



**HAL**  
open science

# Dysfonction de la nitric oxide synthase endothéliale au cours de la pré-éclampsie : rôle du glutathion et du stress oxydant

Paul Guerby

► **To cite this version:**

Paul Guerby. Dysfonction de la nitric oxide synthase endothéliale au cours de la pré-éclampsie : rôle du glutathion et du stress oxydant. Endocrinologie et métabolisme. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30078 . tel-02893766

**HAL Id: tel-02893766**

**<https://theses.hal.science/tel-02893766>**

Submitted on 8 Jul 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

## En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Paul GUERBY**

Le 21 mai 2019

**Dysfonction de la Nitric Oxide Synthase endothéliale au cours de  
la pré-éclampsie : rôle du glutathion et du stress oxydant**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **MALADIES METABOLIQUES ET CARDIOVASCULAIRES**

Unité de recherche :

**I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires**

Thèse dirigée par

**Anne NEGRE-SALVAYRE**

Jury

M. Philippe DERUELLE, Rapporteur

M. Olivier MOREL, Rapporteur

M. Norbert WINER, Examineur

M. Christophe VAYSSIERE, Examineur

M. Olivier PARANT, Examineur

Mme Anne NEGRE-SALVAYRE, Directrice de thèse



## REMERCIEMENTS

*Aux membres du jury :*

A ma directrice de Thèse, Docteur Anne Nègre-Salvayre, merci pour votre disponibilité, vos conseils, vos idées, votre expertise scientifique et nos échanges enrichissants. Je suis très reconnaissant de votre accueil et de votre encadrement bienveillant tout au long de ces cinq années.

Aux Professeurs Philippe Deruelle et Olivier Morel, merci d'avoir accepté de juger ce travail et de partager vos commentaires qui enrichiront et feront progresser ce projet de recherche.

Au Professeur Norbert Winer, merci d'avoir accepté d'être membre du jury et de juger ce travail.

Au Professeur Olivier Parant, merci pour ta confiance, ta disponibilité, tes conseils et pour la suite !

Au Professeur Christophe Vayssiere, merci pour ton soutien et de m'accompagner dans mon parcours.

*A toutes celles et ceux qui m'ont accompagné pendant ce travail :*

A Audrey Swiader, merci pour tout ce que tu as fait, toute ton aide, ta disponibilité, ton investissement, tes idées et tous ces rires et debriefings ! Je ne peux te remercier assez. Je te souhaite sincèrement le meilleur pour la suite.

A Sandra Garoby-Salom, merci de m'avoir présenté à cette équipe et de m'avoir fait rencontrer Anne. Cette année de Master 2 fut riche en émotion !

A Oriane et Nelly pour votre motivation et votre bonne humeur !

Au Professeur Robert Salvayre, pour votre accueil chaleureux, votre expertise et vos remarques pertinentes.

A toute l'équipe 10 de m'avoir accueilli et aidé, en particulier Nancy, Elodie, Corinne, Marie-Hélène, Christophe, Myriam, Nathalie, Nassera...

A Frédéric Pont et Frédéric Rodriguez pour leur collaboration

Au Professeur Thierry Levade et au Docteur Roger Leandri. Merci d'avoir participé à mes Comités de Suivi de Thèse et d'avoir ainsi enrichi de votre expérience notre réflexion tout au long du parcours de cette Thèse.

A mes frérots Charles et Paul, à Guillaume, à Greg et tous les académiciens pour leur amitié, leurs conseils et leur constante bonne humeur.

Au Professeur Emmanuel Bujold, de me permettre de donner suite à ce projet.

A Marie & Julia, de rendre ma vie si belle.

A nos familles, nos copains et collègues, me soutenant dans ce parcours.

## TABLE DES MATIERES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b> .....	<b>11</b>
<b>REVUE GÉNÉRALE</b> .....	<b>12</b>
<b>1. LA PRÉ-ÉCLAMPSIE</b> .....	<b>13</b>
1.2 COMPLICATIONS MATERNELLES .....	15
1.3 COMPLICATIONS FŒTALES .....	17
1.4 COMPLICATIONS A LONG TERME DE LA PE .....	17
1.5 ÉTIOLOGIES ET FACTEURS DE RISQUE.....	18
1.6 GENETIQUE DE LA PE.....	21
1.7 TRAITEMENT .....	22
1.8 PREVENTION .....	23
1.9 DEPISTAGE.....	25
<b>2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA PE</b> .....	<b>29</b>
2.1 PLACENTATION NORMALE.....	29
2.2 EMBRYOLOGIE .....	29
2.3 VASCULARISATION UTEROPLACENTAIRE.....	31
2.4 INVASION TROPHOBLASTIQUE ET REMODELAGE VASCULAIRE UTERIN .....	32
2.5 GRADIENT EN O <sub>2</sub> UTERO-PLACENTAIRE PHYSIOLOGIQUE .....	37
2.6 PLACENTATION ANORMALE.....	38
<b>3. LE STRESS OXYDANT</b> .....	<b>43</b>
3.1 DEFINITION .....	43
VOIE MITOCHONDRIALE .....	44
NADPH OXYDASE (NOX) .....	44
XANTHINE OXYDASE (XO).....	45
NITRIC OXIDE SYNTHASE (NOS) .....	45
DIMINUTION DES DEFENSES ANTIOXYDANTES .....	45
PEROXYDATION LIPIDIQUE .....	46
LE GLUTATHION .....	47
3.2 NO ET NOS : FONCTION NORMALE.....	48
FONCTION DU NO.....	50
3.3 NO ET NOS : FONCTION PATHOLOGIQUE .....	52
LES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA DYSFONCTION D'ENOS (DECOUPLAGE).....	53
<b>4. STRESS OXYDANT PHYSIOLOGIQUE AU COURS DE LA GROSSESSE</b> .....	<b>56</b>
<b>5. STRESS OXYDANT ET PE</b> .....	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSION DE LA REVUE GENERALE</b> .....	<b>59</b>
<b>HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS</b> .....	<b>60</b>

<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>61</b>
<b>TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX.....</b>	<b>72</b>
1 - S-GLUTATHIONYLATION DE ENOS PLACENTAIRE EN CAS DE PRE-ECLAMPSIE.....	73
2-MODIFICATIONS DE ENOS PLACENTAIRE INDUITES PAR LES ALDEHYDES ISSUS DE L'OXYDATION LIPIDIQUE EN CAS DE PRE-ECLAMPSIE.....	97
3- STRESS OXYDANT ET VIEILLISSEMENT PLACENTAIRE : UN ROLE DANS LA PE ? .....	132
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>141</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>150</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>165</b>

## RÉSUMÉ

**Contexte.** Au cours de la pré-éclampsie (PE), le défaut d'invasion trophoblastique et de remodelage des artères utérines spiralées génère une mauvaise adaptation de la circulation utéro-placentaire associée à des phénomènes d'hypoxie/réoxygénation (H/R).

Il en résulte un stress oxydant et un déséquilibre des facteurs angiogéniques/antiangiogéniques (diminution du VEGF et PIGF vs augmentation du sFlt1) responsables d'une placentation anormale, une dysfonction endothéliale et une inflammation systémique. Le dysfonctionnement de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) et la diminution de la biodisponibilité du NO, jouent un rôle critique dans la pathophysiologie de la PE. eNOS est la principale source de production du NO dans le placenta, et elle joue un rôle primordial dans l'homéostasie et la régulation du tonus vasculaire. Des données récentes indiquent que eNOS peut être modifiée au cours du stress oxydant, en particulier par S-glutathionylation, ce qui entraîne son découplage avec une génération d'ion superoxyde et une réduction du NO.

**Objectif.** Le but de ce travail a été d'étudier les conséquences du stress oxydant sur la eNOS placentaire, en particulier sa glutathionylation, et les modifications par les produits d'oxydation lipidique (LPO), en relation avec sa dysfonction observée au cours de la PE.

**Matériels et Méthodes.** La modification de eNOS a été étudiée dans des tissus placentaires obtenus à partir de césariennes réalisées chez des patientes pré-éclamptiques (n=13), vs grossesses normales (n=9). Des études complémentaires sont réalisées sur des trophoblastes humains HTR-8/SVneo exposés à un stress oxydant induit par H/R, ou par exposition à des LPO.

**Résultats :** Les études en immunofluorescence et microscopie confocale montrent une importante glutathionylation de eNOS dans les placentas de PE, sensible aux agents réducteurs (dithiothréitol), sans différence d'expression de eNOS totale entre PE et grossesses normales. La S-glutathionylation est confirmée par immunoprécipitation et Western Blot de la eNOS placentaire. L'exposition des trophoblastes HTR8 à des conditions d'H/R, génère une S-glutathionylation d'eNOS associée à une production réduite de NO, et une génération d'ion superoxyde. Le NO est nécessaire pour le potentiel invasif des trophoblastes, comme démontré par l'absence de migration des HTR8 après inhibition spécifique de eNOS par small ARN interference (siRNA), et rétablie après addition d'un

donneur de NO, le NOC-18. Les trophoblastes exposés aux variations H/R, montrent des capacités de migration diminuées témoignant d'un potentiel invasif réduit, et rétabli par NOC-18.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons recherché la présence de LPO dans les placentas de PE, et nous avons émis l'hypothèse que eNOS puisse être une cible de ces agents. Nous montrons que les LPO tels que le 4-hydroxynonanal (4-HNE), et le 4-oxo-2-nonanal (ONE), s'accumulent dans les placentas de PE, en particulier sur la eNOS, alors qu'aucune modification n'est observée dans les placentas de grossesse normale. Les études en protéomique sur eNOS recombinante, montrent que ONE et 4-HNE modifient plusieurs épitopes (ONE-Lys, HNE-His, HNE-Cys). L'addition de 4-HNE ou de ONE aux HTR8, inhibe la production de NO et la migration des cellules, restaurée par l'addition de NOC-18.

**Conclusions et perspectives** : Ces résultats montrent que la eNOS placentaire est une cible importante du stress oxydant au cours de la PE, avec des modifications par S-glutathionylation ou par formation d'adduits avec ONE ou 4-HNE, associées à une diminution de la production de NO. Ces modifications pourraient contribuer au dysfonctionnement de la eNOS placentaire observé au cours de la PE. En perspective, nous pourrions étudier les conséquences du stress oxydant et des LPO, sur le vieillissement accéléré du placenta, qui contribueraient à la physiopathologie de la PE.

## ABSTRACT

Context: During pre-eclampsia (PE), the defective trophoblastic invasion and remodeling of the uterine spiral arteries leads to poor adaptation of utero-placental circulation associated with hypoxia/reoxygenation phenomena. This induces oxidative stress and an imbalance between angiogenic/antiangiogenic factors (decrease in VEGF and PlGF vs. increase in sFlt1) responsible for abnormal placentation, endothelial dysfunction and systemic inflammation. Endothelial nitric oxide synthase dysfunction (eNOS) and decreased NO bioavailability play a critical role in the pathophysiology of PE. eNOS is the main source of placental NO production, and plays a key role in homeostasis and vascular tone regulation. Recent evidence indicates that eNOS may undergo glutathionylation in the vascular wall, and subsequent uncoupling in a prooxidant environment, this resulting in an increased generation of superoxide anion and a decreased production of NO.

Objective: The purpose of this work was to study the consequences of oxidative stress on placental eNOS, in particular its glutathionylation and modification by lipid oxidation products (LPO), in relation to its dysfunction observed during PE.

Materials and Methods: The modification of eNOS was studied in placental tissues obtained from preeclampsia-affected (n=13), vs normal pregnant women (n=9) and in HTR-8/SVneo human trophoblasts exposed to hypoxia/reoxygenation (H/R), or by exposure to LPO.

Results: Immunofluorescence and confocal microscopy revealed a high glutathionylation of eNOS in PE placentas, reversed by dithiothreitol, which was confirmed by immunoprecipitation and western-blot experiments, with no difference in total eNOS expression between PE and normal pregnancy. Exposure of HTR8 trophoblasts to H/R conditions generates S-glutathionylation of eNOS associated with reduced NO production, and increased superoxide anion generation. NO is necessary for the invasive potential of trophoblasts, since trophoblasts exposed to H/R, or silenced for eNOS by small interfering RNAs (siRNA), showed a decreased migration capacity, which was restored by the NO donor, NOC-18.

In the second part of this work, we investigated the presence of LPO in PE placentas, and hypothesized that eNOS could be a target of these agents. We show that LPO such as 4-hydroxynenal (4-HNE), and 4-oxo-2-nonenal (ONE), accumulate in PE placentas, particularly on eNOS, while no

changes are observed in normal pregnancy placentas. Proteomics studies on recombinant eNOS show that ONE and 4-HNE modify several epitopes (ONE-Lys, HNE-His, HNE-Cys). The addition of 4-HNE or ONE to HTR8 inhibits NO production and cell migration, restored by the addition of NOC-18.

Conclusions and perspectives: These results show that placental eNOS is an important target for oxidative stress during PE, with modifications by S-glutathionylation or adduct formation with ONE or 4-HNE, associated with a decrease in NO production. These changes could contribute to the dysfunction of placental eNOS observed during the PE. In perspective, we plan to study the consequences of oxidative stress and LPO on accelerated placental aging, which may contribute to the pathophysiology of PE, and beyond, of pathological pregnancies.

## LISTE des ABRÉVIATIONS

ADMA : asymmetric methylarginine	NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
BH4 : tétrahydrobioptérine	nNOS : neuronal Nitric Oxide Synthase
CTEV : cytotrophoblastes extravilleux	NO : oxide nitrique
DAU : doppler des artères utérines	NOX : NADPH oxydase
DTT : dithiostréitol	ONE : 4-oxo-2-nonenal
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase	PAM : pression artérielle moyenne
GPx : Glutathion peroxidase	PE : pré-éclampsie
GSH : glutathion réduit	PIGF : Placental Growth Factor
GSSG : glutathion oxydé	RCIU : retard de croissance intra-utérin
H/R : Hypoxie/Réoxygénation	ROS : espèces réactives de l'oxygène
hCG : human Chorionic gonadotropin	SA : semaines d'aménorrhée
HELLP hemolysis elevated liver enzymes and low platelets	SA-βgal : Senescence-Associated β-galactosidase
HRP : Hématome rétroplacentaire	sFlt-1 : soluble fms-like tyrosine kinase 1
HTA : hypertension artérielle	siRNA : small ARN interference
IMC : indice de masse corporelle	SOD : superoxyde dismutases
iNOS : inductible Nitric Oxide Synthase	VEGF : vascular endothelial growth factor
L-NAME : N-Nitro-L-argininemethyl ester hydrochloride	XO : xanthine oxydase
LPO : produit d'oxydation lipidique	

## **LISTE des FIGURES et TABLEAUX**

### **Liste des figures :**

Figure 1 : Prise en charge de la pré-éclampsie modérée (PEM) ou sévère (PES) selon le terme de grossesse.

Figure 2 : Prise en charge de la pré-éclampsie sévère selon le terme de la grossesse.

Figure 3 : Représentation schématique des principales étapes du développement placentaire humain.

Figure 4 : Schéma de la vascularisation artérielle de l'utérus humain non gravide.

Figure 5 : Représentation schématique de la villosité crampon.

Figure 6 : Diagramme illustrant la migration des cellules cytotrophoblastiques autour et à l'intérieur de la lumière des artères spiralées.

Figure 7 : Diagramme illustrant l'anatomie du sac gestationnel vers la 8e SA.

Figure 8 : Comparaison d'artères spiralées utérines remodelées ou non-remodelées.

Figure 9 : Schéma illustrant l'origine du stress induit par l'hypoxie/reoxygénation ainsi que les défenses anti-oxydantes diminuées.

Figure 10 : structure du GSH et GSSG.

Figure 11 : Représentation schématique de la eNOS.

Figure 12 : Actions du stress oxydant sur la eNOS.

Figure 13 : Structure d'aldéhydes produits au cours de la peroxydation des acides gras polyinsaturés.

Figure 14 : Paramètres du stress oxydant.

Figure 15 : Effet de la normoxie et de l'hypoxie +/-BSO sur la migration des trophoblastes évaluée par la technique de « wound closure».

Figure 16 : Marquage XGAL sur HTR8 en condition d'hypoxie +/- BSO ou avec des adduits HNE et ONE à 48h et 72h d'hypoxie.

Figure 17 : Marquage Histones H2AX (vert) dans les placentas contrôle (cnt) versus PE.

### **Liste des tableaux :**

Tableau 1 : Taux de détection de PE en fonction de la combinaison des marqueurs biologiques et biophysiques utilisés pour le calcul de risque.

# **REVUE GÉNÉRALE**

## 1. LA PRÉ-ÉCLAMPSIE

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

L'historique de la PE est en réalité récent : le terme PE fut introduit vers la fin du 19<sup>e</sup> siècle pour décrire l'état précédant l'éclampsie (Lindheimer 2015). L'éclampsie, elle, est en revanche décrite depuis plus longtemps puisqu'on trouve des papyrus égyptiens décrivant ces crises convulsives (Bell 2010). Le mot « éclampsie » est dérivé du mot grec « eklampsis » qui signifie « lumière éclatante, jet de lumière », reflétant le caractère soudain de l'apparition de ces crises convulsives chez les femmes enceintes. Il fut introduit par François Boissier de la Croix de Sauvages en référence à l'occurrence subite des convulsions chez les patientes (Lindheimer 2015). La PE est spécifique à l'espèce humaine (Doridot 2012).

La sémiologie de la PE est riche, rendant sa définition difficile, variable d'un pays à l'autre. Les critères diagnostics ont récemment été modifiés en 2014 par la Société internationale de l'étude de l'HTA pendant la grossesse (ISSHP). La PE était classiquement définie comme une hypertension artérielle (HTA) de-novo présente après 20 semaines d'aménorrhée (SA) associée à une protéinurie significative (> 300 mg /jour). Désormais, pour la plupart des sociétés savantes, la présence d'une protéinurie n'est plus obligatoire pour établir le diagnostic d'une PE (ACOG, NICE, RANZCOG) si l'HTA est associée à des dysfonctionnements organiques maternels. Ils sont représentés par une atteinte rénale, et/ou une atteinte hépatique (cytolyse > 2N), et/ou l'apparition de signes neurologiques ou hématologiques (thrombopénie < 100 000). Sur le plan fœtal, on peut retrouver une restriction de croissance dont l'étiologie est le dysfonctionnement utéro-placentaire.

La PE est sévère lorsqu'elle est associée à au moins l'un des signes suivants, témoignant d'une souffrance viscérale :

- HTA sévère PAS > 160mmHg et/ ou PAD > 110mmHg
- Oligurie < 500ml/24h ou créatinémie > 135µmol/l
- Un Œdème aigu du poumon (OAP)
- Une barre épigastrique persistante
- HELLP syndrome
- Convulsions ou symptômes neurologiques persistants.

La PE est précoce lorsqu'elle survient avant 34SA.

### **1.1 ÉPIDÉMIOLOGIE**

Les troubles hypertensifs de la grossesse sont une cause importante de morbi-mortalité maternelle et périnatale. Selon l'Enquête Nationale Confidentielle sur les Morts Maternelles en France publiée en 2017, les complications hypertensives correspondent à la quatrième cause de mortalité maternelle directe au cours de la grossesse avec 4,9 % des décès maternels (après les causes hémorragiques, thromboemboliques et les embolies amniotiques). La PE est responsable également d'un tiers de naissances de grands prématurés, associé souvent à un retard de croissance intra-utérin (RCIU). (Deneux-Tharaux 2017)

Dans la plupart des cas, un suivi permet d'éviter les complications graves. Dans le monde, la PE complique 2 à 8% des grossesses, avec de grandes disparités géographiques. Elle est plus fréquente dans les pays en voie de développement, liés à la difficulté d'accès à des soins médicaux adaptés et aux carences en calcium. En Afrique et en Asie, près de 15% des décès maternels sont associés à des troubles hypertensifs au cours de la grossesse. En Amérique latine, ce chiffre est porté à un quart. Elle augmente dans les populations à haut risque. L'incidence de la PE est également plus élevée aux États-Unis. Elle concerne 3 à 5% des grossesses. Ceci peut être lié à une prévalence accrue de facteurs prédisposant dans cette population, tels que l'HTA chronique, le diabète et l'obésité. (Hutcheon 2011, Mol 2016)

En France, une épidémiologie descriptive de la PE issue d'une grande cohorte ou d'un registre n'a jamais été publiée. Des études réalisées à partir de données hospitalières françaises ont montré une incidence observée entre 1,1 % et 3 % chez les primipares, entre 0,4 et 1,5 % chez les multipares, et que le taux de PE précoce était de 1,2 % chez des femmes primipares. Ainsi, chaque année en France, 40 000 femmes sont touchées par cette maladie. (Haddad 2000, Goffinet 2010, Saucedo 2013)

On estime que cette affection serait responsable de 50000 à 76000 morts maternelles de façon annuelle dans le monde. Elle est responsable d'une morbidité maternelle et périnatale importante.

## **1.2 COMPLICATIONS MATERNELLES**

Si elle n'est pas traitée, la PE peut se compliquer et se manifester par des atteintes multi-viscérales. L'éclampsie est définie comme une manifestation convulsive et/ou des troubles de la conscience survenant dans un contexte de PE et ne pouvant être rapportés à un problème neurologique préexistant. Il s'agit d'une complication grave de la PE qui met en jeu rapidement le pronostic vital maternel en l'absence de prise en charge adaptée. L'éclampsie complique 1 % à 2 % des PE sévères. (Sibai 2006) Une surveillance clinique régulière au cours de la grossesse et l'extraction fœtale en cas de PE sévère minorent ce risque. L'incidence de la maladie est nettement plus élevée dans les pays en voie de développement où l'éclampsie peut représenter jusqu'à 16% des décès. (Collange 2010)

L'éclampsie peut cependant survenir en l'absence de signe de PE ou d'HTA dans 25% des cas. Au niveau clinique on recherche essentiellement la présence de prodromes (ou signes d'imminence) afin d'instaurer un traitement préventif efficace pour éviter la survenue de la crise convulsive : élévation rapide de la pression artérielle, céphalées rebelles aux traitements antalgiques simples, troubles visuels, réflexes vifs et poly cinétiques, apparition ou exacerbation d'une douleur en barre épigastrique, et troubles du comportement. Ces prodromes peuvent être absents dans 21% des cas. (Zwart 2008)

Le syndrome HELLP (anémie hémolytique, micro angiopathie avec thrombopénie, et une cytolyse hépatique) est considéré comme une variante de la PE sévère et peut se produire dans 10 à 20% des cas de PE. Il peut apparaître avec ou sans protéinurie ou d'HTA sévère. Le syndrome HELLP a souvent

un début aigu, et l'état maternel se dégrade rapidement. (Abildgaard 2013) Le syndrome HELLP est le témoin biologique de la microangiopathie thrombotique maternelle pouvant survenir au cours de la PE. La lésion de l'endothélium au cours de la PE est responsable d'une atteinte microvasculaire provoquant une vasoconstriction et une activation de la coagulation à l'origine de microthrombi disséminés. (Baxter 2004) L'hémolyse est ainsi la conséquence de la destruction des hématies sur les dépôts endothéliaux de fibrine. La thrombopénie est liée à l'agrégation et à la consommation des plaquettes au contact des lésions endothéliales. La cytolysé hépatique traduit pour sa part la nécrose hépatocytaire. Cette nécrose, essentiellement péri-portale, est la conséquence ischémique des dépôts intra-vasculaires de fibrine à l'intérieur des sinusoides hépatiques. Des lésions hépatiques hémorragiques peuvent également être observées, causées par l'hyperpression intra-parenchymateuse, et pouvant exceptionnellement être à l'origine d'un hématome sous capsulaire du foie, voire d'une rupture hépatique.

Les complications maternelles sont également représentées par :

- L'hématome rétro placentaire (HRP). Il s'agit d'un décollement prématuré du placenta qui peut être responsable de troubles de l'hémostase maternelle tels que la coagulation intra vasculaire disséminée.
- L'atteinte hépatique peut également se manifester par une insuffisance hépatique, un hématome sous-capsulaire ou une rupture
- Les complications neurologiques qui comprennent hormis les convulsions de l'éclampsie, les accidents vasculaires cérébraux ou le déficit neurologique ischémique réversible, la cécité corticale, le décollement de la rétine.
- Les complications cardiorespiratoires qui comprennent l'ischémie myocardique et l'œdème aigu du poumon.
- L'atteinte rénale, marquée par une insuffisance rénale aigue plus ou moins réversible.
- Et dans les cas extrêmes, le décès. (Mol 2016, Dubar 2012)

### **1.3 COMPLICATIONS FŒTALES**

Les complications fœtales et néonatales de la PE comprennent la restriction de croissance intra-utérine (RCIU), la mort fœtale in utéro, et l'admission en unité de soins intensifs. La morbi-mortalité néonatale est avant tout liée à la prématurité induite et au RCIU qui lui est associé. La PE correspond à la première cause de prématurité induite avant 33SA. Près de 80 à 90 % des cas de RCIU sont liés à une insuffisance placentaire qui s'intègre dans le cadre d'une pathologie vasculaire placentaire. (Haddad 2004)

Les résultats de l'étude EPIPAGE-2 ont mis en évidence une morbi-mortalité néonatale significativement plus élevée, en cas de prématurité associée à une PE (OR = 1.7 ; IC 95%, 1.0-2.7), et notamment lorsqu'un RCIU y est associé (OR = 3.7 ; IC 95%, 2.5-5.5). (Torchin 2016)

### **1.4 COMPLICATIONS A LONG TERME DE LA PE**

#### *Le risque de récurrence*

Les femmes ayant des antécédents de PE ont un risque accru de récurrence de PE au cours de la grossesse ultérieure. Le taux de récurrence est très variable selon les études (de 6 à 30 %). La méta-analyse d'Oostwaard en 2015 étudie le risque de récurrence des troubles hypertensifs de la grossesse. Celui-ci est de l'ordre de 18 %, toute manifestation confondue. Ce taux varie cependant en fonction du terme d'apparition de la PE lors de la précédente grossesse, de la gravité de la maladie et de la présence ou de l'absence de facteurs de risques médicaux, et le délai entre les 2 grossesses préexistants. (Hernandez-Diaz 2009)

#### *Le risque vasculaire à long terme*

La maladie cardiovasculaire (CV) est la première cause de mortalité chez la femme : 52 % des femmes en Europe décèdent de maladie cardiovasculaire ; soit 8 fois plus que le cancer du sein. Pourtant, le risque CV des femmes est sous-évalué et sous-traité. (Mounier-Vehier 2016) L'American Heart Association (AHA) insiste sur le fait que la grossesse est une situation « unique » de stress transitoire métabolique et vasculaire qui permet d'identifier précocement les femmes à risque. (Mosca 2011)

Les données de la littérature démontrent que la PE apparait comme un facteur de risque spécifique, d'HTA chronique, d'accidents coronaires, d'accidents vasculaires cérébraux, d'insuffisance rénale chronique, et de mortalité cardio-neuro-vasculaire. Le risque d'accidents CV est d'autant plus important que la PE est survenue précocement ou en cas de complication materno-fœtale. (Wu 2017, Garcia 2016) Ces risques à long terme sont méconnus par les patientes, mais également par les professionnels de santé. (Young 2012)

### **1.5 ÉTIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUES**

Comme évoqué précédemment, la PE est considérée comme un syndrome particulièrement complexe, spécifique de la grossesse. (Roberts 1989) Cette définition complique finalement la recherche d'étiologie de la PE. En effet, la PE a très probablement des causes particulières associées à chacune de ses formes cliniques –précoce, tardive, ...– mais chaque forme clinique de PE a encore probablement plusieurs causes différentes possibles. Il n'y a donc pas une étiologie mais un ensemble de causes possibles à la PE.

#### ***Facteurs de risques de la PE***

À ce jour, l'étiologie exacte de la PE est inconnue. Seuls les facteurs de risques sont bien caractérisés.

#### ***Facteurs immunologiques***

La nulliparité triple le risque de PE par rapport à la multiparité et les patientes pré-éclamptiques sont deux fois plus souvent nullipares que les femmes non pré-éclamptiques. (Duckitt 2005) Si on se réfère à l'hypothèse immunologique de la maladie, le conflit entre la mère et les antigènes d'origine fœtale (donc d'origine paternelle pour moitié) serait en effet plus fréquent et plus grave au cours de la première grossesse. L'effet protecteur de l'exposition au sperme (risque de PE multiplié par 2,4 chez les primipares lorsque le couple utilisait des préservatifs en pré-conceptionnel), et a contrario l'augmentation du risque de PE en cas de nulliparité, de changement de partenaire ou d'insémination par donneur, ont permis d'étayer cette hypothèse immunologique dans l'étiologie de survenue de la PE. (Eskenazi 1991, Abi-Said 1997)

L'exposition au sperme paternel semble jouer un rôle central, avec une élévation d'autant plus élevée du risque de PE que la période pré-conceptionnelle d'exposition a été courte. Robillard et al. ont ainsi mis en évidence un risque, par rapport à un groupe témoin avec exposition de plus de 12 mois, multiplié par 11,6 lorsque l'exposition au sperme était inférieure à 4 mois, 5,9 entre 5 et 8 mois et 4,2 entre 9 et 12 mois, avec ainsi un facteur « temps-dépendant ». L'exposition au sperme permettrait donc le développement d'une forme de tolérance immunologique maternelle aux antigènes paternels. (Robillard 1999, Dekker2011) L'exposition maternelle à des villosités d'origine foetale comportant donc du matériel antigénique d'origine paternelle serait à l'origine de cette inadaptation immunologique entrant dans le cadre des PE. L'effet protecteur des antécédents de fausse-couche ou d'interruption de grossesse permettent également de soutenir cette hypothèse. Par ailleurs, il a été démontré qu'un père ayant déjà engendré une grossesse avec PE avait 1,8 fois plus de risque d'engendrer une autre grossesse avec PE chez une autre femme, par rapport à un père n'ayant jamais engendré de PE. (Lie 1998)

#### *Facteurs obstétricaux*

Les femmes qui ont développé une PE au cours d'une première grossesse ont un risque de PE multiplié par sept au cours d'une seconde grossesse. En cas de grossesse multiple, le risque de survenue d'une PE est multiplié par trois, tout comme le risque de développer une éclampsie. Plusieurs rapports ont également permis de mettre en évidence un risque modérément augmenté (RR 1,34) en cas de malformation foetale, de trisomie 13, triploïdie ou de môle hydatiforme. (Schieve1994, Zhang 1997, Ros 1998, Anastasiadis 2007) Enfin, plusieurs auteurs ont mis en évidence une augmentation du risque en cas d'infection urinaire, sans qu'une hypothèse physiopathologique ne puisse être avancée. (Schieve1994, Villar 2006) Enfin, chez les patientes multipares, l'incidence de la PE augmenterait avec le délai entre les grossesses. Ainsi, quand l'intervalle entre les deux grossesses est de 10 ans ou plus, le risque de PE rejoindrait celui des patientes nullipares. Chaque année séparant les deux grossesses multiplierait par 1,12 le risque de développer une PE. Cette majoration du risque avec l'allongement de la durée entre deux grossesses, lorsqu'il est pris en compte, minore l'effet de la « primipaternité ». (Redman 2011, Cormick 2016)

## *Facteurs maternels*

### *-Facteurs physiologiques*

Les femmes de plus de 40 ans, quelle que soit la parité, ont un risque de PE quasiment doublé par rapport aux femmes plus jeunes. En revanche, l'âge jeune ne semble pas être un facteur de risque. Le risque augmente également avec l'indice de masse corporelle (IMC) et ce risque accru persiste même après ajustement sur des facteurs tels que l'âge ou l'hypertension artérielle chronique. Ainsi, un IMC supérieur à 35 double le risque de PE. Les femmes nées avant 34 semaines d'aménorrhée ou qui pesaient moins de 2 500 g à la naissance ont aussi un risque fortement augmenté (multiplié respectivement par trois et par cinq). (Dubar 2012)

### *- Pathologies maternelles*

Plusieurs pathologies maternelles favorisent le développement d'une PE. Le diabète insulino-dépendant préexistant à la grossesse quadruple le risque. L'HTA chronique est également un facteur favorisant de PE surajoutée, tout comme les néphropathies. Les maladies auto-immunes sont aussi plus fréquemment retrouvées parmi les patientes pré-éclampsiques. Enfin, une thrombophilie est un facteur de risque, notamment la présence d'un syndrome des antiphospholipides (SAPL).

### *- Facteurs génétiques*

Une histoire familiale de PE (mère ou sœur) triplerait le risque de PE. (Zhang 1997) Cependant, une part de ce risque est certainement attribuable à un terrain familial d'HTA chronique. Cette élévation du risque en cas de PE chez une des femmes de la famille a été confirmée dans des études plus récentes, avec un niveau de risque ajusté à l'âge, l'ethnie, l'obésité et le tabagisme, estimé plutôt aux alentours de 2 (OR de 1,7 à 2,3). (Carr 2005) Une étude a également rapporté une augmentation du risque de survenue de PE en cas d'existence de cas de PE dans la famille du père de l'enfant à naître. Ces résultats vont dans le sens de l'existence d'un terrain génétique tendant à favoriser la survenue d'une PE. (Esplin 2001)

### - Facteurs environnementaux

La vie en altitude (par le biais de l'hypoxie placentaire) et le stress sont deux facteurs de risque de la maladie. (Dubar 2012)

Le tabac, contrairement aux données plus anciennes ne prenant pas en compte tous les facteurs de confusion, serait en réalité un facteur de risque de PE, indépendamment du risque de RCIU. (Tanaka 2019)

## 1.6 GÉNÉTIQUE DE LA PE

De très nombreuses études génétiques ont été conduites autour de la PE et des pathologies vasculaires placentaires en général. Plusieurs types d'études génétiques ont été utilisés pour essayer de résoudre le mystère de la PE (études familiales, études sur les jumeaux, analyses de ségrégation, analyses de liaison, études d'association et des études à partir de séquençage nouvelle-génération). Grâce à ces études, la PE est connue comme étant un syndrome multifactoriel qui a une base génétique polygénique, et une héritabilité estimée à environ 55 % à partir de l'analyse de grandes cohortes scandinaves. (Cnattingius 2004)

Cependant, déterminer un gène responsable de l'apparition d'un syndrome ne consiste pas uniquement en la recherche d'un polymorphisme ou d'une mutation causale. Le niveau d'expression d'un gène peut également être l'élément causal. De nombreux auteurs se sont ainsi penchés sur des études transcriptomiques placentaires ou des études de la méthylation pour rechercher des gènes causaux. L'interprétation de ces résultats est complexe. Plusieurs polymorphismes ont en effet été retrouvés au sein de plusieurs populations différentes et les gènes mis en évidence sont impliqués dans des voies biologiques très diverses. Les principaux gènes retrouvés sont :

- le gène de l'angiotensinogène (AGT), facteur impliqué dans la régulation de la pression artérielle (Ward 1993)
- le gène du facteur V de Leiden (FVL), facteur de la coagulation impliqué dans les thrombophilies (Dizon-Townson 1996)
- le gène HLA-G (human leucocyte antigen G), codant une protéine de surface responsable de l'identité cellulaire et impliquée dans les réponses immunitaires (O'Brien 2001)

- le gène de l'époxyde hydrolase (EPHX), qui est une enzyme antioxydante (Zusterzeel 2001)
- le gène STOX1 (storkhead box 1), impliqué dans la migration et la fusion cellulaire (van Dijk 2005)

La PE peut être vue comme un trouble familial impliquant visiblement plusieurs gènes appartenant à de multiples voies biologiques.

### 1.7 TRAITEMENT

Il n'existe actuellement pas de traitement curatif de la PE mis à part l'arrêt de la grossesse. Lorsque la PE survient prématurément, la poursuite de la grossesse peut se justifier afin de limiter les séquelles post-natales de la prématurité. Les modalités de prise en charge de la PE dépendent essentiellement de la sévérité de la pathologie et l'âge gestationnel. (Figures 1 et 2)

Pré-éclampsie < 24SA	Pré-éclampsie 24-34 SA	Pré-éclampsie 34-36 SA	Pré-éclampsie > 37 SA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• PES : interruption de grossesse à discuter</li> <li>• PEM : expectative</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PES : expectative à discuter</li> <li>• PEM : expectative</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PES : accouchement</li> <li>• PEM : expectative</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PES : accouchement</li> <li>• PEM : accouchement</li> </ul>

Figure 1 : Prise en charge de la pré-éclampsie modérée (PEM) ou sévère (PES) selon le terme de grossesse (HTA et grossesse : consensus d'experts de la Société française d'hypertension artérielle, <http://www.sfhta.eu>) PEM : pré-éclampsie modérée ; PES : pré-éclampsie sévère ; SA : semaine d'aménorrhée.

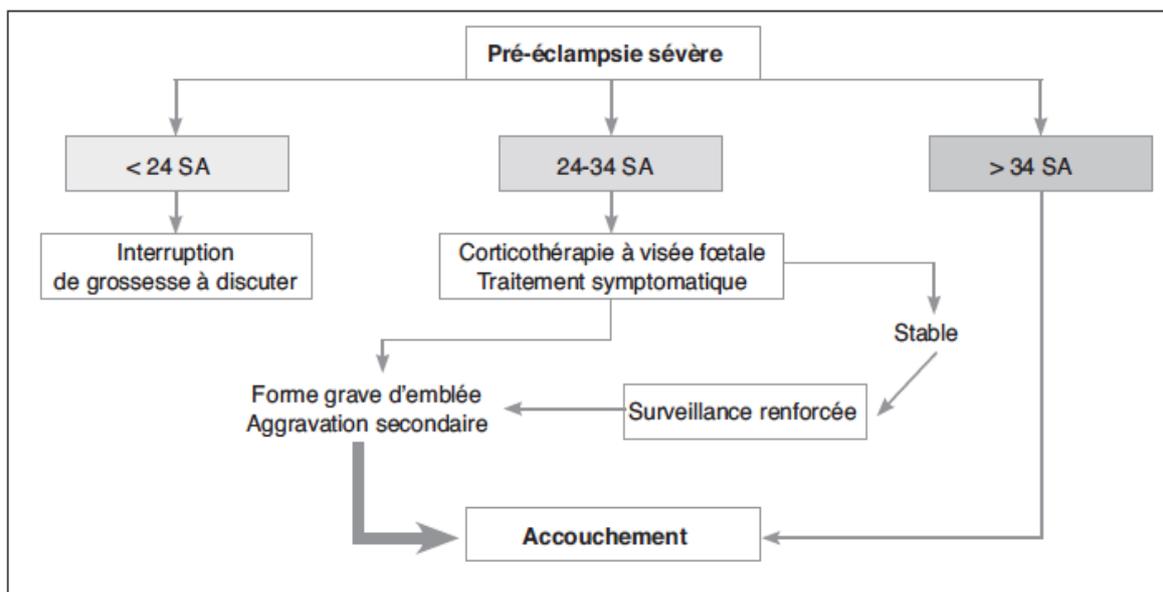


Figure 2 : Prise en charge de la pré-éclampsie sévère selon le terme de la grossesse (HTA et grossesse : consensus d'experts de la Société française d'hypertension artérielle).

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

Ce traitement curatif étant pourvoyeur d'une morbidité néonatale majeure du fait de la prématurité induite, il apparaît nécessaire de mieux prédire et prévenir la PE.

## **1.8 PRÉVENTION**

De nombreuses méthodes de prévention ont été publiées, avec pour objectif de réduire la probabilité de survenue ou la gravité de la PE. Très peu ont donné lieu à des résultats probants. A ce jour, le seul traitement ayant montré un effet en prévention de la PE et du RCIU est l'acide acétylsalicylique. L'efficacité de l'aspirine pour prévenir la survenue d'une PE est évaluée depuis plus de 30 ans et plus d'une centaine d'essais cliniques ont été publiés. (Beaufils 1985, Lecarpentier 2016) Après plusieurs périodes de controverse, le bénéfice préventif de la prise d'acide acétylsalicylique à faible dose (60–150 mg) sur la survenue d'une PE est étayé par plusieurs méta-analyses, notamment chez les patientes présentant un antécédent de PE. Le bénéfice préventif de la prise d'acide acétylsalicylique sur la survenue d'une PE est étayé par plusieurs méta-analyses. (Askie 2007, Bujold 2010, Bujold 2014, Roberge 2018)

L'efficacité de l'aspirine dans cette indication a encore été confirmée récemment par le vaste essai contrôlé randomisé ASPRE (Rolnik 2017). Dans le cadre de cet essai clinique randomisé multicentrique mené dans 12 pays, 26 941 femmes ont été soumises au dépistage de la PE, et 1 776 participantes présentant un risque accru ont été réparties aléatoirement en deux groupes, soit placebo ou aspirine (150 mg au coucher).

Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

- La plupart des cas de PE avant terme pouvaient être détectés au moyen d'un algorithme de dépistage au premier trimestre.
- La prise d'aspirine commencée entre la 11e et la 14e semaine de grossesse a entraîné une réduction de 62 % de la PE avant terme (<37 semaines) et une réduction de 82 % de la PE

d'apparition précoce (<34 semaines) : 1,6% de PE avant terme contre 4,3% dans le groupe contrôle, soit un OR à 0,38 (IC95% 0,20-0,74)

- Une tendance à la réduction du risque de MFIU, du décès néonatal, du RCIU et du syndrome de détresse respiratoire a été observée.
- La fréquence des effets indésirables était identique dans les deux groupes.

Le risque élevé de PE était défini par une combinaison de paramètres au premier trimestre (dépistées selon l'algorithme de la Fetal Medicine Foundation FMF) : des facteurs maternels tels que l'âge, l'ethnie, les antécédents, mais également la pression artérielle moyenne, la moyenne des index de pulsatilité des deux artères utérines et le dosage de biomarqueurs sériques : la PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A) et le PIGF (Placental Growth Factor).

Sur l'ensemble de la littérature, on considère que 60% des PE pourraient être évitées par la prise précoce d'acide acétylsalicylique. Toutefois, l'âge gestationnel auquel ce traitement doit être instauré a longtemps été débattu. L'aspirine a longtemps été un traitement controversé concernant la prévention de la PE. Cependant, les premières méta-analyses n'avaient pas pris en compte des études récentes qui ont évalué la prise d'aspirine  $\geq 100$  mg avant 16 SA et qui ont distingué le risque de PE précoce et tardive. Comme le souligne la dernière méta-analyse publiée par Roberge et al., le traitement par aspirine doit être commencé avant 16 SA à une dose  $\geq 100$  mg par jour pour prévenir les PE précoces. (Roberge 2017) Dans ces conditions, il a été montré que l'aspirine, administrée aux femmes à haut risque de PE, réduit très significativement le taux de naissance avant 34SA, ce qui induit une réduction de 70 % de la durée des séjours en unité de soins intensifs néonataux. L'effet bénéfique, majoré lorsque la compliance est  $\geq 90$  %, n'est cependant pas observé chez les femmes présentant une HTA chronique préexistante. (Bujold 2014, Roberge 2017, Poon 2017, Roberge 2018)

L'apport de calcium aurait un effet préventif bénéfique dans la population des femmes carencées, correspondant principalement aux populations de pays en voie de développement parmi lesquelles l'incidence de la pré-éclampsie est très élevée. (Hofmeyr 2018)

Plusieurs essais randomisés ont évalué l'intérêt des antioxydants (vitamine C et vitamine E) des héparines de bas poids moléculaire et des donneurs de NO pour la prévention de la PE mais sans succès. (Mol 2016)

## 1.9 DÉPISTAGE

Les recommandations internationales relatives à la prise en charge anténatale préconisent qu'à la première consultation, toute femme devrait pouvoir bénéficier d'une estimation du risque de PE basée sur les facteurs de risque propres à son histoire clinique. Un dépistage efficace peut être proposé pour les PE précoces et l'intérêt d'un dépistage précoce de la PE réside dans la possibilité d'instaurer une prophylaxie par aspirine. Cependant, les PE à déclenchement plus tardif et qui requièrent un accouchement après 34 SA constituent deux tiers de toutes les PE. Elles représentent donc également un défi majeur en termes de dépistage. (Poon 2014)

Il est dès lors intéressant de proposer une stratégie d'identification des patientes à risque en deux étapes qui engloberait tous les cas de PE. La première étape a lieu en fin de premier trimestre et a pour but de cibler les PE précoces afin d'en réduire substantiellement sa prévalence en prescrivant un usage prophylactique de doses faibles d'aspirine avant la 16e SA.

### ***Estimation précoce du risque au premier trimestre***

Plusieurs facteurs doivent être considérés pour une estimation précoce du risque de PE.

#### *Facteurs biophysiques*

La pression artérielle moyenne (PAM) est augmentée significativement aux 11-13e SA chez les femmes qui développeront une PE. Il existe une corrélation linéaire négative entre la PAM et l'âge gestationnel à l'accouchement d'une femme pré-éclamptique. (Wright 2012)

Le Doppler de l'artère utérine (DAU) permet d'appréhender de façon non invasive la circulation utéroplacentaire. La capacité de mesurer des valeurs fiables du DAU dépend de l'expérience de l'échographiste, de l'utilisation des techniques standardisées d'ultrasonographie pour avoir une uniformité de résultats parmi les différents opérateurs. Cette mesure est également affectée par l'âge gestationnel au dépistage, le poids maternel, l'origine ethnique et l'histoire d'un diabète sucré et doit donc être ajustée selon ces facteurs. L'index de pulsatilité (IP) de l'artère utérine est augmenté de façon significative chez les femmes sujettes à la PE et il y a une corrélation linéaire

négative entre la pression artérielle utérine et l'âge gestationnel à l'accouchement. (Wright 2012) Il y a une association significative entre la PAM et l'IP de l'artère utérine. C'est pourquoi, lorsque l'on combine ces deux marqueurs biophysiques lors du calcul du risque spécifique de la PE, les facteurs de corrélation doivent être pris en considération pour éviter de surestimer les contributions de chacun des marqueurs afin de fournir une estimation correcte du risque de PE. (Poon 2014)

L'angiographie Doppler 3D placentaire semble être une approche prometteuse pour évaluer la vascularisation utéroplacentaire en fin de premier trimestre par une méthode non invasive et sans utilisation de produits de contraste. (Morel 2010, Duan 2015)

### *Facteurs biochimiques*

Parmi les facteurs biochimiques précédemment explicités, la PAPP-A et le PIGF sont deux biomarqueurs démontrant des résultats prometteurs dans la prédiction précoce de la PE. Ceux-ci permettent en effet d'améliorer les taux de détection obtenus à partir des seuls facteurs maternels. (Tableau 1)

L'intérêt d'une mesure du ratio sFlt-1/PIGF réalisé en fin de premier trimestre de grossesse reste très limité en termes de prédiction précoce de la PE, qu'il soit utilisé seul ou associé aux données cliniques maternelles ou à d'autres biomarqueurs. En effet, les taux de sFlt-1 commencent à augmenter significativement dans le sérum des femmes qui vont développer une pré-éclampsie seulement dans les 5 semaines précédant les premiers signes cliniques. (Verlohren 2010)

### *Approche intégrée multifactorielle*

Les sensibilités et les spécificités de ces différents facteurs considérés isolément étant limitées, il est nécessaire de combiner ces différents facteurs dans le cadre d'algorithmes de prédiction. L'algorithme de la FMF a été le plus étudié : l'estimation du risque est calculée à partir des dosages du PIGF et de la PAPP-A, des mesures biophysiques (poids, taille, IMC, PAM et DAU), des caractéristiques maternelles (diabète, hypertension, origine géographique, tabac...), son historique

(antécédents obstétricaux, parité, antécédents de PE, d'HTA, lupus érythémateux, SAPL...), et les informations relatives à la grossesse en cours (âge gestationnel : date de l'échographie et longueur crânio-caudale).

Les performances cliniques de ces approches sont prometteuses avec un taux de détection élevé des PE précoces (>90% des PE avant 34 SA). Un dépistage efficace de la PE, combiné et se déroulant d'une façon analogue au dépistage actuel des aneuploïdies, pourrait donc être également proposé aux femmes enceintes au premier trimestre de grossesse. (Poon 2014) La combinaison des caractéristiques maternelles, des marqueurs échographiques et biochimiques et du dépistage actuel des aneuploïdies au premier trimestre pourrait permettre de détecter la plupart des cas de PE nécessitant un accouchement prématuré et 90 % des cas les plus graves. (Bujold 2018) (Tableau 1)

Tests de screening	Taux de détection de pré-éclampsie (%) (taux de faux positifs : 5 % - 10 %)		
	< 34 semaines	< 37 semaines	< 42 semaines
Caractéristiques maternelles	36-51	33-43	29-40
Pression artérielle moyenne (MAP)	58-73	44-59	37-54
Doppler artère utérine (DAU)	59-75	40-55	31-42
PAAP-A ( <i>pregnancy associated plasma protein-A</i> )	44-55	37-58	32-42
Placental growth factor (PIGF)	59-72	41-54	29-40
PAPP-A et PIGF	60-74	43-56	30-41
DAU, MAP et PAPP-A	82-93	53-75	36-60
DAU, MAP et PIGF	87-96	61-77	38-53
DAU, MAP, PAPP-A et PIGF	93-96	61-77	38-54

Tableau 1 : Taux de détection de PE en fonction de la combinaison des marqueurs biologiques et biophysiques utilisés pour le calcul de risque (d'après Akolekar 2012) MAP : Pression Artérielle Moyenne DAU : Doppler des Artères Utérines PAPP-A : Pregnancy-Associated Plasma Protein-A PIGF : Placental Growth Factor

### Aide au diagnostic après 20 SA

La seconde étape a lieu au 3<sup>ème</sup> trimestre et permettrait de cibler les grossesses à risque de PE plus tardive et qui pourraient bénéficier d'une surveillance rapprochée afin d'anticiper les complications liées à la survenue d'une PE. Le ratio sFlt-1/PIGF est un nouvel outil diagnostique pour la PE. Un ratio sFlt-1/PIGF augmenté (concentrations majorées de sFlt-1 et diminuées de PIGF) peut être détecté durant la seconde moitié de la grossesse chez des femmes qui présenteront une PE ou plus globalement une pathologie vasculaire placentaire. (Levine 2004) Plusieurs études ont ainsi prouvé que ce ratio permet de prédire le développement d'une PE après 20 SA. Parmi elles, l'étude PROGNOSIS (Prediction of Short-Term Outcome in Pregnant Women with Suspected Preeclampsia Study) a conclu qu'un ratio sFlt-1/PIGF  $\leq 38$  peut être utilisé pour prédire l'absence de PE à court

terme chez les femmes chez qui ce syndrome peut être suspecté cliniquement. (Zeisler 2016) Cette valeur seuil de 38 est indépendante de l'âge gestationnel et permet également d'exclure le développement d'un syndrome HELLP une semaine après sa détermination. La valeur prédictive positive de ce ratio pour détecter les effets indésirables liés à la PE rapportés par l'étude PROGNOSIS était de 36,7 %, ce qui représente une amélioration en termes de prédiction comparés à l'utilisation de la protéinurie et de la tension artérielle qui ont une valeur prédictive positive de seulement 20 %. La valeur prédictive négative de ce ratio  $\leq 38$  est quant à elle  $> 99$  % et permet d'exclure la survenue d'une PE dans la semaine. Le calcul de ce ratio sFlt-1/PIGF permettrait en pratique clinique d'adapter le suivi des patientes à risque de PE. (Zeisler 2016)

Le ratio est ainsi une excellente aide diagnostic en cas de suspicion de PE. Le ratio sFlt-1/PIGF est également étudié pour sa valeur pronostique afin de prédire une issue materno-fœtale défavorable en cas de PE avérée. Un ratio sFlt-1/PIGF  $> 655$  avant 34 SA et  $>201$  après 34SA serait hautement prédictif d'une PE nécessitant une décision d'extraction fœtale dans les 48h. La vitesse de variation du ratio sFlt-1/PIGF est également prédictive de l'évolutivité et du pronostic materno-fœtal de la PE, aucune étude n'a cependant analysé l'intervalle optimal de répétition du dosage sFlt-1/PIGF en fonction du ratio et de l'âge gestationnel. (Baltajian 2016, Zeisler 2016)

Au total, la PE est un syndrome multifactoriel avec un grand polymorphisme clinique. La prise en charge thérapeutique de la PE se limite actuellement au traitement symptomatique de l'hypertension et des complications de la maladie et à l'extraction placentaire en cas de risque vital. Le seul traitement préventif ayant prouvé son efficacité à ce jour est l'aspirine. La nécessité d'instaurer une surveillance obstétricale adaptée des femmes à risque de développer une PE et la possibilité de débiter précocement un traitement prophylactique par aspirine souligne l'intérêt d'un dépistage. Ce dépistage serait qualifié d'efficace s'il permettait d'identifier les femmes enceintes à haut risque de PE qui pourront alors bénéficier de mesures prophylactiques, d'une surveillance rapprochée et d'interventions thérapeutiques le cas échéant, associé à un taux raisonnable de faux positif. Il est nécessaire d'améliorer les connaissances physiopathologiques afin de perfectionner les tests de dépistage de la PE disponibles actuellement.

## **2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA PE**

### **2.1 PLACENTATION NORMALE**

Le placenta humain est un organe autonome et transitoire qui permet le développement et la croissance de l'embryon puis du fœtus. Il se met en place dès le 8ème jour après la fécondation, dès lors que le blastocyste a épuisé ses réserves nutritives. Il constitue une interface entre le fœtus et l'endomètre déцидualisé, assurant à la fois un rôle de barrière et d'échanges essentiels à la croissance fœtale. Le placenta humain présente d'importantes fonctions immunomodulatrices et endocrines, fondamentales à l'établissement de la grossesse, à l'adaptation de l'organisme maternel, à la croissance et au développement du fœtus ainsi qu'au processus de parturition.

La placentation humaine est de type « hémochoriale », car le sang maternel est directement au contact des villosités choriales au niveau de la chambre intervillieuse, et se caractérise par une invasion du trophoblaste dans la décidue et le myomètre. La cellule trophoblastique est la cellule essentielle du placenta. Après la phase d'implantation, le trophoblaste se différencie d'une part en cytotrophoblastes villositaires (CTV) qui assurent les échanges fœto-maternels et la fonction endocrine du placenta, et d'autre part en cytotrophoblastes extravillous (CTEV) invasifs permettant l'implantation du placenta et le remodelage des vaisseaux utérins. De ce fait, la placentation humaine présente un phénomène d'invasion majeure du trophoblaste dans la décidue et le myomètre en première partie de grossesse. Ce phénomène d'invasion va permettre d'établir progressivement un contact direct entre trophoblaste et sang maternel.

### **2.2 EMBRYOLOGIE**

Le développement du placenta peut être divisé en trois stades : pré-lacunaire, lacunaire et villositaire. (Lecarpentier 2015)

#### *Stade pré-lacunaire*

Au 6<sup>ème</sup> jour après la fécondation, le blastocyste limité par une assise cellulaire, le trophoctoderme, s'accroche à l'épithélium utérin. À partir du trophoctoderme se différencient une assise cellulaire interne, constituée de cytotrophoblastes, et une assise cellulaire externe, le syncytiotrophoblaste

(Figure 3A, 3B). Ce dernier, très invasif à ce stade, pénètre l'épithélium utérin et envahit l'endomètre, grâce à son activité protéolytique. Le blastocyste s'implante au sein de la muqueuse utérine.

#### *Stade lacunaire*

Vers le 8<sup>ème</sup> jour suivant la fécondation, des vacuoles apparaissent dans cette masse syncytiale, qui vont progressivement former des lacunes entre les travées syncytiales. Ces lacunes constituent un espace qui deviendra la chambre intervillieuse (Figure 3C).

#### *Stade villositaire*

Au 13<sup>ème</sup> jour, les cytotrophoblastes vont envahir les travées de syncytium formant les villosités chorales primaires (Figure 3D). Après deux semaines, ces villosités primaires sont envahies par le mésenchyme allantoïdien d'origine embryonnaire et constituent les villosités secondaires (Figure 3E). Les capillaires fœtaux apparaissent dans l'axe mésenchymateux, cette vascularisation caractérise la formation de villosités tertiaires (Figure 3F).

Trois semaines après la fécondation, l'unité structurale et fonctionnelle du placenta humain, la villosité chorale, est ainsi en place dans sa structure définitive. Elle est soit flottante dans la chambre intervillieuse, soit ancrée dans l'utérus maternel (Figure 3F).

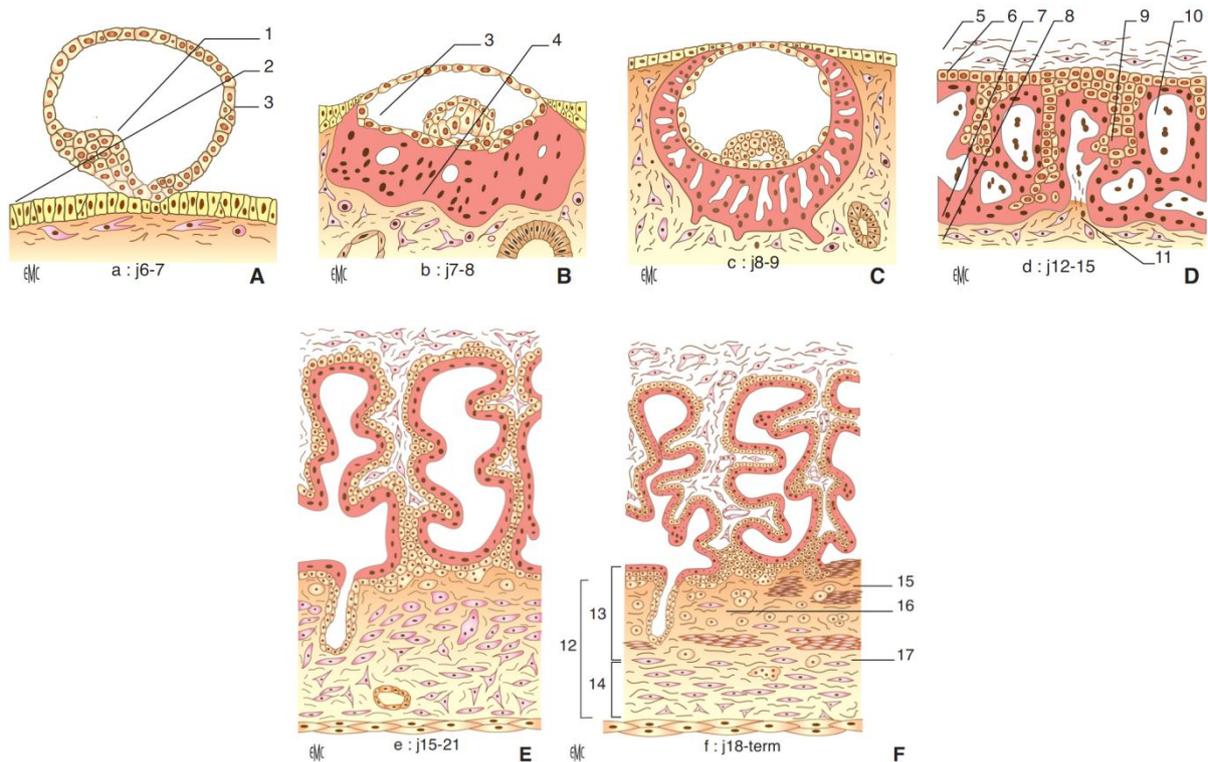


Figure 3 : Représentation schématique des principales étapes du développement placentaire humain (d'après Lecarpentier 2015). A et B. Stade prélacunaire. C. Stade lacunaire. D. Stade villositaire et villosités primaires. E. Stade villositaire et villosités secondaires. F. Stade villositaire et villosités tertiaires. 1. Bouton embryonnaire ; 2. Epithélium endométrial ; 3. Cytotrophoblaste ; 4. Syncytiotrophoblaste ; 5. Mésoderme embryonnaire ; 6. Plaque chorale ; 7. Coque cytotrophoblastique ; 8. Décidue ; 9. Villosité primaire ; 10. Lacunes de sang maternel ; 11. Vaisseau endométrial ; 12. Zone jonctionnelle ; 13. Plaque basale ; 14. Lit placentaire ; 15. Fibrinoïde de Rohr ; 16. Trophoblaste extravilloux ; 17. Fibrinoïde de Nitabuch

### 2.3 VASCULARISATION UTEROPLACENTAIRE

L'artère utérine, principale branche de l'artère iliaque interne, assure la vascularisation de la majeure partie de l'utérus. Les artères utérines gauche et droite montent le long du côté latéral de l'utérus dans le ligament large, et se terminent en s'anastomosant le plus souvent avec l'artère ovarienne. Les artères utérines se divisent pour donner des artères arquées, qui vont secondairement donner les artères radiaires qui traversent le myomètre avant de se transformer en artères spiralées au niveau de l'endomètre. (Figure 4).

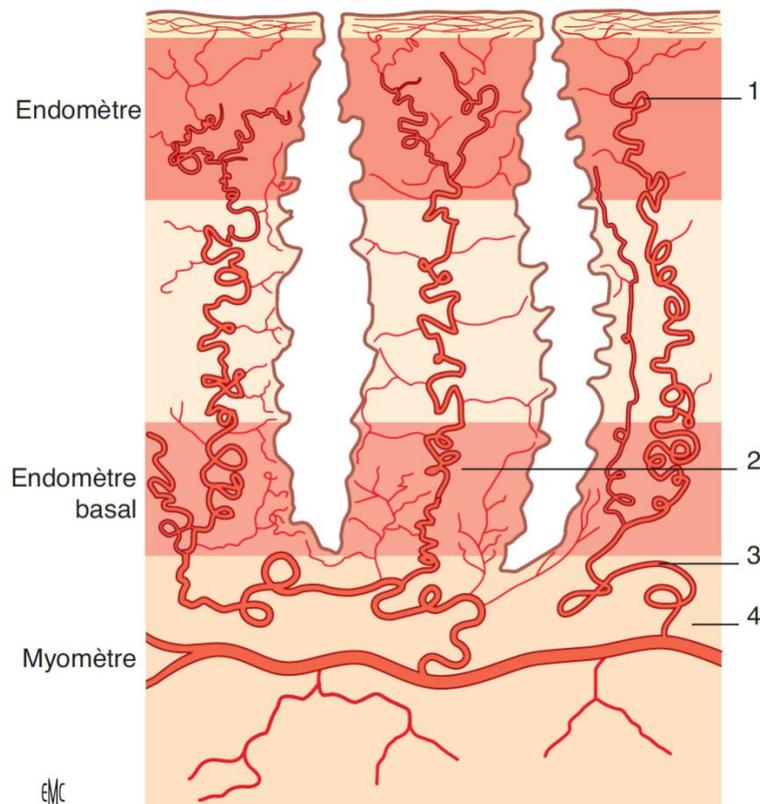


Figure 4 : Schéma de la vascularisation artérielle de l'utérus humain non gravide. 1. Artère spiralée ; 2. artère basale ; 3. artère radiée ; 4. Artère arquée. (D'après Lecarpentier 2015)

Le sang maternel traverse le myomètre via les artères utéroplacentaires, remodelées par les cellules trophoblastiques, et entre dans la chambre intervillieuse sous forme d'un jet produit par la pression artérielle maternelle. Le sang maternel circule ensuite autour des villosités placentaires permettant les échanges entre la mère et le fœtus. Le drainage vers la circulation maternelle systémique se fait via des plexus veineux myométriaux organisés en un système anastomotique. (Evain-Brion 2010)

#### **2.4 INVASION TROPHOBLASTIQUE ET REMODELAGE VASCULAIRE UTERIN**

La placentation humaine est caractérisée par une phase hautement invasive durant laquelle le tissu villositaire recouvre l'entièreté de la surface du sac gestationnel (Burton 2009, Jauniaux 2006, Jauniaux 2016). Du côté utérin, l'endomètre se transforme en décidua dès la fin de la phase sécrétoire du cycle menstruel. Cette transformation est caractérisée par une différenciation et prolifération des cellules du réseau conjonctif et du tissu glandulaire, une invasion leucocytaire notamment par les cellules NK (uterine natural killer cells ou uNKs) et par le remodelage des artères spiralées en artères utéro-placentaires.

Les parois des artères spiralées et radiaires contiennent une grande quantité de cellules musculaires lisses avec une innervation autonome, par conséquent, elles sont très sensibles aux stimuli adrénérgiques exogènes et endogènes. Très développées à la fin du cycle menstruel, les artères spiralées subissent en cas de grossesse une transformation progressive en artères utéro-placentaires, notamment dans la zone d'implantation du blastocyste, en rapport avec l'invasion du trophoblaste extravilleux. Le remodelage vasculaire des artères spiralées se caractérise par une dilatation luminale terminale ainsi qu'une perte de la composante élastique interne et de la couche musculaire lisse. Dès 5 semaines d'aménorrhée (SA), les modifications structurales telles que la vacuolisation endothéliale, la désorganisation des cellules musculaires lisses et la dilatation lumaire surviennent dans la zone d'implantation dans la portion déciduale non concernée par la placentation. Ces modifications seraient dues à des facteurs hormonaux circulant maternels. Certains facteurs angiogéniques sécrétés par les cellules trophoblastiques pourraient être impliqués dans le remodelage vasculaire, tels que vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), placental growth factor (PIGF), VEGF-C. L'angiogénine est aussi un facteur angiogénique produit par le trophoblaste invasif. L'hCG (human Chorionic gonadotropin) produite par le CTV et CTEV possède également des propriétés angiogéniques similaires à celle du VEGF et du récepteur de l'hCG. Tous ces éléments suggèrent que des facteurs trophoblastiques sont directement impliqués dans des processus d'angiogenèse utérine et de remodelage des vaisseaux utérins indépendamment de l'invasion de la paroi des vaisseaux par les cellules trophoblastiques.

Le remodelage vasculaire par le trophoblaste induit une interaction directe entre le CTEV et les composants de la paroi artérielle (cellules musculaires lisses et cellules endothéliales). Cette interaction est étroitement contrôlée par les cellules du stroma et des glandes déciduales utérines, et par les cellules du système immunitaire maternel. De 30 à 50 artères spiralées sont recrutées lors de la placentation. La migration des CTEV est régulée par de nombreux facteurs de croissance, protéases et cytokines déciduaux et est moins prononcée en périphérie qu'au centre du lit placentaire (Pijnenborg 1981). Les artères spiralées mais également les veines sont transformées en un réseau vasculaire à faible résistance aux flux sanguin maternel, indispensable au bon développement de la circulation utéro-placentaire et à la croissance foëto-placentaire (Burton 2009).

Les CTEV, situés à la base de la villosité crampon (Figure 5), apparaissent comme des colonnes de cellules polarisées, agrégées les unes aux autres, reposant sur une lame basale. Elles sont initialement prolifératives puis elles perdent leur caractère prolifératif et se différencient en cytotrophoblastes invasifs, à la partie distale de la colonne. Ces cellules, extrêmement invasives, colonisent l'endomètre et le myomètre superficiel. Cette invasion, définie comme interstitielle, se termine en profondeur par la formation de cellules géantes multinucléées. Dans la grossesse normale, les CTEV envahissent le premier tiers de l'épaisseur de l'endomètre utérin. Les CTEV migrent vers les lumières des artères spiralées, forment un « bouchon » trophoblastique et pénètrent dans les parois des artères.

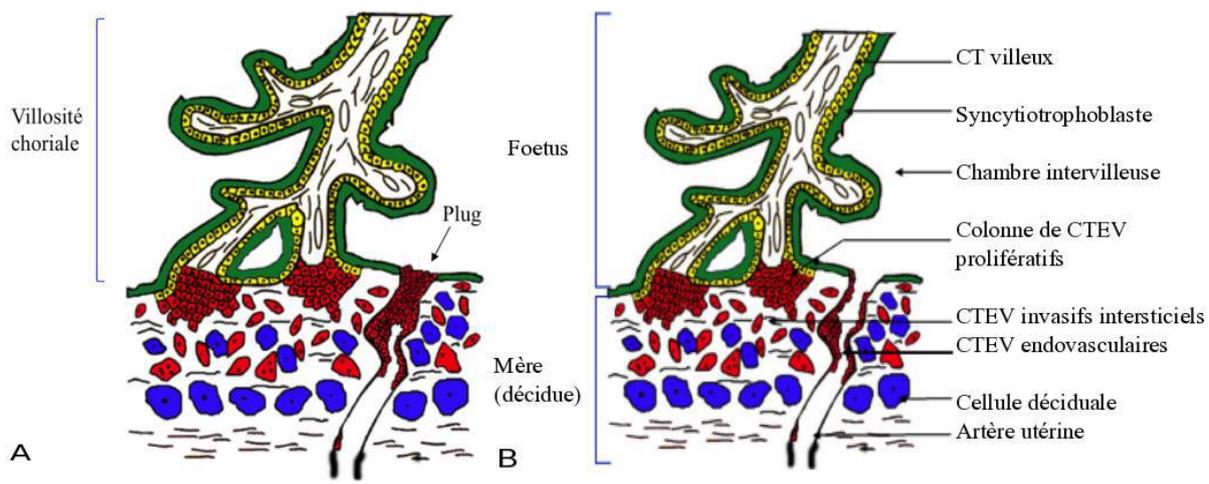


Figure 5 : Représentation schématique de la villosité crampon. A : villosité chorale et plugs endovasculaires en place (flèche), empêchant l'inondation de la chambre intervillieuse par le sang maternel en début de grossesse. B : Un type de villosité baigne librement dans la chambre intervillieuse (villosité flottante), l'autre type de villosité est ancrée dans l'endomètre maternel (villosité crampon). Les bouchons endovasculaires disparaissent progressivement ce qui permet l'entrée du sang maternel dans la chambre intervillieuse. (D'après Tsatsaris 2006)

Les analyses anatomiques et échographiques de Hustin et Schaaps (Hustin 1987) et les travaux de Burton sur les spécimens d'hystérectomie de la collection de Boyd et Hamilton du département d'anatomie de l'université de Cambridge (Burton 1999) ont montré que les CTEV envahissent non seulement les tissus utérins, mais forment également une coque cellulaire continue entre la décidua et la chambre placentaire intervillieuse (Figure 5). Cette coque se prolonge par des « bouchons trophoblastiques » directement dans la lumière des artères spiralées, au niveau de leur ouverture dans la chambre intervillieuse (Figure 6). Cette barrière cellulaire crée un labyrinthe qui filtre le sang maternel et permet seulement au plasma maternel de rentrer dans la chambre intervillieuse. (Burton

2002, Burton 2007, Jauniaux 2003) En raison de la présence de ces bouchons trophoblastiques, la pression d'oxygène dans l'espace intervilloux au premier trimestre de la grossesse est d'environ 20 mmHg, alors qu'au niveau de la décidue elle avoisine 60 mmHg. L'équipe de Jauniaux et Burton a également démontré que, contrairement à la circulation sanguine maternelle qui ne rentre pas directement dans la chambre intervillouse, la lumière des glandes déciduales par contre s'y ouvre directement ce qui permet à leurs sécrétions de passer facilement à l'intérieur du placenta (Burton 2007). Ces données anatomiques ont conduit à changer le concept classique qui décrit la placentation humaine comme étant hémochoriale dès le début de grossesse et de la redéfinir comme étant initialement histiotrophique (basée sur les sécrétions des glandes endométriales) puis progressivement hémochoriale. (Jauniaux 2016)

En effet, à la fin du premier trimestre, les bouchons de CTEV se disloquent progressivement, permettant au sang maternel de rentrer directement de façon continue dans la totalité de la chambre intervillouse. À partir de ce moment, la barrière placentaire devient finalement hémochoriale. La phase de la grossesse humaine entre 10 et 14 SA est donc une phase de transition anatomique fondamentale pendant laquelle la structure du sac gestationnel et du placenta primitif et donc de la barrière materno-fœtale change considérablement. Cette phase de remodelage des annexes fœtales est marquée principalement par la disparition des deux tiers du placenta primitif créant les membranes du placenta définitif, par l'oblitération du coelome extra-embryonnaire (cavité chorionique), la dégénérescence du sac vitellin secondaire et par l'établissement de la circulation maternelle intraplacentaire. (Jauniaux 2003) Ces changements anatomiques rapprochent les circulations maternelle et fœtale en vue de faciliter les échanges entre les deux compartiments au cours du deuxième et troisième trimestre de la grossesse.

Le placenta est ainsi un organe qui subit des variations importantes d'oxygénation au cours de la grossesse. Au premier trimestre, le taux d'oxygénation est physiologiquement très bas (2 % O<sub>2</sub>) et augmente à un taux de 8 % O<sub>2</sub> au cours du deuxième et troisième trimestre de la grossesse. La réplification in vitro de l'environnement des trophoblastes à l'intérieur des villosités placentaires est un défi, car entre autres, les variations des taux d'oxygénation peuvent induire des changements phénotypiques. (Jauniaux 2001, Rodesch 1992) Ce gradient d'O<sub>2</sub> module la migration du CTEV (Gembachev 1997) et a un effet régulateur sur le développement villositaire, notamment de la

vasculogénèse (Burton 2010) et sur les fonctions endocriniennes du trophoblaste. (Cocquebert 2012) Au cours du premier trimestre certains auteurs ont en effet démontré qu'un faible taux d'oxygène aide au maintien des CTEV dans un phénotype prolifératif et non invasif, via la régulation du facteur hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ . (Caniggia 2000, Huppertz 2009) Lorsque l'oxygénation atteint un taux plus élevé les CTEV changent de phénotype : le trophoblaste prolifératif se différencie vers la voie invasive. Ainsi, les trophoblastes envahissent le myomètre et vont induire la modification physiologique des artères spiralées (Kaufmann 2003, Kemp 2002), bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore clairs. Au cours de ce processus, les artères perdent leur tunique musculaire lisse et leur lamina élastique, les cellules endothéliales maternelles sont remplacées par les trophoblastes extravilloux. En conséquence, les artères se dilatent et deviennent atones, insensibles aux éléments vasoactifs (Figure 6).

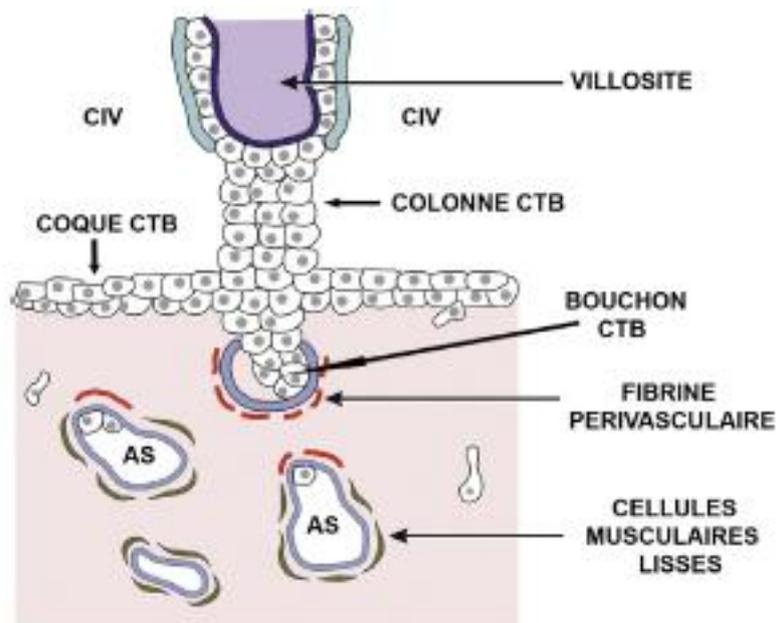


Figure 6 : Diagramme illustrant la migration des cellules cytotrophoblastiques (CTB) autour et à l'intérieur de la lumière des artères spiralées (AS). CIV : chambre intervillieuse. (D'après Jauniaux 2016, avec accord)

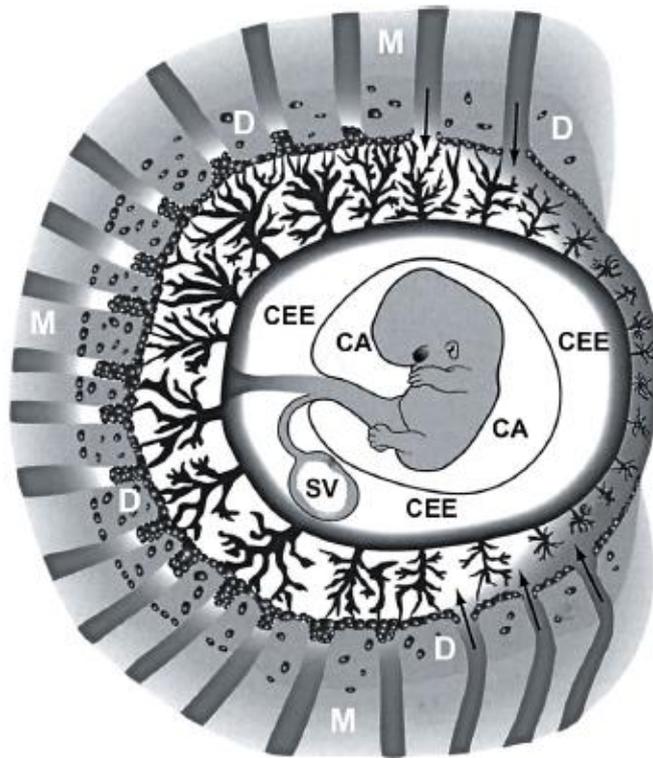


Figure 7 : Diagramme illustrant l'anatomie du sac gestationnel vers la 8e SA. CA : cavité amniotique ; CEE : coelome extra-embryonnaire ; SV : sac vitellin ; D : décida ; M : myomètre. Notez l'arrivée d'une circulation maternelle en périphérie du placenta primitif. (D'après Jauniaux 2016, avec accord)

## 2.5 GRADIENT EN O<sub>2</sub> UTERO-PLACENTAIRE PHYSIOLOGIQUE

Le trophoblaste villositaire a besoin d'O<sub>2</sub> pour ses activités métaboliques essentielles, c'est-à-dire principalement pour les transferts materno-fœtaux et la synthèse de protéines tout au long de la grossesse. Cependant, au premier trimestre, le tissu villositaire et plus particulièrement le syncytiotrophoblaste présente une activité faible en enzymes du métabolisme oxydatif et une grande sensibilité au ROS. Les cellules trophoblastiques doivent alors se protéger contre l'effet délétère d'un excès en radicaux libres dérivés de l'oxygène hautement tératogènes. (Evain-Brion et Malassiné, 2010) L'ouverture des artères spiralées, amenant le sang maternel riche en O<sub>2</sub> dans la chambre intervillieuse, doit ainsi être progressive et étroitement contrôlée, pour permettre aux défenses anti-oxydantes intra-placentaires de s'adapter.

Les études in utero du niveau d'O<sub>2</sub> à l'intérieur du sac gestationnel ont montré que la pression partielle intra-placentaire en O<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub>) est 2 à 3 fois plus basse à 8—10 SA qu'à 12—14 SA. (Boyd

1970, Jauniaux 2000, Jauniaux 2001) Dans la décidua, les changements de la PO<sub>2</sub> entre 7 à 16 SA sont progressifs et indépendants des changements rapides de la PO<sub>2</sub> intra-placentaire. L'architecture du sac gestationnel humain au premier trimestre serait ainsi conçue pour limiter l'exposition du fœtus à l'O<sub>2</sub> à ce qui est strictement nécessaire au développement de ses organes et à sa croissance. (Figure 7) Cette hypoxie placentaire physiologique protège le fœtus en développement contre les effets délétères et tératogènes des ROS. Durant le premier trimestre, le développement fœtal se déroule donc dans un environnement physiologiquement bas en O<sub>2</sub>, soutenu par une nutrition histiotrophique provenant des glandes endométriales. (Hempstock 2004)

Au total, la placentation humaine est unique et caractérisée par une invasion trophoblastique dans la décidue et le myomètre, le conduisant au contact du sang maternel. La mise en place du réseau vasculaire utéro-placentaire est un phénomène complexe et primordial pour le développement fœtal et le déroulement de la grossesse. Le remodelage des artères spiralées par le trophoblaste est un processus physiologique crucial pour le développement et la croissance du fœtus. Le développement placentaire et fœtal au premier trimestre de la grossesse se fait dans un environnement pauvre en oxygène du fait de « bouchons » trophoblastiques. Cette hypoxie physiologique permet de moduler la migration du CTEV et a un effet régulateur sur le développement villositaire, notamment de la vasculogénèse et sur les fonctions endocriniennes du trophoblaste. L'ouverture des artères spiralées doit se faire de manière progressive et contrôlée pour permettre aux défenses anti-oxydantes placentaires de s'adapter à cet afflux de sang riche en oxygène.

## **2.6 PLACENTATION ANORMALE**

Les développements techniques en échographie diagnostique, et en particulier ceux de l'imagerie Doppler couleur, ont permis la visualisation précise des changements de la vascularisation placentaire dès la 5e SA. La corrélation des données cliniques, biologiques, échographiques et anatomo-pathologiques, ont permis de mieux comprendre la physiopathologie des maladies gravidiques liées aux anomalies du développement placentaire. La grande majorité de ces anomalies est due à une pathologie de la circulation utéro-placentaire dont l'origine est le plus

vraisemblablement immunologique. Ces pathologies perturbent l'interaction déciduo-trophoblastique normale et affecte le développement placentaire dès le premier trimestre de la grossesse. (Jauniaux 2016)

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

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

#### *Défaut de placentation*

Au cours de la PE, la transformation incomplète des artères spiralées se traduit par la persistance de cellules musculaires lisses au sein de leurs parois (Figure 8), en particulier au niveau de leur portion basale située au sein de la zone de jonction. L'invasion trophoblastique est défailante pour environ 30 % à 50 % des artères spiralées du lit placentaire. Si une certaine vasomotricité persiste dans 30 à 50 % des artères utéro-placentaire, cela va conduire non seulement à une diminution de la perfusion de la chambre intervillieuse, mais également et surtout à une perfusion intermittente de celle-ci. Le placenta et le fœtus en développement ayant besoin d'extraire continuellement de l'O<sub>2</sub> pour leur métabolisme respectif, cela provoque une hypoxie transitoire à l'intérieur de la chambre intervillieuse. En conséquence, le placenta est exposé à un phénomène de type ischémie-reperfusion (I/R) chronique de bas grade.

Le mécanisme aboutissant à une invasion trophoblastique défailante n'est pas encore complètement élucidé : il s'agit des causes inconnues de la PE. Il pourrait y avoir des causes immunologiques (Redman 2010) ou une protéolyse insuffisante, les enzymes protéolytiques sécrétées par les cellules trophoblastiques ayant pour rôle de permettre à ces dernières l'invasion des artères spiralées du myomètre. (Dubar 2012) On pense ainsi que la spécificité de la PE dans l'espèce humaine est liée à la spécificité humaine concernant l'invasion profonde des trophoblastes humains dans le myomètre maternel.

La PE précoce serait le résultat d'un défaut de placentation caractérisée par une infiltration incomplète du lit placentaire par le CTEV et une transformation limitée des artères spiralées en artères utéro-placentaires.

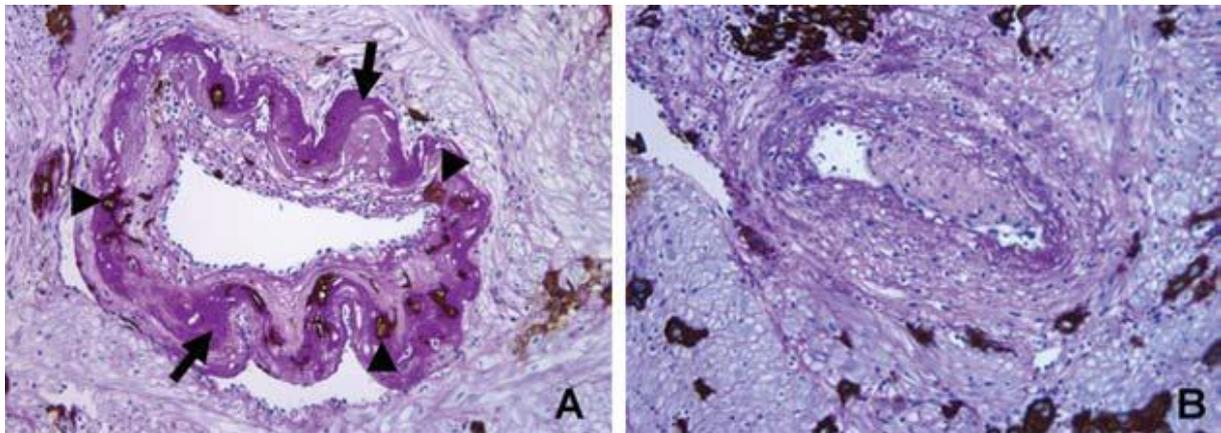


Figure 8 : Comparaison d'artères spiralées utérines remodelées ou non-remodelées. D'après Espinoza et al., 2006. Les deux images sont colorées avec la cytokératine 7 (marque les trophoblastes en marron) et à l'acide périodique de Schiff (marque en rose les polysaccharides présents dans certains tissus conjonctifs), grossissement X 200. À gauche : au sein du myomètre utérin, les artères spiralées remodelées sont caractérisées par la présence de trophoblastes (pointes de flèches) ainsi que des dégénérescences fibrineuses au sein de la paroi du vaisseau (flèches entières). À droite : les artères spiralées non-remodelées ne présentent ni trophoblastes, ni dégénérescence fibrineuse au sein de la paroi du vaisseau, et conservent des contours artériels intacts. On peut voir que des trophoblastes ont envahi le myomètre mais n'ont pas atteint la paroi du vaisseau.

#### *Ischémie/reperfusion et stress oxydant*

Le phénomène d'I/R est un puissant inducteur de stress oxydant, beaucoup plus puissant que l'hypoxie simple même prolongée car le tissu placentaire commence son développement dans un environnement physiologiquement bas en O<sub>2</sub>. Le stress oxydant stimule progressivement la libération dans la circulation maternelle de débris placentaires trophoblastiques apoptotiques et nécrotiques, des cytokines pro-inflammatoires, et des facteurs antiangiogéniques comme le sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1 ou sVEGFR-1, forme soluble du récepteur du VEGF de type 1) et l'endogline soluble. (Levine 2004, Venkatesha 2006) Ces différentes substances libérées dans la circulation maternelle, ainsi que l'activation des leucocytes circulants maternels lors de leur passage dans la chambre intervillieuse du placenta, sont responsables d'une réponse inflammatoire systémique, d'une altération de la fonction endothéliale et du développement de l'HTA. (Hubel 1999, Hung 2002, Jauniaux 2016)

### *Dysfonction endothéliale et inflammation*

De nombreux travaux ont ainsi mis en évidence des marqueurs d'activation ou de lésion cellulaire endothéliale au cours de la PE dont, entre autres, l'augmentation dans la circulation maternelle du facteur von Willebrand, de l'endothéline, de la thrombomoduline et de la fibronectine (Roberts 1989). L'identification du sFlt-1 et de l'endogline, produits en quantité excessive au cours de la PE, a mis en évidence le lien entre l'anomalie placentaire et la dysfonction endothéliale. Le sFlt-1 fixe ses ligands (le VEGF et le PlGF) qui sont impliqués dans la survie des cellules endothéliales, la vasodilatation périphérique et l'intégrité de l'endothélium fenêtré glomérulaire au cours de la grossesse normale. Les taux circulants de VEGF et de PlGF libres sont ainsi habituellement effondrés chez les patientes pré-éclamptiques, d'où un déséquilibre anti-angiogénique aboutissant à une dysfonction endothéliale maternelle et à la néphropathie glomérulaire. (Levine 2004)

L'endogline est le récepteur du TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta), protéine possédant une action sur l'homéostasie vasculaire par l'intermédiaire de la Nitric Oxide Synthase endothéliale (eNOS). La forme soluble de l'endogline (sENG) prévient donc la liaison du TGF- $\beta$  à ses récepteurs membranaires. Elle potentialise la dysfonction endothéliale induite par le sFlt-1, et contribue à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à l'HTA. Elle joue un rôle, en association avec le sFlt-1, dans l'apparition des formes sévères de la maladie et semble également être impliquée dans la physiopathologie du HELLP syndrome. (Venkatesha 2006) Les altérations cellulaires endothéliales, à la fois morphologiques et fonctionnelles, sont des éléments clés du retentissement de la PE sur les organes maternels. On observe ainsi une altération de la réponse vasomotrice conduisant à l'augmentation des résistances périphériques totales et à l'apparition d'une HTA. (Khalil 2002)

Cette altération de la réponse vasomotrice est liée à une production accrue d'endothéline et de thromboxane A<sub>2</sub>, qui sont des substances vasoconstrictrices, et plus particulièrement à une inhibition de la production de NO et de prostacycline, qui sont des substances vasodilatatrices. On note également une augmentation des résistances vasculaires périphériques due à l'activation du système rénine-angiotensine par les cytokines placentaires. (Tsatsaris 2003, Levine 2004, Levine 2006) Les activités endothéliales eNOS et cyclooxygénase qui augmentent au cours de la grossesse sont en effet inhibées dans la PE d'où une vasoconstriction et une modification de la perméabilité

capillaire en partie responsables de l'œdème et de l'HTA. (Guibourdenche 2013) Les patientes pré-éclamptiques peuvent présenter des lésions d'athérosclérose localisées au niveau des artères spiralées avec activation plaquettaire (production de TxA<sub>2</sub>), dépôts de fibrine et de complément, et présence de cellules spumeuses. Les patientes ayant un antécédent de PE ont ainsi un risque cardiovasculaire augmenté, notamment après la ménopause. (Ying 2018) Enfin, au niveau rénal, les cellules endothéliales des capillaires glomérulaires accumulent les lipides et obstruent fréquemment la lumière de ces capillaires : l'atteinte histologique caractéristique est l'endothéliose glomérulaire suggérant un rôle central pour l'endothélium dans la PE. (Spargo 1959, Strevens 2003, Jeyabalan 2007, Tsatsaris 2008, Roberts 2009, Roberts 2013, Walker 2000)

Le défaut de remodelage vasculaire utérin ne peut pas expliquer toutes les PE. (Stegers 2010) Une PE peut en effet survenir chez des patientes présentant une vascularisation utéro-placentaire normale (Doppler utérins normaux, pas de RCIU). C'est notamment le cas lorsqu'une PE survient en présence d'une grossesse multiple (gros placenta), d'un diabète, d'un placenta post-mature ou d'une infection. Il s'agit alors en général de PE tardives. La dysfonction placentaire trouve donc son origine dans d'autres causes (Dubar 2012). A l'inverse, le défaut de perfusion placentaire n'est cependant pas suffisant pour induire un syndrome pré-éclamptique. En effet, un défaut de remodelage vasculaire utérin et d'invasion trophoblastique s'observe également en cas de RCIU sans PE associée et dans un tiers des accouchements prématurés, ce qui souligne l'influence de paramètres maternels spécifiques sur l'apparition ou non du syndrome pré-éclamptique. (Guerby 2015, annexe 1)

Au total, la PE ne se résume pas à l'HTA associée à une protéinurie significative. Elle se caractérise par une dysfonction endothéliale et une réponse inflammatoire systémique. Une caractéristique physiologique importante est la diminution de la biodisponibilité du NO associée à une eNOS dysfonctionnelle mais l'origine de ce dysfonctionnement est encore méconnue.

### 3. LE STRESS OXYDANT

#### 3.1 DEFINITION

Les dérivés actifs de l'oxygène (ROS) sont des molécules simples issues du métabolisme de l'oxygène, produites physiologiquement dans tous les organismes aérobies. Toutes les cellules aérobies, qui fonctionnent grâce à l'énergie fournie par l'O<sub>2</sub>, sont source de ROS. Ceux-ci sont caractérisés par un électron non apparié associé à un radical libre, comme l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), l'hydroxyle radicalaire (HO<sup>•</sup>), le monoxyde d'azote radicalaire (NO<sup>•</sup>) ou encore les radicaux lipidiques. L'oxyde nitrique (°NO) est un radical de l'azote qui peut réagir avec O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pour former des ions peroxytrinitrites qui peuvent réagir avec divers constituants cellulaires (lipides, protéines, ADN...).

Les ROS se comportent comme des seconds messagers indispensables dans diverses réponses cellulaires (prolifération, migration, angiogenèse). Dans les conditions normales, les ROS sont rapidement captés (par des antioxydants tels les vitamines C et E) ou métabolisés par de multiples systèmes de défenses antioxydantes (par exemple, superoxyde dismutases SOD, glutathion peroxydases GPx, catalase, thioredoxines, peroxyredoxines...). (Guerin 2001)

La production excessive de ROS, dépassant les capacités de défenses antioxydantes endogènes, engendre l'oxydation de macromolécules biologiques telles que l'ADN, les protéines, les carbohydrates et les lipides. Ce phénomène est nommé stress oxydant. Les conséquences du stress oxydant se traduisent par des réponses inflammatoires et de la toxicité. Un des mécanismes majeurs responsables de production de ROS est la réponse à l'hypoxie-reperfusion (réduction du flux sanguin dans un organe suivi par une reperfusion avec variation du gradient d'oxygène). (Lum 2001)

Après avoir été considérés comme délétères, les radicaux libres apparaissent aujourd'hui comme des molécules qui à faibles concentrations sont nécessaires à des fonctions essentielles de l'organisme comme les défenses immunitaires, la signalisation cellulaire, l'expression génique, le maintien de l'homéostasie redox et les voies de transduction signalétique impliquées dans la croissance, la différenciation et la mort cellulaire. (Al-Gubory 2010) En revanche à forte concentration, les radicaux libres endommagent les lipides membranaires, les protéines et l'ADN. Pour faire face à cette production permanente de ROS/RNS, les organismes vivants ont développé un système de défense antioxydant qui permet de contrôler cette production et d'éviter la survenue d'un stress oxydant. Il

existe deux types de systèmes de défenses antioxydantes, enzymatiques et non-enzymatiques. Les antioxydants enzymatiques, les plus connus sont la superoxyde dismutase (SOD) capable de dismuter l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ , la métabolisation de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  est ensuite réalisée par catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). La glutathion reductase (GRase) permet la régénération du glutathion, un antioxydant endogène, qui existe sous forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG), et présente des propriétés oxydoréductrices très élevées. Sous sa forme réduite (GSH), le glutathion est un antioxydant intracellulaire majeur, qui protège les constituants cellulaires des radicaux libres, et c'est également un substrat de la glutathion peroxydase (GPx) (cf. infra). Il appartient à la classe des antioxydants non-enzymatiques, dans laquelle figurent également d'autres piègeurs de radicaux libres d'origine exogène comme la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), les caroténoïdes, les polyphénols, ainsi que les oligoéléments tels que le cuivre, le zinc, le sélénium et le manganèse.

Il existe de nombreuses sources de ROS au sein des cellules eucaryotes, incluant la respiration mitochondriale, la voie de l'acide arachidonique, les cytochromes p450s, la xanthine oxydase, la NADH/NADPH oxydase (NOX), les NOS, les peroxidases et d'autres protéines sanguines (albumine).

#### **VOIE MITOCHONDRIALE**

En conditions normales, la mitochondrie produit des ROS qui vont servir de messagers pour différentes voies de signalisation. Cette production de ROS est due à une fuite d'électrons au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale et va entraîner la formation d'anions superoxydes (Figure 9). (Lavie 2003) De nombreuses données sont en faveur d'une augmentation de la production d'anions superoxydes par la mitochondrie après exposition à l'hypoxie-réoxygénation. (Peng 2003)

#### **NADPH OXYDASE (NOX)**

La NOX est une enzyme membranaire exprimée dans de nombreux tissus (vaisseaux, cœur, système nerveux central) et dans les cellules sanguines. Elle va générer des anions superoxydes en transférant des électrons du NADPH vers une molécule de dioxygène (Figure 9). (Lavie 2015) Cette enzyme est très sensible aux phénomènes d'hypoxie-réoxygénation.

### **XANTHINE OXYDASE (XO)**

La XO est une enzyme également responsable d'une production d'anion superoxyde (Figure 9). Elle est ubiquitaire et exprimée dans de nombreux tissus (Lavie 2015). Son rôle délétère dans la génération d'un stress oxydant a d'abord été démontré au cours de l'ischémie-reperfusion dans différents tissus (cœur, intestin, foie, reins et cerveau) grâce à l'utilisation d'inhibiteurs tels que l'allopurinol (Manning 1984, McCord 1985).

### **NITRIC OXIDE SYNTHASE (NOS)**

La NOS est l'enzyme responsable de la synthèse du NO, un composé vasoactif, à partir de la L-arginine. Libéré par les cellules endothéliales vasculaires, il va diffuser vers les cellules musculaires lisses et entraîner une vaso-relaxation. En plus de ces propriétés, il possède également des propriétés anti-thrombotiques et protège les vaisseaux de l'athérosclérose. Il existe 3 isoformes de la NOS : la NOS neurale (nNOS, NOS I) exprimée dans le cerveau et le cœur, la NOS endothéliale (eNOS, NOS III) exprimée par les cellules endothéliales et les cardiomyocytes, et la NOS inducible (iNOS, NOS II) (Andrew 1999). Dans certaines conditions, eNOS peut être découplée et être responsable de la production d'anion superoxyde au lieu du NO (Figure 9). (cf paragraphe 3.2)

### **DIMINUTION DES DEFENSES ANTIOXYDANTES**

La première enzyme intervenant dans la défense antioxydante est la SOD qui va transformer l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Il existe 3 formes de SOD : une forme cytosolique constitutive (Cu/Zn-SOD, SOD1), une forme mitochondriale inducible (Mn-SOD, SOD2) et une forme extracellulaire (SOD3). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sera ensuite transformé en eau par la catalase et la GPx (Figure 9). D'autres molécules non enzymatiques telles que des vitamines (C, E) et le glutathion peuvent jouer un rôle antioxydant important. Une diminution des défenses antioxydantes peut aboutir à la génération d'un stress oxydant endogène.

## PEROXYDATION LIPIDIQUE

L'une des conséquences biochimiques directes de la production de ROS va être la peroxydation lipidique (Figure 9). L'oxydation des lipides altère de nombreux processus physiologiques et entraîne des dysfonctions cellulaires à l'origine des complications cardiovasculaires. Un très grand nombre de produits de peroxydation lipidique sont générés, parmi lesquels des aldéhydes tels que le 4-hydroxynonanal (4-HNE), le 4-oxo-2-nonanal (ONE), l'acroleïne, le malondialdéhyde (MDA) et les substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS) ainsi que des isoprostanes, dont les taux peuvent être mesurés. (Lavie 2015)

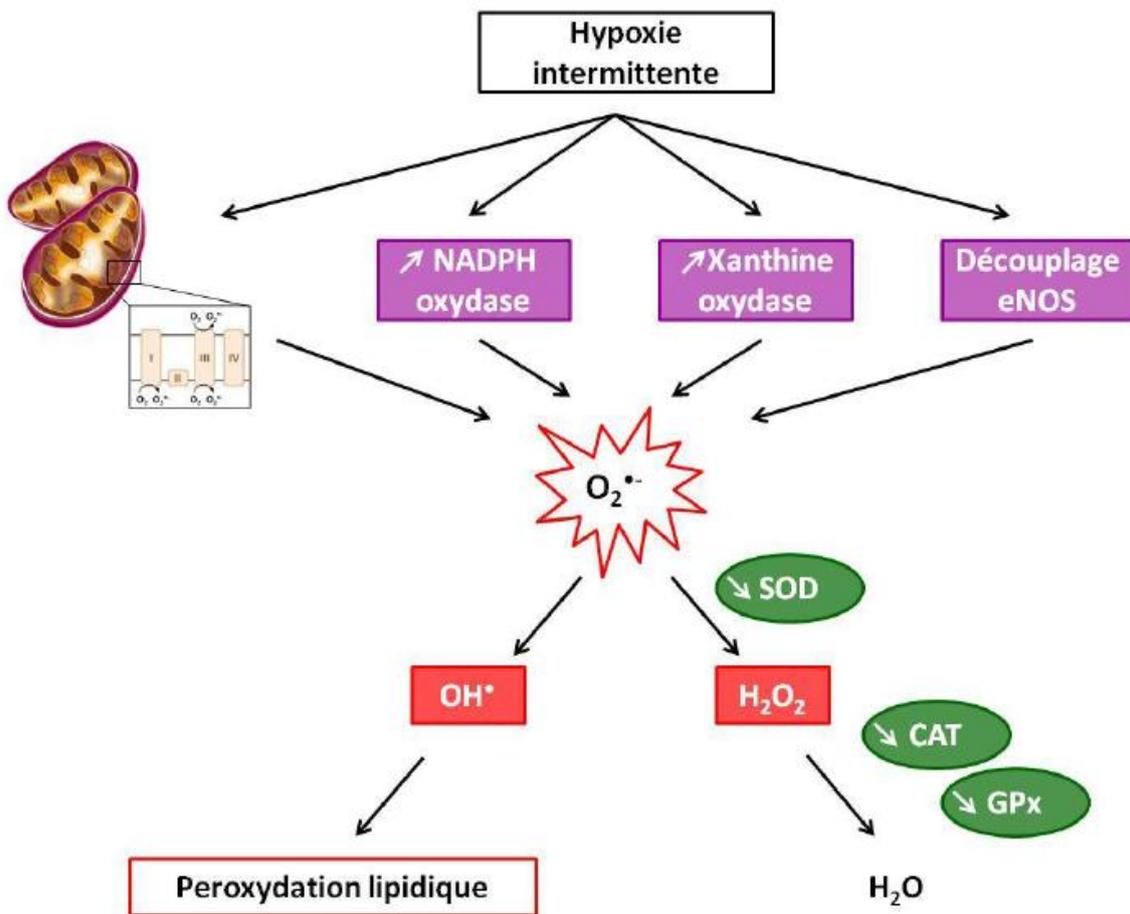


Figure 9 : Schéma illustrant l'origine du stress induit par l'hypoxie/reoxygénation ainsi que les défenses anti-oxydantes diminuées (D'après Morand 2017). En rouge : le stress oxydant ; Violet : son origine ; vert : les défenses anti-oxydantes.  $O_2^{\bullet-}$ , anion superoxyde ; SOD, superoxyde dismutase ; CAT, catalase ; GPx, glutathion peroxydase ;  $H_2O_2$ , peroxyde d'hydrogène ;  $OH^{\bullet}$ , radical hydroxyle ;  $H_2O$ , eau.

## LE GLUTATHION

Le glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinylglycine) est un tripeptide formé par l'association de L-glutamate, de L-cystéine, et de L-glycine. Il contient un groupement thiol (-SH) au niveau du résidu cystéine qui possède un fort pouvoir réducteur. Les deux tiers du glutathion libre sont sous la forme réduite GSH. Les chaînes latérales de sulfhydryle provenant des résidus de cystéine au niveau de molécule de glutathion peuvent former une liaison disulfure (GSSG) au cours de l'oxydation lors de réactions avec des oxydes et peroxydes dans les cellules. (Figure 10) La réduction du GSSG en deux molécules de GSH est effectuée par la glutathion réductase, une enzyme qui nécessite l'oxydation couplée de NADPH. (Meister 1995) Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intra-cellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Au cours du vieillissement et lors d'un exercice intense, ce rapport tend à diminuer. Les autres propriétés antioxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire... La diminution du glutathion serait associée au vieillissement cellulaire et aux pathologies associées au vieillissement telles que la cataracte, l'athérosclérose... (Julius 1994)

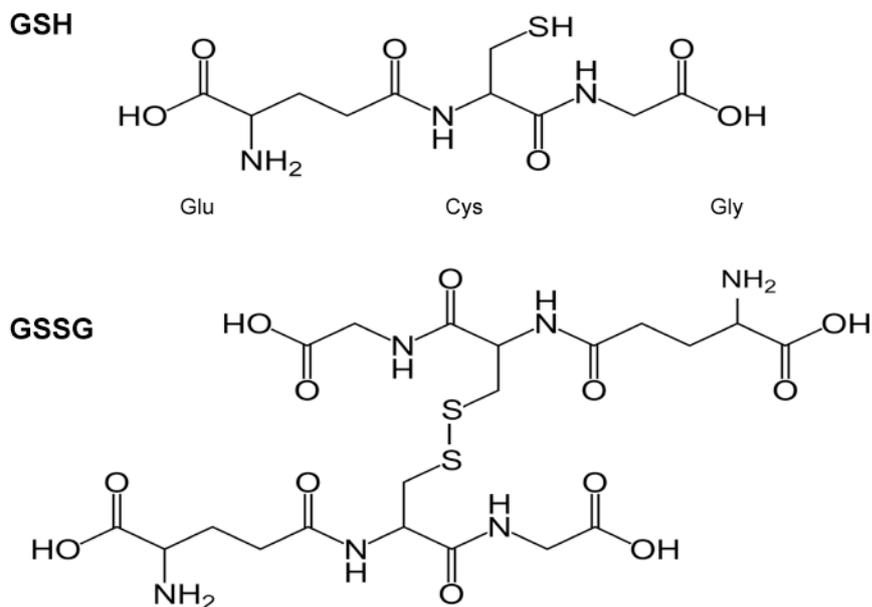
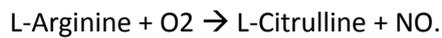


Figure 10 : structure du GSH et GSSG.

### 3.2 NO ET NOS : FONCTION NORMALE

Le NO a un rôle essentiel dans l'homéostasie du fait de son effet vasodilatateur. Le NO est synthétisé à partir de L-Arginine et d'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) selon la réaction suivante :



Brièvement, la réaction de synthèse du NO peut être assimilée à deux réactions de mono-oxygénation. La première réaction consiste en l'oxydation de la L-Arginine. Cette réaction engendre un intermédiaire, la -OH-L-Arginine, rapidement oxydée en L-Citrulline. Ces deux réactions d'oxygénation sont réalisées en parallèle avec la réduction de NADPH en NADP<sup>+</sup>. Les électrons sont fournis par le NADPH, transférés sur les flavines et la calmoduline, puis présentés à l'hème, centre catalytique. Il est synthétisé par les Nitric Oxide Synthases (NOS).

Il existe trois isoformes de NOS : la NOS neuronale (nNOS ou NOS I), la NOS inducible (iNOS ou NOS II) et la NOS endothéliale (eNOS, ou NOS III). Leurs noms font référence aux tissus dans lesquels elles ont été découvertes, cependant leur localisation ne s'arrête pas à ces dénominations. Les trois isoformes fonctionnent à l'état d'homodimère. Chaque monomère contient un domaine oxygénase en partie N-terminal et un domaine réductase en partie C-terminale. Le domaine oxygénase possède des sites de liaison pour le FAD, le FMN et le NADPH et est liée, par un site de reconnaissance à la calmoduline, au domaine réductase qui, lui, possède des sites de liaison pour l'hème, la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), et la L-arginine. Dans une NOS fonctionnelle, les électrons sont donnés par le NADPH au domaine réductase et sont transférés à travers le FAD et le FMN vers le groupement hème du dimère opposé. À cet endroit, en présence de L-arginine et du cofacteur BH<sub>4</sub>, les électrons vont permettre la réduction de l'oxygène et la formation de NO<sup>°</sup> et de L-citrulline. (Alderton2001, Förstermann 2012) De ce fait, la biodisponibilité des substrats (L-arginine et O<sub>2</sub>) et du cofacteur BH<sub>4</sub> sont des éléments importants de l'activité de l'enzyme. Le BH<sub>4</sub> joue également un rôle critique dans le « couplage » de l'activité enzymatique en se fixant à l'interface des deux monomères, où il est directement impliqué dans le processus d'oxydation en fournissant temporairement un électron à l'hème. Ainsi, en cas d'absence de BH<sub>4</sub>, la liaison entre l'O<sub>2</sub> et l'hème est rompue et la NOS produit alors l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>°-</sup>). On parle alors de « découplage de la NOS ».

La nNOS est exprimée notamment au sein des fibres nerveuses péri-vasculaires, mais également au niveau de la paroi artérielle. (Schwartz 1999, Melikian 2009) Cette enzyme joue un rôle important dans la régulation du tonus basal, mais n'est cependant pas sensible à l'acétylcholine (ACh) ni au shear stress. (Seddon2008) La nNOS induit également une vasodilatation liée au stress mental et à l'augmentation de la température cutanée globale. (Seddon 2009)

La iNOS (NOS inductible) n'est pas exprimée en condition physiologique. Son expression est induite dans les vaisseaux par les stimuli inflammatoires, elle est très fortement activée au cours de septicémies, ou lorsque le stress oxydant est décompensé. (Pautz 2010) Contrairement à la nNOS et à la eNOS, la iNOS n'est pas calcium-dépendante et sa production est continue sur de longues périodes. Elle peut dans ces conditions, produire des taux de NO cent fois plus élevés que ceux générés par les autres isoformes de NOS (10nM pour la eNOS et nNOS, 1 $\mu$ M pour la iNOS). Le NO produit par iNOS peut se combiner avec l'ion superoxyde pour former du peroxynitrite qui est toxique. Ce phénomène entraîne des troubles endothéliaux en altérant à la fois les voies de vasoconstriction et de vasodilatation. (Li 2014)

Au cours de notre étude, nous nous sommes surtout intéressés à la eNOS, qui est exprimée dans les vaisseaux et le placenta, et est particulièrement sensible aux stress physiologiques et pathologiques.

La eNOS est une protéine homodimérique, dont chaque dimère est formé d'un domaine C-terminal réducteur, contenant des sites de liaisons pour FMN, FAD, NADPH et la calmoduline, et d'un domaine N-terminal oxydant, contenant des sites de liaisons pour un hème, la L-arginine, et son co-facteur essentiel, le tétrahydrobioptérine (BH4). La formation de NO requiert un flux d'électrons, débutant au niveau des flavines du domaine réductase, et se terminant au niveau de l'hème, présent sur le domaine oxygénase de l'enzyme. L'hème oxydé est alors capable de fixer le dioxygène et la L-arginine afin de synthétiser du NO et de la L-citrulline (Figure 11A). (Alderton 2001) La présence du BH4 est essentielle au couplage de la protéine et donc à la formation de NO, car il assure le couplage de la protéine sous sa forme homodimérique. Il participe également à la fixation du substrat, la L-Arginine, ainsi qu'au transfert d'électron. eNOS est retrouvée dans l'endothélium vasculaire, les vaisseaux placentaires et les syncytiotrophoblastes. (Conrad 1993, Martin 2000)

En l'absence de co-facteur BH4, la L-arginine ne peut se fixer sur son site au niveau de la protéine, et l'accepteur terminal d'électron devient le dioxygène, formant ainsi un ion superoxyde (Figure 11B). Il en résulte une diminution de la biodisponibilité en NO, et une augmentation de la production d'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ). Comme présenté plus haut pour la iNOS, ce phénomène peut générer le peroxy-nitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ), inflammatoire et toxique, et responsable de dommages cellulaires qui impliqués dans la formation des plaques d'athérosclérose et également dans l'HTA. (Chanon 2004, Meziat 2016)

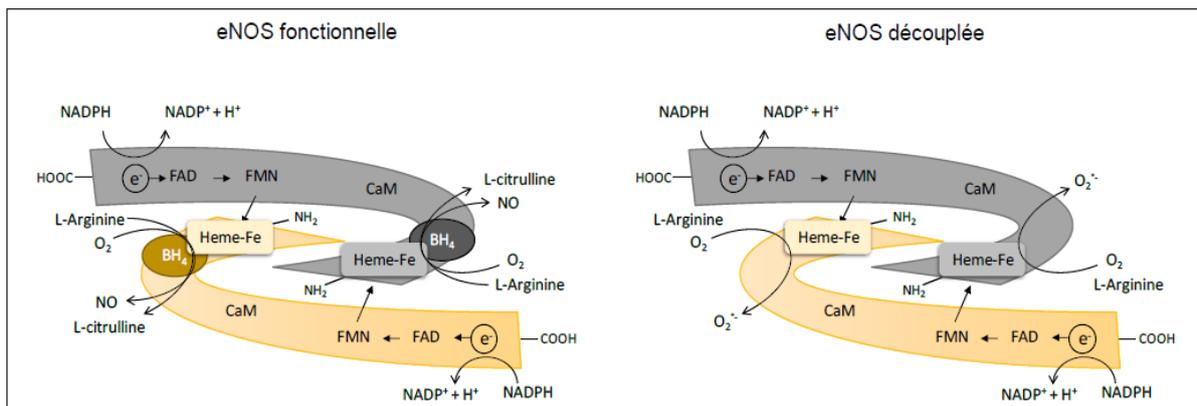


Figure 11 : Représentation schématique de la eNOS. A. eNOS fonctionnelle, production de NO grâce au flux électronique assuré par le système de flavines et le BH4 intimement lié à l'hème ferrique. B. eNOS découplée à cause de l'absence de BH4, production d'anion superoxyde et donc source de stress oxydant. NO : monoxyde d'azote ; CaM : calmoduline ; FMN : flavine mononucléotide ; FAD: Flavine adenine dinucléotide. (D'après Meziat 2016, avec accord)

## FONCTION DU NO

Le NO formé par les différentes NOS est un agent de signalisation impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques essentielles, telle que la régulation de la pression artérielle, la vasodilatation, la potentialisation des capacités du système nerveux central à long terme, et également au sein du système immunitaire.

Au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses, le NO est capable d'induire des effets suivant deux modes d'actions direct ou indirect. La voie directe est celle de la S-nitrosylation, qui permet au NO de modifier les propriétés fonctionnelles de la protéine sur laquelle il se fixe. La voie indirecte est celle du GMPc (Guanosine monophosphate cyclase), responsable des propriétés vaso-relaxantes du NO.

Au cours de la grossesse, le NO a un rôle primordial de vasodilatation et régulation de la tension artérielle, il participe à la placentation et à la synthèse du VEGF. (Doridot 2014)

#### *Voie indirecte NO / GMPc*

Cette voie est impliquée dans la vasodilatation. Le NO, une fois produit par les cellules endothéliales (*via* eNOS), va diffuser dans les cellules musculaires lisses adjacentes et activer une guanylate cyclase (GC). En se fixant sur cette guanylate cyclase, la guanosine triphosphate va être convertie en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). GMPc active une protéine kinase G (PKG) à l'origine de différentes actions synergiques et complémentaires, conduisant à une diminution de la concentration de calcium intracellulaire. Cette baisse de calcium intracellulaire entraîne un relâchement des fibres musculaires lisses, et réduit également la formation du complexe Calmoduline-Ca<sup>2+</sup>, inhibant ainsi la vasoconstriction. (Horowitz 1996, Schlässmann 2000)

Le NO libéré par les cellules endothéliales *in vivo* est à l'origine d'un tonus vasodilatateur permanent au niveau artériolaire qui contribue à la régulation de la pression artériolaire. Ainsi, l'inhibition de la eNOS s'accompagne d'une diminution des relaxations endothélium-dépendantes observées *in vitro* et *in vivo*. (Moore 1990, Rees 1990)

Si le NO peut avoir un effet immédiat sur les propriétés mécaniques artérielles, il est aussi impliqué dans le remodelage de la paroi artérielle. Il induit l'angiogenèse sous le contrôle de HIF, la mobilisation de cellules endothéliales progénitrices, la production de VEGF. En plus de ses propriétés vasodilatatrices, le NO exerce de nombreuses fonctions au niveau vasculaire et notamment, une action inhibitrice sur l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium, sur l'agrégation plaquettaire, et sur la prolifération des cellules musculaires lisses qui lui permet de s'opposer au développement de l'athérosclérose. (Balligand 2009)

#### *S-nitrosylation par le NO.*

Le NO a la capacité de se fixer à des résidus cystéines de protéines, pour former des groupements nitrosothiols (SNO). La S-nitrosylation d'une protéine entraîne une modification réversible de sa fonction, notamment au niveau de la eNOS (Ravi 2004) et de la protéine chaperonne HSP90. Il s'agit d'un mécanisme de modification fonctionnelle. (Meziat 2016)

### *Effet anti-adhésif et anti-plaquettaire du NO*

Le NO joue un rôle fondamental dans l'équilibre hémostatique entre l'endothélium et les plaquettes, équilibre dont on connaît l'importance en pathologie cardiovasculaire. Le NO stimule la GC responsable de la synthèse de GMPc, l'augmentation de cette dernière étant à l'origine de l'inhibition plaquettaire. (Benjamin 1991)

En résumé, la fonction endothéliale possède un rôle majeur au sein du système cardiovasculaire. Elle joue un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire. Elle utilise pour cela, différents agents vasoactifs, dont le NO, qui est responsable majoritairement de la relaxation endothélium-dépendante des vaisseaux. Cet agent est produit par une enzyme endothéliale, la eNOS, régulée de manière fine et sensible aux modifications des conditions redox cellulaires.

### **3.3 NO ET NOS : FONCTION PATHOLOGIQUE**

De nombreux mécanismes sont impliqués dans la pathogenèse de la dysfonction endothéliale. La réduction de la biodisponibilité du NO joue un rôle majeur et peut résulter d'une diminution de la production de NO et/ou une augmentation de la production de ROS. (Deanfield 2007) En effet, du fait des effets bénéfiques du NO au niveau vasculaire, la préservation de sa biodisponibilité est essentielle à la prévention de dysfonctions vasculaires. (Flammer 2012) Toutefois, cette molécule est particulièrement sensible aux ROS et le déséquilibre entre la concentration en NO et en ROS est un facteur de dysfonction endothéliale (Higashi 2009)

La voie eNOS/NO est particulièrement impactée par le stress oxydant. Une forte production de ROS entraîne une diminution de la biodisponibilité du NO, d'une part en réduisant la quantité déjà formée par réaction avec l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> responsable de la formation de peroxy-nitrite (Channon 2004), et d'autre part en limitant l'activité catalytique de eNOS.

La eNOS et le NO sont des senseurs intracellulaires de l'état redox de la cellule. De ce fait, en condition non-pathologique, où la production de ROS est faible, le NO joue un rôle de tampon en se

couplant à l'ion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , formant ainsi l'anion peroxynitrite  $ONOO^-$ . (Balligand 2009) La production de  $NO^\circ$  étant plus importante que celle de l' $ONOO^-$ , cette association demeure sans conséquence pour la cellule. En revanche, en condition pathologique, où la production de ROS est importante et dépasse la production de NO, eNOS est découplée (elle ne produira plus de NO). Ce processus, aujourd'hui bien décrit dans la littérature, est connu sous le nom de « découplage de eNOS ». (Figure 12)

### **LES MECANISMES IMPLIQUES DANS LA DYSFONCTION D'ENOS (DECOUPLAGE)**

#### *La diminution du substrat (L-arginine)*

L'activité enzymatique de eNOS dépend de ses nombreux cofacteurs (BH<sub>4</sub>, FAD, FMN, NADPH) mais également de la disponibilité de son substrat, la L-arginine. La L-arginine plasmatique (80 à 120μM), ne représente que 1,2% de la fraction totale, mais contribue à environ 60% de la formation de NO au sein des cellules endothéliales. (Wu 1998) Le flux de L-arginine n'est pas le seul facteur impactant sa biodisponibilité au sein des cellules endothéliales. En effet, le métabolisme de cette molécule est complexe et fait intervenir différents facteurs qui peuvent être influencés par le stress oxydant notamment. La L-arginine peut être dégradée en ornithine et en urée par l'arginase, enzyme dont l'expression augmente considérablement en présence de ROS. (Wu 1998) De plus, la protéine arginine N-méthyltransférase (PRMT) catalyse la formation d'asymmetric methylarginine (ADMA) à partir de la L-arginine. (Bedford 2009) Cet ADMA est un agent compétitif inhibiteur de la L-arginine, empêchant ainsi la synthèse de NO. Le stress oxydant favorise l'expression de PRMT, participant ainsi à la dégradation du substrat de eNOS, et à son inhibition. Une enzyme permet cependant de dégrader les molécules d'ADMA en citrulline et en diméthylamine, la diméthylarginine diméthylarginohydrolase (DDAH). (Vallance 2004) Mais celle-ci est également la cible des ROS qui inhibent son activité. (Palm 2007)

#### *L'oxydation du cofacteur essentiel : BH<sub>4</sub>*

Le BH<sub>4</sub> possède un métabolisme assez complexe, avec deux voies de synthèse, une voie à partir de la sepiaptérine et une voie de synthèse de novo à partir de guanosine triphosphate (GTP). Une enzyme clé impliquée dans la première voie, la dihydrofolate réductase (DHFR), est limitante dans la production de BH<sub>4</sub> et donc déterminante pour l'état de couplage de la eNOS. La disparition du BH<sub>4</sub>

en condition de stress oxydant semble être la principale cause de découplage de la eNOS, ce qui en fait également une très bonne cible thérapeutique. (Bendall 2005) Le BH4 stabilise la forme dimérique de la eNOS, permet la fixation de la molécule de dioxygène et participe au transfert électronique au sein de l'enzyme.

Sans la présence de BH4, le complexe hème-ferreux se dissocie formant l'anion superoxyde  $O_2^{\circ-}$  et un hème ferrique. La déplétion de BH4 est généralement attribuée à son oxydation par les ROS et notamment, par  $ONOO^{\circ-}$ , il est alors oxydé en dihydrobioptine (BH2). Sous cette forme il peut toujours se lier à la eNOS mais ne permet plus la formation de NO, participant ainsi à la production d' $O_2^{\circ-}$ . Le ratio BH4/BH2 est déterminant dans la production de NO (Crabtree 2011, Chen 2014).

Il s'agit du principal mécanisme de découplage de eNOS, mais au cours de la PE, le taux de BH4 n'est pas vraiment diminué dans les placentas de femmes pré-éclamptiques comparés aux grossesses normales. (Kukor 2000)

#### *Le découplage de la eNOS par S-glutathionylation*

La S-glutathionylation consiste en une modification post-traductionnelle, au cours de laquelle une molécule de glutathion oxydé (GSSG) se fixe sur une protéine grâce à la formation d'un pont disulfure avec un groupement thiol, dans un contexte de stress oxydant. (Dalle-Donne 2007, Mielal 2012) Au moins deux résidus cystéines (Cys689 et Cys908) au sein de la structure protéique de eNOS, peuvent être la cible de S-glutathionylation, comme démontré récemment. (Chen 2010) Ce phénomène engendre un découplage fonctionnel de eNOS malgré la conservation de sa conformation homodimérique, avec une diminution significative de production de NO. Cette même étude met d'ailleurs en évidence chez des rats hypertendus, une augmentation du niveau de la S-glutathionylation de eNOS, corrigée par un traitement visant à réduire les groupements thiols.

Ainsi, le découplage fonctionnel réversible de eNOS par la S-glutathionylation semble contribuer à la dysfonction endothéliale. Cette modification n'est pas connue pour la PE.

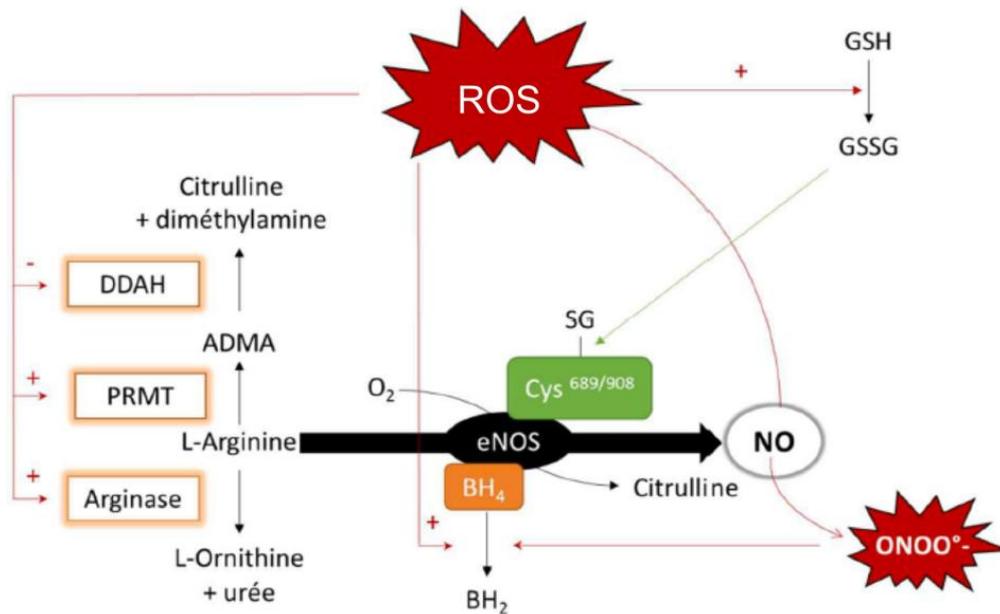


Figure 12 : Actions du stress oxydant sur la eNOS. ROS : espèces réactives de l'oxygène ; DDAH : diméthylarginine diméthylarginohydrolase ; PRMT : protéine arginine N-méthyltransférase ; GSH/GSSG : glutathion réduit/oxydé, BH4 : tétrahydrobioptérine, ONOO<sup>o-</sup> : peroxyde nitrite. (D'après Meziat 2016, avec accord)

#### *Autre mécanisme de dysfonction d'eNOS : le polymorphisme génétique*

Le gène eNOS est situé à l'extrémité du bras long du chromosome 7 (7q35-36). eNOS inclut certains polymorphismes du nucléotide simple, dont deux (G894T et T-786C) seraient associés à une diminution de la production de NO et à un risque augmenté de PE. (Zeng 2016)

#### 4. STRESS OXYDANT PHYSIOLOGIQUE AU COURS DE LA GROSSESSE

Le mécanisme d'hypoxie-réoxygénation est observé physiologiquement pendant la grossesse, au cours de laquelle la perfusion placentaire est sujette à de nombreuses variations en fonction de la posture, de l'alimentation, des exercices ou des contractions utérines. (Roberts 1999) De plus, comme abordé précédemment, l'unité fœto-placentaire se développe dans un environnement très hypoxique vers 8–10 SA, puis sa vascularisation permet d'enrichir cet environnement en oxygène au cours de sa maturation vers 13–14 SA, source de ROS physiologiques et essentiels au développement d'une grossesse normale. (Rodesch 1992, Siddiqui 2010, Wang 2013) Il a ainsi été décrit une élévation de l'expression des protéines de choc thermique HSP70 (70 KDa Heat Shock Proteins), au niveau du syncytiotrophoblaste villositaire de la zone périphérique du placenta primitif vers la 9<sup>ème</sup> SA. L'expression de ces protéines indique une réaction aux ROS et est concomitante de l'apparition de la circulation maternelle intra-placentaire. Celle-ci se réalise plus précocement en région périphérique du placenta primitif à un stade du développement villositaire où le trophoblaste ne possède que de très faibles concentrations en enzymes anti-oxydantes. Ce stress oxydant physiologique local entraîne la dégénérescence du tissu villositaire de la région périphérique, essentielle à la formation des membranes placentaires. (Jauniaux 2016)

La grossesse favorise donc le stress oxydant, notamment par le développement rapide du placenta qui sollicite au maximum les mitochondries. (Toescu 2002) En effet, la grossesse induit des modifications hémodynamiques avec augmentation de la consommation énergétique de base et en oxygène de différents organes, y compris au niveau de l'unité fœto-placentaire. Le placenta est riche en mitochondries, possède une vascularisation riche et consomme environ 1 % du métabolisme de base de la femme enceinte. Par ailleurs le NO est localement produit par le placenta et contribue à la production de ROS physiologiques et nécessaires à la placentation normale. (Jones 2008) On note également une diminution de l'activité superoxyde dismutase (SOD) et du taux de thiols plasmatiques, alors que le taux de ceruleoplasmine augmente, suggérant un certain niveau de «stress physiologique» au cours d'une grossesse normale par la production de ROS nécessaires au développement de l'unité fœto-placentaire. (Qanungo 2000) Le stress oxydant devient pathologique lorsque les ROS sont produits en excès sans compensation par les défenses antioxydantes, comme observé en cas de PE.

## 5. STRESS OXYDANT ET PE

Différents marqueurs de stress oxydant seraient majorés au cours de la PE alors que les réserves anti-oxydantes diminueraient. (Raijmakers 2004, Siddiqui 2010, Guerby 2015) De plus le stress oxydant contribuerait à l'établissement et au maintien de la maladie. (Hung 2006) Au cours de la PE, les ROS sont générés à la fois par les phénomènes d'H/R observés dans la chambre intervillieuse et par le système vasculaire systémique au cours de la 2ème étape. (Jauniaux 2016, Roggensack 1999) Les homogénats placentaires issus de patientes pré-éclamptiques produisent davantage de peroxydes d'hydrogène que ceux issus de grossesses non compliquées. (Aris 2009)

Divers mécanismes sont impliqués dans la génération des ROS :

- Au cours de la PE, le défaut d'invasion trophoblastique et de remodelage vasculaire entraînent des phénomènes d'H/R au niveau de la chambre intervillieuse d'où une majoration du stress oxydant avec augmentation de la production de ROS et de peroxydes lipidiques toxiques, en particulier pour les cellules endothéliales. (Jauniaux 2016) On note également une augmentation du taux de malondialdéhyde (MDA), un indice de peroxydation lipidique. (Madazli 2002) Les lipoperoxydes exercent une action particulièrement toxique, avec un effet négatif sur la libération de prostacyclines par les cellules endothéliales. Comme le sang intervillieux contient beaucoup plus d'acides gras polyinsaturés et de thromboxane A2 que le sang maternel périphérique, il s'établit donc un déséquilibre entre la production de prostacyclines qui diminue et de thromboxane qui augmente, ce qui altère le rapport prostacycline/ thromboxane A2 normalement favorable à la vasodilatation.

- Les radicaux libres activent les monocytes et les neutrophiles, qui produisent des cytokines pro-inflammatoires, tels le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, des facteurs antiangiogéniques et des microparticules. Les polynucléaires neutrophiles sont une source importante de ROS. Les neutrophiles activés produisent des ROS, par l'action de plusieurs enzymes, incluant la NADPH oxydase (NOX), la xanthine oxydase (XO) et eNOS. (Lee 2003, Gielis 2011) Le taux de neutrophiles augmente significativement dans la circulation périphérique chez les patientes pré-éclamptiques, ce qui place ces cellules au centre des systèmes générateurs de ROS au cours de la PE.

- NOX est une enzyme ubiquitaire, très fortement exprimée dans les neutrophiles et les cellules endothéliales (cf paragraphe 3.2). Les doses modérées de ROS produites par NOX participent à la

régularisation du tonus vasculaire. Cependant le stress oxydant induit par des doses fortes de ROS contribue au dysfonctionnement vasculaire. (Raijmaker 2004, Lee 2003) L'activité NOX augmente au cours de la PE, ce qui suggère un rôle pour les neutrophiles et NOX dans la pathogénèse du stress oxydant au cours de cette pathologie. (Sanchez-Aranguren 2014) NOX génère l'anion superoxyde.

- La génération d'anion superoxyde par XO serait augmentée au cours de la PE. (Bainbridge 2009)

- Chez les femmes pré-éclamptiques, on observe une diminution des taux circulants d'agents anti-radicalaires tels que l'ascorbate et la vitamine E, ce qui, associé à une augmentation des taux plasmatiques de TNF $\alpha$  et d'acide urique, favorise le stress oxydant et les lésions cellulaires. La peroxydation lipidique serait également liée à la protéine de choc thermique 70 (HSP70), dont le taux augmente dans le sang périphérique fœtal et maternel au cours de la PE. (Guerby 2015)

Les données récentes de la littérature montrent que le NO semble jouer un rôle primordial dans la PE car l'interaction entre les ROS et le NO (balance nitroso-redox) régule l'équilibre entre le stress oxydant et le stress nitrosant, via ion superoxyde et peroxyde nitrite, et cette balance serait altérée en cas de PE. (Doridot 2014)

Ainsi la production de ROS est exacerbée au cours de la PE, ce qui génère un stress oxydant. Les sources impliquées dans la génération des ROS conduisant au stress oxydant au cours de la PE sont surtout les activités XO et NOX. Le stress oxydant induit une peroxydation lipidique et contribue à la diminution du NO disponible, qui est au centre de la physiopathologie de la PE.

## 6. CONCLUSION DE LA REVUE GENERALE

Au cours de la PE, le défaut d'invasion trophoblastique et de remodelage des artères utérines spiralées entraîne une mauvaise adaptation de la circulation utéro-placentaire associée à une circulation sanguine maternelle intermittente et à des phénomènes d'hypoxie/réoxygénation (H/R). Il en résulte un stress oxydant et un déséquilibre des facteurs angiogéniques/antiangiogéniques (VEGF/PIGF vs sFlt1) responsables d'une placentation anormale, une dysfonction endothéliale et une inflammation systémique. Un environnement pro-oxydant est nécessaire à la placentation normale mais il apparaît décompensé en cas de PE : les ROS sont nécessaires à la placentation normale en contribuant à l'expression du VEGF mais en cas de PE, des phénomènes d'H/R au niveau de la chambre intervillieuse imposent un stress oxydant majeur aux cellules trophoblastiques.

Parmi les mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement placentaire, la biodisponibilité réduite du NO et le stress oxydant jouent un rôle important. Un certain nombre de facteurs contribuent à modifier la signalisation du NO et sont associés à un risque accru de PE. La dysfonction de eNOS semble être une hypothèse physiopathologique importante. Les causes de dysfonctionnement de eNOS sont le polymorphisme génétique eNOS (G894T et T-786C), la diminution de son expression ou le découplage de eNOS.

Une cause du découplage de eNOS est l'oxydation de son cofacteur, le BH4, qui est très sensible au stress oxydant. D'autres mécanismes de découplage ont été rapportés, notamment une augmentation du taux d'ADMA (diméthyl-L-arginine asymétrique), inhibiteur endogène de la NOS ou une activité accrue de l'arginase qui réduit la disponibilité de la L-arginine, substrat de eNOS.

Un autre mécanisme de découplage eNOS, de découverte récente pourrait résulter de sa S-glutathionylation, une modification post-traductionnelle par le glutathion oxydé des résidus de cystéine (en particulier Cys689 et Cys908) qui sont critiques pour maintenir la fonction de eNOS. La S-glutathionylation des résidus cystéine des protéines est une modification réversible se produisant dans des conditions de stress oxydatif physiologique ou sévère. Comme la glutathionylation de eNOS est une cause de réduction de la production de NO, une hypothèse est que le stress oxydant majeur décrit dans la physiopathologie de la PE, pourrait générer une glutathionylation de eNOS dans le placenta des femmes pré-éclamptiques. D'autres modifications post-traductionnelles pourraient être observées sur eNOS, en particulier par des aldéhydes de peroxydation lipidique, dont l'accumulation induit une dysfonction des protéines ciblées.

## **HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS**

La diminution de la disponibilité du NO est une observation majeure et constante dans la physiopathologie de la PE. Plusieurs observations indiquent que le stress oxydant contribue au mécanisme de diminution du NO :

- Au cours de la PE, l'hypoxie/réoxygénation induit un stress oxydant et des ROS
- Les ROS induisent un découplage de eNOS
- Le cofacteur BH4 ne serait pas réellement diminué dans les placentas de PE.

Notre hypothèse de travail est que la dysfonction de eNOS pourrait résulter de modifications post-traductionnelles, qui inhiberaient en partie la production de NO, ou génèreraient un découplage de eNOS, favorisant ainsi la production d'ion superoxyde. Dans le contexte de stress oxydant, diverses modifications pourraient être impliquées, en particulier la glutathionylation de eNOS, ou sa modification par des produits d'oxydation lipidique.

Nos objectifs de travail sont d'étudier les effets du stress oxydant et de la peroxydation lipidique sur eNOS et la voie du NO au cours de la PE. Le stress oxydant étant un facteur majeur de vieillissement accéléré, notre objectif secondaire est d'analyser la corrélation entre les marqueurs de stress oxydant et de sénescence placentaire observés au cours de la PE.

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **Produits et réactifs**

Le RPMI 1640 medium (1X) + glutamax I + 10% SVF (Serum Veau Fœtal), sont fournis par GIBCO, le iodure de propidium est fourni par Molecular Probes (Interchim), la trypsine EDTA (1X) par GE Healthcare, le PBS (phosphate buffered saline) par Euromedex, le DMSO (diméthylsulfoxyde) par Riedel-deHaën.

L'anti-eNOS (ab5589) et l'anti-iNOS (ab3523) utilisés en immunohistochimie proviennent d'Abcam (Paris, France). L'anticorps anti-eNOS (AF950) utilisé pour les expériences d'immunoprécipitation provient de R&D Systems (Bio-Techne, France). L'anticorps anti-glutathion reconnaissant les protéines GS-S- est de Virogen (Watertown, MA, USA). Les anticorps secondaires mouse et rabbit HRP-conjugués sont issus de CellSignalingTechnology (Ozyme, France). L'anti-Facteur de Von Willebrand (VWF) (AB7356) est de Chemicon (Merck Millipore) et l'anti-VEGF est de Sigma. Le secondaire goat HRP-conjugué provient de SouthernBiotech (Clinisciences, France). Les anticorps secondaires Alexa Fluor (488 et 546) sont de Life Technologies (Courtaboeuf, France). Le Dihydroéthidine (DHE), le DAF-FM diacétate (diacétate de 4-amino-5-méthylamino-2',7'-difluorofluorescéine diacétate), le dithiothréitol (DTT), le 4,6-diamidino 2-phénylindole dihydrochloride (DAPI), l'oxypurinol, le VAS2870, le L-NAME (N-Nitro-L-argininemethyl ester hydrochloride) et le BH4 (dihydrochlorure de tétrahydrobioptérine) sont fournis par Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le 2',7' dichlorodihydrofluoréinediacetate (H2DCFDA) et le SYTO-13 proviennent de Thermofisher (Villebon sur Yvette, France), le NOC-18 (adduit diéthylènetriamine/oxyde nitrique ; DETA NONOate) est de Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences, France).

### **Prélèvement des extraits placentaires**

L'utilisation et l'étude des prélèvements humains dans le cadre de ces travaux ont été approuvées par le Comité d'Ethique de la Recherche du CHU de Toulouse (numéro CER 03-0115). Deux groupes de femmes enceintes appariés selon l'âge ont été analysés, un groupe témoin établi à partir de grossesses non compliquées (n = 9, âge gestationnel moyen de 39 semaines) et un groupe présentant des caractéristiques de PE sévère et précoce (n = 13, âge gestationnel moyen de 29 semaines). Les

placentas de grossesses normales et de PE sont récupérés par césarienne élektive après signature d'un consentement éclairé (au Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, France).

La PE était définie selon les critères classiques du CNGOF/SFAR, c'est-à-dire par une tension artérielle systolique supérieure ou égale à 140 mm Hg, ou une tension artérielle diastolique supérieure ou égale à 90 mm Hg et associée à une protéinurie significative (supérieure ou égale à 300 mg par 24 h), après 20 SA. Les caractéristiques de sévérité de PE comprenaient des complications foétales et maternelles (œdème aigu du poumon, syndrome de détresse respiratoire aiguë, coagulopathie, insuffisance rénale grave, symptômes neurologiques ou ophtalmologiques persistants) menant à l'accouchement avant 34 SA.

Tous les prélèvements placentaires ont été obtenus après césarienne pour éviter tout effet induit par le travail. (Cindrova-Davies 2007) Pour éviter les modifications induites par l'oxydation et la dégradation de l'ARN, seuls les tissus placentaires disséqués moins de 20 minutes après l'accouchement ont été inclus. Après retrait des décidues maternelles et des membranes amniotiques, des sections de 1 cm<sup>3</sup> de villosités placentaires ont été disséquées dans quatre cotylédons différents entre les plaques basales et chorioniques. Pour chaque patiente, le placenta a été prélevé immédiatement après l'accouchement et lavé quatre fois dans du PBS pour éliminer le sang restant. Certains fragments ont été fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % et incorporés dans de la paraffine pour analyse en immunofluorescence. Les autres fragments sont conservés congelés à - 80 °C jusqu'à leur utilisation.

### **Culture cellulaire**

Les trophoblastes humains (HTR8/SVneo) dérivés de syncytiotrophoblaste et établis à partir de placenta ont été donnés gracieusement par le Pr. Charles Graham, Kingston, Canada. Cette lignée a été obtenue par transfection des explants de trophoblastes de premier trimestre de la grossesse (HTR-8) avec un vecteur d'expression codant pour l'antigène T du virus simiens 40 (SV40). En condition standard, les cellules sont cultivées en milieu RPMI 1640 contenant 5% de SVF et des antibiotiques (penicilline/streptomycine). Pour les expériences, les cellules HTR8 confluentes sont incubées dans du RPMI sans sérum de veau foetal (SVF) et placées dans une cuve à hypoxie (37°C, 5%

CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>). Les cellules sont exposées à des variations de pO<sub>2</sub> (hypoxie/réoxygénation ou H/R), soit à une pO<sub>2</sub> basse (1 % d'O<sub>2</sub>) ou élevée (20 % d'O<sub>2</sub>), afin d'induire un stress oxydant. Les cellules sont maintenues en pO<sub>2</sub> faible (hypoxie, 1% O<sub>2</sub>) pendant 18 h, puis exposées à une pO<sub>2</sub> élevée (reoxygénation, 20% d'O<sub>2</sub>) pendant 2 h et exposées de nouveau à une pO<sub>2</sub> de 1% pendant 4 h. Avant exposition à pO<sub>2</sub> élevée, le milieu hypoxique est enlevé et remplacé par du RPMI frais.

Les transfections de siRNA sont effectuées en utilisant ON-TARGET plus human NOS3 siRNA (006490, Dharmacon) avec le réactif Hiperfect (301705, Qiagen) selon les instructions du fabricant.

### **Quantification des ROS, de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et du NO**

La génération des ROS intracellulaires est mesurée avec une sonde fluorescente, sensible au ROS, la sonde H<sub>2</sub>DCF<sub>2</sub>DA-AM (dihydro-dichlorofluorescein-acetoxymethylester). La sonde est ajoutée aux cellules (5µM) 30 min. avant la fin de l'incubation. Les cellules sont lavées avec du PBS, scrappées dans l'eau, et la fluorescence est mesurée (exc/em495/525nm). Les protéines sont mesurées par la méthode de Bradford et les résultats de fluorescence rapportée aux protéines sont exprimés en ratio FT/FT<sub>0</sub> (0 étant la fluorescence du temps 0 avant incubation en hypoxie).

La génération intracellulaire d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a été détectée dans les mêmes conditions, à l'aide de la sonde dihydroéthidine (DHE). Cette sonde s'oxyde au contact d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, ce qui la rend fluorescente. Les cellules sont incubées avec DHE (5 µM) et avec la sonde perméante Syto13 (0.5 µM), qui est un intercalant de l'ADN et permet de marquer les noyaux. Après 15 minutes à 37 °C, la fluorescence des cellules est observée en microscopie, dans les conditions rapportées par Chen et al. (Chen 2010). Dans un second temps, les cellules sont homogénéisées dans du PBS, et la fluorescence est mesurée (Spectrofluoromètre Hitachi F-2500, exc/em 530/610 nm).

La production de NO est déterminée dans les HTR8 avec la sonde diacétate DAF-FM (5 µM, 30 min. preincubation à 37°C). Après lavage au PBS, la production de NO est évaluée par fluorométrie (exc/em 495/525 nm). Pour assurer la spécificité de la production de NO qui peut varier à l'aide de la sonde DAF-FM, un contrôle négatif est effectué en présence de L-NAME (100 µM), et soustrait à chaque mesure.

La production de NO par les HTR8 ainsi que l'activité de la NO Synthase recombinante sont également mesurées par évaluation des nitrites/nitrates (Ultrasensitive Nitric Oxide Synthase Assay Kit, Oxford Biomedical Research), dans les conditions données par le fournisseur.

### **Dosage des TBARS**

Cette technique permet de doser le taux de peroxydation lipidique des échantillons. Le principe repose sur la formation, en milieu acide et à 95°C, de complexes entre des produits d'oxydation lipidique (malondialdéhyde ou MDA) et l'acide thiobarbiturique(TBA), que l'on dose en fluorescence par rapport à une gamme d'étalonnage d'un précurseur du MDA. Dans un tube eppendorf 10 µl HCl 0.5N + 100 µl de réactif TBA + 100 µl d'échantillon sont chauffés 10 min à 95°C au bain à sec pendant 10 min, puis refroidis pendant 5 min à 4°C. Après addition de 200 µl de butanol, les tubes sont centrifugés 5-10 min à 2000 rpm à 4 °C. La fluorescence de la phase supérieure (organique) est mesurée au fluorimètre (515 nm/548 nm).

### **Test de viabilité MTT**

Cette réaction est basée sur la réduction du MTT (bromure de 3-[4,5- diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium), sel de tétrazolium (jaune et soluble), par la chaîne mitochondriale des cellules métaboliquement actives, en formazan (bleu/ pourpre et insoluble) intracellulaire. Le MTT est dilué dans le milieu RPMI (50 µg/ml). Après 30 min d'incubation à 37°C, le milieu est éliminé et les cristaux de formazan sont dissous dans 1 mL de DMSO. La densité optique est mesurée au spectrophotomètre à 580 nm.

### **RTq PCR**

Les cellules sont cultivées en milieu RPMI contenant 10% de SVF jusqu'à confluence. Le milieu est remplacé par du milieu RPMI sans SVF pendant 24h, puis les cellules sont incubées en hypoxie ou H/R. A la fin, une solution de TRI-reagent RT (Euromedex) est ajoutée aux cellules afin d'extraire les

ARNs conformément aux instructions du fournisseur. Les ARN extraits sont quantifiés à l'aide d'un NanoDrop ND-1000. Un  $\mu\text{g}$  d'ARN est utilisé pour la reverse transcription grâce au kit high-capacityDNA reverse transcription (AppliedBiosystems) en suivant les instructions du fournisseur.

### **Tests de migration cellulaire : technique de la strie ou blessure-cicatrisation (wound-closure assay)**

Ce test permet d'étudier la migration des trophoblastes dans les différentes conditions utilisées. Les stries sont réalisées sur des HTR8 très confluentes dans des boîtes stériles de 30 mm. Une strie est réalisée à l'aide d'un embout de pipette en plastique stérile de 200  $\mu\text{l}$ , et les cellules sont placées dans des conditions d'hypoxie pendant 48 h (témoin) ou sont soumises à des variations de  $\text{pO}_2$  (H/R), comme décrit ci-dessus. Alternativement, l'effet du NO sur la migration du HTR8 est étudié en utilisant un inhibiteur de eNOS, le L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) ou un siRNA spécifique de eNOS. Ces inhibiteurs sont testés sur des HTR8 maintenus en hypoxie (1% d' $\text{O}_2$ ) pendant 48 h. A la fin, les cellules sont lavées avec du PBS, fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15min, puis perméabilisées avec du Triton X100 à 0.25% dans du PBS pendant 5 min. Après lavage en PBS, on ajoute 1 ml de DAPI, un agent intercalant de l'ADN qui marque les noyaux cellulaires (solution à 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PBS) pendant 5 min. Les cellules sont de nouveau lavées en PBS et observées en microscopie à fluorescence (filtre UV 365 nm). Une strie contrôle est réalisée au temps 0 et les cellules sont immédiatement fixées et colorées au DAPI (contrôle négatif).

### **Immunohistochimie**

Après collecte, des fragments de placenta sont directement fixés en PFA 4%, inclus en paraffine et coupés en série.

Les coupes de 3 $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont ensuite déparaffinées et réhydratées :

- 3 bains de xylène 5min
- 1 bain d'éthanol absolu 5min
- 1 bain d'éthanol 90° 5min

- 1 bain d'éthanol 75° 5min
- 1 bain H2O déminéralisée

Les antigènes sont démasqués par une solution citrate à pH 6, chauffée 20min à 100°C.

Après refroidissement des lames, les sites non spécifiques sont bloqués dans une solution Lait 5%/PBS/Triton 0.05% 30min sous agitation. Les coupes sont incubées en présence de l'anticorps primaire au 1/50 pendant 12h à 4°C en chambre humide. Après rinçage (3x5min PBS), les coupes sont incubées en présence de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome au 1/250, 1h à température ambiante, en chambre humide et à l'obscurité. Les noyaux sont marqués par une solution de DAPI (1µg/ml) (5min, à température ambiante). Les lames sont montées avec une lamelle à l'aide du Fluorescent Mounting Medium Dako. Les coupes sont observées à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM780 aux grossissements 40x et 63x, et les images analysées à l'aide du logiciel ImageJ software.

L'étude de la co-localisation de eNOS avec le glutathion a été réalisée par plusieurs méthodes :

- un "merge" des 2 channels avec visualisation d'un marquage jaune correspondant à la superposition des pixels rouge (eNOS) et vert (glutathion)
- la réalisation d'un «line profile», profil d'intensité des fluorochromes le long d'un vecteur (plugin RGB Profiler sous Fiji)
- une étude statistique basée sur l'évaluation du coefficient de corrélation de Pearson (plugin JacoP sous Fiji en évaluant le coefficient de Mander).

La modification de eNOS placentaire par des produits de peroxydation lipidique est évaluée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-ONE-lysine (donné par Pr. Koji Uchida, Tokyo), ou des anticorps monoclonaux anti-acroléine (Abcam ab48501), anti 4-HNE (Percipio Biosciences 24327) et des anticorps primaires rabbit anti-eNOS humain (Abcam ab5589).

### **Coloration Hématoxyline Eosine**

Les lames sont déparaffinées par passage dans trois bains successifs de xylène, puis réhydratés dans 3 bains d'éthanol à 60%, 80% et 100%. Les échantillons sont mis en contact pendant 5 minutes avec l'hématoxyline de Mayer, rincées puis plongées dans une solution de carbonate de lithium pendant 15 secondes. Les échantillons sont ensuite mis en contact avec une solution eosine-orange G pendant 2 minutes. Enfin les échantillons sont déshydratés par 3 bains successifs d'éthanol à 60%, 80% et 100% 5 minutes chacun puis dans 3 bains successifs de xylène de 5 minutes.

### **Sénescence et dosage X-Gal**

L'activité de la SA- $\beta$ -Gal est réalisée sur des coupes de placenta congelé à l'aide du kit Senescence detection kit (K320, Biovision). Après décongélation, la coupe de placenta est fixée 15 min à température ambiante dans une solution 2% formaldéhyde - 0.2% glutaraldéhyde.

Après rinçage au PBS, la coupe est incubée avec la solution de marquage (40mM acide citrique/Na phosphate buffer pH6.0, 150mM sodium chloride, 1mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-d-galactopyranoside ou X-gal, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ferrocyanure de potassium, 5mM ferricyanure de potassium), pendant 24h à 37°C, en chambre humide. La coloration bleue positive à XGAL est observée au microscope optique au grossissement 40x après contre coloration à l'éosine.

### **Préparation d'homogénats placentaires**

Les tissus placentaires (20 mg) sont placés dans un tube Eppendorf contenant 1 mL de PBS et des inhibiteurs de protéase. Le tissu est homogénéisé avec un homogénéisateur PreCellys pendant 2x 30 s sur glace. Les homogénats sont centrifugés à 13 000 tour/min pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est recueilli, aliquoté et conservé à - 80 °C jusqu'à utilisation.

### **Quantification du ratio GSH/GSSG et du taux de protéines carbonylées**

Le ratio du glutathion réduit (GSH) vs oxydé (GSSG) est mesuré sur homogénat de placenta après précipitation des protéines au TCA, en suivant les instructions du kit GSH/GSSG Ratio Detection kit (Ab100662, Abcam).

Le taux de protéines carbonylées est mesuré à l'aide du kit Protein Carbonyl ELISA kit (ALX-850-312-KI01, Enzo Lifesciences).

### **Immunoprécipitation et Western-blot**

Les homogénats de placentas témoins et PE, ou les cellules HTR8, sont utilisés pour l'immunoprécipitation de eNOS. Un fragment de 20 mg est placé dans un tube à billes contenant 1mL de PBS glacé + des inhibiteurs de protéases, puis homogénéisé au Precellys. Les homogénats sont centrifugés 15min à 13000rpm à 4°C.

Les trophoblastes sontensemencés dans des boites de culture (100 mm Falcon), à la concentration de  $10^6$  Cellules dans 4 mL de milieu RPMI contenant 5% SVF et incubés à 37°C. 24 h avant les expérimentations, le milieu de culture est retiré et remplacé par le même volume de RPMI sans SVF en fonction des conditions testées. Après solubilisation dans un tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH7,4, 150 mM NaCl, Igepal 1%, inhibiteurs de protéase et de phosphatase), les extraits protéiques (1 mg) sont incubés à 4 °C avec un anticorps anti-eNOS humain pendant 18h, puis immunoprécipités à 4 °C avec des billes enrobées de sépharose protéine A (qui précipitent les immunoglobulines). Les billes sont lavées trois fois avec du PBS, remises en suspension dans le tampon avec ou sans DTT (1 mM DTT pendant 30 minutes à température ambiante), qui permet de réverser la glutathionylation. Les échantillons sont portés à ébullition pendant 5 minutes, déposés sur gel de polyacrylamide, puis transférés sur membrane PVDF (polyfluorure de vinylidène, Millipore) pendant 2h. Après transfert, les membranes sont lavées et colorées au Rouge Ponceau, afin d'évaluer l'équilibre protéique.

Après plusieurs étapes de lavage et saturation dans des bains de PBS-Tween à 3% de BSA (Bovine Serum Albumine), les membranes sont incubées avec un anticorps primaire pendant une nuit, à 4°C. Après lavage et incubation avec un anticorps secondaire (Ac monoclonal anti-Ig de lapin, 0.2µL/mL, Sigma-Aldrich ou anti-Ig de souris 0,5 µL/mL), l'expression des protéines est révélée en chemiluminescence (Amersham ECL, GE Healthcare). Les films sont scannés et l'image traitée par le logiciel Image J, afin de réaliser une quantification du signal pour chaque bande. L'équilibre protéique est obtenu avec un Ac primaire dirigé contre la  $\beta$ -actine.

### **Modification et activité enzymatique de eNOS recombinante**

La glutathionylation de la eNOS humaine recombinante (ALX-201-853) (Enzo LifeSciences, Villeurbanne, France) a été réalisée par incubation avec le GSSG (2 µg de protéine et 1 mM de GSSG, en tampon phosphate pH 7,4, 18 h incubation à 37°C), dans les conditions indiquées par Chen et al. (Chen 2010). La modification de eNOS par ONE et 4-HNE est réalisée dans les mêmes conditions (2 µg de protéine, 1 mM de ONE ou 4-HNE, en tampon phosphate pH 7,4, 18 h incubation à 37°C).

### **Spectrométrie de masse**

Les études de protéomique et spectrométries de masse ont été réalisées par le Dr Frédéric Pont au plateau de protéomique du pôle technologique du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT, UMR 1037 INSERM, sous la responsabilité du Dr Frédéric Lopez).

#### *eNOS in-solution digestion.*

L'échantillon de eNOS est séché dans un concentrateur et digéré pendant une nuit à 37°C avec 400ng de trypsine porcine de qualité séquentielle (Promega), diluée dans 20µl de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (100 mM). Les peptides sont séchés et dilués dans 10 % d'acétonitrile à 0,05 % d'AGT avant analyse LC-MS.

#### *Analyse eNOS LC-MS.*

Les peptides digérés à partir de eNOS sont mesurés avec un spectromètre de masse SCIEX 5600+ TripleTOFmass fonctionnant en mode DDA (Data Dependant Acquisition).

### *Analyse des données LC-MS.*

Pour identifier les peptides eNOS, les fichiers sont soumis à la base de données Mascot (version 2.5) qui les recherche dans la base de données humaine UniProtSwiss-Prot.

### *Études in silico*

Les structures RX des isozymes NOS (nNOS neuronal chez le rat et iNOS inducible chez l'humain) ont été obtenues dans la base de données du Protein Data Base PDB (<http://www.rcsb.org/>). Les structures de la eNOS (eNOS, humaine) sont issues de ModBase : une base de données de modèles comparatifs de structures protéiques. Deux modèles d'homologie de eNOS (utilisant 1TLL PSB structure60 comme modèle) étaient disponibles sur ModBase. Les deux modèles sont similaires dans la région d'intérêt (LYS 1085, LYS 519) et le plus récent (2013) a été utilisé. Les graphiques moléculaires sont réalisés avec le logiciel UCSF Chimera (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>), développé par la « Ressource for Biocomputing, Visualization, and Informatics » de l'Université de San Francisco, Californie (soutenu par le NIGMS P41-GM103311). Les structures protéiques (1TLL, 3HR4 62) utilisées dans ce travail, ont été structurellement alignées à l'aide du programme UCSF Chimera/Matchmaker 63, la structure 1TLL (chaîne A) a été choisie comme référence pour le jeu structural. Les structures protéiques de cet espace de référence ont été préparées (contrôles de structure, fractionnement de chaîne) en utilisant Accelrys (Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego : AccelrysSoftware Inc. 2013) Discovery Studio Visualizer 4.0 (DSV) et UCSF Chimera.

### *Analyses statistiques*

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  ET. L'estimation de la significativité statistique est réalisée avec le test de Student en cas de distribution normale, ou le test U de Mann-Whitney non paramétrique. Les calculs statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel GraphpadPrism, version 6.01 (Graph Pad Software Inc., CA, USA). Les résultats pour lesquels  $p < 0,05$ , sont considérés comme statistiquement significatifs.

# **TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX**

## 1 - S-glutathionylation de eNOS placentaire en cas de pré-éclampsie

### Introduction

La physiopathologie de la PE est encore imparfaitement comprise mais est caractérisée par un défaut d'invasion trophoblastique associé à un défaut de remodelage vasculaire utérin, responsables d'une placentation défectueuse, d'une dysfonction endothéliale et d'une inflammation systémique. En plus de la vasodilatation, le NO intervient dans le remodelage vasculaire utérin et la placentation. (Mol 2016, Lecarpentier 2016)

Parmi les mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement placentaire, la biodisponibilité réduite du NO et le stress oxydant semblent jouer un rôle critique à plusieurs stades de la pathogénèse de la PE. (Guerby 2015) De plus, l'inhibition de eNOS (par L-NAME ou par invalidation génique) est classiquement utilisée pour le développement de modèles animaux de PE. Un certain nombre de facteurs contribuent à modifier la signalisation du NO et sont associés à un risque accru de PE :

- Diminution de l'expression de eNOS.
- Polymorphisme génétique de eNOS (G894T et T-786C)
- Découplage de eNOS.

Une cause du découplage eNOS est l'oxydation de son cofacteur, le BH4, qui est très sensible au stress oxydant. Il semble cependant que le BH4 ne soit pas vraiment diminué dans les placentas de femmes pré-éclamptiques. (Kukor 2000)

D'autres mécanismes de découplage ont été rapportés, notamment une augmentation du taux d'ADMA, inhibiteur endogène de la NOS ou une activité accrue de l'arginase qui réduit la disponibilité de la L-arginine, substrat de eNOS. (Savvidou 2003, Bernardi 2008)

Un autre mécanisme de découplage de eNOS pourrait résulter de sa S-glutathionylation, une modification post-traductionnelle des résidus de cystéine par le glutathion oxydé (en particulier Cys689 et Cys908). Ces résidus Cys sont critiques pour maintenir la fonction de eNOS. (Chen 2010, Zweier 2011) La S-glutathionylation de eNOS a récemment été identifiée comme une cause de découplage de eNOS chez les rats hypertendus. (Chen 2010, de Pascali 2014) La S-glutathionylation

correspond à la liaison réversible du glutathion ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine) à une protéine, par formation d'une liaison disulfure avec un groupement thiol. La S-glutathionylation des résidus cystéine des protéines est une modification réversible se produisant dans des conditions de stress oxydant faible ou sévère. Cette forme de découplage de eNOS est, contrairement au découplage induit par la déplétion en BH4, insensible aux inhibiteurs de la NOS et aux chélateurs calciques. (Dalle-Donne 2007, Chen 2010)

L'hypoxie-réoxygénation pourrait être responsable d'un découplage de eNOS *via* sa S-glutathionylation. (De Pascali 2014)

Ces données ont une signification physiopathologique évidente et les vaisseaux sanguins de rats spontanément hypertendus présentent des niveaux plus élevés de S-glutathionylation de eNOS et une vasorelaxation endothélio-dépendante altérée, pouvant être reversés des agents réducteurs spécifiques, tels que le DTT. (Chen 2010)

La S-glutathionylation de eNOS n'a pas été explorée en tant que cause d'une réduction de la production de NO au cours des grossesses pathologiques. Un des objectifs de notre étude a été d'explorer cette modification post-traductionnelle de eNOS dans les placentas des femmes pré-éclampsiques, en relation avec le stress oxydant majeur décrit dans la physiopathologie de la PE.

Ce travail expérimental est subdivisé en trois parties :

- Dans la première partie, nous comparons la glutathionylation de eNOS dans des placentas PE avec des placentas issus de grossesse normale. Cette étude est réalisée en immunofluorescence et imagerie confocale en étudiant l'expression de eNOS (en rouge) et du glutathion (en vert), la colocalisation des deux ou « merge » donnant une coloration jaune aux zones concernées. Le taux de glutathionylation de eNOS est évalué en faisant le rapport de eNOS-glutathionylée sur eNOS total. Les résultats sont confirmés par immunoprécipitation de eNOS et Western Blot pour révéler le glutathion.
- Dans la deuxième partie, nous avons modélisé la glutathionylation de eNOS sur des trophoblastes humains en culture (HTR8/SVneo) dérivés de syncytiotrophoblastes (issus d'explants du premier trimestre) qui expriment eNOS. Nous avons induit un stress oxydant en exposant les cellules

à des variations de gradient d'oxygène (H/R) (1% vs 20% O<sub>2</sub>), ce qui permet d'induire des ROS et une glutathionylation de eNOS.

- Dans la troisième partie de ce travail, nous avons étudié la capacité des HTR8 à migrer dans un modèle de strie (wound closure), afin d'étudier le rôle du NO dans la migration des trophoblastes, et le potentiel rôle pathogène de la glutathionylation de eNOS induite par le stress oxydant.



Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/redox](http://www.elsevier.com/locate/redox)

Research Paper

## High glutathionylation of placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia

Paul Guerby<sup>a,b,1</sup>, Audrey Swiader<sup>a,1</sup>, Nathalie Augé<sup>a</sup>, Olivier Parant<sup>b</sup>, Christophe Vayssière<sup>b</sup>, Koji Uchida<sup>c</sup>, Robert Salvayre<sup>a</sup>, Anne Negre-Salvayre<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Inserm U-1048, Université de Toulouse, France

<sup>b</sup> Pôle de gynécologie obstétrique, Hôpital Paule-de-Viguier, CHU de Toulouse, France

<sup>c</sup> Laboratory of Food Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Japan



## ARTICLE INFO

## Keywords:

NO  
eNOS  
S-glutathionylation  
Glutathione  
Oxidative stress  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>  
Pregnancy  
Trophoblast  
Migration  
Preeclampsia

## ABSTRACT

Decreased nitric oxide (NO) bioavailability plays a critical role in the pathophysiology of preeclampsia (PE). Recent evidence indicates that S-glutathionylation may occur on the endothelial nitric oxide synthase (eNOS), leading to eNOS uncoupling, characterized by a decreased NO production and an increased generation of superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). We hypothesized that eNOS glutathionylation may occur in PE placentas and participate in eNOS dysfunction.

The glutathionylation of eNOS was investigated in thirteen PE-affected patients and in nine normal pregnancies. Immunofluorescence, confocal microscopy and western-blot experiments carried out on eNOS immunoprecipitates, revealed a high level of eNOS glutathionylation in PE placentas, mostly reversed by dithiothreitol (DTT), thus indicative of S-glutathionylation. In order to investigate whether eNOS glutathionylation may alter trophoblast migration, an important event occurring during early placentation, cultured HTR-8/SVneo human trophoblasts (HTR8) were exposed either to low pO<sub>2</sub> (O<sub>2</sub> 1%) or to pO<sub>2</sub> changes (O<sub>2</sub> 1–20%), in order to generate oxidative stress. Trophoblasts exposed to low pO<sub>2</sub>, did not undergo oxidative stress nor eNOS S-glutathionylation, and were able to generate NO and migrate in a wound closure model. In contrast, trophoblasts submitted to low/high pO<sub>2</sub> changes, exhibited oxidative stress and a (DTT reversible) S-glutathionylation of eNOS, associated with reduced NO production and migration. The autonomous production of NO seemed necessary for the migratory potential of HTR8, as suggested by the inhibitory effect of eNOS silencing by small interfering RNAs, and the eNOS inhibitor L-NAME, in low pO<sub>2</sub> conditions. Finally, the addition of the NO donor, NOC-18 (5 μM), restored in part the migration of HTR8, thereby emphasizing the role of NO in trophoblast homeostasis.

In conclusion, the high level of eNOS S-glutathionylation in PE placentas provides new insights in the mechanism of eNOS dysfunction in this disease.

## 1. Introduction

Preeclampsia (PE), is a pregnancy-specific systemic vascular disorder that affects 3–7% of pregnancies in western countries and 4–18% in developing countries [1,2]. It is classically diagnosed by hypertension and proteinuria observed after 20 weeks of gestation. If untreated, PE can lead to complications, including eclampsia, HELLP syndrome (elevated liver enzymes, haemolysis, and low platelets), pulmonary oedema, placental abruption. Moreover, PE is a cause of maternal and

perinatal morbidity and mortality [2,3]. Though the pathophysiology of PE has been deeply investigated and the clinical outcomes ameliorated, the underlying causes of poor placentation are not yet clarified [1].

It is generally admitted that in PE, the low resistance vasculature does not occur, due to abnormal cytotrophoblast invasion and defective spiral artery remodeling. The consequences are a decrease of blood flow to the placenta and an abnormal placentation due to abnormal hypoxia/oxygenation conditions in the intervillous space [2]. The hypoperfused placenta releases 'placental antiangiogenic factors' such as the

**Abbreviations:** NO, nitric oxide; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide anion; ROS, reactive oxygen species; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; BH4, tetrahydrobiopterin; PE, preeclampsia

\* Correspondence to: INSERM U-1048 – I2MC, CHU Rangueil, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France.

E-mail address: [anne.negre-salvayre@inserm.fr](mailto:anne.negre-salvayre@inserm.fr) (A. Negre-Salvayre).

<sup>1</sup> Equally contributors.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101126>

Received 9 January 2019; Accepted 25 January 2019

Available online 26 January 2019

2213-2317/© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt1) and s-endoglin into the maternal circulation [4–7]. sFlt1 is a splice variant of VEGF receptor 1, and a soluble receptor of the proangiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PlGF). In PE, there is an increased expression of sFlt1, concomitant with a decreased production of angiogenic PlGF and VEGF, leading to endothelial dysfunction and systemic inflammation [4–7].

During normal pregnancy, important maternal circulatory changes (expanded plasma volume, increased cardiac output, peripheral vasodilation, increased vascular compliance) are associated with the adaptation of uteroplacental circulation, that is required for optimal placental and embryo/fetal development [8,9]. In early pregnancy, extravillous cytotrophoblasts invade and plug spiral arteries, thereby restricting blood flow, and leading to low pO<sub>2</sub> (estimated < 20 mm Hg at 8–10 weeks) in the intervillous space. This relative hypoxia is required for cytotrophoblasts migration and to prevent oxidative stress in developing embryo that possesses only low antioxidant defenses at this stage of development [9–11].

Cytotrophoblasts participate in the remodeling of uterine spiral arteries that are transformed into large diameter and low resistance vessels with reduced pulsatility and weak vasoconstrictive ability. At 10–12 weeks, the trophoblastic arterial plugs dissolve, and uterine spiral arteries, remodeled into large diameter and low resistance vessels, increase progressively the oxygenated blood flow into intervillous space, thereby rising progressively placental O<sub>2</sub> concentration (reaching about 60 mm Hg at 12–13 weeks) and inducing an extensive villous remodeling [8–11].

In addition to histological changes of uterine arterial wall, the vasodilation of these arteries is mediated/reinforced by mediators, such as hormones (estrogens, progesterone), angiogenic growth factors (VEGF, PlGF) and vasodilator mediators such as nitric oxide (NO), prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) [12–14]. In addition to vasodilation, NO is involved in uterine artery remodeling and placentation [12].

In PE, the deficiency of both cytotrophoblast invasion and remodeling of uterine spiral arteries may induce a maladaptation of uteroplacental circulation associated with intermittent maternal blood flow and hypoxia/reoxygenation events. This leads to oxidative stress and an imbalance of angiogenic/antiangiogenic factors (VEGF/PlGF vs sFlt1) that elicit placental cell stress and abnormal placentation, endothelial dysfunction and systemic inflammation [2,4–7,10,11].

Among the mechanisms involved in placenta dysfunction, the reduced bioavailability of NO and oxidative stress are thought to play a critical role in the maternal-placental circulation [12–16] and poor placentation [17,18]. Moreover, the inhibition of nitric oxide synthase (eNOS) by L-NAME or genetic invalidation, is classically used for developing PE animal models [19]. A number of factors contribute to alter NO signaling, and are associated with an increased risk of PE, as recently summarized [20]. This includes alterations of eNOS regulation or function. For instance, eNOS polymorphism (G894T and T-786C) [21,22], or eNOS uncoupling [17,23,24], have been associated with an increased risk of PE. A cause of eNOS uncoupling is the oxidation of its cofactor, (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH4), which is highly sensitive to oxidative stress [25]. Other uncoupling mechanisms have been reported including an increased level of the endogenous NOS inhibitor ADMA (asymmetric dimethyl-L-arginine) [26,27], or an increased arginase activity which reduces the availability of the eNOS substrate L-arginine [28].

A new mechanism of eNOS uncoupling, reported by Zweier's group [29], may result from its S-glutathionylation, a post-translational modification by oxidized glutathione of cysteine residues, specifically Cys689 and Cys908, that are critical to maintain eNOS function. The S-glutathionylation of cysteine residues of proteins is a reversible modification occurring under mild and severe oxidative stress conditions [30–32].

Since eNOS glutathionylation is a cause of reduced NO production,

we investigated whether eNOS glutathionylation is increased in PE placentas, and whether such eNOS modification may occur in cultured trophoblast under oxidative stress conditions, and is associated with trophoblast dysfunction.

## 2. Methods

### 2.1. Materials

Anti-eNOS (ab5589) and anti-iNOS (ab3523) used for immunohistochemistry were from Abcam (Paris, France). Anti-eNOS antibody (AF950) used for immunoprecipitation experiments was from R & D Systems (Bio-Techne, France). Anti-glutathione antibody recognizing GS-S-proteins was from Virogen (Watertown, MA, USA). Secondary antibodies anti-mouse and anti-rabbit HRP-conjugated were from Cell Signaling Technology (Ozyme, France). Anti-Von Willebrand Factor (VWF) (AB7356) was from Chemicon (Merck Millipore) and anti-VEGF was from Sigma. Secondary anti-goat HRP-conjugated was purchased from Southern Biotech (Clinisciences, France). Secondary Alexa Fluor antibodies (488 and 546) were from Life Technologies (Courtaboeuf, France). Dihydroethidine (DHE), DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate), dithiothreitol (DTT), 4,6-Diamidino 2-phenylindole dihydrochloride (DAPI), oxypurinol, VAS2870, L-NAME (N-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), BH4 (tetrahydrobiopterin dihydrochloride) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) and SYTO-13 were from ThermoFisher (Villebon sur Yvette, France), NOC-18 (diethylenetriamine/nitric oxide adduct; DETA NONOate), was from Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences, France).

### 2.2. Placental tissue collection

The use and study of human placentas were approved by the Research Ethic Committee of Toulouse University Hospital (CER number 03-0115). Two groups of age-matched pregnant women were analyzed, one normotensive control group established from uncomplicated pregnancies (n = 9, mean gestational age 39 weeks), and one group exhibiting severe PE features (n = 13, mean gestational age 29 weeks). The clinical details are summarized in Table I. Placentas from normal and PE pregnancies were recovered from elective cesarean section (University Hospital Center of Toulouse, France).

Preeclampsia was defined according to the American College of Obstetricians and Gynecologists, i.e. by a systolic blood pressure (SBP) greater than or equal to 140 mm Hg, or a diastolic blood pressure (DBP) greater than or equal to 90 mm Hg and a proteinuria greater than or

**Table I**  
Placental tissue collection.

Patient characteristics	Normal (n = 9)	Preeclampsia (n = 13)	p-value
Maternal age, mean (SD)	30.5 (4.1)	31.1 (6)	0.82
BMI	26.7 (3.7)	24.2 (4)	0.17
Parity	1.8 (1.0)	1.4 (0.7)	0.32
<b>Blood sampling</b>			
Systolic blood pressure (mmHg), mean (SD)	118.9 (8.2)	159.6 (11)	< 0.001
Diastolic blood pressure (mmHg), mean (SD)	70.5 (5.8)	97.5 (9.4)	< 0.001
Proteinuria (g/24 h) mean, (SD)	< 0.3	5.4 (5)	< 0.01
Delivery			
Gestational age (wk), median (IQR)	39 (1)	29 (3.2)	< 0.001
Birth weight (g), mean, (SD)	3383.9 (479.0)	1108.3 (423.3)	< 0.001

P value: P < 0.05 statistically significant; BMI: body mass index; results are expressed as means ± SD or medians ± IQR.

equal to 300 mg per 24-h urine collection, after 20 weeks of gestation. Severe PE features included fetal and maternal complications (pulmonary oedema, myocardial infarction, stroke, acute respiratory distress syndrome, coagulopathy, severe renal failure, and retinal injury) leading to delivery induction before 34 weeks of gestation. For each patient, the placenta was immediately collected after delivery, and washed four times in ice-cold PBS to remove remaining blood. Some fragments were fixed into 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin for immunofluorescence analysis. Other fragments were kept frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. As illustrated in *supp. Fig. 1*, histological analysis (hemalun/eosin) of PE placentas, showed characteristic features of increased syncytial knots, distal villous hypoplasia and calcification deposits.

### 2.3. Cell culture

HTR-8/SVneo cells (HTR8) were a generous gift from Dr Charles H. Graham (Queen's University, Kingston, ON, Canada) [33]. This cell line was established from explant culture of first-trimester human placenta and immortalized by the simian virus 40 large T antigen. Under standard conditions, HTR8 were cultured in RPMI supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (5%  $\text{CO}_2$ , 20%  $\text{O}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ ). For the experiments, subconfluent HTR8 were incubated in FBS-free RPMI and put in a hypoxic chamber ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 1%  $\text{O}_2$ ). Exposure to low (1%  $\text{O}_2$ ) vs high (20%  $\text{O}_2$ )  $\text{pO}_2$  experiments for inducing oxidative stress, were carried out as reported in [34], modified as follows: cells were maintained in low  $\text{pO}_2$  ( $\text{O}_2$  1%) for 18 h, then exposed to high  $\text{pO}_2$  ( $\text{O}_2$  20%) for 2 h and re-exposed to 1%  $\text{O}_2$  for 4 h (or as indicated in legends). Before exposure to high  $\text{pO}_2$ , the hypoxic medium was removed and replaced by fresh RPMI medium. Cell viability was estimated using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay [35].

siRNA transfections were carried out using ON-TARGET plus human NOS3 siRNA (006490, Dharmacon) with the Hiperfect reagent (301705, Qiagen) according to manufacturer's instructions.

### 2.4. Intracellular ROS, $\text{O}_2^{\cdot-}$ and NO determination

Intracellular  $\text{O}_2^{\cdot-}$  generation was detected using the dihydroethidine (DHE) probe. Live cells were stained with DHE (5  $\mu\text{M}$ ) and counterstained with the permeant DNA probe Syto 13 (0.5  $\mu\text{M}$ ), for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$ , and the fluorescence was monitored by microscopy, in the conditions reported by Chen et al. [29], or was measured in PBS (Spectrofluorometer Hitachi F-2500, exc/em 530/610 nm) [36,37].

Alternatively, ROS were evaluated using the oxidation of the non specific  $\text{H}_2\text{DCFDA-AM}$  probe [37]. The probe was added to the culture medium (5  $\mu\text{M}$  final concentration) 30 min before the end of the experiment. After washing in PBS, the fluorescence was measured in PBS (exc/em 495/525 nm). The data are expressed as ratio of the low  $\text{pO}_2$  control.

NO production was determined in HTR8 preincubated for 30 min using the DAF-FM diacetate probe (5  $\mu\text{M}$ ). After washing with PBS, NO production was monitored fluorometrically (exc/em 495/525 nm). To ensure the specificity of NO production which may vary using DAF-FM probe [37], a negative control was done in the presence of L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), and subtracted to each measurement. NO production was expressed as % of the low  $\text{pO}_2$  control/h.

### 2.5. Wound closure assay for evaluation of the HTR8 invasive potential

HTR8 were cultured up to confluency on sterile coverslips in 30 mm sterile dishes. A scratch was made with a sterile 200  $\mu\text{l}$  plastic pipette tip, and cells were put in low  $\text{pO}_2$  conditions for 48 h (control) or were submitted to  $\text{pO}_2$  changes, as above described. Alternatively, the effect of eNOS inhibition on HTR8 migration, was studied using L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) or eNOS silencing by siRNAs, in HTR8 maintained in low  $\text{pO}_2$

( $\text{O}_2$  1%) for 48 h. At the end, cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized for 5 min with 0.25% Triton X-100 in PBS. After DAPI staining, the coverslips were mounted on a glass slide and analyzed by fluorescence microscopy.

### 2.6. Immunofluorescence studies

Serial 3  $\mu\text{m}$  thin sections of placentas were dewaxed, rehydrated and used for immunofluorescence analysis. The glutathionylation of eNOS was analyzed under conditions described by Chen et al. [29], using mouse anti-glutathione recognizing GSS-proteins and rabbit anti-human eNOS primary antibodies, followed by secondary anti-mouse Alexa fluor-488 and anti-rabbit Alexa fluor-546 conjugated antibodies. Alternatively, dewaxed and rehydrated slides were treated by DTT (1 mM) for 30 min at room temperature, washed in PBS, and immunofluorescence studies were carried out. Nuclei were stained with DAPI (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The slides were analyzed by confocal microscopy (Zeiss LSM780). The percentage of eNOS overlapping with GSS-protein was determined using the plug-in JACoP of ImageJ software, by evaluating the Mander's coefficient.

### 2.7. Preparation of placental homogenates

Placental tissues (20 mg) were placed into a homogenate plastic tube containing 1 mL of ice-cold PBS and protease inhibitors. The tissue was homogenized with a PreCellys homogenizer for twice 30 s on ice. Homogenates were centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was collected, aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until required.

### 2.8. Reduced vs oxidized glutathione content

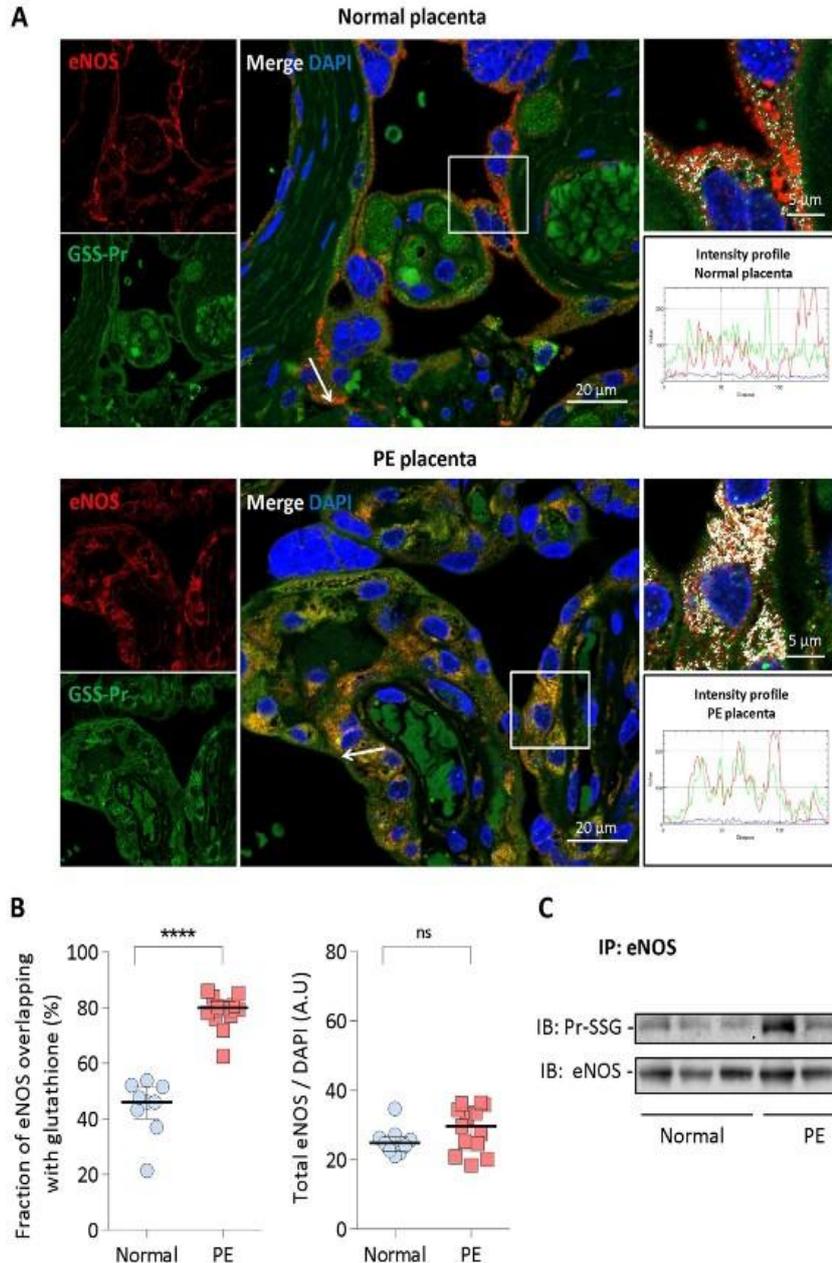
The ratio of reduced (GSH) to oxidized glutathione (GSSG) was determined in control and PE homogenates using the GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit (Abcam, Paris, France).

### 2.9. Immunoprecipitation and western-blot experiments

Control and PE placenta homogenates, or HTR8 cell extracts were used for eNOS immunoprecipitation. After solubilization in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, Igepal 1%, protease and phosphatase inhibitors), protein extracts (1 mg) were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with a human anti-eNOS antibody followed by precipitation for 2 h at  $4^{\circ}\text{C}$  with protein-A sepharose coated beads. The beads were washed three times with PBS, resuspended with loading buffer in non-reducing or reducing conditions with or without DTT (1 mM DTT for 30 min at room temperature) and boiled for 5 min. The protein complexes were subjected to Western-blot analysis. The protein extracts were separated by 7% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane (Millipore). The membranes were blocked with 5% nonfat milk/TBST for 2 h and incubated with glutathione or eNOS antibodies (1:1000) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . After washing, the membranes were incubated with horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000) for 1 h.

### 2.10. Statistical analysis

The results are expressed as mean  $\pm$  SEM. For normally distributed data, Student's *t*-test was used, otherwise nonparametric Mann-Whitney *U*-test was employed. Statistical calculations were carried out using the software Graphpad Prism, version 6.01 (Graph Pad Software Inc., CA, USA). Values of  $p < 0.05$  were considered significant.



**Fig. 1. Glutathionylation of eNOS in control and PE placentas.** A, Representative pictures of eNOS glutathionylation showing the colocalization of eNOS (red) and glutathione (green) in placentas from one normal pregnancy (upper picture) and one PE patient (lower picture) (scale bar, 20  $\mu$ m). Co-immunofluorescence staining and confocal microscopy were carried out on placenta sections using anti-polyclonal eNOS antibody and anti-glutathione antibody recognizing GSS-proteins. Nuclei were counterstained with DAPI. Yellow area show the colocalization of eNOS with glutathione on the composite image (merge). Inserts indicate area selected for higher magnification (colocalization of eNOS and glutathione in white areas, scale bar 5  $\mu$ m). The fluorescence intensity profiles indicate the colocalization of eNOS (red) and GSH (green) along the arrow, in PE vs normal placentas. These pictures are representative of all studied normal and PE placentas (and see also Supp Fig. II). B, Quantification from confocal pictures, of glutathione-modified vs total eNOS (left) and total eNOS vs DAPI (right), in normal (n = 9) and in PE placentas (n = 13). Total eNOS was quantified by the ratio between red-fluorescence and the number of DAPI-stained nuclei. The quantification of eNOS fluorescence overlapping with GSH fluorescence, was based on Mander's coefficient analysis. Data represent median  $\pm$  interquartile range. C, Immunoprecipitation and western-blot experiments showing eNOS glutathionylation in placentas from normal (3) and PE (3) pregnancies. Statistical significance was assessed using the nonparametric Mann-Whitney U test (ns, non significant; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

### 3. Results

#### 3.1. S-Glutathionylation of eNOS in human placentas

Immunofluorescence staining with anti-glutathione recognizing GSS-protein and anti-eNOS antibodies showed an apparent colocalization between eNOS (red) and GS-S-protein (green) in PE and at a lesser extent in normal placentas (Fig. 1A and Supp. Fig. II). The quantification of eNOS glutathionylation was evaluated by measuring the ratio of glutathionylated eNOS (white) vs total eNOS (red). In placentas from normal pregnancies, the ratio glutathionylated/total eNOS was around 45%, whereas it reached more than 80% in PE placentas (Fig. 1B). Total eNOS protein expression, evaluated by the ratio eNOS/DAPI, was similar or slightly higher in PE compared to normal placentas (Fig. 1B). eNOS was highly expressed in syncytiotrophoblasts and in endothelial cells of microvessels, where it colocalized with the von Willebrand factor, a specific endothelial cell marker (Supp. Fig. III). As inflammation is a classical component of PE [9,15–18], we also investigated the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS), which was comparable in PE and normal placentas (Supp. Fig. IV), in agreement with previous reports [38]. It is to note that iNOS was much less glutathionylated than eNOS, and no differences in iNOS glutathionylation expression were observed between normal and PE placentas (Supp. Fig. IV).

Western-blot experiments were carried out on eNOS immunoprecipitates prepared from placenta homogenates, and confirmed the lack of difference in total eNOS expression, and the high eNOS glutathionylation levels in PE when compared to normal placentas (Fig. 1C).

To investigate whether eNOS is S-glutathionylated, i.e. sensitive to reducing agents, placenta slides were mildly treated by dithiothreitol (DTT) (1 mM, 30 min), before immunostaining with anti-glutathione and anti-eNOS antibodies. As shown in Fig. 2A, most of eNOS glutathionylation was reversed by DTT in normal and PE placentas, indicating that placental eNOS was mainly S-glutathionylated. It is to note that a minor fraction of glutathionylated eNOS was resistant to DTT treatment of immunoprecipitated samples (1 mM, 30 min) in PE placentas (Fig. 2B), suggesting that the major part of placental glutathionylated eNOS undergoes (DTT-reversible) S-glutathionylation and a minor part could be (DTT-resistant) C-glutathionylated [39].

As the ratio of GSH to glutathione disulfide (GSSG) regulates the intracellular redox status, and its imbalance may lead to protein S-glutathionylation [30], the GSH and GSSG levels were evaluated in placenta homogenates. Data in sup Fig.V, point out a significant decrease of the GSH/GSSG ratio in PE placentas, indicative of oxidative stress and redox status imbalance.

#### 3.2. Human trophoblasts HTR8 exposed to pO<sub>2</sub> variations exhibit eNOS S-glutathionylation

As eNOS is expressed in trophoblasts and is involved in placentation and trophoblast migration into spiral arteries [12], and as oxidative stress is thought to disturb placentation and remodeling of uterine spiral circulatory by extravillous trophoblasts [9], we used a trophoblastic cell line to investigate whether oxidative stress may induce eNOS glutathionylation and subsequent cellular dysfunction. For this purpose, we used the HTR-8/SVneo cytotrophoblast cell line (HTR8), which was established by Graham et al. [33] from first trimester human trophoblasts. These immortalized cells exhibit a stable phenotype during cell culture, and express eNOS.

HTR8 in FBS-free culture medium, were exposed to low pO<sub>2</sub> (1% O<sub>2</sub>), in which they migrate and proliferate [40]. Oxidative stress was generated by pO<sub>2</sub> changes (1–20%). These conditions did not elicit any loss of HTR8 viability (Supp. Fig.VI). Low pO<sub>2</sub> stimulated the expression and stabilization of the hypoxia-sensitive transcription factor Hif1 $\alpha$  [41,42], in agreement with previous studies in HTR8 [43]. In

contrast, Hif1 $\alpha$  was unstable in cells exposed to high pO<sub>2</sub> (20% O<sub>2</sub>), or submitted to pO<sub>2</sub> changes [41] (Supp. Fig.VII).

The exposure of HTR8 to pO<sub>2</sub> changes stimulated the production of intracellular ROS, detected using the nonspecific DCF-DA probe [37], which were partly inhibited by Vas2870, a pan NADPH oxidase inhibitor, and by the xanthine oxidase inhibitor oxypurinol (Fig. 3A), indicating a role for xanthine oxidase, in agreement with [34]. ROS production included the generation of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, detected using dihydroethidine (DHE, a cell-permeant O<sub>2</sub><sup>-</sup> sensitive probe ) [36] (Fig. 3B,C).

In HTR8 exposed to pO<sub>2</sub> changes (i.e. oxidative stress), immunofluorescence and confocal microscopy pointed out the glutathionylation of eNOS (i.e. its colocalisation with glutathione) (Fig. 4A), which was confirmed by immunoprecipitation and western blot experiments (Fig. 4B). The DTT treatment suppressed the overlay of immunofluorescence of GS-S-protein and eNOS as well as the glutathionylation of eNOS on western blot (Fig. 4A,B), indicating that eNOS is S-glutathionylated in HTR8 submitted to pO<sub>2</sub> changes.

The production of NO was quantified using the fluorescent NO-sensitive probe DAF-FM. The generation of NO by cells exposed to pO<sub>2</sub> changes, was significantly decreased, when compared to cells maintained in 1% O<sub>2</sub> (Fig. 4C). The addition of BH4 (10  $\mu$ M) did not restore the production of NO, indicating that the decrease of eNOS activity induced by oxidative stress, could not result from BH4 oxidation, and that BH4 cannot compensate when eNOS is inactive.

#### 3.3. HTR8 migration is reduced under conditions of eNOS S-glutathionylation and is partly restored by NO donor

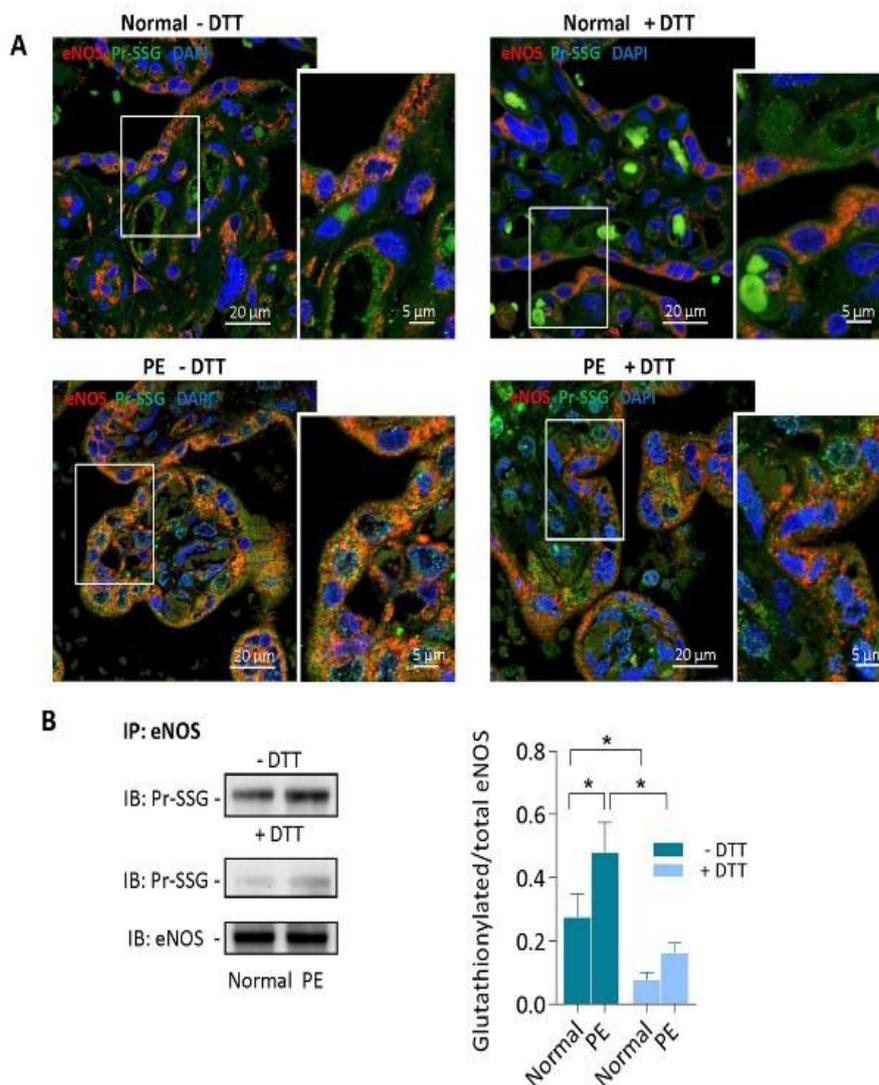
NO plays an important role throughout pregnancy, and particularly in the early steps of placentation, where it contributes to the invasion of spiral arteries by cytotrophoblasts [8–11,17,18]. To test the role of NO in trophoblast migration and the potential pathogenic role of eNOS glutathionylation induced by oxidative stress, we used the ability of HTR8 to migrate in the wound closure assay [40].

As shown in Fig. 5, HTR8 grown in serum-free medium, at low pO<sub>2</sub> (O<sub>2</sub> 1%), migrated within the wound through a cell-autonomous NO-dependent mechanism, as suggested by the inhibition of HTR8 migration induced by the silencing of eNOS by siRNAs (Fig. 5), or by the eNOS inhibitor L-NAME (Supp.Fig.VIII). Interestingly, under oxidative stress conditions (exposure to pO<sub>2</sub> changes) inducing eNOS glutathionylation, HTR8 migration was inhibited, but was compensated (in part) by the NO donor NOC-18, which also restored the migration of cells either eNOS-silenced by siRNAs (Fig. 5). These data support the hypothesis that cell autonomous production of NO by eNOS is required for trophoblast migration during the early steps of placentation and remodeling of uterine spiral arteries, and that oxidative stress induced by pO<sub>2</sub> changes induces S-glutathionylation and inhibition of eNOS, resulting in deficient cytotrophoblast migration. It is to note that a constant exposure to high pO<sub>2</sub> (O<sub>2</sub> 20%) in serum-free medium, did not stimulate HTR8 migration within the wound (data not shown).

### 4. Discussion

The decreased NO bioavailability in the first trimester of pregnancy, is a cause of poor placentation [8–11,13], while eNOS deficiency is associated with reduced placental vascularization and fetal growth restriction in homozygous eNOS<sup>-/-</sup> conceptus, but not in heterozygous [44]. In PE, the molecular basis of eNOS dysfunction are still unclear. In this study, we report for the first time that eNOS is highly S-glutathionylated in placentas from PE patients. As the reversible (reductant-sensitive) S-glutathionylation leads to eNOS uncoupling and a decrease in NO production [29], the results reported here may partly explain the molecular and pathophysiological mechanisms leading to eNOS dysfunction and reduced NO generation in PE.

A first point is that eNOS was found glutathionylated in all



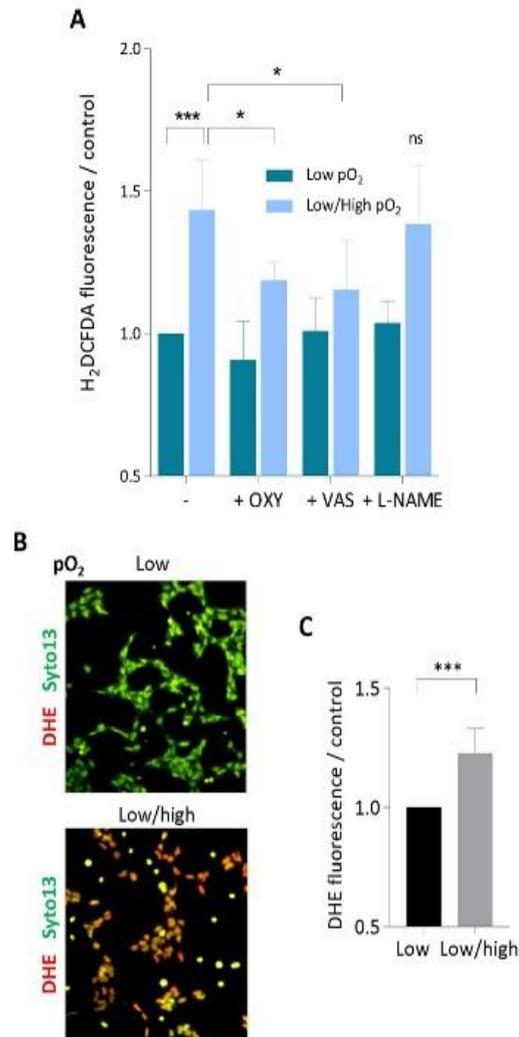
**Fig. 2. Reversion of eNOS glutathionylation by DTT in placentas.** A, Representative pictures of DTT-sensitive eNOS glutathionylation in placentas from one normal pregnancy (upper panel), and one PE patient (lower panel). Slides were preincubated with DTT (1 mM, 30 min room temperature), before immunofluorescence staining and confocal microscopy, as indicated in Fig. 1 (scale bar 20 μm). In insert, higher magnification picture (scale bar 5 μm). B, Immunoprecipitation and western-blot experiments showing the reversible eNOS glutathionylation in placentas, after DTT treatment of the protein extract. Left, representative western-blot picture; Right, expression of the data as median with interquartile range. The statistical analysis was assessed using a Mann-Whitney test. \* $p < 0.05$ .

placentas, with levels reaching around 45% of total eNOS in placentas from normal pregnancy, vs more than 80% in PE placentas. No major differences were observed concerning the total eNOS expression in placentas, in agreement with previous studies [38,45], and in contrast to the decrease in eNOS expression reported by Du et al. [46]. These discrepancies could be due to the severity of PE cases (higher in [38,45] and in our study), which could be associated with an increased eNOS expression [46]. Most part of eNOS glutathionylation was reversed by the reducing agent DTT in normal and PE placentas, indicating that eNOS is mainly S-glutathionylated, i.e. undergoes a post-translational reversible modification of cysteine residues by oxidized glutathione, according to the mechanism described by Chen et al. [29]. This high level of eNOS S-glutathionylation, with less than 20% of non-glutathionylated, thus still active eNOS, may constitute a mechanism of

decreased NO bioavailability, with consequences on placentation [9–11], uterine artery contractility, placental circulation and maternal blood pressure regulation [17,18].

S-glutathionylation is a post-translational modification of proteins occurring as an adaptative response to oxidative stress and loss of intracellular reductive ability, and a mechanism protecting oxidant-sensitive thiol of cysteine residues from irreversible modifications [29–31]. The S-glutathionylation of eNOS was reported in the vascular wall of hypertensive rats [29], and in endothelial cells exposed to hypoxia/reoxygenation [34], or mutant for glutamate-cysteine ligase, in which the biosynthesis of glutathione is altered [47], but to our knowledge, this is the first report showing that eNOS is S-glutathionylated in placentas.

In early pregnancy, extravillous cytotrophoblasts invade and plug



**Fig. 3.** Intracellular ROS increase and  $O_2^{\cdot -}$  generation evoked by  $pO_2$  changes in HTR8. **A**, Intracellular ROS detected using the  $H_2DCFDA$ -AM fluorescent probe, in HTR8 maintained in low  $pO_2$  ( $O_2$  1%) or submitted to  $pO_2$  changes, and effect of inhibitors L-NAME (100  $\mu M$ ), oxypurinol (OXY) (1 mM) and Vas2870 (VAS, 5  $\mu M$ ).  $H_2DCFDA$ -AM was added to the HTR8 culture medium (5  $\mu M$ ) 30 min before the end of incubation. Cells were washed in PBS, lysed in water, and the fluorescence was measured (exc. 495 nm/em. 525 nm). **B**, **C**, Detection of intracellular  $O_2^{\cdot -}$  using the dihydroethidine probe (DHE). **B**, representative pictures of HTR8 showing the production of  $O_2^{\cdot -}$  in low  $pO_2$  or exposed to  $pO_2$  changes. DHE (5  $\mu M$ ) and the cell permeant Syto13 (for nuclei counterstaining), were added to the culture medium at the end of incubation, and the fluorescence of cells was immediately monitored. **C**, Measurement of  $O_2^{\cdot -}$  production by HTR8. DHE fluorescence was measured in cell homogenates in PBS (Spectrofluorometer Hitachi 2500, exc. 530 nm/em. 610 nm). Results are expressed as ratio of the low  $pO_2$  control. Means  $\pm$  SEM of 4 separate experiments, statistical analysis with a Student *t*-test. \*\*\**p* < 0.001.

the maternal uterine spiral arteries, thereby decreasing blood flow and lowering  $pO_2$ . This relative hypoxia, necessary for promoting cytotrophoblast migration, and spiral artery remodeling [9–11], maintains a low local production of ROS and prevents oxidative stress that would be highly deleterious because of the low expression of antioxidant systems

in the early stage of placenta and embryo development [9–11,48]. In the same way, a local NO production is required for optimal trophoblast migration and uterine spiral artery remodeling [12,44]. In our HTR8 experimental model system, a relative hypoxia is associated with a moderate eNOS glutathionylation and NO production sufficient for HTR8 migration.

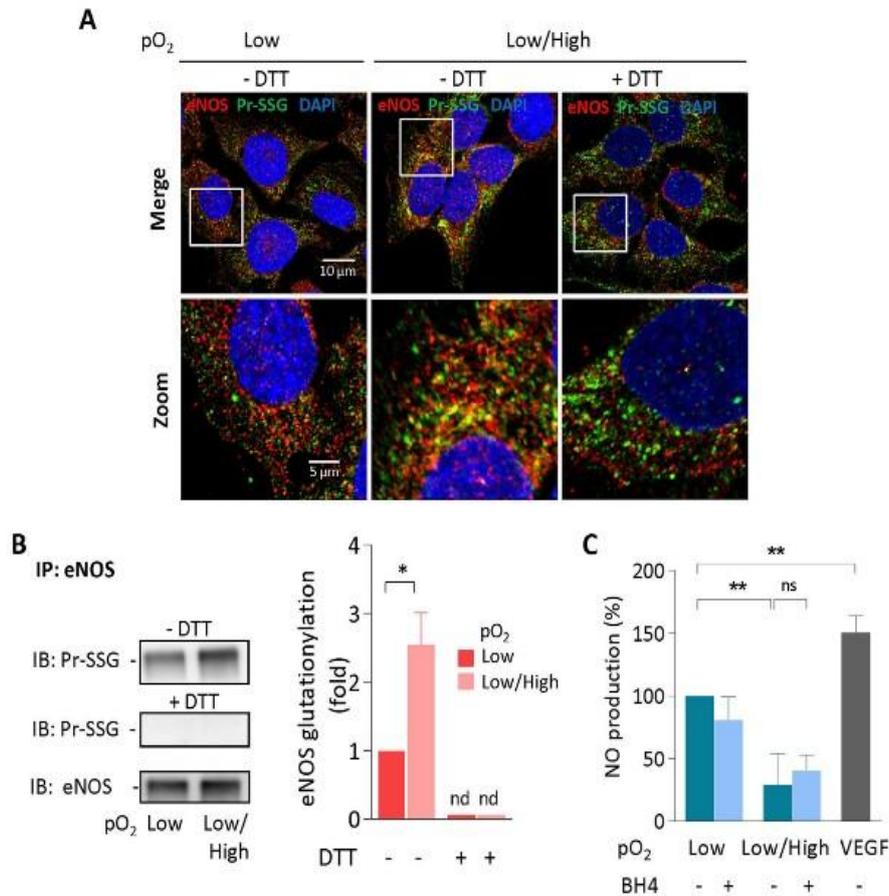
Later on, during normal pregnancy, the removal of trophoblastic plugs and the remodeling of placental vessels, allow progressively increasing the blood flow into placental intervillous spaces, while the expression of antioxidant enzymes increases in the placenta and embryo [9]. A low to moderate oxidative stress apparently occurs throughout normal pregnancy [9], that may explain the moderate eNOS glutathionylation observed in normal placentas at the end of the pregnancy. It may be noted that this moderate eNOS glutathionylation (estimated to around 45%) allows generating around 70% of the maximal rate of NO production (60% by non-modified eNOS and 10% by S-glutathionylated eNOS, since highly S-glutathionylated eNOS retains approximately 30% of its activity) [29]. This rate of NO production (70%) is compatible with a normal placentation, the remodeling of uterine spiral arteries and the embryo development, like that observed in heterozygous eNOS<sup>+/-</sup> embryos [44].

In contrast, oxidative stress conditions (generated by  $pO_2$  changes), increase eNOS glutathionylation, and reduce NO production and trophoblast migration, as observed in the HTR8 experimental model system. This is in agreement with the hypothesis of Burton and Jauniaux stating that in the early stages of placenta development, excessive blood flow in the intervillous space may induce an oxidative stress that impairs trophoblast migration, vascular remodeling and placentation [10–12,44,48].

Later on, during PE pregnancy, the defect of remodeling of uterine spiral arteries maintains an intermittent contractility, leading to unsteady placental blood flow that generates local oxidative stress conditions. The persistent oxidative stress may explain the high level of eNOS glutathionylation in PE placentas. As highly glutathionylated eNOS is uncoupled, with loss of NO generation and gain of  $O_2^{\cdot -}$  production [29], this may participate to impair uterine spiral artery remodeling and enhance a local oxidative stress, possibly worsened by intermittent episodes of ischemia/reperfusion, and finally leading to a reduction of the placental blood flow.

In placentas, ROS could be produced by various sources, including xanthine oxidase, mitochondrial respiratory chain, or NOXs [9,48,49]. In PE, oxidative stress can be worsened by risk factors (preexisting hypertension, diabetes, obesity or disturbed immune response...), which are classically characterized by high rates of ROS and oxidative damages [15,16,48,49]. These high oxidative stress conditions are known to cause an excessive and persistent S-glutathionylation of eNOS and other targets in diseases such as diabetes, renal fibrosis, Alzheimer, cataract, and cancer [30–32,47,50].

S-glutathionylation may modify the protein function and compromise the cell fate, when occurring on critical cysteine residues [30,31]. The S-glutathionylation of eNOS occurs on Cys 689 and Cys 908, which are critical to maintain the normal function of the enzyme [29]. Consequently, S-glutathionylation triggers eNOS uncoupling, switching the protein activity from a NO producing enzyme towards a NADPH oxidase activity producing  $O_2^{\cdot -}$ , with consequences on the pathophysiology of cardiovascular and renal diseases [29–32,49,50]. A consequence is that S-glutathionylation of eNOS may per se maintain or aggravate ROS production and oxidative stress. Another major consequence is the decreased NO production due to eNOS dysfunction. An important function for NO, as for growth factors and  $H_2S$ , is to promote the migration of cytotrophoblasts towards spiral arteries in the first weeks of pregnancy [17,18]. In our model, this role of NO was demonstrated by the lack of HTR8 migration evoked by L-NAME, or by the silencing for eNOS by siRNAs. Likewise,  $pO_2$  changes leading to eNOS S-glutathionylation, inhibited the migration of HTR8. The key-role of NO on trophoblast migration, was emphasized by the benefit exerted by



**Fig. 4.** pO<sub>2</sub> changes elicit eNOS S-glutathionylation and dysfunction in HTR8. **A**, Representative pictures of eNOS and glutathione expression in HTR8 incubated in low pO<sub>2</sub> (O<sub>2</sub> 1%) (left panel), or pO<sub>2</sub> changes (18 h O<sub>2</sub> 1%-2 h O<sub>2</sub> 20%-2 h O<sub>2</sub> 1%) before (middle panel), and after (right panel) DTT treatment (1 mM, 30 min, room temperature). The colocalization of eNOS and glutathione was studied as described in the legend to Fig. 2 and in the Method Section. Upper panels, scale-bar 10 μm, lower panels, scale-bar 5 μm. **B**, Immunoprecipitation and immunoblotting experiments showing the glutathionylation of eNOS in HTR8 submitted to low pO<sub>2</sub> or pO<sub>2</sub> changes. The reversibility of glutathionylation was studied by preincubating eNOS immunoprecipitates with DTT (1 mM, 30 min, room temperature), before immunoblotting. **C**, Measurement of NO production by HTR8 in low pO<sub>2</sub> conditions or exposed to pO<sub>2</sub> changes. DAF-FM diacetate probe (5 μM) was added to the HTR8 culture medium (5 μM) 30 min before the end of the incubation. The production of NO was fluorometrically recorded (exc/em 495/525 nm) for 60 min in the presence or absence of BH4 (10 μM). A negative control using L-NAME (100 μM) was done concomitantly, and the L-NAME-insensitive residual fluorescence was subtracted to each point, for eliminating the non NO-specific DAF fluorescence. A positive control was done by stimulating HTR8 with VEGF (20 nM, 15 min). The results are expressed as % of NO produced by the control in low pO<sub>2</sub>, means ± SEM of 4 separate experiments, statistical analysis with a Student *t*-test. \**p* < 0.05; ns, non significant.

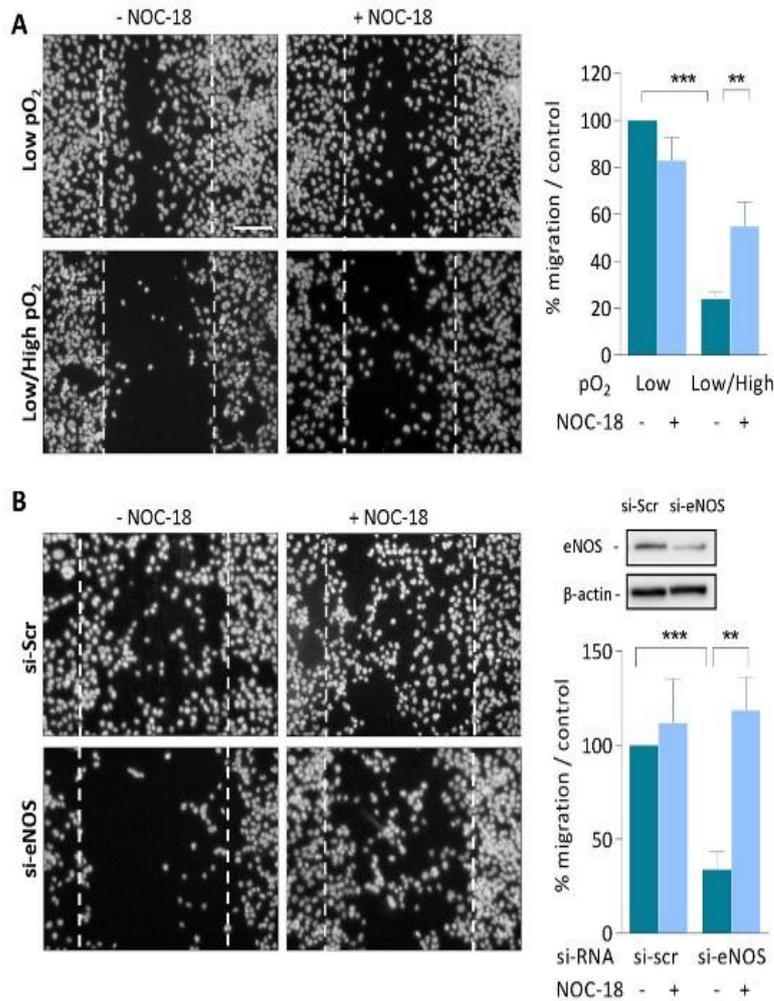
the NO donor, NOC-18 [51], which significantly restored cell migration in HTR8 silenced for eNOS or submitted to pO<sub>2</sub> changes. So far, several NO donors have been tested on the late events of PE, in particular transdermal glyceryl trinitrate or transdermal isosorbide dinitrate patches, which improved the maternal blood pressure and fetoplacental circulation [52,53]. Likewise, S-nitrosoglutathione (GSNO), was used for the treatment of HELLP syndrome and severe PE, with an improvement of blood pressure and platelet activation [54]. The protective effect of NOC-18 on HTR8 migration suggests that this NO donor could improve early events such as the invasive potential of trophoblasts and placentation, thereby allowing to prevent the development of PE.

### 5. Conclusion

In conclusion, our data highlight a high level of eNOS S-glutathionylation in preeclamptic placentas, which may possibly trigger eNOS dysfunction and decrease NO bioavailability throughout pregnancy. The benefit exerted by NOC-18, confirms the potential interest of NO donors for compensating the lack of NO and preventing the pathological process of PE.

### Acknowledgements

The authors wish to thank Pr. Charles H. Graham (Queen's University, Ontario, Canada), for giving us the HTR8/svNeo cytotrophoblast cell line. The Cell Imaging Facility at INSERM U1048-I2MC is gratefully acknowledged.



**Fig. 5. NO is required for HTR8 migration in the wound closure assay.** A scratch was made on confluent HTR8, before incubation in low pO<sub>2</sub> or pO<sub>2</sub> change conditions (A), as in Fig. 4. Alternatively, HTR8 were maintained in low pO<sub>2</sub> for 48 h in the presence of siRNAs specifically targeting NOS3 (eNOS) (B). A control was done using a scrambled si-RNA mixture (Scr). The efficacy of siRNAs was evaluated on eNOS expression by western-blot, using β-actin as control (upper panel). The effect of NOC-18 (5 μM) was tested on HTR8 in each condition. Scale bar = 100 μm. A negative control was done with a wound scratch extemporaneously made on HTR8 at the end of the experiment. The quantification of HTR8 invasive capacity was evaluated by counting the cells having migrated within the wound in each condition. Means ± SEM of 4 separate experiments, statistical analysis with a Student t-test. \*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

**Fundings**

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), and University Paul Sabatier Toulouse.

**Declarations of interest**

None.

**Appendix A. Supplementary material**

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.redox.2019.101126.

**References**

[1] J.M. Roberts, M.J. Bell, If we know so much about preeclampsia, why haven't we cured the disease? *J. Reprod. Immunol.* 99 (2013) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.05.003>.  
 [2] J. Uzan, M. Carbonnel, O. Piconne, R. Asmar, J.M. Ayoubi, Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management, *Vasc. Health Risk Manag.* 7 (2011) 467–474, <https://doi.org/10.2147/VHRM.S20181>.  
 [3] N. Arulkumaran, L. Lightstone, Severe pre-eclampsia and hypertensive crises, *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 27 (6) (2013) 877–884, <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2013.07.003>.

[4] S.E. Maynard, J.Y. Min, J. Merchan, K.H. Lim, J. Li, S. Mondal, T.A. Libermann, J.P. Morgan, F.W. Sellke, I.E. Stillman, F.H. Epstein, V.P. Sukhatme, S.A. Karumanchi, Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia, *J. Clin. Invest.* 111 (5) (2003) 649–658, <https://doi.org/10.1172/JCI17189>.  
 [5] R. Kendall, K. Thomas, Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 10705–10709.  
 [6] C. Lam, K.H. Lim, S. Karumanchi, Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia, *Hypertension* 46 (2005) 1077–1085, <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000187899.34379.b0>.  
 [7] M.L. Tjota, R.J. Levine, S.A. Karumanchi, Angiogenic factors and preeclampsia, *Front Biosci.* 12 (2007) 2395–2402.  
 [8] G. Osol, I. Bernstein, Preeclampsia and maternal cardiovascular disease: consequence or predisposition? *J. Vasc. Res.* 51 (4) (2014) 290–304, <https://doi.org/10.1159/000367627>.  
 [9] M.H. Schoots, S.J. Gordijn, S.A. Scherjon, H. van Goor, J.I. Hillebrands, Oxidative stress in placental pathology (pii: S0143-4004(18)30070-5), *Placenta* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.03.003>.  
 [10] G.J. Burton, J. Hempstock, E. Jauniaux, Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies, *Reprod. Biomed. Online* 6 (2003) 84–96.  
 [11] G.J. Burton, E. Jauniaux, D.S. Charnock-Jones, The influence of the intrauterine environment on human placental development, *Int J. Dev. Biol.* 54 (2–3) (2010) 303–312, <https://doi.org/10.1387/ijdb.082764gb>.  
 [12] O.W. van der Heijden, Y.P. Essers, G. Fazzi, L.L. Peeters, J.G. De Mey, G.J. van Eys, Uterine artery remodeling and reproductive performance are impaired in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice, *Biol. Reprod.* 72 (5) (2005)

- 1161–1168, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.033985>.
- [13] T. Johal, C.C. Lees, T.R. Everett, I.B. Wilkinson, The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 78 (2) (2014) 244–257, <https://doi.org/10.1111/bcp.12301>.
- [14] A. Ahmed, W. Ramma, Unravelling the theories of pre-eclampsia: are the protective pathways the new paradigm? *Br. J. Pharmacol.* 172 (6) (2015) 1574–1586, <https://doi.org/10.1111/bph.12977>.
- [15] L.C. Sánchez-Aranguren, C.E. Prada, C.E. Riaño-Medina, M. Lopez, Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress, *Front Physiol.* 5 (2014) 372, <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00372>.
- [16] L. Poston, N. Igosheva, H.D. Mistry, P.T. Seed, A.H. Shennan, S. Rana, S.A. Karumanchi, L.C. Chappell, Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders, *Am. J. Clin. Nutr.* 94 (6 Suppl) (2011) 1980S–1985S, <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001156>.
- [17] D.T. Lowe, Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia, *Nitric Oxide*. 4 (4) (2000) 441–458.
- [18] K. Matsubara, T. Higaki, Y. Matsubara, A. Nawa, Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (3) (2015) 4600–4614, <https://doi.org/10.3390/ijms16034600>.
- [19] L. Erlandsson, Å. Nääv, A. Hennessy, D. Vaiman, M. Gram, B. Åkerström, S.R. Hansson, Inventory of novel animal models addressing etiology of pre-eclampsia in the development of new therapeutic/intervention opportunities, *Am. J. Reprod. Immunol.* 75 (3) (2016) 402–410, <https://doi.org/10.1111/aji.12460>.
- [20] G. Osol, N.L. Ko, M. Mandala, Altered endothelial nitric oxide signaling as a paradigm for maternal vascular maladaptation in preeclampsia, *Curr. Hypertens. Rep.* 19 (2017) 82, <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0774-6>.
- [21] H.P. Qi, W.D. Fraser, Z.C. Luo, P. Julien, F. Audibert, S.Q. Wei, Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of preeclampsia, *Am. J. Perinatol.* 30 (10) (2013) 795–804, <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333406>.
- [22] F. Zeng, S. Zhu, M.C. Wong, Z. Yang, J. Tang, K. Li, X. Su, Associations between nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and preeclampsia risk: a meta-analysis, *Sci. Rep.* 6 (2016) 23407, <https://doi.org/10.1038/srep23407>.
- [23] S.J. Orange, D. Painter, J. Horvath, B. Yu, R. Trent, A. Hennessy, Placental endothelial nitric oxide synthase localization and expression in normal human pregnancy and pre-eclampsia, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 30 (5–6) (2003) 376–381.
- [24] U. Förstermann, T. Münzel, Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace, *Circulation* 113 (13) (2006) 1708–1714, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532>.
- [25] Z. Kukor, S. Valent, M. Toth, Regulation of nitric oxide synthase activity by tetrahydrobiopterin in human placentae from normal and pre-eclamptic pregnancies, *Placenta* 21 (2000) 763–772, <https://doi.org/10.1053/plac.2000.0584>.
- [26] M.D. Savvidou, A.D. Hingorani, D. Tsikas, J.C. Frölich, P. Vallance, K.H. Nicolaidis, Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop preeclampsia, *Lancet* 361 (2003) 1511–1517, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13177-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13177-7).
- [27] A.A. Khalil, D. Tsikas, R. Akolekar, J. Jordan, K.H. Nicolaidis, Asymmetric dimethylarginine, arginine and homocysteine at 11–13 weeks' gestation and preeclampsia: a case-control study, *J. Hum. Hypertens.* 27 (2013) 38–43, <https://doi.org/10.1038/jhh.2011.109>.
- [28] F. Bernardi, L. Constantino, R. Machado, F. Petronilho, F. Dal-Pizzol, Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in pre-eclamptic women, *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 34 (2008) 957–963, <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2008.00860.x>.
- [29] C.A. Chen, T.Y. Wang, S. Varadharaj, L.A. Reyes, C. Hemann, M.A. Talukder, Y.R. Chen, L.J. Druhan, J.L. Zweier, S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function, *Nature* 468 (7327) (2010) 1115–1118, <https://doi.org/10.1038/nature09599>.
- [30] I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, R. Colombo, A. Milzani, S-glutathionylation in protein redox regulation, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (6) (2007) 883–898, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.014>.
- [31] J.J. Mielay, P.B. Chock, Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: focus on S-glutathionylation, *Antioxid. Redox Signal.* 16 (2012) 471–475, <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4454>.
- [32] F.J. Sánchez-Gómez, C. Espinosa-Díez, M. Dubey, M. Dikshit, S. Lamas, S-glutathionylation: relevance in diabetes and potential role as a biomarker, *Biol. Chem.* 394 (10) (2013) 1263–1280, <https://doi.org/10.1515/hsc-2013-0150>.
- [33] C.H. Graham, T.S. Hawley, R.G. Hawley, J.R. MacDougall, R.S. Kerbel, N. Khoo, P.K. Lala, Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan, *Exp. Cell Res.* 206 (2) (1993) 204–211.
- [34] F. De Pascali, C. Hemann, K. Samons, C.A. Chen, J.L. Zweier, Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation, *Biochemistry* 53 (22) (2014) 3679–3688, <https://doi.org/10.1021/bi500076c>.
- [35] C. Camaré, M. Traysac, B. Garmy-Susini, E. Mucher, R. Sabbadini, R. Salvayre, A. Negre-Salvayre, Oxidized LDL-induced angiogenesis involves sphingosine 1-phosphate: prevention by anti-S1P antibody, *Br. J. Pharmacol.* 172 (1) (2015) 106–118, <https://doi.org/10.1111/bph.12897>.
- [36] S.I. Dikalov, D.G. Harrison, Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2) (2014) 372–382, <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4886>.
- [37] B. Kalyanaram, V. Darley-Usmar, K.J. Davies, P.A. Dennerly, H.J. Forman, M.B. Grisham, G.E. Mann, K. Moore, L.J. Roberts 2nd, H. Ischiropoulos, Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (1) (2012) 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>.
- [38] K. Smith-Jackson, M.R. Hentschke, C.E. Poli-de-Figueiredo, B.E. Pinheiro da Costa, L.O. Kurlak, Broughton Pipkin F, Czajka A, Mistry HD, Placental expression of eNOS, iNOS and the major protein components of caveolae in women with pre-eclampsia, *Placenta* 36 (5) (2015) 607–610, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.02.001>.
- [39] A.J. Cooper, J.T. Pinto, P.S. Callery, Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7 (7) (2011) 891–910, <https://doi.org/10.1517/17425255.2011.577738>.
- [40] X. Liu, Q. Deng, X. Luo, Y. Chen, N. Shan, H. Qi, Oxidative stress-induced Gadd45a inhibits trophoblast invasion and increases sFlt1/sEng secretions via p38 MAPK involving in the pathology of pre-eclampsia, *J. Matern Fetal Neonatal Med* 29 (2016) 3776–3785, <https://doi.org/10.3109/14767058.2016.1144744>.
- [41] T.P. Keeley, G.E. Mann, Defining physiological normoxia for improved translation of cell physiology to animal models and humans, *Physiol. Rev.* 99 (2019) 161–234, <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2017>.
- [42] L.E. Huang, Z. Arany, D.M. Livingston, H.F. Bunn, Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit, *J. Biol. Chem.* 271 (50) (1996) 32253–32259.
- [43] K. Wang, Y. Chen, S.D. Ferguson, R.E. Leach, MTA1 and MTA3 regulate HIF1 $\alpha$  expression in Hypoxia-treated human trophoblast cell line HTR8/Svneo, *Med J. Obstet. Gynecol.* 1 (3) (2013) (pii 1017).
- [44] S. Kulandavelu, K.J. Whiteley, D. Qu, J. Mu, S.A. Bainbridge, S.I. Adamson, Endothelial nitric oxide synthase deficiency reduces uterine blood flow, spiral artery elongation, and placental oxygenation in pregnant mice, *Hypertension* 60 (2012) 231–238, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187559>.
- [45] C. Motta-Mejia, N. Kandzija, W. Zhang, V. Mhlomi, A.S. Cerdeira, A. Burdujan, D. Tannetta, R. Dragovic, I.L. Sargent, C.W. Redman, U. Kishore, M. Vatsih, Placental vesicles carry active endothelial nitric oxide synthase and their activity is reduced in preeclampsia, *Hypertension* 70 (2) (2017) 372–381, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09321>.
- [46] L. Du, F. He, L. Kuang, W. Tang, Y. Li, D. Chen, eNOS/iNOS and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placentas of patients with preeclampsia, *J. Hum. Hypertens.* 31 (1) (2017) 49–55, <https://doi.org/10.1038/jhh.2016.17>.
- [47] C. Espinosa-Díez, V. Miguel, S. Vallejo, F.J. Sánchez, E. Sandoval, E. Blanco, P. Cannata, C. Peiró, C.F. Sánchez-Ferrer, S. Lamas, Role of glutathione biosynthesis in endothelial dysfunction and fibrosis, *Redox Biol.* 14 (2018) 88–99, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.019>.
- [48] G.J. Burton, E. Jauniaux, Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 218 (2S) (2018) S745–S761, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00373>.
- [49] (a) F. Wu, F.J. Tian, Y. Lin, W.M. Xu, Oxidative Stress: Placenta Function and Dysfunction, *Am. J. Reprod. Immunol.* 76 (4) (2016) 258–271; (b) M. Murata, K. Fukushima, T. Takao, H. Seki, S. Takeda, N. Wake, Oxidative stress produced by xanthine oxidase induces apoptosis in human extravillous trophoblast cells, *J. Reprod. Dev.* 59 (1) (2013) 7–13, <https://doi.org/10.1111/aji.12454> (41).
- [50] J.L. Zweier, C.A. Chen, L.J. Druhan, S-glutathionylation reshapes our understanding of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and nitric oxide/reactive oxygen species-mediated signaling, *Antioxid. Redox Signal.* 14 (10) (2011) 1769–1775, <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3904>.
- [51] M. Shimaoka, T. Iida, A. Ohara, N. Taenaka, T. Mashimo, T. Honda, I. Yoshiya, NOC, a nitric-oxide-releasing compound, induces dose dependent apoptosis in macrophages, *Biochem Biophys. Res Commun.* 209 (2) (1995) 519–526, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1532>.
- [52] C. Lees, H. Valensise, R. Black, K. Harrington, S. Byiers, C. Romani, S. Campbell, The efficacy and fetal-maternal cardiovascular effects of transdermal glyceryl trinitrate in the prophylaxis of pre-eclampsia and its complications: a randomized double-blind placebo-controlled trial, *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 12 (5) (1998) 334–338, <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1998.12050334.x>.
- [53] M. Nakatsuma, M. Takata, K. Tada, K. Asagiri, T. Habara, S. Noguuchi, T. Kudo, A long-term transdermal nitric oxide donor improves uteroplacental circulation in women with preeclampsia, *J. Ultrasound Med.* 21 (8) (2002) 831–836.
- [54] T.R. Everett, I.B. Wilkinson, C.C. Lees, Pre-eclampsia: the potential of GSNO reductase inhibitors, *Curr. Hypertens. Rep.* 19 (3) (2017) 20, <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0717-2>.

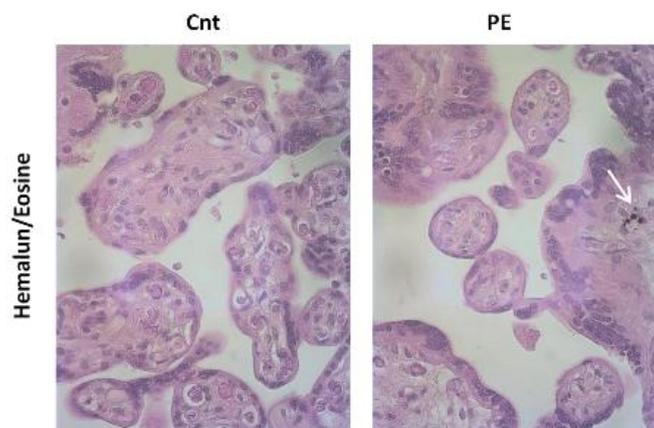
### High glutathionylation of placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia

Paul Guerby, Audrey Swiader, Nathalie Augé, Olivier Parant, Christophe Vayssière, Koji Uchida,

Robert Salvayre, Anne Negre-Salvayre

#### SUPPLEMENTAL RESULTS

##### Supplemental Figure I

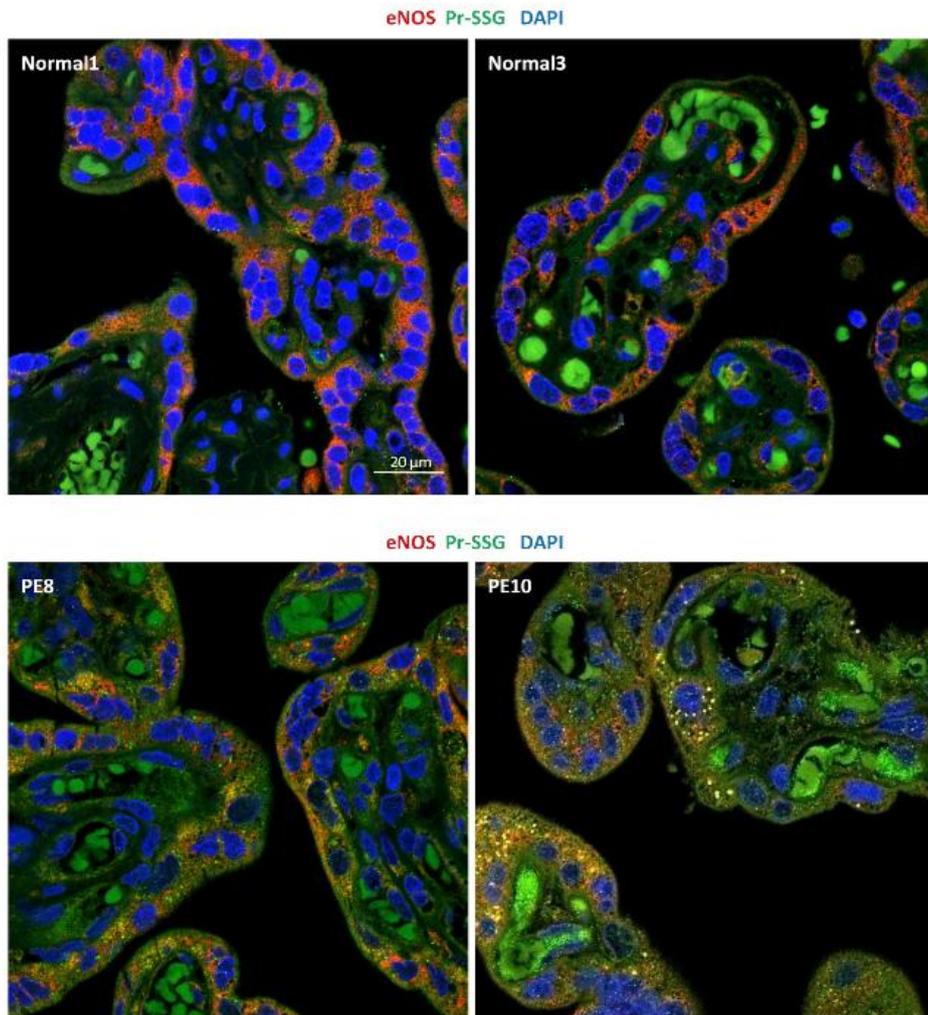


##### Supplemental Figure I: Immunohistological features of control and PE placentas

Hemalun/eosin histological staining in control and PE placentas. The arrow indicates the presence of calcification clusters, characteristic of PE.

These pictures are an exemple of 4 separate experiments on control and PE placentas.

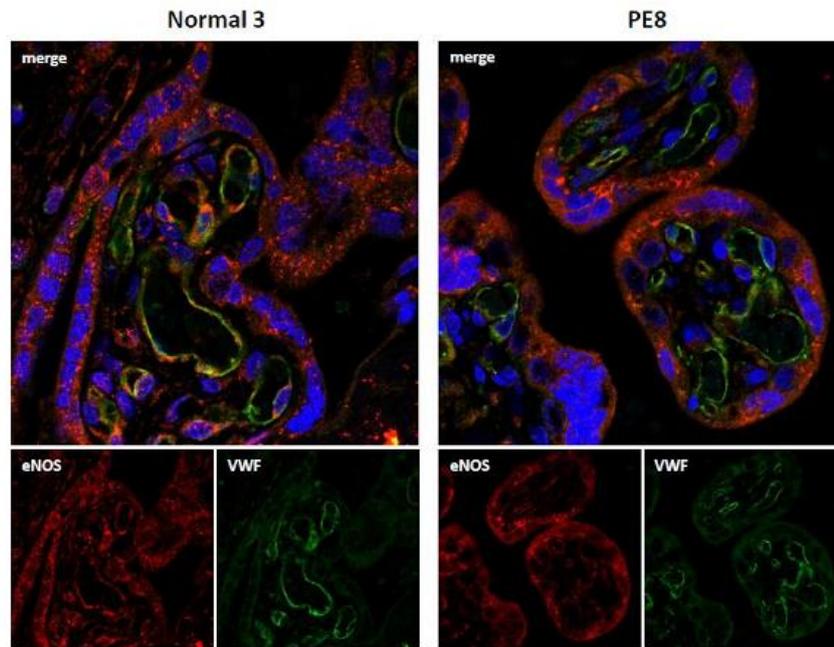
Supplemental Figure II



Supplemental Figure II: Representative pictures of eNOS glutathionylation in PE placentas

Supplemental pictures showing the colocalization of eNOS (red) with glutathione (green,) in two different normal (upper panels) and two different PE placentas (lower panel), treated as described in the legend to Figure 1.

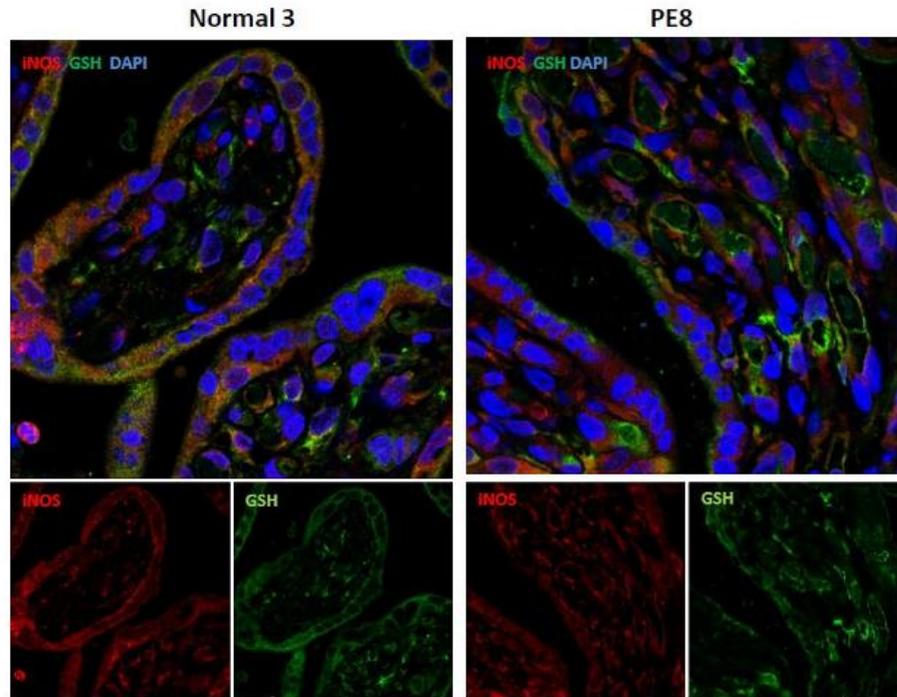
Supplemental Figure III: Representative pictures of eNOS and vWF staining in PE placentas



Supplemental Figure III: Colocalization of eNOS and the Von Willebrand Factor

Immunofluorescence and confocal microscopy pictures showing the expression of eNOS (red) and von Willebrand factor (VWF), and the merge in normal (left panels) and PE placentas (right panels), treated as described in the legend to Figure 1. These pictures are representative of the analysis of 3 normal and 3 PE placentas

Supplemental Figure IV

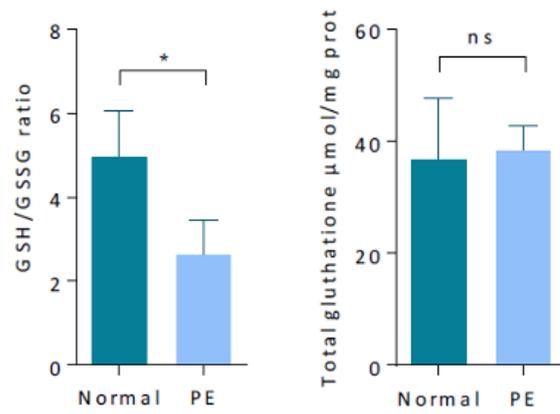


Supplemental Figure IV: iNOS expression and glutathionylation in placentas

Immunofluorescence and confocal microscopy pictures showing the expression of iNOS (red) and GSH, and the merge in normal (left panels) and PE placentas (right panels), treated as described in the legend to Figure 1.

These pictures are representative of the analysis of 3 normal and 3 PE placentas

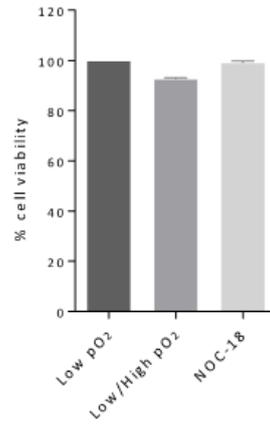
Supplemental Figure V



**Supplemental Figure V. Total glutathione content in placentas**

Reduced/oxidized glutathione ratio, and total glutathione (detected using the GSH Detection Assay Kit Abcam), were measured in normal (n=4) and PE (n=4) placenta homogenates. Data are expressed as means  $\pm$  SEM, and statistical analysis was assessed using a Mann-Whitney test. \* $p < 0.05$ ; ns, non significant.

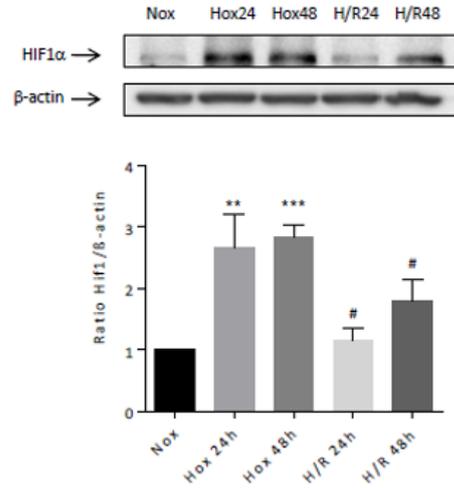
**Supplemental Figure VI**



**Supplemental Figure VI: Viability of HTR8 exposed to low pO<sub>2</sub> and pO<sub>2</sub> changes and NOC-18**

The viability of HTR8 exposed for 48h to low pO<sub>2</sub> and pO<sub>2</sub> change conditions and NOC-18 (5μM, O<sub>2</sub>1%), was evaluated using the MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] test. The results are expressed as % of the low pO<sub>2</sub> control, means ± SEM of 4 separate experiments.

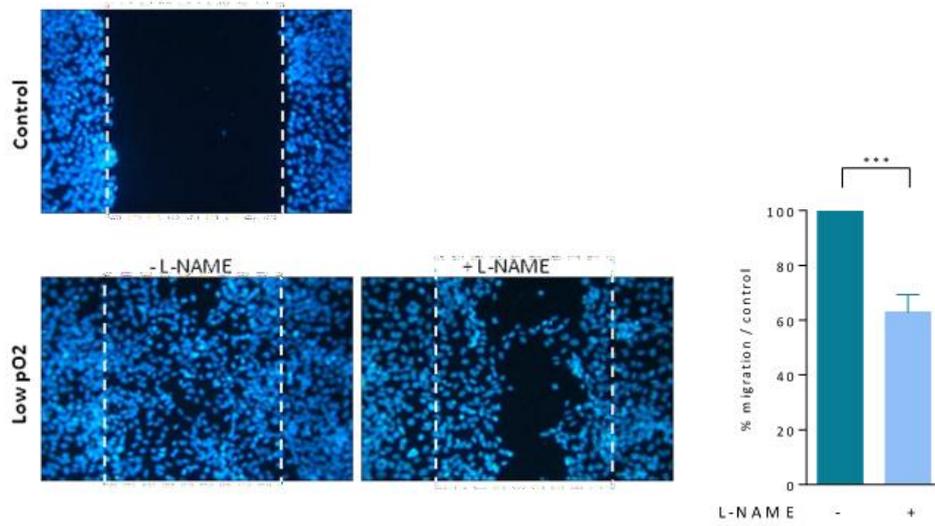
Supplemental Figure VII



Supplemental Figure VII: Expression of HIF1α in HTR8 exposed to low pO<sub>2</sub> and pO<sub>2</sub> changes

The expression of HIF1α was investigated by western-blot of cell homogenates from HTR8 exposed for 24h or 48h to high pO<sub>2</sub> (20%, Nox), low pO<sub>2</sub> (1%, Hox) and pO<sub>2</sub> change conditions (H/R). The results are representative of 4 separate experiments. Means ± SEM of 4 separate experiments, statistical analysis with a Student t-test. #, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p < 0.001.

Supplemental Figure VIII



Supplemental Figure VIII: Effect of L-NAME on HTR8 migration in the wound closure assay

The wound-closure assay was performed as described in the Methods Section and in Fig.5, and HTR8 were maintained in low pO<sub>2</sub> for 48h in the presence of L-NAME (100 μM). The quantification of HTR8 migration was done by counting the cells having migrated within the wound. Data are means ± SEM and representative images of 4 separate experiments. Statistical analysis with a Student t-test, \*\*\*p<0.001.

## Discussion

Parmi les mécanismes impliqués dans le dysfonctionnement placentaire, la biodisponibilité réduite du NO et le stress oxydant semblent jouer un rôle critique à plusieurs stades de la pathogénèse de la PE et auraient un rôle majeur dans le défaut de placentation.

Dans notre étude, nous mettons en évidence que eNOS est fortement S-glutathionylée dans les placentas de patientes présentant une PE. Comme la S-glutathionylation réversible (sensible aux agents réducteurs) entraîne un découplage de eNOS et une diminution de la production de NO, nos résultats peuvent expliquer en partie les mécanismes moléculaires et physiopathologiques qui entraînent un dysfonctionnement de la eNOS placentaire et une production réduite de NO au cours de la PE.

Nos résultats mettent en évidence une glutathionylation de eNOS dans tous les placentas, à hauteur de 45 % au cours des grossesses normales et jusqu'à plus de 80% en cas de PE. La sensibilité de cette glutathionylation à l'agent réducteur DTT, indique que la modification se produit sur des groupements thiol (cystéine), et est donc réversible. La S-glutathionylation correspond en effet à une modification post-traductionnelle de résidus cystéine par le glutathion oxydé, comme décrit récemment par l'équipe de Zweier. (Chen 2010, Zweier 2011, De Pascali 2014) Dans les placentas de PE, plus de 80 % de eNOS est glutathionylée et donc découplée, ce qui signifie que moins de 20 % de eNOS reste fonctionnelle. Il s'agit d'une cause probable de diminution de la production du NO au cours de la PE, qui pourrait être en partie responsable d'une placentation défectueuse, d'une augmentation de la résistance des artères utérines et d'une augmentation de la pression artérielle. Par ailleurs il semble qu'une discrète partie de glutathionylation de eNOS reste insensible au DTT dans les placentas de PE, ce qui suggère un processus de C-glutathionylation (irréversible), dont le mécanisme et la nature restent à étudier.

La glutathionylation est un mécanisme d'adaptation au stress oxydant et peut protéger les cystéines d'une oxydation irréversible mais peut également moduler, positivement ou négativement, l'activité des protéines.

Comme nous l'avons décrit précédemment, au cours de la placentation normale, il existe une production de ROS physiologique qui pourrait expliquer le taux élevé (45%) de glutathionylation de eNOS dans les grossesses normales, l'enzyme restant en grande partie fonctionnelle. Au cours de la

PE, le stress oxydant est décompensé, notamment par des phénomènes d'H/R, d'où une augmentation forte du taux de glutathionylation de eNOS, avec des conséquences sur la production de NO.

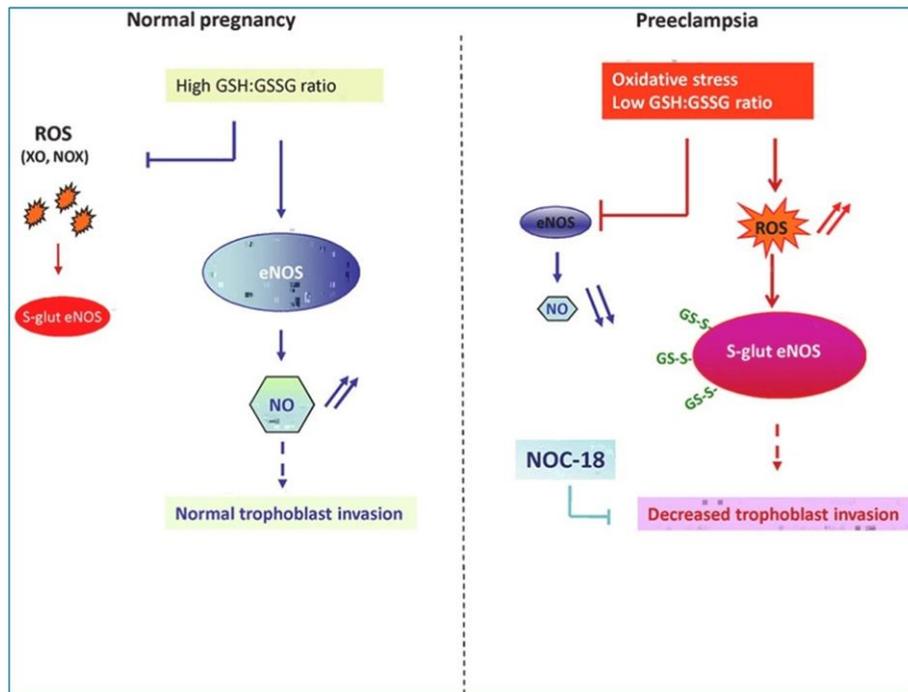
La glutathionylation de eNOS contribue au maintien du stress oxydant car le découplage de eNOS inhibe la production de NO et modifie l'enzyme vers une activité NADPH oxydase produisant du O<sub>2</sub><sup>°</sup>- ce qui participe à maintenir ou aggraver la production de ROS et le stress oxydant.

Par ailleurs les trophoblastes HTR8 en culture exposés à un stress oxydant induit par des variations H/R, montrent une S-glutathionylation de eNOS, en immunofluorescence et en Western Blot, avec diminution de la production de NO. Ces résultats confirment bien le rôle du stress oxydant dans la modification de eNOS et sa dysfonction.

Les résultats obtenus sur les HTR8 mettent en évidence plusieurs rôles pour le NO dans la placentation :

- Absence de migration des trophoblastes en présence de L-NAME, un inhibiteur de eNOS
- Absence de migration des trophoblastes lorsque l'expression d'eNOS est éteinte par si-RNA
- Inhibition de la migration lorsque les trophoblastes sont exposés à une H/R, responsable d'une S-glutathionylation de eNOS
- Migration restaurée par l'addition d'un donneur de NO, le NOC-18.

Le rôle de la s-glutathionylation de eNOS est résumé dans le schéma ci-dessous.



Le stress oxydant, induite par H/R génère une dysfonction de eNOS placentaire entre autre *via* sa S-glutathionylation. D'autres modifications pourraient être observées sur eNOS, en relation avec le stress oxydant, en particulier un effet direct (effet sur l'enzyme) ou indirect (effet sur la signalisation de son activation). Ces modifications pourraient impliquer entre autres des produits d'oxydation lipidique, générés au cours de l'oxydation des acides gras polyinsaturés.

## **2-Modifications de eNOS placentaire induites par les aldéhydes issus de l'oxydation lipidique en cas de pré-éclampsie.**

### Introduction

Les ROS sont générés physiologiquement pendant la placentation et tout au long de la grossesse. La placentation normale nécessite un environnement pauvre en O<sub>2</sub> favorisant l'invasion et l'obturation des artères spiralées par les cytotrophoblastes. (Jauniaux 2016) Ces conditions d'hypoxie relative permettent à l'embryon de se protéger des dommages oxydatifs car il présente de faibles défenses antioxydantes dans les premiers stades du développement. (Burton 2009)

La diminution de la disponibilité du NO est une observation constante dans la physiopathologie de la PE et de cette placentation défectueuse, impliquant une dysfonction de eNOS (principale source de NO disponible). Au cours des travaux présentés dans l'article précédent, nous montrons que la eNOS placentaire subit une modification post-traductionnelle par S-glutathionylation, qui correspond à un mécanisme de protection des protéines, sur les cystéines sensibles au stress oxydant environnant. (Dalle-Donne 2007, Mieyal 2012) D'autres modifications post-traductionnelles régulent l'activité des différentes NOS, y compris la eNOS dans la paroi vasculaire, que ce soit par acétylation, phosphorylation, S-nitrosylation ou par interaction avec les protéines ou co-facteurs de eNOS, avec des conséquences variables sur la production de NO. (Heiss 2014)

Par ailleurs, le stress oxydant induit des dommages sur les lipides, les protéines et l'ADN, provoquant un stress du réticulum endoplasmique, un dysfonctionnement cellulaire et la mort cellulaire. Les protéines peuvent être endommagées par les ROS, par oxydation directe, et indirectement par carbonylation. L'oxydation des acides gras polyinsaturés génère des produits de peroxydation lipidique (LPO), dont l'acroléine, le 4-hydroxynonéal (HNE), le malondialdéhyde (MDA) ou le 4-oxo-2nonenal (ONE). (Figure 13)

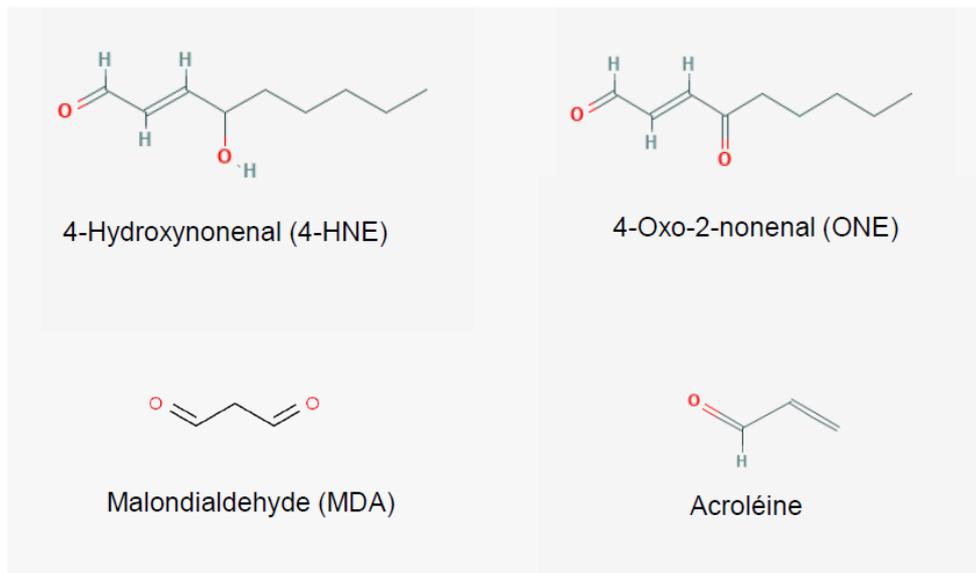


Figure 13 : Structure d'aldéhydes produits au cours de la peroxydation des acides gras polyinsaturés

Un certain nombre de protéines peuvent être des cibles des LPO, notamment les lipoprotéines, l'albumine sérique, les protéines de signalisation, les protéines mitochondriales et de la matrice extracellulaire (Dalle-Donne 2003, Levine 2001). Le stress carbonyle induit un dysfonctionnement de l'activité protéique, associé à des réponses inflammatoires, une sénescence accélérée et de la toxicité cellulaire. (Dalle-Donne 2003, Forman 2014).

Des LPO (HNE, MDA) ont été détectés dans la circulation fœtale et maternelle, dans les syncytiotrophoblastes, dans les cellules endothéliales et les macrophages issus de grossesses pathologiques, dont la PE. (Chapple 2013) Ces données suggèrent une implication possible de ces LPO dans la dysfonction endothéliale observée dans la PE. Certains auteurs ont montré que HNE pourrait modifier l'activité de eNOS et réduire la production de NO dans les cellules endothéliales, via des mécanismes non élucidés. (Whitsett 2007)

Nous avons fait l'hypothèse que les LPO présents dans les placentas de patientes pré-éclamptiques, pourraient contribuer à la dysfonction de eNOS.

*Article*

**Modification of endothelial nitric oxide synthase by 4-oxo-2(E)-nonenal (ONE )in preeclamptic placentas.**

Paul Guerby<sup>1,2\*</sup>, Audrey Swiader<sup>1\*</sup>, Oriane Tasta<sup>1,2</sup>, Frédéric Pont<sup>3</sup>, Frédéric Rodriguez<sup>4</sup>, Olivier Parant<sup>2</sup>, Christophe Vayssière<sup>2</sup>, Takahiro Shibata<sup>5</sup>, Koji Uchida<sup>6</sup>, Robert Salvayre<sup>1</sup>, Anne Negre-Salvayre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inserm U-1048, Université de Toulouse, France

<sup>2</sup>Pôle de gynécologie obstétrique, Hôpital Paule-de-Viguer, CHU de Toulouse, France

<sup>3</sup>Pôle technologique du CRCT, Toulouse, France

<sup>4</sup>SPCMIB UMR 5068 CNRS-UPS, Toulouse, France

<sup>5</sup>Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Japan

<sup>6</sup>Laboratory of Food Chemistry, University of Tokyo, Japan

\* Equally contributors

**Running title:** ONE-modified placental eNOS in preeclampsia

**Corresponding author:** Dr A. Negre-Salvayre INSERM U1048, BP84225, 31432 Toulouse Cedex 4

France. Tel. (33) 561-32-27-05 - Fax (33) 561-32-20-84

E-mail: anne.negre-salvayre@inserm.fr

## Highlights

Lipid peroxidation products accumulate in placentas from preeclampsia

ONE-Lys adducts accumulate on eNOS in preeclamptic placentas

Recombinant eNOS is modified by ONE on Lys residues

ONE modifies eNOS and alters NO production in HTR8 trophoblasts

The migration of HTR8 inhibited by ONE is restored by the NO donor NOC-18

**Key-words:** Preeclampsia, placental eNOS, 4-oxo-2(E)-nonenal, 4-hydroxynonenal, acrolein, nitric oxide, trophoblasts, invasion

**Abbreviations:** PE, preeclampsia; LPP, lipid peroxidation products; ONE, 4-oxo-2(E)-nonenal; NO, nitric oxide; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; Lys (K), lysine;

## **ABSTRACT**

Preeclampsia (PE) is a leading cause of pregnancy complications, affecting 3-7% of pregnant women worldwide. The pathophysiology of preeclampsia involves a redox imbalance, oxidative stress and a reduced nitric oxide (NO) bioavailability. The molecular and cellular mechanisms leading to the dysfunction of the placental endothelial NO synthase (eNOS) are not clarified. This study was designed to investigate whether aldehydes generated by lipid peroxidation (LPP), may contribute to placental eNOS dysfunction in PE.

The analysis of placentas from PE-affected patients and normal pregnancies, showed a significant increase in protein carbonyl content, indicative of oxidative stress-induced protein modification, as shown by the accumulation of acrolein, 4-hydroxynonenal (HNE), and 4-oxo-2(E)-nonenal (ONE) adducts in PE placentas. In contrast, the levels of these LPP-adducts were low in placentas from normal pregnancies. Immunofluorescence and confocal experiments pointed out a colocalization of eNOS with ONE-Lys adducts, whereas eNOS was not modified in normal placentas. LC-MS/MS analysis of recombinant eNOS preincubated with ONE, allowed to identify several ONE-modified Lys-containing peptides, confirming that eNOS may undergo post-translational modification by LPP. The preincubation of HTR-8/SVneo human trophoblasts (HTR8) with ONE, resulted in ONE-Lys modification of eNOS and a reduced generation of NO. ONE inhibited the migration of HTR8 trophoblasts in the wound closure model, and this was partly restored by the NO donor, NOC-18, this confirming the important role of NO in the invasive potential of trophoblasts.

In conclusion, placental eNOS is modified by ONE in PE placentas, which emphasizes the sensitivity of this protein to oxidative stress in the disturbed redox environment of preeclamptic pregnancies.

## Introduction

Preeclampsia (PE) is a leading cause of pregnancy complications, affecting 3-7% of pregnant women worldwide [1-3]. The diagnosis of PE is suspected in case of *de novo* maternal hypertension (>140/90 mm Hg systolic/diastolic blood pressure) and proteinuria (>300 mg/24 h), observed after 20 weeks of gestation. If untreated, PE evolves towards complications of eclampsia and HELLP syndrome (Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelet count), kidney injury and acute respiratory distress syndrome [1-5]. The complications of PE may affect both the mother and the foetus, with an increased risk of fetal growth restriction, preterm birth, placental abruption, maternal and fetal mortality [2,3]. The clinical symptoms are alleviated with the delivery, but PE could increase the risk of developing cardiovascular diseases, type 2 diabetes, or cancers [5-8].

Reactive oxygen species (ROS) are physiologically generated during placentation and throughout pregnancy [9-13]. During the early stages of pregnancy, the normal placentation requires a local low  $pO_2$  environment allowing the invasion and plug of spiral arteries by cytotrophoblasts [12,13]. These conditions of relative hypoxia may prevent oxidative damages to the embryo which has low levels of antioxidant defenses in the first stages of development [14]. At the end of the first trimester, trophoblastic plugs are progressively degraded, and spiral arteries are remodeled into low resistance vessels, allowing the passage of maternal blood in the placental intervillous chamber and the progressive increase of placental  $pO_2$  [14,15]. A number of factors including angiogenic growth factors, estrogens, or vasodilator mediators (nitric oxide, hydrogen sulfide), are involved in the remodeling of spiral arteries and placentation [10,14,15].

The pathophysiology of PE involves a defective trophoblastic invasion to the spiral arteries, resulting in abnormal placentation and disturbed maternal uteroplacental blood flow with abnormal conditions of hypoxia/oxygenation [9,10,13-15]. These events generate a redox imbalance and oxidative stress, as well as inflammation and release in the maternal blood of cytokines and placental-derived antiangiogenic factors (soluble fms-like tyrosine kinase-1, soluble endoglin), that

generate endothelium dysfunction [16-18]. The causes of defective placentation could involve a reduced bioavailability of nitric oxide (NO) for which several possible mechanisms have been reported, including a reduced expression and polymorphism of placental eNOS, or a depletion in arginine or in tetrahydrobiopterin (BH4), leading to eNOS uncoupling and dysfunction [10,19-21]. In the vascular wall, the activity of eNOS is regulated by posttranslational modifications, including acylation, phosphorylation, S-nitrosylation or S-glutathionylation, depending on the cellular redox state [22]. We recently reported that placental eNOS is highly S-glutathionylated in preeclamptic patients, probably consequently to oxidative stress [23].

At the cellular level, oxidative stress induces damages on lipids, proteins and DNA, causing endoplasmic reticulum stress, cellular dysfunction and cell death [24-26]. Proteins can be damaged by ROS, *via* a direct oxidation of amino acid residues, and indirectly *via* their modification by lipid oxidation products (LPP) [25,27-30]. The oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) generates many LPP, including aldehydes such as acrolein, 4-hydroxynonenal (HNE), malondialdehyde (MDA), or 4-oxo-2-nonenal (ONE). These LPP covalently bind to the nucleophilic sulfhydryl and primary amine groups of proteins, forming Schiff bases, Michael adducts and protein crosslinks [31-34]. A number of proteins can be targeted by LPP, particularly lipoproteins, serum albumin, growth factor receptors, mitochondrial and extracellular matrix proteins, with consequences depending on their local concentration, the nature of stressors, cell type, oxidative stress intensity and duration [35-37]. LPP-adduct formation triggers various biological responses, ranging from hormesis and the induction of protective mechanisms at low concentrations, to "carbonyl stress" characterized by protein dysfunction, inflammatory responses, accelerated senescence and toxic events [30,34-38].

HNE- and MDA-adducts are detected in the fetal and maternal circulation, in syncytiotrophoblasts, in endothelial cells and macrophages from pathological pregnancies [38-40], suggesting their possible involvement in fetal and maternal endothelial dysfunction and complications [37,38]. As LPP may inhibit NOS activity and reduce NO generation in vascular cells, [38,41,42], we investigated whether LPP may affect placental eNOS activity, with possible consequences on PE pathophysiology.

## **Materials and Methods**

### ***Materials***

Anti-eNOS (ab5589) used for immunohistochemistry, anti-acrolein (ab48501) and ONE were from Abcam (Paris, France). Anti-4-HNE Michael adduct antibody (24327) was purchased from Oxis Research (Tebu-Bio, France). The anti-ONE-lysine antibody was prepared as reported [43]. Recombinant eNOS was from Enzo-Life Science (Villeurbanne, France). Secondary Alexa Fluor antibodies (488 and 546) were from Life Technologies (Courtaboeuf, France). DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate), VEGF and DAPI (4,6-Diamidino 2-phenylindole dihydrochloride) were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). NOC-18 (diethylene-triamine/nitric oxide adduct; DETA NONOate) was from Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences, France).

### ***Placental Tissue Collection***

Human placentas were recovered through caesarean delivery (University Hospital Center of Toulouse, France) and analyzed upon approval by the Research Ethic Committee of Toulouse Hospitals (CER number 03-0115), as reported [23]. Two groups of placentas were analyzed, one group from normotensive pregnant women (n=9), one with severe and very severe PE features (n=13). PE parameters were defined according to the American College of Obstetricians and Gynecologists as the presence of a systolic blood pressure (SBP) higher than or equal to 140 mm Hg, or a diastolic blood pressure (DBP) higher than or equal to 90 mm Hg and a proteinuria higher than or equal to 300 mg per 24-hours urine collection after 20 weeks of gestation.

Immediately after their recovery, placentas were carefully rinsed in ice-cold PBS, one sample was fixed into 4% paraformaldehyde for immunofluorescence analysis. Another sample was kept frozen at -80°C until use. Placental homogenates for biochemistry analysis, were prepared as described [23].

### ***Cell culture and cell viability***

HTR-8/SVneo cells (HTR8) were a generous gift from Dr. Charles Graham (Kingston, Canada), and were cultured in RPMI supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>, 37°C) [44]. Before experiments, subconfluent HTR8 were incubated in FBS-free RPMI *w/wo* aldehydes, as indicated in the text and legends to figures, and put in a hypoxic chamber (5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>, 37°C), as reported [23]. Cell viability was estimated using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay.

### ***Carbonylated protein content***

The carbonylated protein content was measured using the Protein Carbonyl ELISA kit (Enzo LifeSciences, Villeurbanne, France) according to the instructions of the manufacturer. The absorbance was read at 450 nm (spectrophotometer microplate reader TECAN France).

### ***Immunofluorescence studies***

Immunofluorescence experiments were carried out on 3 µm thin sections of placentas. The accumulation of aldehyde-adducts and the modification of placental eNOS were evaluated by co-immunostaining experiments using as primary antibodies, anti-human eNOS polyclonal rabbit antibody, anti-ONE-lysine monoclonal [43], anti-acrolein monoclonal, or anti HNE-adduct monoclonal mouse antibodies, and secondary anti-mouse Alexa fluor-488 and anti-rabbit Alexa fluor-546-conjugated antibodies. Nuclei were stained with DAPI (1 µg/mL). The slides were analyzed by confocal microscopy (Zeiss LSM780). The percentage of eNOS overlapping with aldehydes was determined using the plug-in JACoP of ImageJ software, by evaluating the Mander's coefficient [45].

### ***Wound closure assay***

The invasive potential of HTR8 was evaluated by the wound closure assay, as reported [23].

Confluent HTR8 were preincubated for 2 hours with HNE 10  $\mu$ M or ONE 1 $\mu$ M. A scratch was made with a pipettetip, the medium was replaced by fresh FBS-free medium containing (or not) the NO donor NOC-18 (5  $\mu$ M), and cells were put in a hypoxic chamber ( 1% O<sub>2</sub>) for 48h as reported [23]. At the end, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized for 5 min with 0.25% Triton X-100 in PBS, DAPI-stained and observed by fluorescence microscopy.

#### ***Determination of NO production by HTR8 trophoblasts***

The production of NO by HTR8 was determined with the DAF-FM diacetate probe (5  $\mu$ M), in the conditions given by the manufacturer [23]. Alternatively, eNOS activity was determined by measuring the nitrite/nitrate production, using the Nitric oxide Synthase activity Assay kit (Abcam, France).

#### ***Mass spectrometry***

Recombinant human eNOS (ALX-201-853, 1 $\mu$ g) (Enzo LifeSciences, Villeurbanne, France) was modified by ONE (1 mM, overnight at 37°C) [46].

*eNOS in-solution digestion.* eNOS samples were dried in a concentrator and digested overnight at 37°C with 400 ng of sequencing-grade porcine trypsin (Promega) diluted in 20  $\mu$ L of NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (100 mM). Peptides were dried and diluted in 10% acetonitrile 0.05% TFA before injection in LC-MS run.

*eNOS LC-MS analysis.* The peptides digested from eNOS were measured on an SCIEX 5600+ TripleTOF mass spectrometer operated in DDA mode. A Dionex Ultimate 3000 nanoLC HPLC system and a Hypersil GOLD 150x0.32 mm column (Thermo Scientific), packed with C18 3  $\mu$ m 175 Å material, were used for peptide separation. For the HPLC method, the buffer A used was 0.1% (v/v) formic acid, and the buffer B was 0.1% (v/v) formic acid, 90% (v/v) acetonitrile. The gradient was 4–45% of buffer B in 24 min with a flow rate of 5  $\mu$ L/min. For MS method, a survey scan at the MS1 level (350–1600 m/z) was first carried out with 250 ms per scan. The Top20 most intense precursors, whose charge states are 2–4 were fragmented. Signals exceeding 75 counts per second were selected for fragmentation and MS2 spectra generation. MS2 spectra were collected in the mass range 100–1600

m/z for 80 ms per scan. The dynamic exclusion time was set to 10 s.

*LC-MS data analysis.* To identify eNOS peptides, profile-mode.wiff files from data acquisition were centroided and converted to mzML format using the AB Sciex Data Converter v.1.3 and submitted to Mascot [47] (version 2.5) database searches against UniProtSwiss-Prot human database [48]. ESI-Quad-TOF was chosen as the instrument, trypsin/P as the enzyme and 2 missed cleavages were allowed. Peptide tolerances at MS and MS/MS level were set to be 20 ppm and 0.2 Da, respectively. Peptide variable modifications allowed during the search are shown in Table I. To calculate the false discovery rate (FDR), the search was performed using the “decoy” option in Mascot.

**Table I**

Name	Delta mass
4-ONE (K)	154,09938
4-ONE+Delta:H(-2)O(-1)(K)	136,088815

Peaks heights of peptides MS1 spectra were measured using the Proline v2.0 software (<http://www.profiroteomics.fr/proline>). The percentage of modified peptide on total peptide was calculated by the ratio of the cumulative peak heights of modified peptide peaks on the sum of all peptide heights (modified + unmodified) x100. These data are given as indicative because peptide modification by ONE can affect the peptide sensitivity and induce a missed cleavage.

### ***In silico studies***

The RX structures of NOS isozymes (neuronal nNOS from rat and inducible iNOS from human) were obtained on the PDB (<http://www.rcsb.org/>) database [49]. The endothelial NOS (eNOS, human) structures were issued from ModBase, a database of comparative protein structure models [50]. Two homology models of eNOS (using 1TLL PSB structure [51] as template) were available on ModBase, model 7e09b (short form of 7e09b90c4f6474771f6bc4e8d2370945) was chosen. Molecular graphics

were performed with the UCSF Chimera package [52]. Chimera (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>) is developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by the NIGMS P41-GM103311). The protein structures (1TLL [50], 3HR4[52]), used in this paper were structurally aligned using UCSF Chimera/Matchmaker program [53].The PDB structure 1TLL (chain A) was chosen as reference for the structural set (1TLL [50], 3HR4 [52], model 7e09b) of eNOS reductase domain. .The PDB structure 4D1O (chain A) was chosen as reference for the structural set (4D1O [54], 5VVD [55]) of eNOS oxygenase domain. The protein structures were prepared (structure checks, chain splitting) using Accelrys (Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.0, San Diego: Accelrys Software Inc., 2013) Discovery Studio Visualizer 4.0 (DSV) and UCSF Chimera.

### ***Statistical analysis***

The results are expressed as mean  $\pm$  SEM. For normally distributed data, Student's t-test was used, otherwise nonparametric Mann-Whitney U-test was employed. Statistical calculations were carried out using the software Graphpad Prism, version 6.01 (Graph Pad Software Inc., CA, USA). A p-value  $<0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## Results

### Accumulation of lipid oxidation-derived aldehydes in PE placenta

The detection of protein-adducts implicating aldehydes generated through the peroxidation of polyunsaturated fatty acids, is a hallmark of oxidative stress [30,56], which led us to check whether such adducts could be detected in the placentas of PE-affected women, as reported [38]. As shown in Fig.1A, a significant increase in carbonylated protein content was observed in homogenates from PE placentas, indicative of an amino-acid modification by reactive carbonyl compounds [56,57]. Immunofluorescence staining and confocal microscopy studies pointed out a strong accumulation of HNE-, acrolein- and ONE-aldehyde adducts in PE placentas, by comparison with placentas from normal pregnancies (Fig.1B and 1C).

### Modification of eNOS by lipid oxidation products

Several evidences indicate that oxidative stress is associated with eNOS uncoupling or decreased expression, leading to its dysfunction [38,41]. However whether LPP could alter eNOS activity is not known [38]. As various post-translational modifications may regulate eNOS activity [22], we checked whether LPP may modify eNOS in PE placentas.

Immunofluorescence and confocal microscopy studies highlighted a significant and strong modification of eNOS by ONE on Lys residues, (using an anti-ONE-Lys mAb [43]) in PE placentas (Fig.2, lower right panel). The modification of eNOS by HNE, was much weaker, though significant, and acrolein-adducts were not detected (Fig.2), upper and middle right panels), though both HNE- and acrolein-adducts were abundantly expressed in PE placentas (Fig.1B,C). The modification of eNOS by LPP was low in placentas from normal pregnancies (Fig.2, left panels). No variation in total eNOS expression was observed between normal and PE placentas (Supp. Fig.1) as previously reported [23]. These immunofluorescence findings indicate that ONE forms adducts on placental eNOS in PE pregnancies. To confirm that ONE-adducts can be formed on eNOS and to identify which Lys residues could be targeted, MS studies were carried out on ONE-modified recombinant eNOS.

### **LC-MS/MS analysis of recombinant eNOS modified by ONE-**

Recombinant human eNOS (1  $\mu$ M) was incubated with ONE (1 mM, overnight at 37°C), prior to proteolytic digestion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) analysis. Modified peptides were detected by LC–MS and their primary sequence was determined by MS/MS. In contrast to unreacted eNOS, the MS analysis of tryptic peptides from ONE-incubated eNOS allowed to identify several ONE-modified Lys(K) residues, in the oxygenase and reductase domains, the sequences being confirmed by MS/MS spectra (Fig.3A and Supp. Fig.II).

The modification of recombinant eNOS by ONE, significantly reduced its enzymatic activity (Fig.3B), so that we used molecular modelling to predict the three-dimensional structure of eNOS and the location of ONE-modified Lys-residues (Fig.3C). This 3D-modelling allowed to predict that most ONE-modified Lys-residues are located at the surface of the reductase and oxidase domains, and that at least two Lys-residues, K519 and K1085, could modulate eNOS activity. Lys(K)519 is located near the calmodulin (CaM)-binding domain [58], which suggests that its modification by ONE may alter the  $\text{Ca}^{2+}$  and CaM-dependent activation of the enzyme. Beside, Lys(K)1085 is located near the FAD/NADPH-containing domain [59], so that its modification by ONE could alter the transfer of electrons between the flavins, and inhibit enzyme activity (Fig.3C).

### **ONE alters the production of NO by HTR8 human trophoblasts**

The effects of ONE were investigated on eNOS activity and NO production in cultured HTR8 human trophoblasts [44]. HTR8 were incubated under hypoxic conditions (1%  $\text{O}_2$ ), in FBS-free medium, these conditions being convenient to evaluate HTR8 proliferation and migration [23]. Immunofluorescence and confocal microscopy analysis elicited on HTR8 (after 2h preincubation with ONE, 1  $\mu$ M), allowed to detect the presence of ONE-adducts, particularly on eNOS (Fig.4A). These conditions generated a significant decrease in NO production (Fig.4B), and of eNOS enzymatic activation by VEGF (10 ng/mL) (Fig.4C). The preincubation of HTR8 with ONE did not elicit any loss of viability, up to 72h incubation in hypoxia (data not shown).

### **ONE inhibits the migration of HTR8 in the wound closure assay. Restoration by NOC-18**

We then investigated whether ONE affects the invasive potential of HTR8 trophoblasts in the wound closure assay, and the role of NO. Under standard conditions, HTR8 maintained in low pO<sub>2</sub> conditions (1% O<sub>2</sub>), and in serum-free medium, migrated within the wound (Fig.5, upper panel). In contrast, the migration of HTR8 was significantly inhibited when cells were preincubated with ONE, under conditions inhibiting NO production (Fig.5). The NO-donor, NOC-18 (5 μM) [60], significantly restored the migration of HTR8 exposed to ONE, thereby emphasizing the role of NO in the invasive potential of trophoblasts, in agreement with [23].

Altogether, these data indicate that ONE exogenously added to HTR8 culture medium, form Lys-adducts on eNOS, this resulting in a decreased NO production and altered trophoblast migration. These data support the hypothesis that ONE-Lys adducts generated on eNOS in PE placentas, could locally contribute to its dysfunction, with possible consequences on the invasive capacity of cytotrophoblasts and throughout pregnancy.

### **Discussion**

NO produced by placental eNOS plays a key-role throughout pregnancy, whether in the early stages of placentation, trophoblast invasion and spiral artery remodeling, in embryo development, in the maternal/foetal vascular tone, and in the vasculogenic and angiogenic signalling evoked by growth factors (VEGF, TGFβ, angiopoietin-1/2...) and their receptors [61]. A close relationship has been established between oxidative stress and the decreased NO bioavailability which characterizes the pathophysiology of PE, with consequences on systemic endothelial dysfunction [10,12,62]. We recently reported that eNOS undergoes high levels of S-glutathionylation in PE placentas [23], a mechanism linked to oxidative stress and known to trigger eNOS uncoupling and reduced NO production [63]. In the present article, we show that eNOS undergoes post-translational modifications elicited by the highly reactive lipid oxidation-derived aldehyde ONE, in PE placentas and

in cultured HTR8 trophoblasts, with consequences on NO production and the invasive potential of trophoblasts.

A first observation is that PE placentas exhibit high levels of carbonyl proteins, a hallmark of oxidative stress and lipid peroxidation [27,30,56]. The carbonylation of proteins results from their irreversible post-translational modification by reactive carbonyl compounds (ketones, aldehydes), generated through lipid peroxidation, this resulting in protein dysfunction, or "carbonyl stress"[56,64]. Carbonyl stress links oxidative stress to disease progression and age-related disorders, that are associated with increased levels of carbonylated proteins [65]. As a matter of fact, the increased carbonyl protein level detected in PE placentas, may play a role in the premature senescence of this tissue, in agreement with recent evidence showing a role for oxidative stress in premature placental ageing and PE pathophysiology [66]. Confocal microscopy pictures of PE placentas emphasized the abundant accumulation of ONE-, HNE- and acrolein-adducts, in agreement with previous reports showing an increased staining of HNE- and MDA-adducts in placentas from pathological pregnancies, in syncytiotrophoblasts, endothelial cells and macrophages [37,38,67,68], together with other features of oxidative stress, including an imbalance of the GSH/GSSG content, protein glutathionylation [23], and decreased activities of antioxidant enzymes (SOD, catalase, glutathione peroxidase) [10,38,69].

The post-translational modification of proteins by aldehyde-adducts may (or not) induce their dysfunction, with gain or loss of activity, depending on protein abundance, subcellular location, accessibility, and the nature of the modified residues [56]. Baraibar et al [65] recently identified more than 183 cellular and extracellular proteins susceptible to be carbonylated, in the cytosol, mitochondria, and at the plasma membrane. In the present study, we show that placental eNOS is a target of carbonyl stress, as assessed by confocal microscopy showing its colocalization with ONE-Lys adducts. Supporting this observation, the structural analysis of recombinant eNOS confirmed that ONE may bind several Lys-residues. Surprisingly, we did not find any modification of Cys residues by ONE, whereas Cys is a target of ONE [70], and several Cys can be modified by S-glutathionylation [23,63]. However, ONE-Lys adducts generated on recombinant eNOS, should anyway affect its

enzymatic activity. The 3D-modelling of eNOS shows that two Lys residues modified by ONE are close to the  $\text{Ca}_2^+$ -calmodulin (K519), or the FAD/NADPH (K1085) domains, which may alter the enzymatic activity of recombinant eNOS. As a matter of fact, the addition of ONE to HTR8 trophoblasts, resulted in a decreased production of NO by these cells, and a decreased eNOS activity, that could partly result from the formation of ONE-Lys adducts on eNOS (Fig.4A). To our knowledge, this is the first report showing that eNOS is targeted by LPP, more precisely ONE, in addition to its previously reported post-translational modifications, including phosphorylation, nitrosylation, ubiquitination, sumoylation, glutathionylation, that may regulate the activity of neuronal, endothelial or inducible NOS [22,71]. Interestingly, a modification of eNOS by carbonyl stress was observed by Du et al [72], who reported that high glucose levels inhibit eNOS activity in BAEC and in the aorta of diabetic rats, *via* an O-linked N-acetylglucosamine post-translational modification at the Akt site, impairing the phosphorylation and activation of eNOS. Placental eNOS is exposed to redox variations occurring throughout pregnancy, particularly in PE, in which altered trophoblast invasion and defective placentation lead to ischemia/reperfusion waves, and massive ROS production [9,10,12,13,62]. We recently reported that eNOS is highly S-glutathionylated in PE placentas, in response to oxidative stress [23]. S-glutathionylation of eNOS induces its uncoupling which converts its activity in a ROS generating enzyme that may contribute to locally increase oxidative stress, lipid peroxidation and the generation of LPP, able to rapidly react on proteins (including eNOS itself) or its substrates (Arginine). Though HNE- and acrolein-adducts were detected in PE placentas, our data indicate that eNOS is only slightly modified by these LPP. This is in agreement with report from Whitsett et al, showing that the inhibitory effect of HNE on eNOS is not attributed to the modification of eNOS residues, but rather to the depletion in BH4 and/or inhibition of serine 1179 phosphorylation on eNOS [41]. Previous studies have shown that ONE is much more reactive than HNE on protein nucleophiles, particularly on Lys, as it rapidly forms readily reversible Schiff base adducts on Lys, that can be oxidized to stable 4-ketoamide adducts for longer time of exposure [70,73-75]. ONE shares structural similarities with HNE, of which it differs by the carbonyl group in C4 position (instead of the hydroxyl group in HNE)

[73], which increases its cross-linking potential, and particularly the formation of Lys–Lys cross-links, thus it is considered as more reactive and more toxic than HNE [57,70,73,74].

The modification of eNOS by ONE triggers its dysfunction, as reported for other protein targets, such as an inhibition of tubulin polymerization [75],  $\alpha$ -synuclein oligomerization [57], or the formation of adducts on histones [76]. In our study, the exposure of HTR8 to exogenous ONE, inhibited their invasive capacity to migrate in the wound closure model, *via* mechanisms possibly resulting (at least in part), from eNOS modification and subsequent decreased NO production, since the NO donor NOC-18, significantly restored cell migration. Various NO-mediated signaling mechanisms have been shown to play a role in the invasive potential of trophoblasts. For instance, NO regulates the expression and activity of matrix metalloproteases (MMP2 and MMP9), which stimulate the migration and proliferation of human trophoblasts, including in HTR8 [77,78]. NO, cGMP and Sildenafil (an inhibitor of phosphodiesterase 5) promotes the switching of trophoblast integrins from a stationary ( $\alpha 6\beta 4$ ) to a more invasive ( $\alpha 1\beta 1$ ) phenotype, which is an important step for initiating trophoblast invasion during placentation [79,80]. Likewise, NO and cGMP regulate the expression of growth factors such as HGF, an essential factor of placentation and trophoblast invasion [80], and VEGF which, beside its implication in vasculogenesis and angiogenesis, may contribute to trophoblast motility [81].

Our data confirm the role of NO in trophoblast invasiveness, and emphasize oxidative stress as a cause of post-translational modification of eNOS, by S-glutathionylation [23], and by lipid peroxidation-derived aldehydes such as ONE, which finally reduces NO production, thereby contributing to aggravate the pathological process of PE.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank Pr. Charles H. Graham (Queen's University, Ontario, Canada), for giving us the HTR8/svNeo cytotrophoblast cell line. The cell Imaging Facility at INSERM U1048-I2MC and Proteomics platform (Pôle Technologique du CRCT) are gratefully acknowledged.

**Fundings**

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), and University Paul Sabatier Toulouse.

**Declarations of interest:** none

## References

1. Roberts JM, Bell MJ. If we know so much about preeclampsia, why haven't we cured the disease? *Reprod Immunol*. 2013;99: 1–9.
2. Phipps EA, Thadhani R, Benzing T, Karumanchi SA. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nat Rev Nephrol*. 2019. doi: 10.1038/s41581-019-0119-6.
3. Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, et al. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag*. 2011;7:467-74
4. Arulkumaran N, Lightstone L. Severe pre-eclampsia and hypertensive crises. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2013;27(6):877-84.
5. Garovic VD, Hayman SR. Hypertension in pregnancy: an emerging risk factor for cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2011;3(11):613-22.
6. Brown MC, Best KE, Pearce MS, et al. Cardiovascular disease risk in women with pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2013;28(1):1-19.
7. Veerbeek JH, Hermes W, Breimer AY, et al. Cardiovascular disease risk factors after early-onset preeclampsia, late-onset preeclampsia, and pregnancy-induced hypertension. *Hypertension*. 2015;65:600-6.
8. Ahmed R, Dunford J, Mehran R, Robson S, Kunadian V. Pre-eclampsia and future cardiovascular risk among women: a review. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(18):1815-22.
9. Wu F, Tian FJ, Lin Y, Xu WM. Oxidative Stress: Placenta Function and Dysfunction. *Am J Reprod Immunol*. 2016;76(4):258-71.
10. Aouache R, Biquard L, Vaiman D, Miralles F. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).
11. Sánchez-Aranguren LC, Prada CE, Riaño-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front Physiol*. 2014;5:372.
12. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):747-55.
13. Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol* 2003;162:115–25
14. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*. 2009;30(6):473-82.
15. Jauniaux E, Pahal GS, Gervy C, Gulbis B. Blood biochemistry and endocrinology in the human fetus between 11 and 17 weeks of gestation. *Reprod Biomed On-line* 2000;1:38—44.
16. Kendall R, Thomas K. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ;90:10705-10709.
17. Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003;111(5):649-58.
18. Tjoa ML1, Levine RJ, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Front Biosci*. 2007;12:2395-402.
19. Johal T, Lees CC, Everett TR, Wilkinson IB. The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78(2):244-57.
20. Lyall F, Bulmer JN, Kelly H, Duffie E and Robson SC Human trophoblast invasion and spiral artery transformation – The role of nitric oxide. *Am J Pathol*. 1999;154,1105–1114.
21. Lowe DT. Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *Nitric Oxide*. 2000;4(4):441-58.
22. Heiss EH, Dirsch VM. Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification. *Curr Pharm Des*. 2014;20(22):3503-13.
23. Guerby P, Swiader A, Augé N, Parant O, Vayssière C, Uchida K, Salvayre R, Negre-Salvayre A. High

- glutathionylation of placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia. *Redox Biol.* 2019;22:101126. doi: 10.1016/j.redox.2019.101126.
24. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35:1147–1150.
25. Stadtman ER, Levine RL. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25:207–218.
26. Panieri E, Gogvadze V, Norberg E, Venkatesh R, Orrenius S, Zhivotovsky B. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radic Biol Med.* 2013;57:176-87
27. Levine RL, Stadtman ER. 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 36:1495–1502.
28. Castro JP, Jung T, Grune T, Siems W. 4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases. *Free Radic Biol Med.* 2017;111:309-315.
29. Forman HJ, Ursini F, Maiorino M. An overview of mechanisms of redox signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;73:2-9.
30. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003;9(4):169-76
31. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
32. Uchida K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends Cardiovasc Med.* 1999;9(5):109-13.
33. Sayre LM, Lin D, Yuan Q, Zhu X, Tang X. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and ONE. *Drug Metab Rev.* 2006;38(4):651-75.
34. Forman H.J., Fukuto J.M., Miller T., Zhang H., Rinna A., Levy S. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;477:183.
35. Higdon A., Diers A.R., Oh J.Y., Landar A., Darley-Usmar V.M. Cell signaling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem. J.* 2012;442:453–464.
36. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev.* 2008;28(4):569-631
37. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2010;44(10):1125-71.
38. Chapple SJ, Cheng X, Mann GE. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol.* 2013;1:319-31.
39. Santoso DI, Rogers P, Wallace EM, Manuelpillai U, Walker D, Subakir SB. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase and 4-hydroxynonenal in normal and pre-eclamptic placentae. *Placenta.* 2002;23(5):373-9.
40. Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Ohira S, Konishi I. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch.* 2004 ;444(1):49-55
41. Whitsett J., Picklo M.J., Sr, Vasquez-Vivar J. 4-Hydroxy-2-nonenal increases superoxide anion radical in endothelial cells via stimulated GTP cyclohydrolase proteasomal degradation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2007;27:2340–2347.
42. Hattori Y., Hattori S., Kasai K. 4-hydroxynonenal prevents NO production in vascular smooth muscle cells by inhibiting nuclear factor-kappaB-dependent transcriptional activation of inducible NO synthase. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology.* 2001;21:1179–1183.
43. Shibata T, Shimozu Y, Wakita C, et al. Lipid peroxidation modification of protein generates Ne-(4-oxononanoyl)lysine as a pro-inflammatory ligand. *J. Biol. Chem.* 2011;286, 9943-19957.
44. Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, et al. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res.* 1993;206:204-11.
45. Manders EMM, Verbeek, FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy.* 1993;169, 375-382.
46. Zhu X, Gallogly MM, Mieyal JJ, et al. Covalent cross-linking of glutathione and carnosine to

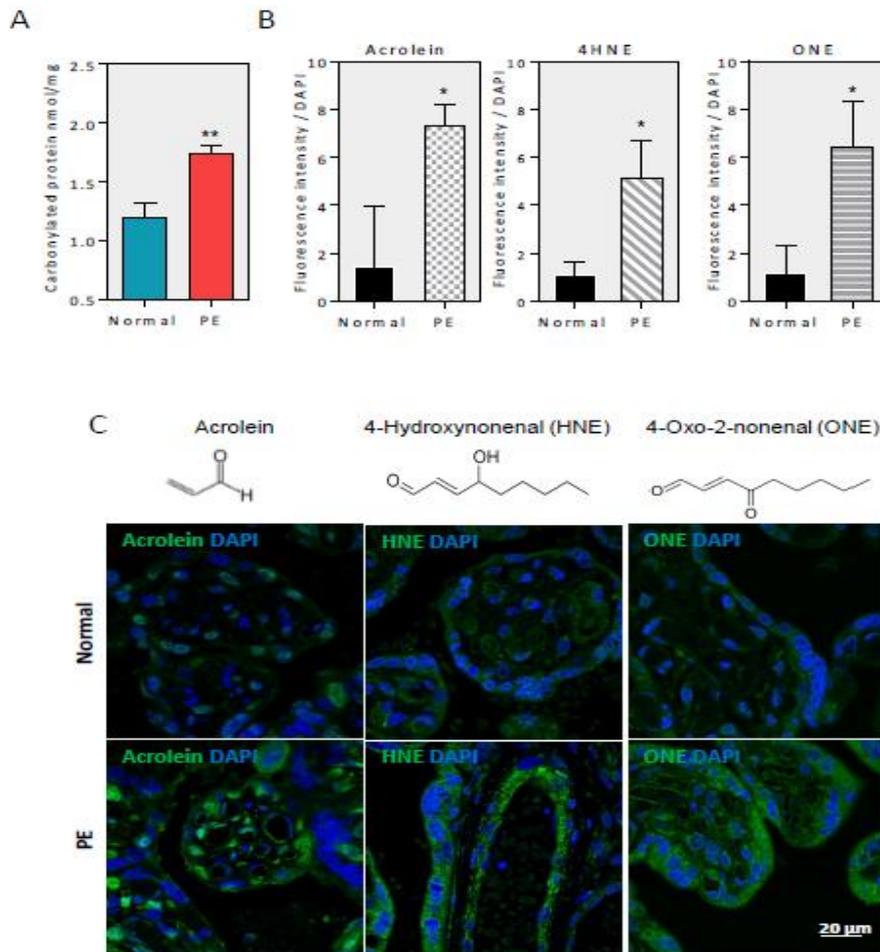
proteins by 4-oxo-2-nonenal. *Chemical Res. Toxicol.* 2009;22:1050–1059.

47. Perkins DN., Pappin DJC, Creasy DM, Cotrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999;20:3551-3567.
48. Berman HM, Westbrook J, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:235-242.
49. Pieper U, Webb BM, Dong GQ, et al. MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D336-46.
50. Garcin ED, Bruns CM, Lloyd SJ, et al. Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 2004;279: 37918-37927.
51. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis *J. Comput. Chem.* 2004;25:1605-1612.
52. Xia C, Misra I, Iyanagi T, Kim JJ. Regulation of interdomain interactions by calmodulin in inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2009;284:44, 30708-17.
53. Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, et al. Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:339-349.
54. Li, H., Jamal, J., Plaza, C., Pineda, S.H., Chreifi, G., Jing, Q., Cinelli, M.A., Silverman, R.B., Poulos, T.L. Structures of Human Constitutive Nitric Oxide Synthases. *Acta Crystallogr., Sect. D* 2014;70: 2667.
55. Pensa, A.V., Cinelli, M.A., Li, H., Chreifi, G., Mukherjee, P., Roman, L.J., Martasek, P., Poulos, T.L., Silverman, R.B. Hydrophilic, Potent, and Selective 7-Substituted 2-Aminoquinolines as Improved Human Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2017;60: 7146-7165.
56. Fedorova M, Griesser E, Vemula V, Weber D, Ni Z, Hoffmann R. Protein and lipid carbonylation in cellular model of nitrosative stress: mass spectrometry, biochemistry and microscopy study. *Free Radic Biol Med.* 2014;75 Suppl 1:S15.
57. Näsström T, Wahlberg T, Karlsson M, Nikolajeff F, Lannfelt L, Ingelsson M, Bergström J. The lipid peroxidation metabolite 4-oxo-2-nonenal cross-links  $\alpha$ -synuclein causing rapid formation of stable oligomers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378;872-876.
58. Venema RC, Sayegh HS, Kent JD, Harrison DG. Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases. *J Biol Chem;*271(11):6435-40.
59. Zhang J, Martasek P, Paschke R, et al. Crystal structure of the FAD/NADPH-binding domain of rat neuronal nitric-oxide synthase. Comparisons with NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37506-13
60. Shimaoka M1, Iida T, Ohara A, et al. NOC, a nitric-oxide-releasing compound, induces dose dependent apoptosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209(2):519-26.
61. Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta.* 2011;32(11):797-805
62. Matsubara K, Higaki T, Matsubara Y, Nawa A. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):4600-14.
63. Chen CA, Wang TY, Varadharaj S et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature.* 2010;468(7327):1115-8.
64. Doria E, Buonocore D, Focarelli A, Marzatico F. 2012. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2012:830257.
65. Baraibar MA, Friguet B. 2012b. Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging. *Exp Gerontol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2012.10.007>
66. Cindrova-Davies T, Fogarty NME, Jones CJP, Kingdom J, Burton GJ. Evidence of oxidative stress-induced senescence in mature, post-mature and pathological human placentas. *Placenta* 2018;68,15.
67. Hnat, M. D.; Meadows, J. W.; Brockman, D. E.; Pitzer, B.; Lyall, F.; Myatt, L. Heat shock protein-70 and 4-hydroxy-2-nonenal adducts in human placental villous tissue of normotensive, preeclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:836-840.
68. Rudra, C. B.; Qiu, C.; David, R. M.; Bralley, J. A.; Walsh, S. W.; Williams, M. A. A prospective study

of early-pregnancy plasma malondialdehyde concentration and risk of preeclampsia. *Clin Biochem* 2003;39:722-726.

69. Watson AL, Palmer ME, Jauniaux E and Burton GJ. Variations in expression of copper/zinc superoxide dismutase in villous trophoblast of the human placenta with gestational age. *Placenta* 1997;18:295–299.
70. Doorn JA, Petersen DR. Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. *Chem Biol Interact.* 2003;143-144:93-100.
71. Sharma NM, Patel KP. Post-translational Regulation of Neuronal Nitric Oxide Synthase: Implications for sympatho-excitatory states. *Expert Opin Ther Targets.* 2017; 21(1): 11–22.
72. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest.* 2001;108(9):1341-8.
73. Lee SH, Blair IA. Characterization of 4-oxo-2-nonenal as a novel product of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 2000;13:698–702.
74. Lin D, Lee HG, Liu Q, et al. 4-Oxo-2-nonenal is both more neurotoxic and more protein reactive than 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol.* 2005;18(8):1219-31.
75. Stewart BJ, Doorn JA, Petersen DR. Residue-specific adduction of tubulin by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal causes cross-linking and inhibits polymerization. *Chem. Res. Toxicol.* 2007;20:1111-1119.
76. Galligan JJ, Rose KL, Beavers WN, Hill S, Tallman KA, Tansey WP, Marnett LJ. Stable histone adduction by 4-oxo-2-nonenal: a potential link between oxidative stress and epigenetics. *J Am Chem Soc.* 2014;136(34):11864-6
77. Novaro V, Colman-Lerner A, Ortega FV, Jawerbaum A, Paz D, Lo Nostro F, Pustovrh C, Gimeno MF, González E. Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture. *Reprod Fertil Dev.* 2001;13(5-6):411-20.
78. Zhang X, Wang HM, Lin HY, Liu GY, Li QL, Zhu C. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPS) and their inhibitors (TIMPS) during mouse peri-implantation: role of nitric oxide. *Placenta.* 2004 Apr;25(4):243-52.
79. Bolnick JM, Kilburn BA, Bolnick AD, Diamond MP, Singh M, Hertz M, Dai J, Armant DR. Sildenafil stimulates human trophoblast invasion through nitric oxide and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate signaling. *Fertil Steril.* 2015;103(6):1587-95.e1-2.
80. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest,* 99 (1997), pp. 2139-2151
81. Cartwright JE, Holden DP, Whitley GS. Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1999 Sep;128(1):181-9.
82. Lash GE, Warren AY, Underwood S, Baker PN. Vascular endothelial growth factor is a chemoattractant for trophoblast cells. *Placenta.* 2003;24(5):549-56.
83. Hinkle DE, Wiersma W, Jurs SG. Applied Statistics for the Behavioral Sciences. 5th ed. Boston: Houghton Mifflin; 2003.
84. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J.* 2012;24(3):69–71.

**Figure 1**

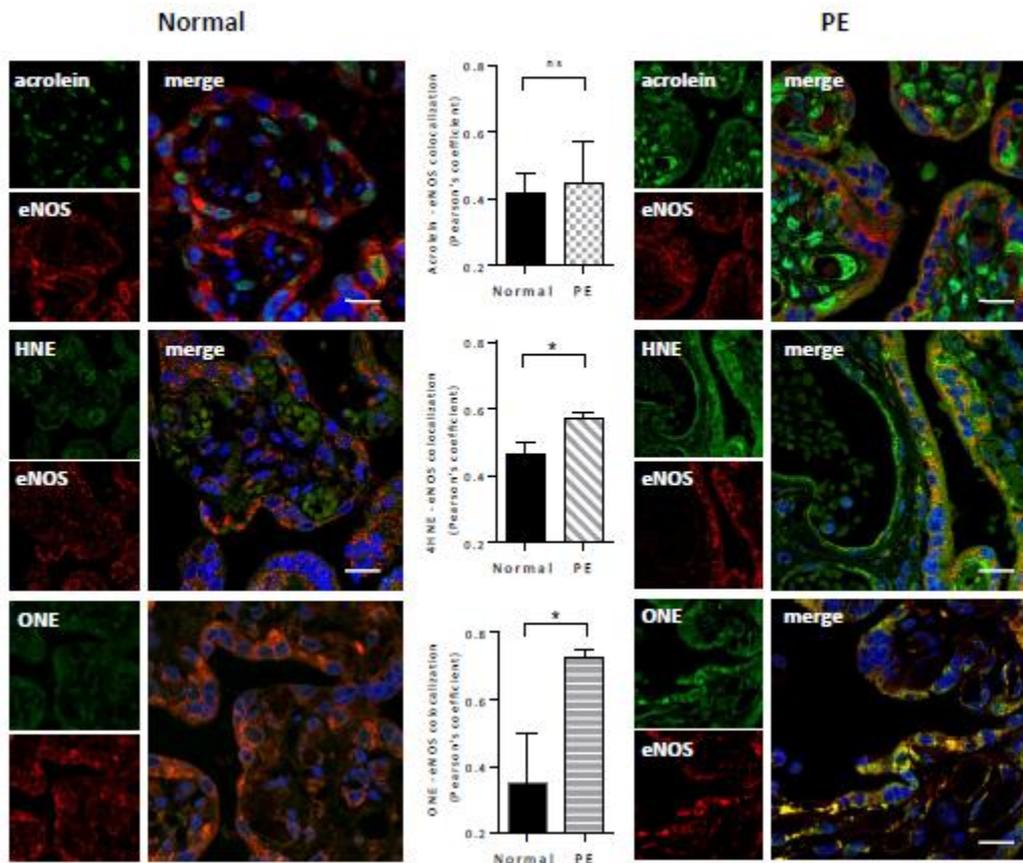


**Figure 1. Protein carbonyl content and aldehyde-adduct accumulation in placentas**

A, quantification of the protein carbonyl content (Enzo LifeSciences), in normal (n=4) and PE (n=4) placenta homogenates. Data are expressed as means  $\pm$  SEM and statistical analysis was assessed using a Mann-Whitney test. \*\*p<0.01

B,C, Immunofluorescence staining and confocal microscopy in normal (upper panels) and PE (lower panels) placentas, of acrolein- (left), HNE- (middle) and ONE- (right) adduct staining (in green), and nuclei DAPI staining (blue) (scale bar 20  $\mu$ m), and chemical formulae of acrolein, HNE and ONE. The statistical quantification of adduct formation was expressed as fluorescence intensity vs DAPI staining. These pictures are representative of 4 control and 4 PE placentas separately analyzed. The data were expressed as medians with interquartile range and the statistical analysis was assessed using a Mann-Whitney test. \*p<0.05.

**Figure 2**

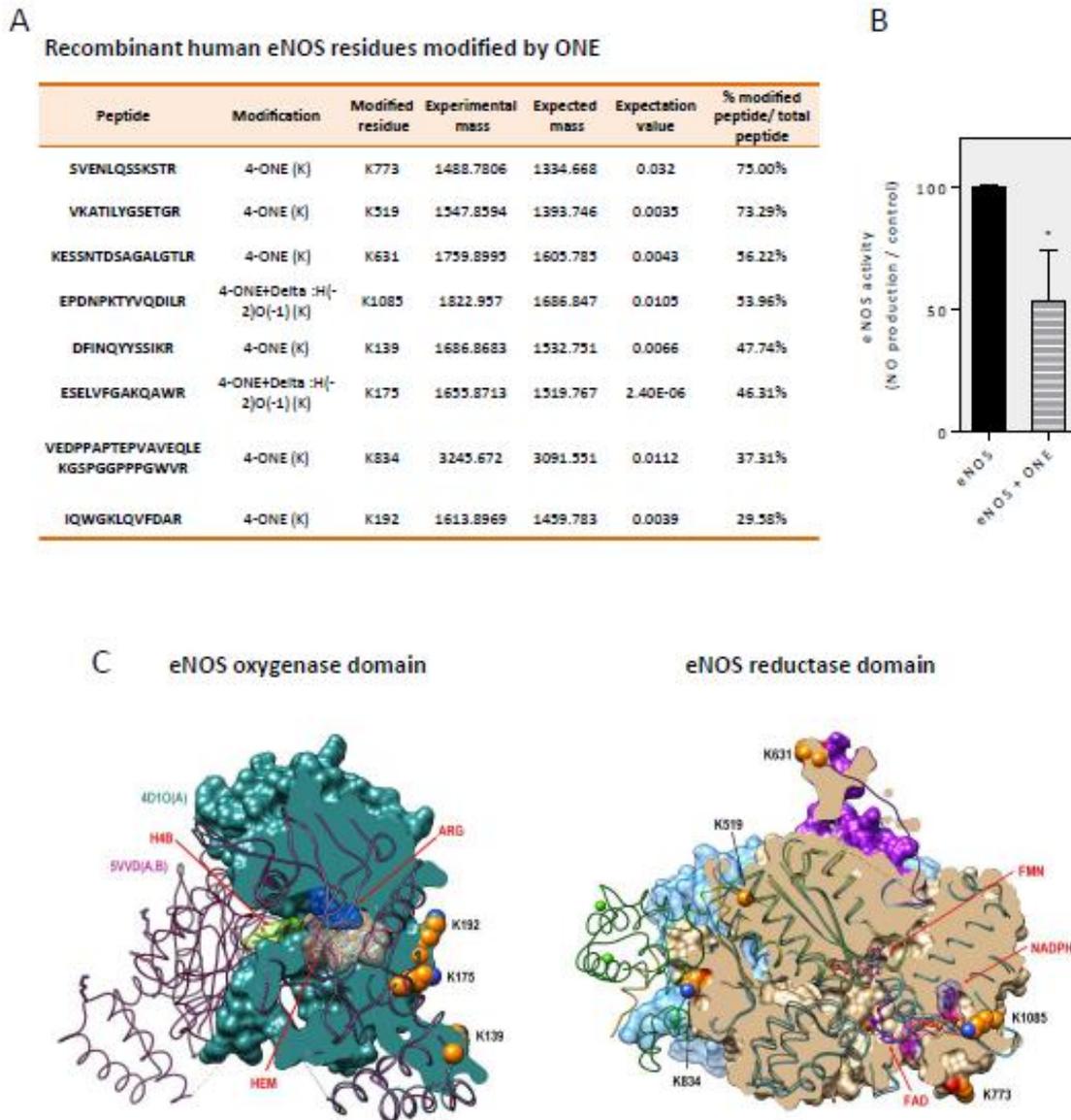


**Figure 2. eNOS is modified by LPO in PE placentas**

Coimmunofluorescence staining and confocal microscopy in normal (left) and PE (right) placentas, of aldehyde-adduct (green), eNOS (red) and merge (yellow), and nuclei Dapi staining (blue) (scale bar 20  $\mu$ m). Acrolein-adduct (upperpanels), HNE-adduct (HNE, middle panels), ONE-adduct (lower panel), and statistical quantification of adduct formation on eNOS for each aldehyde (middle graphs showing Pearson's coefficient or PCC, in front of each aldehyde/eNOS adduct detection). PCC measures the linear relationship between two signal intensities and allows to correlate the intensity distribution between the red channel (eNOS) and the green channel (aldehyde). We used the JACoP tool to analyse the Pearson's correlation coefficient [83,84]. ONE-eNOS displayed the higher degree of colocalization ( $0.72 \pm 0.09$  vs  $0.34 \pm 0.10$  for normal pregnancies), being closer to 1. Comparatively, HNE-eNOS colocalization was weaker ( $0.57 \pm 0.02$  vs  $0.46 \pm 0.05$  for normal placentas) and acrolein-eNOS even lower ( $0.44 \pm 0.02$  vs  $0.41 \pm 0.02$ ).

These pictures are representative of 4 control and 4 PE separately analyzed placentas. The data were expressed as medians with interquartile range and the statistical analysis was assessed using a Mann-Whitney test. \* $p < 0.05$ ; ns, non significant.

**Figure 3**



**Figure 3. Recombinant eNOS modification by ONE**

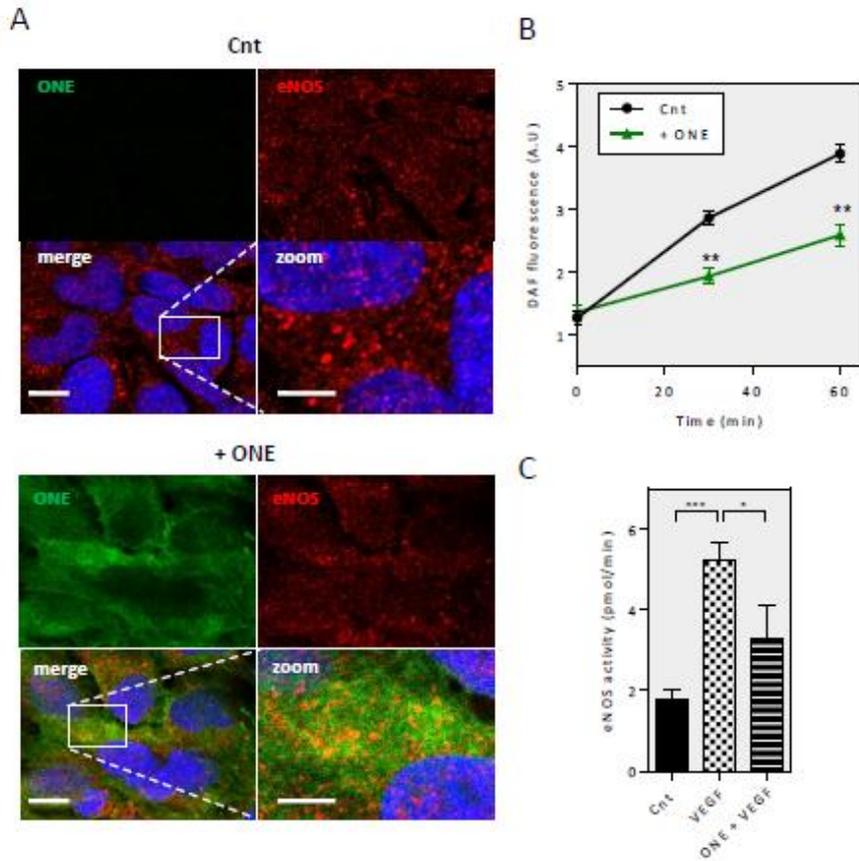
A, LC-MS/MS analysis of recombinant human eNOS (Enzo LifeScience). Recombinant eNOS (1  $\mu$ g) was incubated overnight with ONE (1 mM). Mass spectrometric analysis identified 8 peptides with ONE modification. The fragment EPDNPK\*<sub>1085</sub>TYVQDILR had an experimental mass of 1822.95 while expected at 1686.847, and the fragment VK\*<sub>519</sub>ATILYGSETGR had an experimental mass of 1547.85 while expected at 1393.74. <sup>1</sup> measured mass of the modified peptide, <sup>2</sup> theoretical mass of the unmodified peptide. The percentage of modified peptide on total peptide was calculated for a given peptide, by comparing the area under the curve of the modified peptides vs total peptide, using Proline v2.0 software.

B, Enzymatic activity of recombinant eNOS modified by ONE (100  $\mu$ M) and determined during 1H using the Nitric oxide Synthase activity assay kit (Abcam, France). The results are expressed as % of unmodified eNOS activity (control). The data were expressed as means  $\pm$  SEM and the statistical analysis was assessed using a Student *t*-test. \* $p$ <0.05.

C, 3D-visualization of the oxygenase and reductase domains of eNOS, and putative location of ONE-modifiable Lys-residues. Left, oxygenase (heme) domain of human eNOS. The PDB structure 4D1O (chain A, cyan, clipped surface) was aligned with 5VVD (chain A, showing chains A and B of the crystal, purple). The Lysine residues are shown in orange (4D1O) at right (spheres) and the counterparts in 5VVD (chain B) are shown at left (sticks?), as detailed in the Methods Section.

Right, reductase domains neuronal (Rat), endothelial (Human) and inducible (Human) NOS.

Combination of 3 aligned structures: Human eNOS (ModBase model 7e09b, Chain A: brown, clipped surface); Rat nNOS (PDB entry 1TLL, chain A: cyan, chain B: light-blue behind); Human iNOS (PDB entry 3HR4, chain A: yellow, aligned with 1TLL by chain A) complexed with calmodulin (3HR4, chain B: green, FMN ligand not shown). On the upper part of the picture, the domain 595-640 of eNOS (AI element) is depicted in purple. The ligands (FAD, FMN and NADPH with molecular surface) of 1TLL (used as template for ModBase model) are shown. The Lysine residues are shown in orange (ModBase model) (see details in the Method Section).

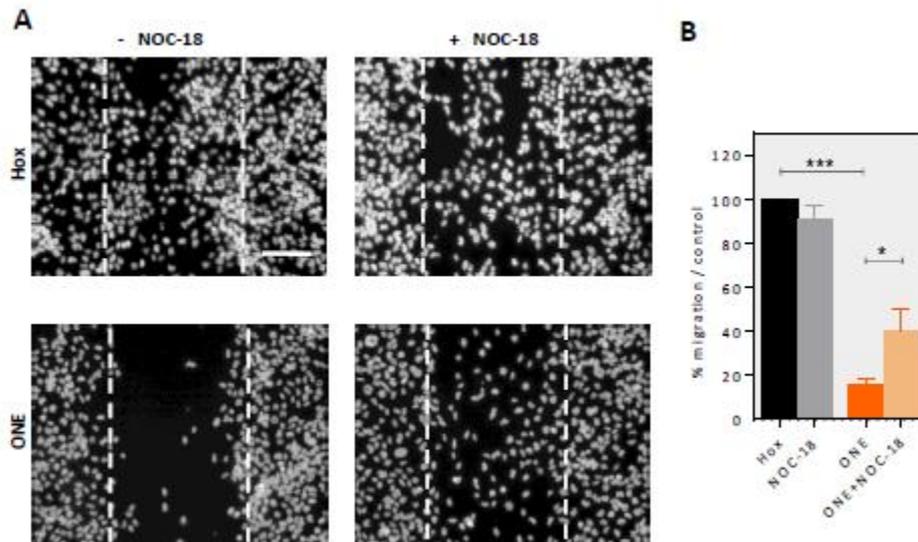


**Figure 4. eNOS modification by ONE in HTR8 and effect on NO production**

A, Representative pictures of ONE-Lys adduct colocalizing with eNOS in HTR8. Cells were incubated with ONE (1  $\mu$ M 2h at 37°C), then washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde. The colocalization of eNOS and ONE-Lys adducts was studied in control untreated cells (upper panels) and in ONE-incubated cells (lower panels), by immunofluorescence and confocal microscopy as described in the Methods section (left, scale-bar 10  $\mu$ m; right, scale-bar 5  $\mu$ m).

B, Measurement of NO production by HTR8 and effect of ONE. HTR8 were preincubated with ONE (1  $\mu$ M for 2h). DAF-FM diacetate probe (5 $\mu$ M) was added to the HTR8 culture medium 30 min. before the end of the incubation. At the end, the medium was changed and the time-dependent production of NO was fluorometrically recorded (exc/em 495/525 nm) during 60 min. The results are expressed as arbitrary units of NO produced by control (black) and ONE-treated cells, means  $\pm$  SEM of 3 separate experiments, statistical analysis with a Student *t*-test. \*\**p*<0.01

C, Measurement of eNOS activity in HTR8 preincubated for 2h with ONE (1  $\mu$ M). After removing the medium, cells were stimulated with VEGF (20 ng/mL, 15 min). The enzymatic activity of eNOS was performed on cell homogenate using the Nitric Oxide Synthase Assay Kit as described in the Methods Section. Means  $\pm$  SEM of 3 separated experiments, statistical analysis with a Student *t*-test. \**p*<0.05; \*\*\**p*<0.001.

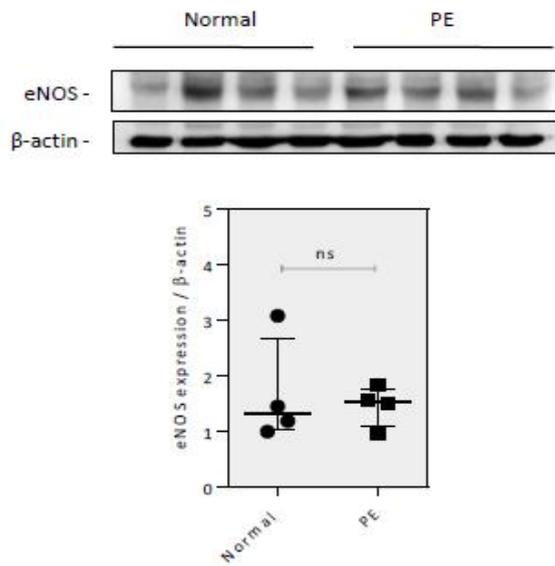


**Figure 5. ONE inhibits the invasive capacity of HTR8. Protection by NOC-18**

The wound-closure assay was done as described in the Methods Section. Confluent HTR8 were preincubated with ONE, in the conditions described in the legend to Fig.4. At the end, the medium was removed, and a scratch was made on confluent HTR8. Cells were maintained in hypoxia for 48h, in the absence or presence of the NO donor, NOC-18 (5  $\mu$ M). After fixation, the slides were stained with DAPI and the migration of HTR8 into the wounded area was quantified. In A, representative images of HTR8 invasion and effect of NOC-18 in control hypoxia conditions (upper panels), and in HTR8 preincubated with ONE (lower panel). Scale bar = 100  $\mu$ m. In B, quantification of cell having invaded the wound in each condition, and effect of NOC-18. Mean $\pm$ SEM of 4 separate experiments, statistical analysis with a Student *t*-test. \* $p$ <0.05; \*\*\* $p$ <0.001.

## Supplemental Data

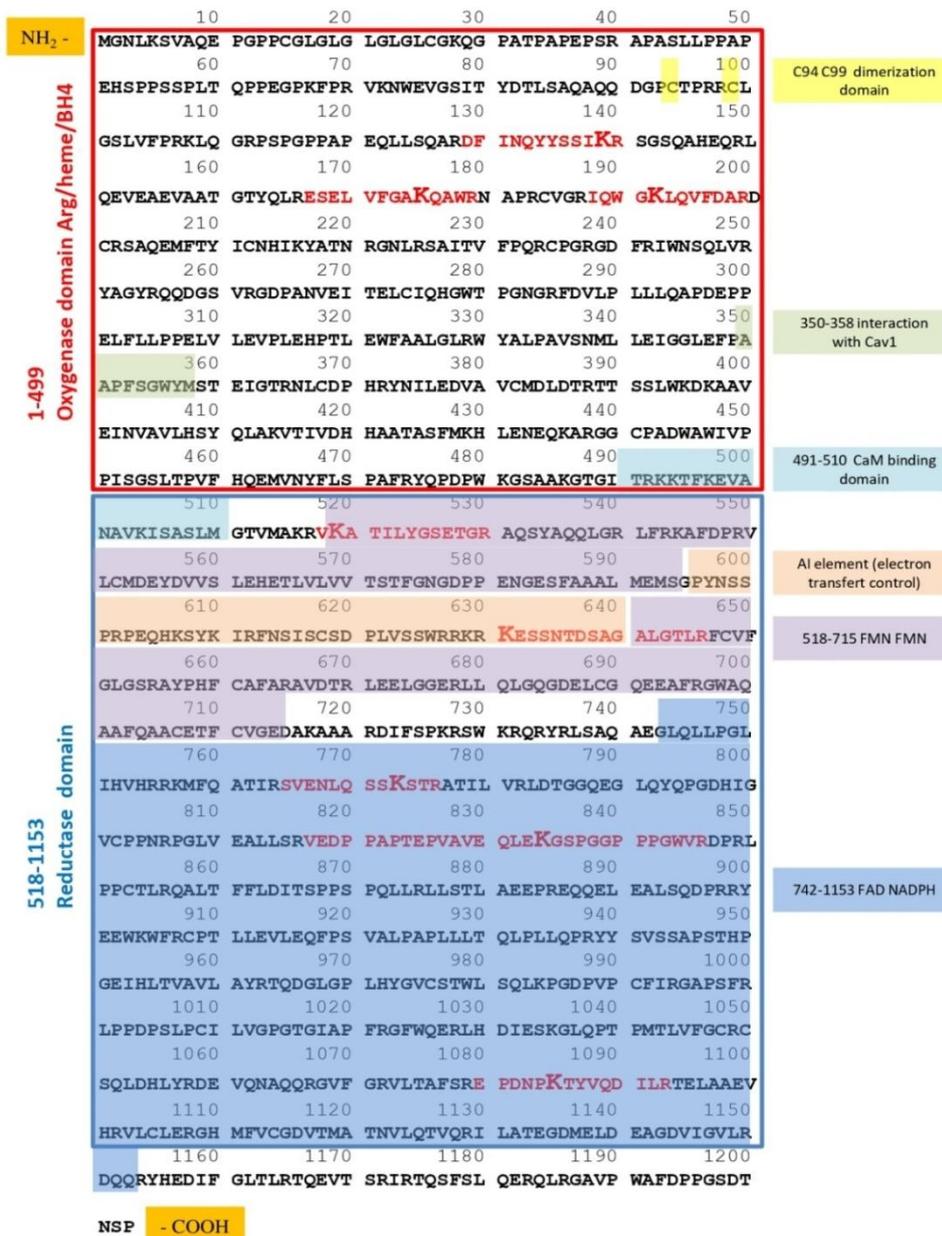
Figure I



**Figure I:** Expression of eNOS in normal and PE placentas

The expression of eNOS was evaluated by western-blot experiments in 4 normal and 4 PE placenta homogenates. Statistical significance was assessed using the nonparametric Mann-Whitney U test (ns, non significant).

Figure II



Supplemental figure I. Human eNOS sequence showing ONE modified peptides and functional or regulatory domains.

Human eNOS primary sequence was obtained from Uniprot Database (P29474). Potential ONE-binding sites are shown in red character with Lys residue (K) in higher size. Three peptides (K139, K175, K192) are located in the oxygenase domain (red square) and five (K519, K631, K773, K834, K1085) in the reductase domain (blue square). ONE-Lys adducts are located on sites near the CaM binding domain, the AI loop and inter-domains between FMN or FAD/NADPH regions 5 [Supp.Refs S1,S2].

### **Supplemental References**

S1: Ruslan Rafikov, Fabio V Fonseca, Sanjiv Kumar, Daniel Pardo, Charles Darragh, Shawn Elms, David Fulton, and Stephen M Black. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol.* 2011 Sep; 210(3): 271–284.

S2: Mika Aoyagi, Andrew S. Arvai, John A. Tainer, and Elizabeth D. Getzoff. Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin. *EMBO J.* 2003 Feb 17; 22(4): 766–775.

## Discussion

Notre étude montre que les placentas issus de PE présentent des niveaux élevés de protéines carbonylées, qui sont des marqueurs de stress oxydant et de peroxydation lipidique. La carbonylation des protéines résulte de leur modification post-traductionnelle irréversible par des composés carbonylés réactifs (cétones, aldéhydes), générés au cours de l'oxydation des acides gras polyinsaturés. La modification des protéines génère un dysfonctionnement des propriétés des protéines, ou "stress carbonyle". Les images en microscopie confocale des placentas issus de PE confirment la présence d'aldéhyde-adduits impliquant surtout ONE, mais aussi HNE et l'acroléine dans les syncytiotrophoblastes, comme précédemment rapportés dans les placentas provenant de grossesses pathologiques, dans les syncytiotrophoblastes, les cellules endothéliales et les macrophages. (Hnat 2005, Rudra 2006, Negre-Salvayre 2010) Cette accumulation d'adduits est corrélée avec les autres marqueurs du stress oxydant observés dans les placentas de PE, tels qu'un déséquilibre GSH/GSSG, et des activités réduites des enzymes antioxydantes (SOD, catalase, GPx). (Chapple 1997, Chapple 2013, Aouache 2018)

La colocalisation de la eNOS placentaire avec les adduits ONE-Lys, et les adduits de HNE, indiquent que cette protéine est une cible du stress carbonyle dans le placenta. De plus, l'analyse protéomique de eNOS recombinante confirme que ONE peut lier plusieurs épitopes de Lysine y compris les résidus impliqués dans l'interaction eNOS avec la calmoduline (K519), ou dans le domaine contenant la FAD/NADPH (K1085), ce qui suggère un effet sur son activité enzymatique. De fait, les HTR8 incubés avec ONE (et HNE), montrent une diminution de la production de NO, indiquant un dysfonctionnement de eNOS. A notre connaissance, il s'agit du premier rapport montrant que eNOS pourrait constituer une cible des LPO. Une telle modification de eNOS par les LPO est peu probable dans la paroi vasculaire, car ces produits sont rapidement neutralisés par l'albumine, le GSH et les autres antioxydants plasmatiques. Contrairement à la paroi vasculaire, la eNOS placentaire est beaucoup plus exposée aux variations de gradients d'O<sub>2</sub> au cours de la PE, où le défaut d'invasion trophoblastique et la placentation défectueuse entraînent des phénomènes d'ischémie/reperfusion, une production massive de ROS et un stress oxydant.

La modification post-traductionnelle des protéines par les LPO induit un dysfonctionnement de leurs propriétés, avec gain ou perte d'activité, selon la localisation subcellulaire de la cible, l'amplitude du stress et la nature de l'épitope modifié. (Fedorova 2014) Le stress carbonyle semble se produire au niveau de sites proches de la production de ROS. (Baraibar 2013) De ce fait, il est possible que la eNOS contribue elle-même à sa carbonylation. En effet, nous avons montré que eNOS est S-glutathionylée dans les placentas de PE, ce qui induit son découplage et la production d'ions superoxyde, donc de ROS qui entretiennent un environnement prooxydant.

Dans cette étude, nous avons identifié ONE comme l'un des principaux LPO produits dans le placenta. ONE serait un aldéhyde plus réactif et plus toxique que HNE, dans ses effets sur la modification des protéines, donc sa présence dans les placentas de PE pourrait potentialiser les effets inflammatoires et toxiques dans ce tissu. (Lee 2000, Lin 2005) Il est par ailleurs intéressant de noter que ONE peut se conjuguer à GSH pour former des adduits –ONE-GSH impliqués dans la glutathionylation irréversible des protéines. (Zhu 2009, Cooper 2011) Cet effet pourra être recherché dans les placentas de PE, puisqu'une faible partie de la glutathionylation de eNOS observée reste résistante au DTT (glutathionylation irréversible).

L'accumulation de LPO et le stress carbonyle sont des marqueurs de vieillissement tissulaire accéléré (Baraibar 2013). Dans ce cadre, l'augmentation des protéines carbonylées et l'accumulation de LPO dans les placentas PE pourraient être considérées comme des marqueurs de sénescence placentaire prématurée, en accord avec les preuves récentes indiquant un rôle pour le stress oxydant dans le vieillissement accéléré du placenta, en particulier dans la PE. (Cindrova-Davies 2018) A contrario, nous avons constaté que les LPO étaient beaucoup plus faibles dans les placentas normaux, ce qui suggère que le stress carbonyle pourrait être un marqueur du vieillissement placentaire accéléré –ou pathologique- lié au stress oxydant, plutôt qu'un marqueur de sénescence placentaire physiologique.

En résumé, notre étude montre que eNOS est une cible des aldéhydes issus de la peroxydation lipidique (ONE et HNE), dans les placentas PE. Cette modification est associée à une diminution de la production de NO et de la migration des trophoblastes, suggérant un rôle pour les LPO, dans la dysfonction de eNOS au cours de la PE. L'effet du donneur de NO, NOC-18, qui reverse l'inhibition de

la migration des trophoblastes induite par les LPO, montre le rôle important du NO dans cette propriété des trophoblastes.

Par ailleurs, nos résultats permettent de faire l'hypothèse que le stress oxydant et les LPO seraient des marqueurs et effecteurs du vieillissement accéléré du placenta, dont l'implication dans la pathophysiologie de la PE est actuellement étudiée.

### 3- Stress oxydant et vieillissement placentaire : un rôle dans la PE ?

#### Introduction

Les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la PE sont encore imparfaitement compris, et pourraient impliquer un vieillissement accéléré du placenta, *via* le stress oxydant.

La sénescence cellulaire (y compris dans le placenta), est caractérisée par un arrêt (quasi) irréversible du cycle cellulaire, un raccourcissement accéléré des télomères et des dommages de l'ADN. La sénescence est associée à une expression élevée des inhibiteurs de cycline kinases tels que p21CDKN1, et de suppresseurs de tumeurs tels p16INK4a et p53, des cellules plus larges que les cellules non-sénescents, une activité mTORC1 élevée sans prolifération cellulaire, une chute du glutathion cellulaire et une inhibition des voies d'autophagie qui entraîne l'accumulation de débris intracellulaires, de granulations cytoplasmiques et de gouttelettes lipidiques. Un marqueur très largement utilisé pour identifier des cellules sénescents *in vitro* et *in vivo*, est le dosage de l'activité de la Senescence-Associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ gal) qui dégrade le composé X-gal dans les cellules sénescents du fait de leur forte activité lysosomale. Par ailleurs, les cellules sénescents présentent une expression élevée de BCL2, qui les protège de l'apoptose, une activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B et l'expression de cytokines inflammatoires telles que IL-6 ou TNF $\alpha$ , contribuant à établir un phénotype de cellule sénescents ou SASP (senescence associated secretory phenotype). D'autres paramètres, tels que la modification post-traductionnelle des histones, par méthylation ou acétylation, constituent des marqueurs émergents du vieillissement cellulaire et tissulaire.

La sénescence cellulaire joue un rôle physiologique dans le développement d'une grossesse normale avec un vieillissement physiologique. (Sultana 2018) En effet, le placenta à terme présente des marqueurs moléculaires de la sénescence cellulaire, par exemple, SA- $\beta$ -gal et une expression accrue des inhibiteurs CDK p16 et p21 et du suppresseur de tumeur p53. (Chuprin 2013) Les signes de dommages oxydatifs et de vieillissement du syncytiotrophoblaste augmentent à mesure que la gestation progresse. (Cox 2017, Maiti 2017) Cependant, dans certaines conditions pathologiques, l'accumulation de stress, tels que le raccourcissement des télomères, les dommages de l'ADN et le stress oxydant, altèrent progressivement les phénomènes de réparation, génèrent un état d'inflammation chronique et une perte de fonction, qui accélèrent la sénescence.

La fusion cellulaire des syncytiotrophoblastes (STB) est un processus de sénescence qui se produit continuellement et physiologiquement tout au long de la grossesse. Les STB acquièrent un phénotype de SASP, avec des activités SA- $\beta$ gal et mTORC1 élevées, ainsi qu'une expression augmentée de p21. Ce processus peut s'accélérer et devenir pathologique au cours de la PE. Les données actuelles suggèrent en effet que la PE serait caractérisée par un vieillissement prématuré du placenta, avec des signes indirects de sénescence (raccourcissement de télomères, augmentation de l'expression de P53, P16 et P21). Le stress oxydant serait impliqué dans le vieillissement accéléré du placenta, en particulier dans l'inflammation chronique caractéristique de la sénescence cellulaire. (Méhats 2018, Lecarpentier 2016, Aouache 2018, Guerby 2015)

Les travaux développés au cours de cette thèse, montrent une forte augmentation des paramètres de stress oxydant dans les placentas de patientes pré-éclamptiques, en particulier un déséquilibre de la balance glutathion réduit/oxydé, et la présence d'aldéhydes issus de la peroxydation lipidique tels que le HNE et ONE. Ces aldéhydes induisent une modification post-traductionnelle des protéines via la formation d'adduits, ce qui génère une dysfonction cellulaire et de la toxicité. L'accumulation tissulaire des aldéhyde-adduits est considérée comme un facteur d'inflammation et de sénescence (Negre-Salvayre 2010), ce qui suggère une implication de ces adduits dans le vieillissement prématuré du placenta au cours de la PE.

Nous faisons ainsi l'hypothèse que les aldéhydes de peroxydation lipidique contribuent à l'inflammation et au vieillissement prématuré du placenta au cours de la PE. Notre objectif est d'établir une corrélation entre l'accumulation des aldéhyde-adduits, et les marqueurs d'inflammation et de sénescence placentaire sur des modèles cellulaires de trophoblastes et *in vivo*, chez les patientes atteintes de PE vs les grossesses normales.

## Méthodes

Nous avons étudié la sénescence cellulaire *in vitro*, sur les trophoblastes HTR8 maintenus en hypoxie, en induisant une déplétion en GSH intracellulaire par un traitement à la buthionine sulfoximine (BSO) qui bloque la synthèse de glutathion, (ce qui génère un stress oxydant intracellulaire). Les HTR8 sont également incubés avec ONE et HNE, afin d'étudier leur effet des adduits de LPO sur la sénescence. Dans ces différentes conditions, nous avons quantifié le glutathion, l'activité SA- $\beta$ gal par le test X-GAL pour étudier le vieillissement induit par les marqueurs de peroxydation lipidique et la migration des trophoblastes avec le modèle de strie.

Nous avons également étudié des paramètres de sénescence sur les placentas de patientes pré-éclamptiques ou normales, tels que l'expression de  $\gamma$ -H2AX, en corrélation avec l'expression des aldéhydes (HNE, ONE), et le taux de glutathion.

## Résultats

Nous avons étudié l'effet de la déplétion en glutathion sur les trophoblastes HTR8, sur la génération du stress oxydant et l'expression de marqueurs de sénescence.

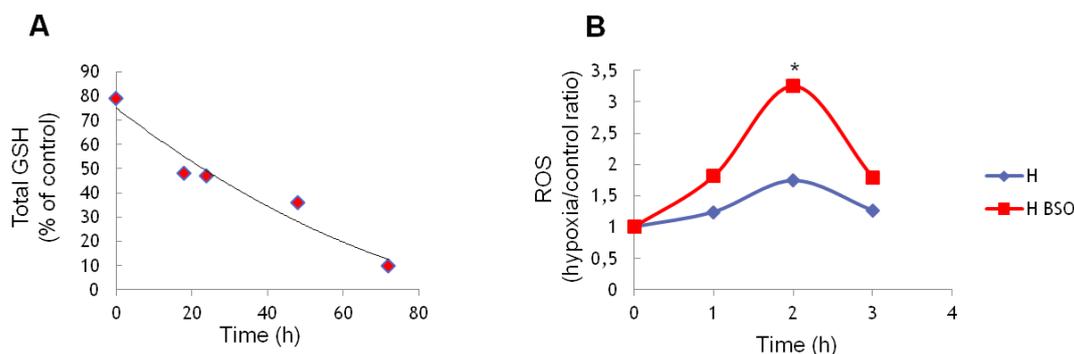
### *Induction d'un stress oxydant par déplétion en glutathion avec la BSO*

La BSO (buthionine sulfoximine) est un inhibiteur irréversible de la  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthétase, qui est nécessaire pour la synthèse de glutathion (Marengo 2008). Nous avons dans un premier temps étudié l'effet de la BSO (100  $\mu$ M), sur le GSH cellulaire, en cinétique de temps, dans des conditions de normoxie ou d'hypoxie. (Figure 14A)

Nos résultats montrent que la BSO n'induit pas ou très peu de variation du taux de GSH en normoxie, indiquant que ces conditions (normoxie) n'induisent pas de stress oxydant dans les trophoblastes. De même les trophoblastes en hypoxie ne présentent pas de chute du taux de GSH (conditions physiologiques). A l'inverse, le traitement par la BSO induit une forte diminution du taux de GSH, en fonction du temps d'exposition à l'hypoxie. Ces résultats suggèrent que l'exposition à l'hypoxie génère des ROS dont la neutralisation implique une utilisation du GSH.

### La déplétion en glutathion induit une génération de ROS

Les ROS sont neutralisés par des enzymes antioxydantes tels que les glutathion peroxydases (GPx), qui neutralisent le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), les hydroperoxydes ou le peroxynitrite en utilisant le GSH. Nos résultats montrent que l'hypoxie génère des ROS, même en faible quantité, mais qui consomment du GSH, donc seraient neutralisés par les GPx. Nous avons étudié l'induction de ROS dans les trophoblastes en fonction du temps d'exposition à l'hypoxie (0, 30 min, 1h, 2h et 3h), avec une sonde sensible aux hydroperoxydes et à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le H<sub>2</sub>-DCFDA-AM (5 µM). Nos résultats montrent que l'exposition à l'hypoxie génère une production de ROS dans les HTR8, qui est beaucoup plus élevée lorsque les cellules sont pré-incubées avec BSO, et donc déplétées en GSH.



**Figure 14 :** Paramètres du stress oxydant. 1A Taux de GSH total dans les cellules incubées en hypoxie et BSO (rapporté au contrôle d'hypoxie sans BSO) en fonction du temps d'hypoxie. 1B Cinétique de la génération de ROS intracellulaires en fonction du temps d'hypoxie (H= Hypoxie, H BSO = Hypoxie + BSO) \* $p < 0,05$ . Les résultats présentés dans cette figure sont la moyenne de 4 expériences séparées  $\pm$  SEM \*  $p < 0.05$ .

### Inhibition de la migration des trophoblastes en hypoxie/BSO

Les études précédentes montrent que les LPO tels que ONE ou HNE inhibent fortement la migration des HTR8 dans le test de la strie (wound closure test), qui permet d'évaluer la capacité invasive des trophoblastes. Dans cette étude, nous avons étudié l'effet de la déplétion en glutathion sur cette propriété majeure des trophoblastes, et déficiente au cours de la PE. Comme montré précédemment, la migration des HTR8 est très faible en normoxie, dans un milieu ne contenant aucun facteur de croissance, alors que l'hypoxie permet cette migration, *via* une signalisation

impliquant l'expression du facteur Hif1- $\alpha$  (cf. article 1, Guerby et al 2019). Les images de la Figure 15, montrent que la déplétion en glutathion induite par la BSO inhibe fortement la migration des trophoblastes, telle qu'observée en hypoxie.

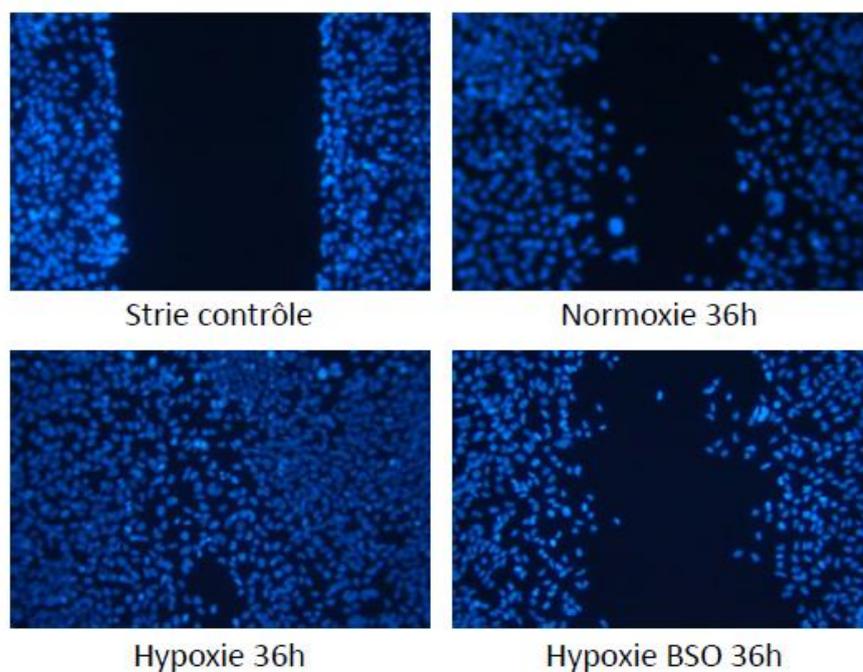


Figure 15 : Effet de la normoxie et de l'hypoxie +/-BSO sur la migration des trophoblastes évaluée par la technique de « wound closure». Photographie au microscope à fluorescence après coloration DAPI des noyaux.

*Effet de la déplétion en glutathion et des LPO sur l'activité de la  $\beta$ -galactosidase activée par la sénescence (SA- $\beta$ gal) : Test XGAL (Résultats O. Tasta, M2R - Encadrement partagé)*

Dans cette étude, les HTR8 sont incubés en hypoxie, après un traitement préalable avec le 4-HNE (10  $\mu$ M 3 h) ou ONE (1  $\mu$ M, 1h) ou déplétés en glutathion par la BSO (100  $\mu$ M). Le test de sénescence XGAL est pratiqué sur ces cellules après 48 à 72h.

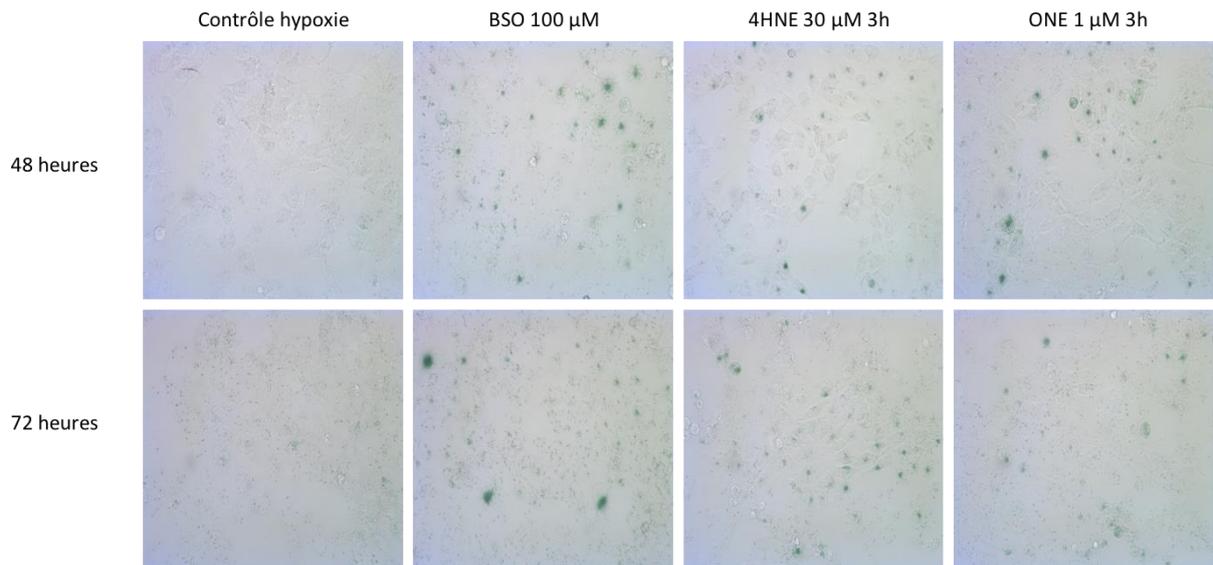


Figure 16 : Marquage XGAL sur HTR8 en condition d'hypoxie +/- BSO ou avec des adduits HNE et ONE à 48h et 72h d'hypoxie

Les HTR8 en hypoxie et en condition de stress oxydant (BSO ou présence d'adduits de HNE ou ONE) montrent un marquage positif XGAL (cellules bleues), témoignant d'une activité SA- $\beta$ gal augmentée, indiquant que ces agents induisent un vieillissement accéléré des HTR8. (Figure 16)

#### *Marqueurs de sénescence dans les placentas humains (Résultats O. Tasta, M2R)*

Les résultats présentés dans les deux articles précédents montrent une augmentation des protéines carbonylées, de même qu'une inversion du ratio GSH/GSSG dans les placentas PE, associés à des marqueurs de peroxydation lipidique, et de vieillissement accéléré. (Figure 6)

Nous avons recherché si ces paramètres étaient associés à des marqueurs reconnus du vieillissement cellulaire, tels que l'expression des histones H2AX, qui marquent la présence d'ADN fragmentés.

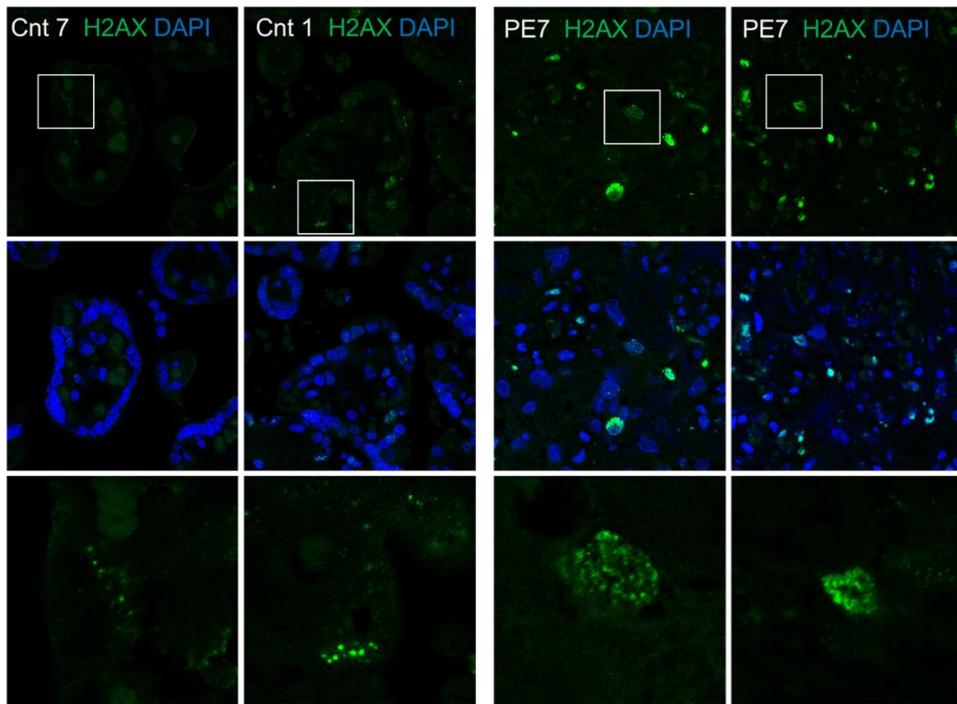


Figure 17 : Marquage Histones H2AX (vert) dans les placentas contrôle (cnt) versus PE.

Les résultats montrent que le marquage Histone H2AX est significativement plus important dans les placentas PE. (Figure 17)

## Discussion

Ces résultats préliminaires montrent que l'accumulation de LPO dans les placentas PE et l'augmentation des paramètres de stress oxydant et carbonyle, sont corrélés à la présence de marqueurs du vieillissement tels que H2AX, un marqueur sensible des cassures d'ADN double brin, de raccourcissement de télomère et de sénescence tissulaire. L'implication des LPO dans le vieillissement accéléré est confirmée par le fait que HNE et ONE stimulent l'activation de SA- $\beta$ gal dans les HTR8. Le rôle du stress oxydant est par ailleurs confirmé par l'effet de la déplétion en glutathion (par la BSO), qui stimule également l'activité SA- $\beta$ gal dans ces cellules. Ces résultats mettent en évidence une corrélation entre l'accumulation de LPO et les marqueurs de sénescence, soulignant leur implication possible dans le vieillissement placentaire et la PE.

Les travaux actuels sont orientés vers les mécanismes cellulaires induits par le stress oxydant et/ou les LPO, et impliqués dans le vieillissement accéléré. Une hypothèse est que le stress oxydant et/ou les LPO, pourraient modifier les enzymes impliquées dans la déacétylation des protéines. Nos résultats préliminaires montrent une accumulation de protéines acétylées sous l'effet de ONE ou de la déplétion en glutathion. Cet effet ne semble pas résulter d'une diminution de l'expression de SIRT1, classiquement observée au cours du vieillissement cellulaire. (Furakawa 2007) De même, on n'observe pas d'augmentation d'expression de p53 (totale ou acétylée) dans les HTR8 soumises au stress oxydant, en comparaison avec les effets décrits pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Furakawa 2007)

Notre hypothèse actuelle est que l'accumulation des protéines acétylées pourrait (entre-autre) provenir d'une diminution d'activité ou d'expression des histones déacétylases HDAC1/2, qui sont exprimées dans le placenta, et permettent la déacétylation des histones et la reprogrammation génétique. Une possibilité est que les HDAC soient elles même ciblées et modifiées par les LPO dans les HTR8 et le placenta humain, comme décrit pour HDAC1 qui serait modifiée par l'acroleïne dans des macrophages mis au contact de la fumée de cigarette. (Randall 2016)

Un objectif de ce projet est d'étudier l'effet d'agents thérapeutiques utilisés dans la prévention de la PE, en particulier les faibles doses d'aspirine, sur le développement des marqueurs de vieillissement accéléré dans le placenta, l'hypothèse étant que ces agents devraient limiter leur expression et leurs effets pathogènes, en prévenant de développement pathologique de la PE.

Le développement de modèles animaux de RCIU (souris traitées par le LPS, études en cours), devrait permettre de mieux caractériser le mécanisme de sénescence du placenta induit par le stress inflammatoire (le LPS est un puissant inducteur de stress oxydant, inflammation et peroxydation lipidique), et l'efficacité thérapeutique d'agents coadministrés au cours de la gestation des animaux.

# **DISCUSSION GÉNÉRALE**

L'environnement pro-oxydant physiologique de la placentation normale, et nécessaire pour l'expression et la signalisation des facteurs de croissance (VEGF), serait décompensé au cours de la PE, en réponse aux vagues successives d'H/R au niveau de la chambre intervillieuse, avec pour conséquence une dysfonction endothéliale et une réponse inflammatoire systémique.

### ***Interaction du stress oxydant, NO et dysfonction de eNOS placentaire***

Le dysfonctionnement placentaire implique entre autre, un stress oxydant et une diminution de la biodisponibilité du NO, via une dysfonction de eNOS. Diverses causes sont connues pour induire ce dysfonctionnement, en particulier le polymorphisme génétique de eNOS (G894T et T-786C), la diminution de son expression ou son découplage.

Nos résultats mettent en évidence la sensibilité de eNOS au stress oxydant. Une originalité de nos travaux a été de montrer que eNOS est fortement S-glutathionylée dans les placentas de patientes en PE. Cette S-glutathionylation réversible (sensible aux agents réducteurs) induit un découplage de eNOS et une diminution de la production de NO, qui pourrait expliquer une part des mécanismes moléculaires et physiopathologiques impliqués dans son dysfonctionnement au cours de la PE.

Par ailleurs, nous montrons que eNOS est modifiée par les LPO (HNE, ONE) dans les placentas de PE, et donc représente une cible de la peroxydation lipidique. Cette modification est retrouvée dans les trophoblastes HTR8 au contact des aldéhydes ajoutés au milieu de culture, avec une réduction de la production de NO, et une inhibition de la migration des trophoblastes. Nous avons identifié ONE comme l'un des principaux LPO produits dans le placenta. Cet aldéhyde très réactif et toxique, se lie aux résidus Lysine de eNOS, entraînant sa modification post-traductionnelle et une altération de ses propriétés. De plus, l'accumulation de LPO serait un indice de vieillissement accéléré des placentas.

L'étude de la migration des trophoblastes sur modèle de strie, confirment le rôle essentiel du NO dans le potentiel invasif des trophoblastes et soulignent le rôle du stress oxydant dans la dysfonction de eNOS, du fait de sa modification par S-glutathionylation, ou par les LPO.

### ***Corrélation des marqueurs de stress oxydant et de vieillissement accéléré des placentas PE***

L'analyse des placentas de PE montre une accumulation d'adduits HNE et ONE dans les placentas humains, corrélée avec une expression accrue d'histone  $\gamma$ -H2AX, un marqueur sensible des cassures d'ADN double brin, de raccourcissement de télomère et de sénescence tissulaire. Le stress oxydant et la carbonylation des protéines sont également des marqueurs de sénescence accélérée. De plus, le traitement des HTR8 par ONE et HNE stimulent l'activité SA- $\beta$ gal qui est activée au cours du vieillissement cellulaire. Ces résultats suggèrent que l'accumulation de LPO serait un inducteur de sénescence, impliquée dans le vieillissement accéléré du placenta au cours de la PE.

### ***Rôle des donneurs de NO***

L'altération de la voie du NO a un rôle majeur dans la physiopathologie de la PE, et l'administration de NO exogène est apparue une option thérapeutique intéressante. Plusieurs études ont testé les donneurs de NO.

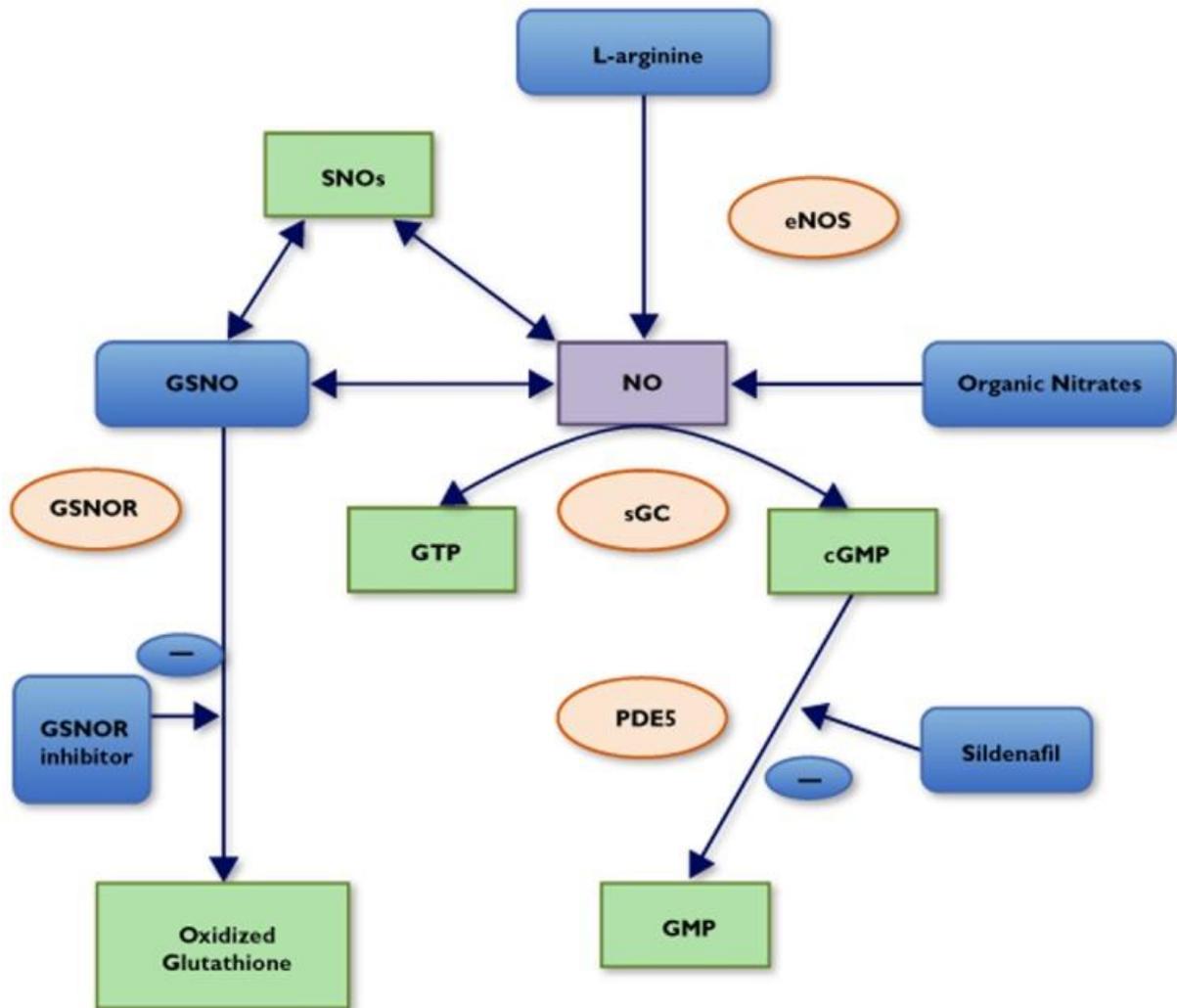


Figure 18 : Aperçu des mécanismes d'action des donneurs de NO et possibles agents thérapeutiques. cGMP, cyclic guanosine 3',5'-monophosphate; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GSNO, S-nitrosoglutathione; GSNOR, S-nitrosoglutathione reductase; GTP, guanosine triphosphate; NO, nitric oxide; PDE5, phosphodiesterase 5; sGC, soluble guanylyl cyclase; SNOs, S-nitrosothiols. (D'après Johal 2014)

Les différents types de donneurs de NO et possibles agents thérapeutiques sont résumés dans la Figure 18.

Les nitrates organiques ont été la première ligne de recherche. Cependant, les preuves de leur efficacité dans la prévention et le traitement de la PE sont actuellement limitées. Leur action pharmacologique non vasculaire a été limitée par l'hypotension, de sorte qu'ils offrent peu d'avantages par rapport aux médicaments existants. De plus, étant donné les effets secondaires importants connus, y compris les maux de tête, l'observance du traitement par le patient peut être affectée. (Deruelle 2010, Johal 2014)

Le S-Nitrosoglutathion a également été administré par voie parentérale en traitement de la PE, mais les données actuelles se limitent à quelques petites études seulement. Bien que, théoriquement, le GSNO soit un donneur de NO sélectif pour les tissus, les données limitées dont on dispose à ce jour ont montré qu'il cible non seulement le dysfonctionnement endothélial de la pré-éclampsie, mais aussi qu'il réduit l'agrégation et l'activation plaquettaire, tout en améliorant la perfusion utéro-placentaire. Il est probable que le GSNO puisse reconstituer les niveaux réduits de glutathion observés chez les femmes en PE, avec peu d'effets secondaires. D'autres recherches sont nécessaires pour déterminer l'apport du GSNO en prévention de la PE. (de Belder 1995, Lees 1996, Johal 2014)

Le sildenafil apparaissait comme une option intéressante avec un effet hypotenseur efficace, mais le seul essai randomisé utilisant le sildenafil chez des femmes enceintes (STRIDER trial) a été stoppé pour des effets indésirables sévères chez le fœtus de mères traitées. (Herraiz 2012, Hawkes 2018, Simon-Tillaux 2018)

La supplémentation alimentaire en L-arginine a été étudiée dans la prévention et le traitement de la PE, avec certains effets qui semblent prometteurs sur de petites séries. Toutefois, les rares essais randomisés ne retrouvent pas de bénéfice dans le traitement du RCIU. (Winer 2009, Vadillo-Ortega 2011)

Les données actuelles sont trop limitées pour recommander ces thérapeutiques en prévention ou traitement de la PE. (Deruelle 2010, Mol 2016)

On peut faire l'hypothèse qu'un traitement associant des donneurs de NO et l'aspirine, pourrait améliorer la prévention de la PE. Des molécules associant un donneur de NO et l'aspirine ont été développées (NCX-4016, NCX-4040), et leur utilisation permettrait de diminuer la pression artérielle dans certains modèles d'hypertension, ainsi que l'inflammation et l'agrégation plaquettaire. (Wallace 2002) Ces traitements n'ont jamais été testés chez la femme enceinte. Ces « nitro-aspirine » sont à l'étude pour leur rôle dans le traitement de divers troubles cardiovasculaires, ce qui pourrait également ouvrir la voie à l'étude de leur utilisation dans la prévention ou le traitement de la PE. (Johal 2014). Cet intérêt supposé est à nuancer du fait des résultats décevants des traitements par donneurs de NO et par antioxydants en prévention de la PE. (Lecarpentier 2016)

### ***Limites de nos travaux***

Une limite importante est l'impossibilité d'étudier au premier trimestre le placenta de patientes qui développeront ensuite une PE. Il n'est en effet pas possible d'utiliser des placentas issus d'interruption de grossesse au premier trimestre car on ne peut pas être certain que la patiente aurait développé ou non une PE. On ne peut qu'extrapoler les résultats observés au moment de l'accouchement.

Les placentas « contrôle » ont été obtenus par césarienne chez des patientes ne présentant aucune pathologie obstétricale pouvant interférer avec les résultats recherchés. Il s'agissait donc principalement de césariennes à terme pour présentation podalique ou utérus cicatriciel. Les patientes ont été ajustées selon l'âge maternel mais pas selon l'âge gestationnel, comme cela est décrit classiquement dans les études sur la PE. (Cindrova-Davies 2007, Przybyl 2016, Zadora 2017)

Enfin, les études fondamentales sur la physiopathologie de la pré-éclampsie sont limitées par l'absence de modèle animal de PE permettant d'étudier tous les aspects spécifiques de la placentation humaine.

Nos travaux apportent de nombreuses données originales *in vivo* et *in vitro* permettant de comprendre (au moins en partie) les mécanismes impliqués dans la dysfonction de eNOS observés au cours de la PE, en lien avec le stress oxydant, la peroxydation lipidique et la sénescence placentaire prématurée.

# **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

Nos travaux de recherche soulignent l'importance du stress oxydant et de l'altération de la voie du NO dans la physiopathologie de la PE. La principale source de NO, eNOS, est très sensible au stress oxydant qui est décompensé au cours de la PE. Nos travaux montrent que eNOS placentaire est glutathionylée au cours de la PE, ce qui induit son découplage et altère son activité. eNOS est également modifiée par la peroxydation lipidique qui est élevée dans les placentas de PE.

A la suite de ces travaux expérimentaux, plusieurs perspectives peuvent être envisagées, sur un plan fondamental et clinique :

***Approfondir l'exploration de la sénescence accélérée dans la PE :***

- Notre projet a pour objectif de corréler l'accumulation des aldéhyde-adduits avec les paramètres d'inflammation (IL-6, TNF $\alpha$ ), le ratio glutathion réduit/oxydé, et le vieillissement (activité SA- $\beta$ gal, expression d'histones modifiées, expression de P21 et de BCl2), dans les placentas de PE.

- Exploration de la voie de l'autophagie : la sénescence cellulaire s'accompagnant classiquement d'une inhibition de l'autophagie, nous étudierons l'expression des marqueurs d'autophagie (LC3-II, beclin1), de même que l'expression du facteur anti-apoptotique BCl2 et les cellules en apoptose par technique TUNEL.

- L'hypothèse d'une glutathionylation irréversible de eNOS reste à confirmer. Nos résultats montrent que eNOS est partiellement glutathionylée de manière irréversible (insensible au DTT), dans les placentas de PE, ce qui suggère une C-glutathionylation (irréversible). Le mécanisme pourrait impliquer une réaction de ONE qui peut se conjuguer à GSH et former des adduits irréversibles – ONE-GSH. (Zhu 2009, Cooper 2011) Des résultats préliminaires en immunofluorescence (confirmés par des études en protéomiques sur la eNOS recombinante) suggèrent que des adduits -ONE-GSH seraient formés dans les placentas de PE, et en partie sur eNOS. La C-glutathionylation est observée au cours du vieillissement tissulaire, en particulier sur les protéines rétinienne des personnes âgées. Sa présence dans les placentas de PE corrobore la théorie de la sénescence placentaire accélérée observée dans les grossesses pathologiques (Cooper 2011, Cindrova-Davies 2018).

***Effet du traitement préventif par aspirine sur les paramètres de stress oxydant, de peroxydation lipidique et les marqueurs de sénescence***

Parmi les perspectives de ce travail, une part importante sera d'étudier l'effet de l'aspirine sur les paramètres de vieillissement placentaire, chez les patientes dépistées à risque élevé de PE et ayant bénéficié d'un traitement préventif par aspirine tout au long de leur grossesse, afin de voir si ce traitement préventif de la PE s'accompagne d'une réversion du processus de vieillissement accéléré. L'aspirine est en effet le seul traitement ayant prouvé son efficacité en traitement préventif de la PE avant terme, chez les patientes dépistées à risque augmenté de PE, si le traitement est instauré avant 16 SA et à une dose de 100-150mg le soir. (Bujold 2011, Roberge 2017, Rolnik 2017) L'objectif serait d'étudier les différents marqueurs précédemment décrits dans le placenta de patientes dépistées à risque selon l'algorithme de la FMF en fonction de l'instauration ou non d'un traitement préventif par aspirine. Ces résultats permettraient d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action de l'aspirine en prévention de la PE.

# **BIBLIOGRAPHIE**

Abi-Said D, Annegers JF, Combs-Cantrell D, Suki R, Frankowski RF, Willmore LJ. A case-control evaluation of treatment efficacy: the example of magnesium sulfate prophylaxis against eclampsia in patients with preeclampsia. *J Clin Epidemiol*. 1997 Apr;50(4):419-23.

Abildgaard U, Heimdal K. Pathogenesis of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP): a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Feb;166(2):117-23.

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Oct;42(10):1634-50.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001 Aug 1;357(Pt 3):593-615.

Anastasiadis P, Tsikouras P, Galazios G, Liberis V, Grapsas X, Koutlaki N, Anastasiadis AF. Hypertensive disorders in pregnancy: risk factors and epidemiologic analysis. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2007;34(3):154-8.

Aouache R, Biquard L, Vaiman D, Miralles F. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).

Aris A, Benali S, Ouellet A, Moutquin JM, Leblanc S. Potential biomarkers of preeclampsia: inverse correlation between hydrogen peroxide and nitric oxide early in maternal circulation and at term in placenta of women with preeclampsia. *Placenta*. 2009 Apr;30(4):342-7.

Askie LM, Duley L, Henderson-Smith DJ, Stewart LA, PARIS Collaborative Group. Antiplatelet agents for prevention of pre-eclampsia: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet*. 26 mai 2007;369(9575):1791-8.

Bainbridge SA, Deng JS, Roberts JM. Increased xanthine oxidase in the skin of preeclamptic women. *Reprod Sci*. 2009 May;16(5):468-78.

Balligand JL, Feron O, Dessy C. ENOS activation by physical forces: From short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* 2009;89:481-534.

Balligand, J.-L., O. Feron, et C. Dessy. 2009. « ENOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues ». *Physiological Reviews* 89 (2): 481-534.

Baltajian K, Bajracharya S, Salahuddin S, Berg AH, Geahchan C, Wenger JB, Thadhani R, Karumanchi SA, Rana S. Sequential plasma angiogenic factors levels in women with suspected preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Jul;215(1):89.e1-89.e10.

Baraibar MA, Friguet B. Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging. *Exp Gerontol*. 2013 Jul;48(7):620-5.

Baxter JK, Weinstein L (2004). HELLP syndrome: the state of the art. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 59, 838–845.

Beaufils M, Uzan S, Donsimoni R, Colau JC. Prevention of pre-eclampsia by early antiplatelet therapy. *Lancet* 1985;1(8433):840–2.

Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33:1–13.

Bendall JK, Alp NJ, Warrick N, Cai S, Adlam D, Rockett K, Yokoyama M, Kawashima S, Channon KM. Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ Res.* 2005 Oct 28;97(9):864-71

Benjamin N, Dutton JA, Ritter JM (1991) Human vascular smooth muscle cells inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate: evidence for generation of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 102:847–850

Bernardi F, Constantino L, Machado R, Petronilho F, Dal-Pizzol F. Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in pre-eclamptic women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2008 Dec;34(6):957-63

Bilodeau JF. Review: maternal and placental antioxidant response to preeclampsia - impact on vasoactive eicosanoids. *Placenta.* 2014 Feb;35 Suppl:S32-8.

Boyd JD, Hamilton WJ. *The Human Placenta.* Cambridge, UK: Heffer and Sons; 1970.

Bujold E, Okun N, Johnson JA, Audibert F. Beyond Fetal Aneuploidy: A Call For A Contemporary Canadian Approach To Prenatal Screening. *J Obstet Gynaecol Can.* 2018 Mar;40(3):273-275

Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, et al. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2010;116(2 Pt 1):402-14

Bujold E, Roberge S, Nicolaides KH. Low-dose aspirin for prevention of adverse outcomes related to abnormal placentation. *Prenat Diagn.* 2014 Jul;34(7):642-8

Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta* 2007;28:S64—9

Burton GJ, Jauniaux E, Charnock-Jones DS. The influence of the intrauterine environment on human placental development. *Int J Develop Biol* 2010;54:303—12.

Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy; the Boyd Collection revisited. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:718—24.

Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2954—9.

Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta* 2009;30:473—82

Carr, D. B., M. Epplen, et al. (2005). "A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* 193(3 Pt 2): 965-972.

Channon K (2004) Tetrahydrobiopterin: Regulator of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease. *Trends in Cardiovascular Medicine* 14:323–327

Chapple SJ, Cheng X, Mann GE. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol.* 2013;1:319-31

Chen CA, Wang TY, Varadharaj S, Reyes LA, Hemann C, Talukder MA, Chen YR, Druhan LJ, Zweier JL. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature.* 2010 Dec 23;468(7327):1115-8

Chen D-D, Chen L-Y, Xie J-B, et al (2014) Tetrahydrobiopterin regulation of eNOS redox function. *Curr Pharm Des* 20:3554–3562

Chuprin A, Gal H, Biron-Shental T, Biran A, Amiel A, Rozenblatt S, Krizhanovsky V. Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev.* 2013 Nov 1;27(21):2356-66

Cindrova-Davies T, Fogarty NME, Jones CJP, Kingdom J, Burton GJ. Evidence of oxidative stress-induced senescence in mature, post-mature and pathological human placentas. *Placenta* 2018;68,15

Cindrova-Davies T, Yung HW, Johns J, Spasic-Boskovic O, Korolchuk S, Jauniaux E, Burton GJ, Charnock-Jones DS. Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. *Am J Pathol.* 2007 Oct;171(4):1168-79

Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Lichtenstein P (2004). Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *Am. J. Med. Genet. A.*, 130A, 365–371

Cocquebert M, Berndt S, Segond N, Guibourdenche J, Murthi P, Aldaz-Carroll L, et al. Comparative expression of hCG betagenes in human trophoblast from early and late first-trimester placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E950—8

Collange O, Launoy A, Kopf-Pottecher A, Dietemann J-L, Pottecher T, Collège national des gynécologues et obstétriciens, et al. (2010). [Eclampsia]. *Ann. Fr. Anesthésie Réanimation*, 29, e75-82.

Conrad KP, Vill M, McGuire PG, Dail WG, Davis AK. Expression of nitric oxide synthase by syncytiotrophoblast in human placental villi. *FASEB J.* 1993 Oct;7(13):1269-76.

Cooper AJ, Pinto JT, Callery PS. Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011;7(7):891-910

Cormick G, Betrán AP, Ciapponi A, Hall DR, Hofmeyr GJ; calcium and Pre-eclampsia Study Group. Inter-pregnancy interval and risk of recurrent pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. *Reprod Health.* 2016 Jul 18;13(1):83.

Cox, L.S. and Redman, C. The role of cellular senescence in ageing of the placenta. *Placenta.* 2017; 52: 139–145

Crabtree MJ, Channon KM (2011) Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric Oxide* 25:81–88.

Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003;9(4):169-76

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med.* 2007 Sep 15;43(6):883-98

De Belder A, Lees C, Martin J, Moncada S, Campbell S. Treatment of HELLP syndrome with nitric oxide donor. *Lancet.* 1995;345:124–125

De Pascali F, Hemann C, Samons K, Chen CA, Zweier JL. Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation. *Biochemistry* 2014;53:3679–88.

Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007 Mar 13;115(10):1285-95. Review.

Deanfield, John E., Julian P. Halcox, et Ton J. Rabelink. 2007. « Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance ». *Circulation* 115 (10): 1285-95.

Dekker, G., P. Y. Robillard, et al. (2011). "The etiology of preeclampsia: the role of the father." *J Reprod Immunol* 89(2): 126-132.

Deneux-Tharoux C, Saucedo M. [Epidemiology of maternal mortality in France, 2010-2012]. *Gynecol Obstet Fertil Senol.* 2017 Dec;45(12S):S8-S21.

Deruelle P, Girard JM, Coutty N, Subtil D. [Prevention of preeclampsia]. *Ann Fr Anesth Reanim.* 2010 Mar;29(3):e31-5.

Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K (1996). The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 175, 902–905.

Doridot L, Châtre L, Ducat A, Vilotte J-L, Lombès A, Méhats C, et al. (2014). Nitroso-Redox Balance and Mitochondrial Homeostasis Are Regulated by STOX1, a Pre-Eclampsia-Associated Gene. *Antioxid. Redox Signal.*,.

Doridot L, Méhats C, Vaiman D (2012). [Comparative analysis of mice models for preeclampsia]. *Ann. Cardiol. Angéiologie*, 61, 234–238.

Doridot L, Passet B, Méhats C, Rigourd V, Barbaux S, Ducat A, et al. (2013). Preeclampsia-Like Symptoms Induced in Mice by Fetoplacental Expression of STOX1 Are Reversed by Aspirin Treatment. *Hypertension*, 61, 662–668.

Duan J, Perdriolle-Galet E, Chabot-Lecoanet AC, Callec R, Beaumont M, Chavatte-Palmer P, Tsatsaris V, Morel O. [Placental 3D Doppler angiography: current and upcoming applications]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2015 Feb;44(2):107-18

Dubar G, Rackelboom T, Tsatsaris V, Mignon A (2012). Prééclampsie. Eclampsie. EMC - Anest.-Rianim., 17, 1–17

Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *Br Med J* 2005;330:565

Eskenazi, B., L. Fenster, et al. (1991). "A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia." *JAMA* 266(2): 237-241.

Esplin, M. S., M. B. Fausett, et al. (2001). "Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia." *N Engl J Med* 344(12): 867-872.

Evain-Brion D, Malassiné A (2010). *Le placenta humain*. Tec & Doc Lavoisier, Cachan; Paris.

Fedorova M, Griesser E, Vemula V, Weber D, Ni Z, Hoffmann R. Protein and lipid carbonylation in cellular model of nitrosative stress: mass spectrometry, biochemistry and microscopy study. *Free Radic Biol Med*. 2014 Oct;75 Suppl 1:S15

Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, et al (2012) The Assessment of Endothelial Function. *Circulation* 126:753–767.

Forman HJ, Ursini F, Maiorino M. An overview of mechanisms of redox signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:2-9

Furukawa A, Tada-Oikawa S, Kawanishi S, Oikawa S. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD<sup>+</sup> depletion. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(1-4):45-54

Galligan JJ , Rose KL , Beavers WN , Hill S , Tallman KA , Tansey WP , Marnett LJ , . *Journal of the American Chemical Society*. 2014 8 27; 136(34)

Garcia M, Mulvagh SL, Merz CN, Buring JE, Manson JE. Cardiovascular Disease in Women: Clinical Perspectives. *Circ Res*. 2016 Apr 15;118(8):1273-93.

Gembachev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 1997;277:1669—72.

Gielis JF, Lin JY, Wingler K, Van Schil PE, Schmidt HH, et al. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radic Biol Med*. 2011 Apr 1;50(7):765-76.

Goffinet, F. [Epidemiology]. *Ann. Fr. Anesthésie Réanimation* 29, e7–e12 (2010).

Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001;7(2):175–89

Guibourdenche J, Leguy MC, Tsatsaris V. [Biology and markers of preeclampsia]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2013;71:79-87.

Haddad, B., Barton, J. R., Livingston, J. C., Chahine, R. & Sibai, B. M. HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) syndrome versus severe preeclampsia: onset at < or =28.0 weeks' gestation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 183, 1475–1479 (2000)

Hawkes N. Trial of Viagra for fetal growth restriction is halted after baby deaths. *BMJ* 2018; 362: k3247

Heiss EH, Dirsch VM. Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification. *Curr Pharm Des.* 2014;20(22):3503-13.

Hempstock J, Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Burton GJ. Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;20:58.

Hernández-Díaz S, Toh S, Cnattingius S. Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. *BMJ.* 18 juin 2009;338:b2255.

Herraiz S, Pellicer B, Serra V, Cauli O, Cortijo J, Felipo V, Pellicer A. Sildenafil citrate improves perinatal outcome in fetuses from pre-eclamptic rats. *BJOG.* 2012 Oct; 119(11):1394-402.

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y (2009) Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73:411–418

Hnat, M. D.; Meadows, J. W.; Brockman, D. E.; Pitzer, B.; Lyall, F.; Myatt, L. Heat shock protein-70 and 4-hydroxy-2-nonenal adducts in human placental villous tissue of normotensive, preeclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:836-840.

Hofmeyr GJ, Lawrie TA, Atallah ÁN, Torloni MR. Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 Oct 1;10:CD001059.

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996;76:967-1003

Hustin J, Schaaps JP. Echographic and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157:162—8

Hutcheon JA, Lisonkova S, Joseph KS. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Aug;25(4):391-403

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, et al (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9265– 9269

Jauniaux E, Burton GJ. Le rôle du stress oxydant dans les pathologies placentaires de la grossesse. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* (2016)

Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the fetus — a review. *Placenta* 2003;24:S86—93.

- Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol* 2003;162:115—25
- Jauniaux E, Pahal GS, Gervy C, Gulbis B. Blood biochemistry and endocrinology in the human fetus between 11 and 17 weeks of gestation. *Reprod Biomed On-line* 2000;1:38—44.
- Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 2006;12:747—55.
- Jauniaux E, Watson AL, Burton GJ. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:998—1003
- Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao Y-P, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress; a possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 2000;157:2111—22.
- Johal T, Lees CC, Everett TR, Wilkinson IB. The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia. *Br J Clin Pharmacol.* 2014 Aug;78(2):244-57
- Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295(4):C849—68.
- Julius M, Lang CA, Gleiberman L, Harburg E, DiFranceisco W, Schork A. Glutathione and morbidity in a community-based sample of elderly. *J Clin Epidemiol.* 1994 Sep;47(9):1021-6
- Kukor Z, Valent S, Tóth M. Regulation of nitric oxide synthase activity by tetrahydrobiopterin in human placentae from normal and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta.* 2000 Nov;21(8):763-72
- Lecarpentier E, Fournier T, Guibourdenche J, Tsatsaris V. [Pathophysiology of preeclampsia]. *Presse Med.* 2016 Jul-Aug;45(7-8 Pt 1):631-7
- Lecarpentier E, Fournier T, Guibourdenche J, Gil S, Tsatsaris V. Le placenta humain. *EMC – Obstétrique/Gynécologie* 2015;10(2):1-18
- Lecarpentier E, Haddad B, Goffinet F, Tsatsaris V. [Medical approaches for managing preeclampsia]. *Presse Med.* 2016 Jul-Aug;45(7-8 Pt 1):638-45
- Lee SH, Blair IA. Characterization of 4-oxo-2-nonenal as a novel product of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 2000;13:698—702. 71.
- Lee VM, Quinn PA, Jennings SC, Ng LL. NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension.* 2003 Apr;41(4):925-31
- Lees C, Langford E, Brown AS, de Belder A, Pickles A, Martin JF, Campbell S. The effects of S-nitrosoglutathione on platelet activation, hypertension, and uterine and fetal Doppler in severe preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 1996;88:14—19
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, et al. CPEP Study Group. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006 Sep 7;355(10):992-1005.

- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 672-683
- Levine RL, Stadtman ER. 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 36:1495–1502
- Li H, Jamal J, Plaza C, et al (2014) Structures of human constitutive nitric oxide synthases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70:2667–2674
- Lie, R. T., S. Rasmussen, et al. (1998). "Fetal and maternal contributions to risk of preeclampsia: population based study." *BMJ* 316(7141): 1343-1347.
- Lin D, Lee HG, Liu Q, et al. 4-Oxo-2-nonenal is both more neurotoxic and more protein reactive than 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol.* 2005;18(8):1219-31.
- Lindheimer MD, Taylor RN, Roberts JM, Cunningham FG, Chesley L (2015). Introduction, History, Controversies, and Definitions, in: *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*, Elsevier, pp. 1–24
- Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280(4):C719–41.
- Madazli R, Benian A, Aydin S, Uzun H, Tolun N. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol.* 2002 Sep;22(5):477-80
- Maiti, K., Sultana, Z., Aitken, R.J. et al. Evidence that fetal death is associated with placental aging. *Am J Obstet Gynecol.* 2017; 217: 441.e114
- Marengo B, De Ciucis C, Verzola D, Pistoia V, Raffaghello L, Patriarca S, Balbis E, Traverso N, Cottalasso D, Pronzato MA, Marinari UM, Domenicotti C. Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free Radic Biol Med.* 2008 Feb 1;44(3):474-82.
- Martin D, Conrad KP. Expression of endothelial nitric oxide synthase by extravillous trophoblast cells in the human placenta. *Placenta.* 2000 Jan;21(1):23-31
- Méhats C, Miralles F, Vaiman D. [New perspectives on preeclampsia]. *Med Sci (Paris).* 2017 Dec;33(12):1079-1088
- Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995; 251: 3-7
- Melikian N, Seddon MD, Casadei B, et al (2009) Neuronal Nitric Oxide Synthase and Human Vascular Regulation. *Trends in Cardiovascular Medicine* 19:256–262
- Meziat C. Hyperglycémie et tissu adipeux, deux acteurs de la dysfonction vasculaire : implication du couple stress oxydant - eNOS et modulation par l'exercice physique. *Cardiologie et système cardiovasculaire.* Université d'Avignon, 2016.
- Mieyal J.J, Chock P.B. Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: focus on s-glutathionylation, *Antioxid. Redox Signal.* 2012;16, 471–475.

- Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJM, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2016 Mar 5;387(10022):999-1011.
- Moore PK, al-Swayeh OA, Chong NW, Evans RA, Gibson A. L-*ng*-nitro arginine (l-noarg), a novel, l-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br J Pharmacol* 1990;99:408-412.
- Morand J. Dysfonction cardiovasculaire et arythmies ventriculaires de l'ischémie-reperfusion : effets délétères de l'hypoxie intermittente et protecteurs de la supplémentation en zinc. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. <NNT : 2017GREAV015>
- Morel O, Pachy F, Chavatte-Palmer P, Bonneau M, Gayat E, Laigre P, Evain-Brion D, Tsatsaris V. Correlation between uteroplacental three-dimensional power Doppler indices and true uterine blood flow: evaluation in a pregnant sheep model. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2010 Nov;36(5):635-40
- Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, et al. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women—2011 update. *Circulation*. 2011;CIR-0b013e31820faaf8.
- Motta-Mejia C, Kandzija N, Zhang W, Mhlomi V, Cerdeira AS, Burdujan A, Tannetta D, Dragovic R, Sargent IL, Redman CW, Kishore U, Vatish M. Placental Vesicles Carry Active Endothelial Nitric Oxide Synthase and Their Activity is Reduced in Preeclampsia. *Hypertension*. 2017 Aug;70(2):372-381.
- Mounier-Vehier C, Madika A-L, Boudghène-Stambouli F, Ledieu G, Delsart P, Tsatsaris V. Hypertensions artérielles de la grossesse et devenir maternel. *Presse Médicale*. 1 juill 2016;45(7):659-66.
- Näsström T, Wahlberg T, Karlsson M, Nikolajeff F, Lannfelt L, Ingelsson M, Bergström J. The lipid peroxidation metabolite 4-oxo-2-nonenal cross-links  $\alpha$ -synuclein causing rapid formation of stable oligomers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;378;872-876.
- Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 2010;44(10):1125-71.
- O'Brien M, McCarthy T, Jenkins D, Paul P, Dausset J, Carosella ED, et al. (2001). Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, 58, 1943–1949.
- Palm F, Onozato ML, Luo Z, Wilcox CS (2007) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 293:H3227– H3245
- Pautz A, Art J, Hahn S, et al (2010) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23:75–93
- Picklo MJ, Azenkeng A, Hoffmann MR. Trans-4-oxo-2-nonenal potently alters mitochondrial function. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(2):400-7.

Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Dixon G, Brosens I. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta* 1981;2:303—16.

Pijnenborg R, Vercruyssen L, Carter AM. Deep trophoblast invasion and spiral artery remodelling in the placental bed of the lowland gorilla. *Placenta* 2011;32:586—91

Poon LC, Nicolaides KH. Early prediction of preeclampsia. *Obstet Gynecol Int* 2014 ; 2014, 297397

Poon LC, Nicolaides KH. First-trimester maternal factors and biomarker screening for preeclampsia. *Prenat Diagn* 2014 ; 34 : 618-27

Poon LC, Wright D, Rolnik DL, Syngelaki A, Delgado JL, Tsokaki T, et al. Aspirin for Evidence-Based Preeclampsia Prevention trial: effect of aspirin in prevention of preterm preeclampsia in subgroups of women according to their characteristics and medical and obstetrical history. *Am J Obstet Gynecol* 2017;217:585.e1—5.

Przybyl L, Haase N, Golic M, Rugor J, Solano ME, Arck PC, Gauster M, Huppertz B, Emontzpoehl C, Stoppe C, Bernhagen J, Leng L, Bucala R, Schulz H, Heuser A, Weedon-Fekjær MS, Johnsen GM, Peetz D, Luft FC, Staff AC, Müller DN, Dechend R, Herse F. CD74-Downregulation of Placental Macrophage-Trophoblastic Interactions in Preeclampsia. *Circ Res.* 2016 Jun 24;119(1):55-68

Qanungo S, Mukherjea M. Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem* 2000;215(1–2):11–9.

Raijmakers MT, Dechend R, Poston L. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension.* 2004 Oct;44(4):374-80

Randall MJ, Haenen GR, Bouwman FG, van der Vliet A, Bast A. The tobacco smoke component acrolein induces glucocorticoid resistant gene expression via inhibition of histone deacetylase. *Toxicol Lett.* 2016 Jan 5;240(1):43-9

Ravi K, Brennan LA, Levic S, et al (2004) S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *PNAS* 101:2619– 2624

Redman CW. Pre-eclampsia: Definitions, paternal contributions and a four stage model. *Pregnancy Hypertens.* 2011 Jan;1(1):2-5.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990;101:746-752.

Roberge S, Bujold E, Nicolaides KH. Aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2018 Mar;218(3):287-293.e1

Roberge S, Nicolaides K, Demers S, Hyett J, Chaillet N, Bujold E. The role of aspirin dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2017 Feb;216(2):110-120.e6.

Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet* 1999;354(9181):788–9.

- Robillard, P. Y., G. A. Dekker, et al. (1999). "Revisiting the epidemiological standard of preeclampsia: primigravidity or primipaternity?" *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 84(1): 37-41.
- Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992;80(2):283–5.
- Roggensack AM, Zhang Y, Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension*. 1999 Jan;33(1):83-9.
- Ros, H. S., S. Cnattingius, et al. (1998). "Comparison of risk factors for preeclampsia and gestational hypertension in a population-based cohort study." *Am J Epidemiol* 147(11): 1062-1070
- Rudra, C. B.; Qiu, C.; David, R. M.; Bralley, J. A.; Walsh, S. W.; Williams, M. A. A prospective study of early-pregnancy plasma malondialdehyde concentration and risk of preeclampsia. *Clin Biochem* 2006;39:722-726
- Sánchez-Aranguren LC, Prada CE, Riaño-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front Physiol*. 2014 Oct 10;5:372
- Saucedo M, Deneux-Tharaux C, Bouvier-Colle M-H, others. Épidémiologie de la mortalité maternelle en France, 2007–2009. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod*. 2013;42(7):613–627.
- Savidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaidis KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet*. 2003 May 3;361(9368):1511-7
- Schieve, L. A., A. Handler, et al. (1994). "Urinary tract infection during pregnancy: its association with maternal morbidity and perinatal outcome." *Am J Public Health* 84(3): 405-410.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of irag, ip3 receptor and cgmp kinase ibeta. *Nature* 2000;404:197-201.
- Seddon M, Melikian N, Dworakowski R, et al (2009) Effects of Neuronal Nitric Oxide Synthase on Human Coronary Artery Diameter and Blood Flow In Vivo. *Circulation* 119:2656–2662
- Seddon MD, Chowienczyk PJ, Brett SE, et al (2008) Neuronal Nitric Oxide Synthase Regulates Basal Microvascular Tone in Humans In Vivo. *Circulation* 117:1991–1996
- Siddiqui LA, Jaleel A, Tamimi W, Al Kadri H.M.F. Role of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2010 ; 282 : 469-474
- Simon-Tillaux N, Lecarpentier E, Tsatsaris V, Hertig A. Sildenafil for the treatment of preeclampsia, an update: should we still be enthusiastic? *Nephrol Dial Transplant*. 2018 Nov 6. doi: 10.1093/ndt/gfy328
- Soothill PW, Nicolaidis KH, Rodeck CH, Gamsu H. Blood gases and acid-base status of the human second-trimester fetus. *Obstet Gynecol* 1986;68:173–6.

Stewart BJ, Doorn JA, Petersen DR. Residue-specific adduction of tubulin by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal causes cross-linking and inhibits polymerization. *Chem. Res. Toxicol.* 2007;20:1111-1119.

Sultana Z, Maiti K, Dedman L, Smith R. Is there a role for placental senescence in the genesis of obstetric complications and fetal growth restriction? *Am J Obstet Gynecol.* 2018 Feb;218(2S):S762-S773

Tanaka K, Nishigori H, Watanabe Z, Iwama N, Satoh M, Murakami T, Hamada H, Hoshiai T, Saito M, Mizuno S, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Fujiwara I, Kuriyama S, Arima T, Nakai K, Yaegashi N, Metoki H; and Japan Environment & Children's Study Group. Higher prevalence of hypertensive disorders of pregnancy in women who smoke: the Japan environment and children's study. *Hypertens Res.* 2019 Jan 21.

Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57(5):609–13.

Torchin H, Ancel PY, Goffinet F, Hascoët JM, Truffert P, Tran D, Lebeaux C, Jarreau PH. Placental Complications and Bronchopulmonary Dysplasia: EIPAGE-2 Cohort Study. *Pediatrics.* 2016 Mar;137(3):e20152163.

Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR et al. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5555-63

Vadillo-Ortega F, Perichart-Perera O, Espino S, Avila-Vergara MA, Ibarra I, Ahued R, Godines M, Parry S, Macones G, Strauss JF. Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on pre-eclampsia in high risk population: randomised controlled trial. *BMJ.* 2011;342:d2901

Vallance P, Leiper J (2004) Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24:1023–1030

van Dijk M, Mulders J, Poutsma A, Könst AAM, Lachmeijer AMA, Dekker GA, et al. (2005). Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat. Genet.*, 37, 514–519

van Oostwaard MF, Langenveld J, Schuit E, Papatsonis DNM, Brown MA, Byaruhanga RN, et al. Recurrence of hypertensive disorders of pregnancy: an individual patient data metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* mai 2015;212(5):624.e1-17

Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, et al. An automated method for the determination of the sFlt1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2010 ; 202 : 161 e1-61 e11.

Villar, J., G. Carroli, et al. (2006). "Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions?" *Am J Obstet Gynecol* 194(4): 921-931

Wallace JL, Ignarro LJ, Fiorucci S. Potential cardioprotective actions of no-releasing aspirin. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 May;1(5):375-82.

Wang K, Chen Y, Ferguson SD, Leach RE. MTA1 and MTA3 regulate HIF1a expression in hypoxia-treated human trophoblast cell line HTR8/Svneo. *Med J Obstet Gynecol* 2013;1(3.).

Ward K, Taylor RN (2015). Genetic Factors in the Etiology of Preeclampsia/Eclampsia, in: *Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy*. Elsevier, pp. 57–80.

Watson AL, Palmer ME, Jauniaux E and Burton GJ. Variations in expression of copper/zinc superoxide dismutase in villous trophoblast of the human placenta with gestational age. *Placenta* 1997;18:295–299.

Whitsett J., Picklo M.J., Sr, Vasquez-Vivar J. 4-Hydroxy-2-nonenal increases superoxide anion radical in endothelial cells via stimulated GTP cyclohydrolase proteasomal degradation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2007

Winer N, Branger B, Azria E, Tsatsaris V, Philippe HJ, Rozé JC, Descamps P, Boog G, Cynober L, Darmaun D. L-Arginine treatment for severe vascular fetal intrauterine growth restriction: a randomized double-blind controlled trial. *Clin Nutr.* 2009 Jun;28(3):243-8

Wright D, Akolekar R, Syngelaki A, Poon LC, Nicolaides KH. A competing risks model in early screening for preeclampsia. *Fetal Diagn Ther* 2012; 32 : 171-8.

Wu G, Morris SM (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1):1–17.

Wu P, Haththotuwa R, Kwok CS, Babu A, Kotronias RA, Rushton C, Zaman A, Fryer AA, Kadam U, Chew-Graham CA, Mamas MA. Preeclampsia and Future Cardiovascular Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2017 Feb;10(2)

Ying W, Catov JM, Ouyang P. Hypertensive Disorders of Pregnancy and Future Maternal Cardiovascular Risk. *J Am Heart Assoc.* 2018 Sep 4;7(17):e009382

Young B, Hacker MR, Rana S. Physicians' knowledge of future vascular disease in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2012;31(1):50-8

Zadora J, Singh M, Herse F, Przybyl L, Haase N, Golic M, Yung HW, Huppertz B, Cartwright JE, Whitley G, Johnsen GM, Levi G, Isbruch A, Schulz H, Luft FC, Müller DN, Staff AC, Hurst LD, Dechend R, Izsvák Z. Disturbed Placental Imprinting in Preeclampsia Leads to Altered Expression of DLX5, a Human-Specific Early Trophoblast Marker. *Circulation.* 2017 Nov 7;136(19):1824-1839

Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennstrom M, et al. Predictive value of the sFlt-1:PIGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Engl J Med* 2016 ; 374 : 13-22.

Zeng F, Zhu S, Wong MC, Yang Z, Tang J, Li K, Su X. Associations between nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and preeclampsia risk: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2016 Mar 21;6:23407.

Zhang, J., J. Zeisler, et al. (1997). "Epidemiology of pregnancy-induced hypertension." *Epidemiol Rev* 19(2): 218-232

Zhu X, Gallogly MM, Mieyal JJ, et al. Covalent cross-linking of glutathione and carnosine to proteins by 4-oxo-2-nonenal. *Chemical Res. Toxicol.* 2009;22:1050–1059

Zusterzeel PL, Peters WH, Visser W, Hermesen KJ, Roelofs HM, Steegers EA (2001). A polymorphism in the gene for microsomal epoxide hydrolase is associated with pre-eclampsia. *J. Med. Genet.*, 38, 234–237.

Zwart JJ, Richters A, Öry F, de Vries JJ, Bloemenkamp KW, van Roosmalen J. Eclampsia in the Netherlands. *Obstet Gynecol.* 2008;112(4):820–827.

Zweier JL, Chen CA, Druhan LJ. S-glutathionylation reshapes our understanding of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and nitric oxide/reactive oxygen species-mediated signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2011 May 15;14(10):1769-75

# **ANNEXES**



Disponible en ligne sur

ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte  
www.em-consulte.com



Tribune des internes

## Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la pré-éclampsie : mise au point



*Oxidative stress and preeclampsia: A review*

P. Guerby<sup>a,\*</sup>, F. Vidal<sup>a</sup>, S. Garoby-Salom<sup>b</sup>, C. Vayssiere<sup>a,c</sup>, R. Salvayre<sup>b</sup>,  
O. Parant<sup>a,c</sup>, A. Negre-Salvayre<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pôle de gynécologie obstétrique, hôpital Paule-de-Viguier, CHU de Toulouse, 330, avenue de Grande-Bretagne, 31059 Toulouse cedex 9, France

<sup>b</sup> Inserm UMR-1048, université de Toulouse, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, France

<sup>c</sup> Université de Toulouse III, UMR1027, 31073 Toulouse, France

### INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 2 juin 2015

Accepté le 15 septembre 2015

Disponible sur Internet le 21 octobre 2015

Mots clés :

Pré-éclampsie  
Stress oxydant  
Physiopathologie  
Antioxydant  
Placenta

Keywords:

Preeclampsia  
Oxidative stress  
Pathophysiology  
Antioxidant  
Placenta

### RÉSUMÉ

La pré-éclampsie (PE) est définie comme une hypertension de novo et une protéinurie après 20 semaines de gestation chez des femmes normotendues, avec une incidence de 3 à 7 % des grossesses. La physiopathologie de la PE reste imparfaitement comprise et est caractérisée par un modèle en deux étapes : la phase présymptomatique avec défaut d'invasion trophoblastique et défaut de remodelage vasculaire utérin ; et la phase symptomatique (le syndrome maternel) au cours de laquelle la patiente développe une réaction inflammatoire systémique avec dysfonction endothéliale généralisée. Le stress oxydant intervient dans chaque étape de ce modèle et pourrait être le « dénominateur commun » à toutes les formes de PE. L'objectif de ce travail est donc de préciser l'implication du stress oxydant dans la pathogenèse de la PE. Le stress oxydant survient lorsque la production d'espèces réactives de l'oxygène n'est plus compensée par l'activation concomitante des systèmes de défenses antioxydantes. Les conséquences du stress oxydant se traduisent par des réponses inflammatoires et de la toxicité. Le stress oxydant apparaît majoré lors de l'invasion trophoblastique en cas de pré-éclampsie, et serait à la fois cause et conséquence du syndrome maternel car il participe également au dysfonctionnement endothélial et à la réponse inflammatoire systémique, en accentuant la libération de débris trophoblastiques dans la circulation maternelle et en étant majoré par ces mêmes produits.

© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### ABSTRACT

Preeclampsia is a leading cause of pregnancy complications and affects 3–7% of pregnant women. Pathophysiology of preeclampsia is still unclear. According to the two-stage model of preeclampsia, the abnormal and hypoperfused placenta (stage 1) releases factors to the bloodstream, which are responsible for the maternal symptoms (stage 2), characterised by a systemic inflammation and endothelial dysfunction. Oxidative stress plays an important role in the pathophysiology of the preeclampsia and could be the common denominator between the two. This review summarizes the current knowledge of a new potential etiology of the disease, with a special focus on oxidative stress. We also review the different factors that have been proposed to cause endothelial cell dysfunction in preeclampsia, and trials investigating the role of antioxidant supplementation in preeclampsia.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : paul.guerby@gmail.com (P. Guerby).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gyobfe.2015.09.011>

1297-9589/© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

## 1. Introduction

La pré-éclampsie (PE) est définie comme une hypertension de novo et une protéinurie après 20 semaines de gestation chez des femmes normotendues a priori, avec une incidence de 3 à 7 % des grossesses dans les pays industrialisés [1,2]. Elle peut être source de complications sévères telles que le HELLP syndrome (Hemolysis, Elevated Liver enzyme, Low Platelet count) ou l'éclampsie, et est une cause majeure de morbi-mortalité périnatale, notamment dans les pays en voie de développement. De nombreux facteurs de risque lui sont associés, tels que la nulliparité, l'âge maternel, l'obésité, les antécédents personnels et familiaux de pré-éclampsie, les grossesses issues d'assistance médicale à la procréation [3,4].

La PE est une pathologie dont l'origine est placentaire, spécifique à l'espèce humaine et à la gestation : elle ne survient qu'en cas de grossesse et se résout après extraction du placenta. Un syndrome pré-éclampsique est néanmoins possible en l'absence d'embryon (grossesse molaire) ou en dehors de l'environnement utérin (grossesse abdominale).

La physiopathologie de la PE reste imparfaitement comprise. Redman et Roberts proposent un modèle physiopathologique en 2 étapes [1,2]. La première étape correspond à un défaut de placentation avec perfusion placentaire insuffisante (phase pré-symptomatique) responsable notamment d'un stress oxydant. La deuxième étape est définie par l'apparition du syndrome maternel (phase symptomatique) au cours duquel la patiente développe une réaction inflammatoire systémique impliquant des lésions de l'endothélium vasculaire, des thromboses et une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. L'ensemble génère une réduction de la perfusion de tous les organes et potentiellement une défaillance multiviscérale. Les liens entre ces deux étapes et la prédiction du syndrome maternel sont encore mal élucidés [5–7]. Le stress oxydant intervient dans chaque étape de ce modèle et pourrait être le « dénominateur commun » à toutes les formes de PE.

Cette revue a pour objectif de faire le point sur l'implication du stress oxydant dans chaque étape de la pathogenèse de la PE, en particulier son rôle dans le défaut d'invasion trophoblastique en début de grossesse, dans la dysfonction endothéliale et dans la réaction inflammatoire systémique observées au cours du syndrome maternel. Le but de cet article est donc de synthétiser les dernières données concernant ce thème d'actualité et de proposer des pistes de recherche.

## 2. Physiopathologie de la PE

### 2.1. 1<sup>re</sup> étape

Au cours d'une grossesse normale, les artères spiralées (branches terminales de petit diamètre des artères utérines assurant la vascularisation de l'endomètre, comprenant une couche musculaire lisse et une limitante élastique interne) se modifient de manière physiologique afin de permettre la vascularisation de l'espace intervilloux. Cette modification se caractérise par une dilatation luminale terminale ainsi qu'une perte de la composante élastique interne et de la couche musculaire lisse. Cette étape de remodelage se fait dans un environnement hypoxique (1 à 2 % de pression en oxygène), le retour à la normoxie s'opérant progressivement avec le développement de la vascularisation du placenta.

Les patientes pré-éclampsiques présentent un défaut de remodelage des artères spiralées utérines par les cytotrophoblastes extravilloux. Ce défaut de remodelage, dû à une invasion trop superficielle, entraîne une augmentation de la résistance vasculaire et la réduction de la perfusion utéroplacentaire ainsi que

des lésions d'athérose et d'ischémie placentaire [8,9]. Ces observations sont cohérentes avec les anomalies de résistance et de pulsatilité observées par le doppler des artères utérines à la fin du premier trimestre chez les femmes qui vont par la suite développer une PE [10].

Ainsi, la première étape correspond à un défaut d'invasion trophoblastique et de remodelage vasculaire utérin au niveau des artères spiralées, d'où une perfusion placentaire insuffisante. La conséquence de cette perfusion inadéquate est une hypoxie intermittente au niveau de la chambre intervillieuse et la génération d'un stress oxydant, avec en aval la libération de protéines anti-angiogéniques ou l'activation des voies de l'inflammation. Les données récentes suggèrent que les modifications au niveau du syncytiotrophoblaste induites par tous ces mécanismes aboutissent à une fragmentation de sa surface. L'altération des fonctions endocrines et métaboliques du placenta ainsi que les phénomènes d'apoptose et de nécrose placentaire favorisent la libération de débris placentaires toxiques (STBM) et de leur contenu (ARN, ADN et protéines). Ces débris placentaires sont à l'origine d'une altération de la fonction endothéliale maternelle et d'une augmentation de la réponse inflammatoire liée à la grossesse, responsables de la deuxième étape : le syndrome maternel [5,11–13].

### 2.2. 2<sup>e</sup> étape

La pré-éclampsie ne se résume pas à l'hypertension artérielle associée à une protéinurie significative. Elle se caractérise par une dysfonction endothéliale et une réponse inflammatoire systémique [2,6]. L'examen anatomopathologique de placentas issus de patientes pré-éclampsiques montre des séquelles d'hémorragie et de nécrose, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'insuffisance de perfusion [2]. L'atteinte histologique caractéristique est l'endothéliose glomérulaire au niveau rénal [14] suggérant un rôle central pour l'endothélium dans la PE.

La libération des facteurs sécrétés par le placenta et des STBM dans la circulation maternelle induit une réponse inflammatoire sur l'endothélium qui contribue à l'extension de la maladie. De nombreux marqueurs d'inflammation, notamment les cytokines IL-6, IL-1 bêta, TNF $\alpha$  sont augmentés au cours de la PE [15,16], de même que le stress oxydant qui serait cause et conséquence de cette inflammation [17]. Les STBM induisent également une réponse inflammatoire systémique avec une augmentation des monocytes, de cellules NK, de cellules dendritiques et des neutrophiles, par activation de récepteurs Toll-like (TLR) et NF- $\kappa$ B [18,19]. La modification de la perfusion placentaire observée au cours de la pré-éclampsie crée un changement de l'environnement placentaire, dans lequel la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'activation des cellules endothéliales entraînent un dysfonctionnement généralisé de l'endothélium. De nombreux marqueurs circulants d'activation ou de dysfonctionnement endothélial sont retrouvés dans la circulation ou les urines maternelles tels que l'endothéline-1, le facteur von Willebrand, des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8) [20]. Les principales conséquences sont l'altération de la réactivité vasculaire aux substances vasomodulatrices, une activation de la coagulation, une augmentation de la perméabilité capillaire et une diminution de la production de monoxyde d'azote (NO) [21]. Cette perte de biodisponibilité du NO a des conséquences délétères sur la dysfonction endothéliale au cours de la PE, car cela contribue à l'augmentation de la pression sanguine (résultant de la perte des propriétés vasodilatatrices du NO). De plus, le NO étant un inhibiteur de l'adhésion et de l'activation plaquettaire, son déficit dans la PE expliquerait (au moins en partie) l'activation et l'agrégation plaquettaire qui sont observées chez les patientes en PE [22].

Un des mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale concerne le relargage de sFLT1 (*soluble fms-like tyrosine kinase 1* ou sVEGFR-1, forme soluble du récepteur du VEGF de type 1). Le sFLT1, protéine circulante anti-angiogénique, est un inhibiteur endogène du VEGF et un antagoniste compétitif du PlGF. Le VEGF et le PlGF sont des facteurs de croissance impliqués dans les processus d'angiogenèse et de vasculogenèse, indispensables à la survie des cellules endothéliales. De nombreuses études ont rapporté que le VEGF et le PlGF sont inhibés par le sFLT1 au cours de la PE [23–26]. Cette carence en VEGF et PlGF contribue donc à l'atteinte endothéliale.

La production d'endogline soluble augmente et potentialise la dysfonction endothéliale induite par sFLT1 en modifiant la perméabilité vasculaire [26,27]. On note également une augmentation des résistances vasculaires périphériques due à l'activation du système rénine-angiotensine par les cytokines placentaires [28–30], de même qu'une altération de la réponse au tonus vasculaire et de la résistance périphérique, avec une chute de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et du NO, et une augmentation du thromboxane (TxA<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub>). Les activités endothéliales eNOS et cyclooxygénase qui augmentent au cours de la grossesse sont en effet inhibées dans la prééclampsie d'où une vasoconstriction et une modification de la perméabilité capillaire en partie responsables de l'œdème et de l'hypertension [11]. Les patientes prééclamptiques peuvent présenter des lésions d'athérosclérose localisées au niveau des artères spiralées avec activation plaquettaire (production de TxA<sub>2</sub>), dépôts de fibrine et de complément, et présence de cellules spumeuses [11,31]. Les patientes ayant un antécédent de pré-éclampsie ont ainsi un risque cardiovasculaire augmenté [32].

Le défaut de perfusion placentaire n'est cependant pas suffisant pour induire un syndrome pré-éclamptique. En effet, un défaut de remodelage vasculaire utérin et d'invasion trophoblastique s'observe également en cas de retard de croissance intra-utérin sans PE associée et dans un tiers des accouchements prématurés [33], ce qui souligne l'influence de paramètres maternels spécifiques sur l'apparition ou non du syndrome pré-éclamptique [5]. Le lien entre ces deux étapes est encore méconnu. Il est admis que lors de la pré-éclampsie, les diverses substances placentaires, libérées par la dysfonction du placenta (possiblement par l'hypoxie et le stress oxydant), altèrent la fonction endothéliale systémique, cependant l'effet dépend de la sensibilité propre de la femme. Sont inclus des facteurs anti-angiogéniques [34], des cytokines [15] et les STBM [35]. Le stress oxydant pourrait être le lien entre ces 2 étapes [17], en participant à la libération des ces diverses substances et en étant généré par ces mêmes produits [1,5].

### 3. Stress oxydant et grossesse

Les dérivés actifs de l'oxygène (ROS) sont des molécules simples issues du métabolisme de l'oxygène, produites physiologiquement dans tous les organismes aérobies. Les espèces les plus réactives sont le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>), le radical peroxyde (ROO<sup>•</sup>), et à un moindre degré l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) devient actif en présence d'ions de métaux de transition (cuivre, fer) qui catalyse la réaction de Fenton et génère OH<sup>•</sup>. L'oxyde nitrique (°NO) est un radical de l'azote qui peut réagir avec (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) pour former des ions peroxyde qui peuvent réagir avec divers constituants cellulaires (par exemple, lipides, protéines, DNA) [36].

Les ROS se comportent comme des seconds messagers indispensables dans diverses réponses cellulaires (prolifération, migration, angiogenèse). Dans les conditions normales, les ROS sont rapidement captés (par des antioxydants tels les vitamines C et E) ou métabolisés par de multiples systèmes de défenses

antioxydantes (par exemple, superoxyde dismutases SOD, glutathion peroxydases GPx, catalase, thioredoxines, peroxyredoxines...). Le stress oxydant survient lorsque la production de ROS dépasse les capacités des systèmes de défenses antioxydantes. Les conséquences du stress oxydant se traduisent par des réponses inflammatoires et de la toxicité.

Un des mécanismes majeurs responsables de production de ROS est la réponse à l'hypoxie-reperfusion (réduction du flux sanguin dans un organe suivi par une reperfusion) [37]. Ce mécanisme est observé pendant la grossesse, au cours de laquelle la perfusion placentaire est sujette à de nombreuses variations en fonction de la posture, de l'alimentation, des exercices ou des contractions utérines [38]. De plus, physiologiquement, l'unité fœtoplacentaire se développe dans un environnement très hypoxique vers 8–10 SA, puis sa vascularisation permet d'enrichir cet environnement en oxygène au cours de sa maturation vers 13–14 SA, source de ROS physiologiques et essentiels au développement d'une grossesse normale [39–41]. La grossesse favorise donc le stress oxydatif, notamment par le développement rapide du placenta qui sollicite au maximum les mitochondries [42]. En effet, la grossesse induit des modifications hémodynamiques avec augmentation de la consommation énergétique de base et en oxygène de différents organes, y compris au niveau de l'unité fœtoplacentaire. Le placenta est riche en mitochondries, possède une vascularisation riche et consomme environ 1 % du métabolisme de base de la femme enceinte. Par ailleurs le NO est localement produit par le placenta et contribue à la production de ROS physiologiques et nécessaires à la placentation normale [43]. On note également une diminution de l'activité superoxyde dismutase (SOD) et du taux de thiols plasmatiques, alors que le taux de ceruloplasmine augmente, suggérant un certain niveau de « stress physiologique » au cours d'une grossesse normale par la production de ROS nécessaires au développement de l'unité fœtoplacentaire [44]. Le stress oxydant devient pathologique lorsque les ROS sont produits en excès sans compensation par les défenses antioxydantes.

### 4. Stress oxydant et pré-éclampsie

Différents marqueurs de stress oxydant seraient majorés au cours de la PE alors que les réserves antioxydantes diminueraient [17,38,40,45–47]. De plus le stress oxydant contribuerait à l'établissement et au maintien de la maladie [2,6,48]. Au cours de la PE, les ROS sont générés à la fois par le placenta hypoxique [49] et par le système vasculaire systémique au cours de la 2ème étape [50]. Les homogénats placentaires issus de patientes pré-éclamptiques produisent davantage de peroxyde d'hydrogène [51] que ceux issus de grossesses non compliquées.

Divers mécanismes sont impliqués dans la génération des ROS :

- au cours de la PE, le défaut de remodelage vasculaire entraîne une réduction de l'oxygénation placentaire, d'où une majoration du stress oxydant avec augmentation de la production de ROS et de peroxydes lipidiques toxiques, en particulier pour les cellules endothéliales [49]. On note également une augmentation du taux de malondialdéhyde, un indice de peroxydation lipidique [52]. La production de ROS est modulée par l'antithrombine-1 et le TNFα dont la génération augmente en cours de la PE [53]. Les lipoperoxydes exercent une action particulièrement toxique, d'autant plus que les patientes pré-éclamptiques présentent une hyperlipidémie [54] avec une accumulation intracellulaire de triglycérides et un taux sérique de lipides élevé, qui exercent un effet négatif sur la libération de prostacyclines par les cellules endothéliales. Comme le sang intervilloux contient beaucoup plus d'acides gras polyinsaturés et de thromboxane A<sub>2</sub> que le

sang maternel périphérique, il s'établit donc un déséquilibre entre la production de prostacyclines qui diminue et de thromboxane qui augmente, ce qui altère le rapport prostacycline/thromboxane A2 normalement favorable à la vasodilatation ;

- les radicaux libres activent les monocytes et les neutrophiles, qui produisent des cytokines pro-inflammatoires, tels le TNF- $\alpha$  l'IL-6, des facteurs anti-angiogéniques et des microparticules [6]. Les polynucléaires neutrophiles sont une source importante de ROS. Les neutrophiles activés produisent des ROS, par l'action de plusieurs enzymes, incluant la NADPH oxydase [26,55], la xanthine oxydase (XO) et le découplage de la eNOS (oxyde nitrique synthase endothéliale) qui produirait des ROS à la place du NO [56]. Le taux de neutrophiles augmente significativement dans la circulation périphérique chez les patientes pré-éclamptiques [57], ce qui place ces cellules au centre des systèmes générateurs de ROS au cours de la pré-éclampsie ;
- la NADPH oxydase est une enzyme ubiquitaire, très fortement exprimée dans les neutrophiles et les cellules endothéliales [58]. Les doses modérées de ROS produites par la NADPH oxydase participent à la régularisation du tonus vasculaire. Cependant le stress oxydant induit par des doses fortes de ROS contribue au dysfonctionnement vasculaire [26]. L'activité NADPH oxydase serait augmentée au cours de la PE [17,55], ce qui suggère un rôle pour cet enzyme et pour les neutrophiles dans la pathogenèse du stress oxydant au cours de cette pathologie [26,53]. La NADPH oxydase génère l'anion superoxyde qui, parmi ses différentes actions, agit en découplant la NOS (ou oxyde nitrique synthase), qui génère du NO dont la combinaison avec l'ion superoxyde forme le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) [26], un puissant agent oxydant, d'où une réduction de la production de NO<sup>o</sup> et de la vasodilatation. L'interaction entre les ROS et le NO<sup>o</sup> (balance nitroso-redox) régule l'équilibre entre le stress oxydant et le stress nitrosant, consécutif à la génération d'ion superoxyde et de peroxy-nitrite (les ROS peuvent réagir avec le NO<sup>o</sup> pour produire du peroxy-nitrite), et cette balance nitroso-redox serait altérée en cas de PE [49,58,62] ;
- l'expression et l'activité de la xanthine oxydase (XO) seraient augmentées au cours de la PE, dans les cytotrophoblastes, le sang maternel et fœtal, ce qui pourrait contribuer à la production de ROS et à l'hyperuricémie. La surexpression de la XO est consécutive à l'état inflammatoire élevé observé chez les patientes pré-éclamptiques [59] ;
- par ailleurs, on observe chez les patientes une diminution des taux circulants d'agents antiradicalaires tels que l'ascorbate et la vitamine E, ce qui, associé à une augmentation des taux plasmatiques de TNF $\alpha$  et d'acide urique, favorise le stress oxydant et les lésions cellulaires [60]. La peroxydation lipidique serait également liée à une augmentation significative du taux circulant de la protéine de choc thermique 70 (HSP70), dans le sang périphérique fœtal et maternel au cours de la PE [61].

Ainsi, l'induction du stress oxydant au cours de la PE impliquerait principalement la production de ROS suite à l'activation de la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, avec en conséquence une peroxydation lipidique.

#### 4.1. Le stress du réticulum endoplasmique

Le stress inflammatoire du réticulum endoplasmique [6] est lié au stress oxydant au cours de la PE, les deux étant activés en conséquence de la diminution de la tension en oxygène. La majorité des protéines sécrétées et membranaires sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique où elles sont repliées et assemblées avant d'être transportées. Dans certaines conditions cellulaires, des protéines de conformation anormale s'accumulent

dans le réticulum endoplasmique et induisent la réponse *unfolded protein response* (UPR). Les phénomènes d'ischémie-reperfusion au cours de la PE accentueraient le stress du RE, aboutissant à une réponse UPR excessive, responsable de mort cellulaire par apoptose. La présence de marqueurs de l'UPR dans le placenta de patientes pré-éclamptiques démontre la survenue d'un stress du RE au cours de la PE [63,64].

Les effets apoptotiques du stress du RE associés aux effets nécrotiques du stress oxydant participent ainsi au relargage des STBM dans la circulation maternelle. Ces particules augmentent au cours de la PE par comparaison avec les grossesses non compliquées et contiennent des lipides oxydés qui pourraient générer un stress oxydant systémique. Les STBM entraînent également une réponse inflammatoire majorée qui participe à leur toxicité [6,63,65].

#### 5. Les défenses antioxydantes (placentaires et maternelles) au cours de la PE

Les antioxydants agissent comme des agents protecteurs physiologiques pour prévenir des lésions oxydatives engendrées par un excès de ROS. Il existe une grande variabilité dans la littérature concernant les taux d'enzymes et composés antioxydants au cours de la PE comparés à la grossesse normale [26,47].

##### 5.1. Réponse antioxydante placentaire au cours de la PE

Les mécanismes mis en place par le placenta soumis à l'hypoxie et à une majoration du stress oxydant jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de la PE. La plupart des études retrouvent une diminution d'antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques au niveau placentaire au cours de la PE, en particulier une diminution du glutathion (GSH), des vitamines C et E, des activités glutathion peroxidase (GPx), glutathion-s-transferase (GST) et SOD [47,52,66,67]. Plusieurs études ont retrouvé une diminution du taux de GPx 1, 3 et 4 dans les villosités placentaires, qui pourrait être attribuée à une disponibilité réduite du sélénium dans le placenta des patientes [47,68]. Bilodeau suggère que « les carences en activité SOD-1 et GPx 1/3/4 sont des facteurs clés de la pathogénie de la PE, en étant responsable d'une augmentation de synthèse d'anion superoxyde (qui va réagir avec NO<sup>o</sup> pour former des peroxy-nitrites) et des eicosanoïdes vasoconstricteurs tels que le F2-isoprostane ou thromboxane » [47].

##### 5.2. Réponse antioxydante maternelle au cours de la PE

Afin d'estimer les réserves antioxydantes maternelles, et devant la difficulté de recueillir des tissus maternels en cours de grossesse, les taux d'antioxydants ont principalement été dosés au niveau sanguin. La plupart des études retrouvent une altération des réserves antioxydantes par rapport aux grossesses non compliquées chez les patientes en PE, mais les résultats sont variables en fonction des études et du type de dosage réalisé [47]. Cependant, toutes les études retrouvent l'altération d'au moins un paramètre antioxydant (endogène ou exogène). Au cours de la PE, les concentrations plasmatiques de peroxydes lipidiques sont élevées avec une diminution concomitante de l'activité de la catalase et de la SOD dans les globules rouges, en comparaison avec les grossesses non compliquées [69,70]. Ces résultats sont très variables et ne reflètent pas les réserves antioxydantes réelles et disponibles.

Les taux de vitamine E (antioxydant lipophile) et de Coenzyme Q10 (antioxydant *vitamin-like*) sont très variables au cours de la PE (augmentation, diminution ou stabilité) [47,71,72].

### 5.3. Supplémentation en antioxydants

Les variations des taux d'antioxydants endogènes ont suggéré l'hypothèse d'un bénéfice amené par la supplémentation en antioxydants exogènes dans la prévention ou le traitement de la PE. Les résultats ont été décevants concernant l'administration d'antioxydants seuls donnés en prévention de la PE dans la population générale. En effet, plusieurs essais randomisés montrent que la supplémentation en vitamine C et E dans une cohorte à faible risque ne diminue pas le risque d'hypertension artérielle gravidique (HTAG), ni de PE [73]. Une revue Cochrane a également conclu qu'il n'y avait pas de preuve d'efficacité de la supplémentation en antioxydant (vitamine C et E seuls) en prévention de la PE [74]. Cependant, une étude plus récente retrouve une diminution significative de l'incidence de la PE chez les patientes ayant bénéficié d'un traitement préventif par antioxydants et donneurs de NO (L-arginine) avant 24 SA, alors que les auteurs ne retrouvent pas d'effet protecteur des antioxydants seuls. Ces résultats soulignent le rôle positif du NO qui pourrait être dysfonctionnel dans la pathogenèse de la PE et dans les mécanismes de stress oxydant [75].

De même l'administration orale de N-acétylcystéine dans le traitement de la PE n'a pas donné d'effet bénéfique sur une seule étude [76]. Cependant, la puissance de l'étude était limitée et l'intervention était probablement trop tardive du fait que les patientes étaient déjà atteintes de PE. Aucune étude n'a été réalisée sur un traitement préventif de la PE par la N-acétylcystéine qui par ailleurs améliorerait la vascularisation fœtoplacentaire sur un modèle *ex vivo* de PE [77].

Un essai clinique randomisé en double aveugle contre placebo rapporte une diminution de l'incidence de la PE après supplémentation de 100 µg/jour de sélénium du premier trimestre jusqu'à l'accouchement [78]. Le faible effetif n'a pas permis d'avoir des résultats significatifs. D'autres études *in vitro* démontrent que l'administration de sélénium protège les cellules trophoblastiques d'un stress oxydant exogène [79]. Une étude pilote réalisée au Royaume-Uni a étudié l'effet d'une supplémentation en sélénium sur les marqueurs de PE (sFLT1). Les auteurs retrouvent une diminution de la concentration en sFLT1 à 35 SA chez les patientes supplémentées en sélénium comparées au groupe placebo sans diminuer le risque de survenue de PE du fait d'un manque de puissance [80]. La supplémentation en sélénium serait donc prometteuse mais ces résultats nécessitent d'être validés par des essais cliniques de plus forte puissance.

## 6. Conclusion

La physiopathologie de la pré-éclampsie demeure complexe et imparfaitement comprise. Les stress oxydant fait partie des composantes physiologiques dont l'exacerbation participe à l'état de PE et intervient à toutes les étapes de cette pathologie. Il est en effet majoré dès le premier stade de la physiopathologie de la PE et participe au défaut d'invasion trophoblastique et de remodelage vasculaire constituant la première étape. Il participe également au dysfonctionnement endothélial et à la réponse inflammatoire systémique observée dans la deuxième étape, en accentuant la libération de débris trophoblastiques dans la circulation maternelle et en étant majoré par ces mêmes produits. Son rôle exact est encore méconnu et de nouvelles études sont nécessaires pour clarifier son implication, ses cibles ainsi que les sources des ROS et le rôle du NO. Une meilleure compréhension des phénomènes observés au cours de la première étape de la PE permettrait de prédire et donc mieux prévenir le risque de PE. À l'heure actuelle, aucun biomarqueur du stress oxydant n'a été mis en évidence en vue d'une aide au diagnostic de la pré-éclampsie. Les perspectives

thérapeutiques doivent tenir compte de ces données physiopathologiques concernant le stress oxydant et le rôle du NO.

### Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

### Références

- [1] Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308(5728):1592–4.
- [2] Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta* 2009;30(Suppl. A):S32–7.
- [3] Walker JJ. Pre-eclampsia. *Lancet* 2000;356(9237):1260–5 [Review].
- [4] Roberts JM, Lain KY. Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta* 2002;23(5):359–72 [Review].
- [5] Roberts JM, Bell MJ. If we know so much about preeclampsia, why haven't we cured the disease? *J Reprod Immunol* 2013;99(1–2):1–9.
- [6] Redman CW, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta* 2009;30(Suppl. A):S38–42.
- [7] Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010;376(9741):631–44.
- [8] Marcourelles P. [Placenta and preeclampsia: relationships between anatomical lesions and clinical symptoms]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2010;29(3):e25–9.
- [9] Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994;101:669–74.
- [10] Carbillon L. First trimester uterine artery Doppler for the prediction of pre-eclampsia and foetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25(7):877–83.
- [11] Guibourdenche J, Leguy MC, Tsatsaris V. [Biology and markers of preeclampsia]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2013;71:79–87.
- [12] Redman CW, Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Southcombe JH, Collett GP, et al. Review: Does size matter? Placental debris and the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 2012;33 Suppl.:S48–54.
- [13] Redman CW. Preeclampsia: a multi-stress disorder. *Rev Med Interne* 2011;32(Suppl. 1):S41–4.
- [14] Strevens H, Wide-Svensson D, Hansen A, Horn T, Ingemarsson I, et al. Glomerular endotheliosis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG* 2003;110(9):831–6.
- [15] Kalinderis M, Papanikolaou A, Kalinderis K, Ioannidou E, Giannoulis C, et al. Elevated serum levels of interleukin-6, interleukin-1b and human chorionic gonadotropin in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 2011;66(6):468–75.
- [16] Taylor BD, Tang G, Ness RB, Olsen J, Hougaard DM, et al. [175-POS]: elevated serum inflammatory markers and preeclampsia: results from a large national cohort study. *Pregnancy Hypertens* 2015;5(1):90.
- [17] Rajmakers MT, Dechend R, Poston L. Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension* 2004;44(4):374–80.
- [18] Laregoiti-Servitje E. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J Leukoc Biol* 2013;94(2):247–57.
- [19] Joeger-Messerli MS, Hoesli IM, Rusterholz C, Lapaire O. Stimulation of monocytes by placental microparticles involves toll-like receptors and nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells. *Front Immunol* 2014;5:173.
- [20] Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16(1):5–15 [Review].
- [21] Powers RW, Catov JM, Bodnar LM, Gallaher MJ, Lain KY, et al. Evidence of endothelial dysfunction in preeclampsia and risk of adverse pregnancy outcome. *Reprod Sci* 2008;15(4):374–81.
- [22] Johal T, Lees CC, Everett TR, Wilkinson IB. The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia. *Br J Clin Pharmacol* 2014;78(2):244–57.
- [23] Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111(5):649–58.
- [24] Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2002;979:80–93.
- [25] Murphy SR, LaMarca BB, Parrish M, Cockrell K, Granger JP. Control of soluble fms-like tyrosine-1 (sFlt-1) production response to placental ischemia/hypoxia: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013;304(2):R130–5.
- [26] Sánchez-Aranguren LC, Prada CE, Riaño-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front Physiol* 2014;5:372.
- [27] López-Novoa JM. Soluble endoglin is an accurate predictor and a pathogenic molecule in pre-eclampsia. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(3):712–4 [Epub 2007 Jan 8].
- [28] Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350:672–83.

- [29] Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 2006;355(10):992–1005 [Erratum in: *N Engl J Med* 2006;355(17):1840].
- [30] Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, et al. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(11):5555–63.
- [31] Staff AC, Dechend R, Redman CWG. Review: preeclampsia, acute atherosclerosis of the spiral arteries and future cardiovascular disease: two new hypotheses. *Placenta* 2012;33:1–6.
- [32] Wilson BJ, Watson MS, Prescott GJ, Sunderland S, Campbell DM, Hannaford P, et al. Hypertensive diseases of pregnancy and risk of hypertension and stroke in later life: results from cohort study. *BMJ* 2003;326(7394):845.
- [33] Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyssen L, Romero R. The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204(3):193–201.
- [34] Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol* 2011;31(1):33–46.
- [35] Goswami D, Tannetta DS, Magee LA, Fuchisawa A, Redman CW, Sargent IL, et al. Excess syncytiotrophoblast microparticle shedding is a feature of early-onset pre-eclampsia, but not normotensive intrauterine growth restriction. *Placenta* 2006;27(1):56–61.
- [36] Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001;7(2):175–89.
- [37] Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280(4):C719–41.
- [38] Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet* 1999;354(9181):788–9.
- [39] Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 1992;80(2):283–5.
- [40] Siddiqui LA, Jaleel A, Tamimi W, Al Kadri HMF. Role of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2010;282:469–74.
- [41] Wang K, Chen Y, Ferguson SD, Leach RE. MTA1 and MTA3 regulate HIF1 $\alpha$  expression in hypoxia-treated human trophoblast cell line HTR8/Svneo. *Med J Obstet Gynecol* 2013;1(3).
- [42] Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57(5):609–13.
- [43] Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295(4):C849–68.
- [44] Qanungo S, Mukherjee M. Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol Cell Biochem* 2000;215(1–2):11–9.
- [45] Patil SB, Kodliwadmath MV, Kodliwadmath M. Lipid peroxidation and antioxidant activity in complicated pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2009;36(2):110–2.
- [46] Bilodeau JF, Hubel CA. Current concepts in the use of antioxidants for the treatment of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can* 2003;25(9):742–50.
- [47] Bilodeau JF. Review: maternal and placental antioxidant response to preeclampsia—impact on vasoactive eicosanoids. *Placenta* 2014;35 Suppl:S32–8.
- [48] Hung TH, Burton GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2006;45(3):189–200.
- [49] Myatt L. Review: reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 2010;31 Suppl:S66–9.
- [50] Roggensack AM, Zhang Y, Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension* 1999;33(1):83–9.
- [51] Aris A, Benali S, Ouellet A, Moutquin JM, Leblanc S. Potential biomarkers of preeclampsia: inverse correlation between hydrogen peroxide and nitric oxide early in maternal circulation and at term in placenta of women with preeclampsia. *Placenta* 2009;30(4):342–7.
- [52] Madazli R, Benian A, Aydin S, Uzun H, Tolun N. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol* 2002;22(5):477–80.
- [53] Matsubara K, Higaki T, Matsubara Y, Nawa A. Nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *Int J Mol Sci* 2015;16(3):4600–14.
- [54] Lorentzen B, Henriksen T. Plasma lipids and vascular dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;16(1):33–9.
- [55] Lee VM, Quinn PA, Jennings SC, Ng LL. NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension* 2003;41(4):925–31.
- [56] Gielis JF, Lin JY, Wingle K, Van Schil PE, Schmidt HH, et al. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radic Biol Med* 2011;50(7):765–76.
- [57] Abe E, Matsubara K, Ochi H, Ito M, Oka K, et al. Elevated levels of adhesion molecules derived from leukocytes and endothelial cells in patients with pregnancy-induced hypertension. *Hypertens Pregnancy* 2003;22(1):31–43.
- [58] Matsubara K, Matsubara Y, Hyodo S, Katayama T, Ito M. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36(2):239–47.
- [59] Bainbridge SA, Deng JS, Roberts JM. Increased xanthine oxidase in the skin of preeclamptic women. *Reprod Sci* 2009;16(5):468–78.
- [60] Kharb S. Vitamin E and C in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;93(1):37–9.
- [61] Molvarec A, Derzsy Z, Kocsis J, Boze T, Nagy B, et al. Circulating anti-heat-shock-protein antibodies in normal pregnancy and preeclampsia. *Cell Stress Chaperones* 2009;14(5):491–8.
- [62] Doridot L, Châtre L, Ducat A, Vilotte JL, Lombès A, Méhats C, et al. Nitroso-redox balance and mitochondrial homeostasis are regulated by STOX1, a preeclampsia-associated gene. *Antioxid Redox Signal* 2014;21(6):819–34.
- [63] Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta* 2009;30(Suppl. A):S43–8.
- [64] Lian IA, Løset M, Mundal SB, Fenstad MH, Johnson MP, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta* 2011;32(11):823–9.
- [65] Huppertz B, Kingdom J, Caniggia I, Desoye G, Black S, et al. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta* 2003;24(2–3):181–90.
- [66] Mutlu-Türkoglu U, Ademoğlu E, İbrahimoglu L, Aykaç-Toker G, Uysal M. Imbalance between lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 1998;46(1):37–40.
- [67] Vanderlelie J, Venardos K, Clifton VL, Gude NM, Clarke FM, et al. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. *Placenta* 2005;26(1):53–8.
- [68] Mistry HD, Kurlak LO, Williams PJ, Ramsay MM, Symonds ME, Broughton Pipkin F. Differential expression and distribution of placental glutathione peroxidases 1, 3 and 4 in normal and preeclamptic pregnancy. *Placenta* 2010;31(5):401–8.
- [69] Dordević NZ, Babić GM, Marković SD, Ognjanović BI, Stajin AS, Zikić RV, et al. Oxidative stress and changes in antioxidative defense system in erythrocytes of preeclampsia in women. *Reprod Toxicol* 2008;25(2):213–8.
- [70] Ademuyiwa O, Odusoga OL, Adebawo OO, Ugbaja R. Endogenous antioxidant defences in plasma and erythrocytes of pregnant women during different trimesters of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007;86(10):1175–82.
- [71] Hubel CA. Plasma vitamin E in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(2):484–5.
- [72] Kaur G, Mishra S, Sehgal A, Prasad R. Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia. *Mol Cell Biochem* 2008;313(1–2):37–44.
- [73] Roberts JM, Myatt L, Spong CY, Thom EA, Hauth JC, et al. Vitamins C and E to prevent complications of pregnancy-associated hypertension. *N Engl J Med* 2010;362(14):1282–91.
- [74] Rumbold A, Duley L, Crowther CA, Haslam RR. Antioxidants for preventing preeclampsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(1):CD004227.
- [75] Vadillo-Ortega F, Perichart-Perera O, Espino S, Avila-Vergara MA, Ibarra I, Ahued R, et al. Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on pre-eclampsia in high risk population: randomised controlled trial. *BMJ* 2011;342:d2901.
- [76] Roes EM, Rajmakers MT, Boo TM, Zusterzeel PL, Merkus HM, et al. Oral N-acetylcysteine administration does not stabilise the process of established severe preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;127(1):61–7 [Epub 2005 Oct 21].
- [77] Bisseling TM, Maria Roes E, Rajmakers MT, Steegers EA, Peters WH, et al. N-acetylcysteine restores nitric oxide-mediated effects in the fetoplacental circulation of preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(1):328–33.
- [78] Tara F, Maamouri G, Rayman MP, Ghayour-Mobarhan M, Sahebkar A, et al. Selenium supplementation and the incidence of preeclampsia in pregnant Iranian women: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2010;49(2):181–7.
- [79] Watson M, van Leer L, Vanderlelie JJ, Perkins AV. Selenium supplementation protects trophoblast cells from oxidative stress. *Placenta* 2012;33(12):1012–9.
- [80] Rayman MP, Searle E, Kelly L, Johnsen S, Bodman-Smith K, et al. Effect of selenium on markers of risk of pre-eclampsia in UK pregnant women: a randomised, controlled pilot trial. *Br J Nutr* 2014;112(1):99–111.