF- β receptor activity. *Cell & Bioscience*, 2(1), 9. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-9>
175. Hilt, Z. T., Maurya, P., Tesoro, L., Pariser, D. N., Ture, S. K., Cleary, S. J., Looney, M. R., McGrath, K. E., & Morrell, C. N. (2021). β 2M Signals Monocytes Through Non-Canonical TGF β Receptor Signal Transduction. *Circulation Research*, 128(5), 655-669. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317119>
176. Shi, X., Young, C. D., Zhou, H., & Wang, X.-J. (2020). Transforming Growth Factor- β Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts. *Biomolecules*, 10(12), 1666. <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/12/1666>
177. Peng, D., Fu, M., Wang, M., Wei, Y., & Wei, X. (2022). Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy. *Molecular Cancer*, 21(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01569-x>
178. Sopel, N., Ohs, A., Schiffer, M., & Müller-Deile, J. (2022). A Tight Control of Non-Canonical TGF- β ; Pathways and MicroRNAs Downregulates Nephronectin in Podocytes. *Cells*, 11(1), 149. <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/1/149>
179. Tzavlaki, K., & Moustakas, A. (2020). TGF- β Signaling. *Biomolecules*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/biom10030487>
180. Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Research*, 19(1), 128-139. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>
181. Zhang, Y. E. (2017). Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022129>

182. Cunha, S. I., & Pietras, K. (2011). ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. *Blood*, *117*(26), 6999-7006. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330142>
183. Goumans, M.-J., Liu, Z., & ten Dijke, P. (2009). TGF- β signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Research*, *19*(1), 116-127. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.326>
184. Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S., & Li, E. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(6), 2626-2631. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.6.2626>
185. Paola, A. G., & Joseph, H. M. (2017). TGF- β Activation and Signaling in Angiogenesis. In S. Dan & S. Agneta (Eds.), *Physiologic and Pathologic Angiogenesis* (pp. Ch. 1). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66405>
186. Vilorio-Petit, A., Richard, A., Zours, S., Jarad, M., & Coomber, B. L. (2013). Role of Transforming Growth Factor Beta in Angiogenesis. In J. L. Mehta & N. S. Dhalla (Eds.), *Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis* (pp. 23-45). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5857-9_2
187. Murphy-Ullrich, J. E., & Suto, M. J. (2018). Thrombospondin-1 regulation of latent TGF- β activation: A therapeutic target for fibrotic disease. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, *68-69*, 28-43. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.009>
188. Kuroki, H., Hayashi, H., Nakagawa, S., Sakamoto, K., Higashi, T., Nitta, H., Hashimoto, D., Chikamoto, A., Beppu, T., & Baba, H. (2015). Effect of LSKL peptide on thrombospondin 1-mediated transforming growth factor β signal activation and liver regeneration after hepatectomy in an experimental model. *Br J Surg*, *102*(7), 813-825. <https://doi.org/10.1002/bjs.9765>
189. Chen, Y., Leask, A., Abraham, D. J., Kennedy, L., Shi-Wen, X., Denton, C. P., Black, C. M., Verjee, L. S., & Eastwood, M. (2011). Thrombospondin 1 is a key mediator of transforming growth factor β -mediated cell contractility in systemic sclerosis via a mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent mechanism. *Fibrogenesis Tissue Repair*, *4*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-4-9>
190. Xu, X., Khoong, Y. M., Gu, S., Huang, X., Ren, J.-Y., Gu, Y.-H., Li, H., Gao, Y., Wang, Z., & Zan, T. (2020). Investigating the potential of LSKL peptide as a novel hypertrophic scar

- treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 124, 109824.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109824>
191. Ostankova, Y. V., Klimovskaya, Y. S., Gorskaya, O. A., Kolobov, A. V., Kvetnoi, I. M., Selkov, S. A., & Sokolov, D. I. (2011). Expression of thrombospondin-1 gene mRNA and protein in the placenta in gestosis. *Bull Exp Biol Med*, 151(2), 215-218.
<https://doi.org/10.1007/s10517-011-1292-1>
192. Duan, F. M., Fu, L. J., Wang, Y. H., Adu-Gyamfi, E. A., Ruan, L. L., Xu, Z. W., Xiao, S. Q., Chen, X. M., Wang, Y. X., Liu, T. H., & Ding, Y. B. (2021). THBS1 regulates trophoblast fusion through a CD36-dependent inhibition of cAMP, and its upregulation participates in preeclampsia. *Genes Dis*, 8(3), 353-363. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.05.007>
193. Gupta, S. K., Malhotra, S. S., Malik, A., Verma, S., & Chaudhary, P. (2016). Cell Signaling Pathways Involved During Invasion and Syncytialization of Trophoblast Cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75(3), 361-371.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/aji.12436>
194. Maurya, V. K., Jha, R. K., Kumar, V., Joshi, A., Chadchan, S., Mohan, J. J., & Laloraya, M. (2013). Transforming Growth Factor-Beta 1 (TGF-B1) Liberation from Its Latent Complex During Embryo Implantation and Its Regulation by Estradiol in Mouse1. *Biology of Reproduction*, 89(4), 84, 81-17. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106542>
195. Nguyen, T. P. H., Yong, H. E. J., Chollangi, T., Brennecke, S. P., Fisher, S. J., Wallace, E. M., Ebeling, P. R., & Murthi, P. (2018). Altered downstream target gene expression of the placental Vitamin D receptor in human idiopathic fetal growth restriction. *Cell Cycle*, 17(2), 182-190. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1405193>
196. Huang, W., & Zhang, S. (2022). Study on the Correlation between the Levels of HtrA3 and TGF- β 2 in Late Pregnancy and Preeclampsia. *J Healthc Eng*, 2022, 4453646.
<https://doi.org/10.1155/2022/4453646>
197. Huang, T., Schor, S. L., & Hinck, A. P. (2014). Biological activity differences between TGF- β 1 and TGF- β 3 correlate with differences in the rigidity and arrangement of their component monomers. *Biochemistry*, 53(36), 5737-5749.
<https://doi.org/10.1021/bi500647d>
198. Brkić, J., Dunk, C., O'Brien, J., Fu, G., Nadeem, L., Wang, Y. L., Rosman, D., Salem, M., Shynlova, O., Yougbaré, I., Ni, H., Lye, S. J., & Peng, C. (2018). MicroRNA-218-5p

- Promotes Endovascular Trophoblast Differentiation and Spiral Artery Remodeling. *Mol Ther*, 26(9), 2189-2205. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.009>
199. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2, 17023-. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
200. Lin, F.-L., Wang, J.-H., Chen, J., Zhu, L., Chuang, Y.-F., Tu, L., Ma, C., Lama, S., Ling, D., Wong, R. C.-B., Hewitt, A. W., Tseng, C.-L., Bui, B. V., Wijngaarden, P. v., Dusing, G. J., Wang, P.-Y., & Liu, G.-S. (2021). TAK1: a potential therapeutic target for retinal neovascularization. *bioRxiv*, 2021.2001.2029.428701. <https://doi.org/10.1101/2021.01.29.428701>
201. Guo, X., Yin, H., Chen, Y., Li, L., Li, J., & Liu, Q. (2016). TAK1 regulates caspase 8 activation and necroptotic signaling via multiple cell death checkpoints. *Cell Death Dis*, 7(9), e2381. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.294>
202. Gee, E., Milkiewicz, M., & Haas, T. L. (2010). p38 MAPK activity is stimulated by vascular endothelial growth factor receptor 2 activation and is essential for shear stress-induced angiogenesis. *J Cell Physiol*, 222(1), 120-126. <https://doi.org/10.1002/jcp.21924>
203. Yang, B., Cao, D. J., Sainz, I., Colman, R. W., & Guo, Y. L. (2004). Different roles of ERK and p38 MAP kinases during tube formation from endothelial cells cultured in 3-dimensional collagen matrices. *J Cell Physiol*, 200(3), 360-369. <https://doi.org/10.1002/jcp.20025>
204. Gräb, J., & Rybniker, J. (2019). The Expanding Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Programmed Host Cell Death. *Microbiol Insights*, 12, 1178636119864594. <https://doi.org/10.1177/1178636119864594>
205. Lee, S. C., Seo, H. C., Lee, J., Jun, J. H., & Choi, K. W. (2019). Effects of dynamic oxygen concentrations on the development of mouse pre- and peri-implantation embryos using a double-channel gas supply incubator system. *Clin Exp Reprod Med*, 46(4), 189-196. <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.00514>
206. Yang, Y., Xu, Y., Ding, C., Khoudja, R. Y., Lin, M., Awonuga, A. O., Dai, J., Puscheck, E. E., Rappolee, D. A., & Zhou, C. (2016). Comparison of 2, 5, and 20 % O₂ on the development of post-thaw human embryos. *J Assist Reprod Genet*, 33(7), 919-927. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0693-5>
207. McLaughlin, J. N., Mazzoni, M. R., Cleator, J. H., Earls, L., Perdigoto, A. L., Brooks, J. D., Muldowney, J. A. S., Vaughan, D. E., & Hamm, H. E. (2005). Thrombin Modulates the

- Expression of a Set of Genes Including Thrombospondin-1 in Human Microvascular Endothelial Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 22172-22180.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M500721200>
208. Hayashi, M., Inoue, T., Hoshimoto, K., Negishi, H., Ohkura, T., & Inaba, N. (2002). Characterization of five marker levels of the hemostatic system and endothelial status in normotensive pregnancy and pre-eclampsia. *Eur J Haematol*, 69(5-6), 297-302.
<https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2002.02691.x>
209. Kobayashi, T., Sumimoto, K., Tokunaga, N., Sugimura, M., Nishiguchi, T., Kanayama, N., & Terao, T. (2002). Coagulation index to distinguish severe preeclampsia from normal pregnancy. *Semin Thromb Hemost*, 28(6), 495-500. <https://doi.org/10.1055/s-2002-36689>
210. Catar, R., Moll, G., Hosp, I., Simon, M., Luecht, C., Zhao, H., Wu, D., Chen, L., Kamhieh-Milz, J., Korybalska, K., Zickler, D., & Witowski, J. (2021). Transcriptional Regulation of Thrombin-Induced Endothelial VEGF Induction and Proangiogenic Response. *Cells*, 10(4).
<https://doi.org/10.3390/cells10040910>
211. Shankar, R., de la Motte, C. A., & DiCorleto, P. E. (1992). Thrombin stimulates PDGF production and monocyte adhesion through distinct intracellular pathways in human endothelial cells. *Am J Physiol*, 262(1 Pt 1), C199-206.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.262.1.C199>
212. Dacosta-Byfield, S., Major, C., Laping, N., & Roberts, A. (2004). SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular pharmacology*, 65, 744-752. <https://doi.org/10.1124/mol.65.3.744>
213. van Caam, A., Madej, W., Garcia de Vinuesa, A., Goumans, M.-J., ten Dijke, P., Blaney Davidson, E., & van der Kraan, P. (2017). TGF β 1-induced SMAD2/3 and SMAD1/5 phosphorylation are both ALK5-kinase-dependent in primary chondrocytes and mediated by TAK1 kinase activity. *Arthritis Research & Therapy*, 19(1), 112.
<https://doi.org/10.1186/s13075-017-1302-4>
214. López-Pérez, W., Sai, K., Sakamachi, Y., Parsons, C., Kathariou, S., & Ninomiya-Tsuji, J. (2021). TAK1 inhibition elicits mitochondrial ROS to block intracellular bacterial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(25), e2023647118.
<https://doi.org/doi:10.1073/pnas.2023647118>

215. Mihaly, S. R., Ninomiya-Tsuji, J., & Morioka, S. (2014). TAK1 control of cell death. *Cell Death Differ*, 21(11), 1667-1676. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.123>
216. Morioka, S., Inagaki, M., Komatsu, Y., Mishina, Y., Matsumoto, K., & Ninomiya-Tsuji, J. (2012). TAK1 kinase signaling regulates embryonic angiogenesis by modulating endothelial cell survival and migration. *Blood*, 120(18), 3846-3857. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-416198>
217. Sun, X., Shen, J., & Wang, L. (2021). Insights into the role of placenta thickness as a predictive marker of perinatal outcome. *J Int Med Res*, 49(2), 300060521990969. <https://doi.org/10.1177/0300060521990969>
218. Markey, S., Demers, S., Girard, M., Tétu, A., Gouin, K., & Bujold, E. (2016). Reliability of First-Trimester Ultrasonic Biopsy for the Evaluation of Placental and Myometrial Blood Perfusion and the Prediction of Preeclampsia. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 38(11), 1003-1008. <https://doi.org/10.1016/j.jogc.2016.09.003>
219. Vachon-Marceau, C., Demers, S., Markey, S., Okun, N., Girard, M., Kingdom, J., & Bujold, E. (2017). First-trimester placental thickness and the risk of preeclampsia or SGA. *Placenta*, 57, 123-128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.06.016>