



Mémoire de Maîtrise en médecine

Etude de l'expression de protéines impliquées dans la dysfonction de la veine ombilicale chez des nouveau-nés souffrant d'un retard de croissance intra-utérin

Etudiante
ARSLAN Dilara

Co-tutrice et tuteur
Dre PEYTER Anne-Christine, PhD
Responsable de recherche, Service de Néonatalogie, CHUV
Prof. TOLSA Jean-François
Chef du Département Femme-Mère-Enfant et Chef du Service de Néonatalogie,
CHUV

Expert
Prof. VIAL Yvan
Médecin-chef, Service d'Obstétrique, CHUV

Lausanne, décembre 2018

Table des matières

1	Liste des abréviations	3
2	Introduction.....	3
2.1	Définition.....	3
2.2	Altérations structurelles.....	5
2.3	Altérations fonctionnelles	5
2.4	Stress oxydatif	8
2.4.1	Entités pro-oxydantes.....	9
2.4.2	Entités anti-oxydantes	10
3	But du travail	11
4	Méthodologie	12
4.1	Echantillons	12
4.2	Critères d'inclusion et d'exclusion	12
4.3	Western Blot.....	13
4.3.1	Extraction des protéines	13
4.3.2	Dosage des protéines	14
4.3.3	SDS-Page.....	14
4.3.4	Transfert sur membrane.....	17
4.3.5	Blocage	17
4.3.6	Immunomarquage	18
4.4	Révélation Odyssey et quantification	18
4.5	Analyses statistiques.....	19
4.6	Immunofluorescence sur coupes histologiques	19
4.6.1	Préparation des coupes	19
4.6.2	Déparaffinage et réhydratation	19
4.6.3	Perméabilisation et blocage	20
4.6.4	Anticorps primaires	20
4.6.5	Anticorps secondaires	20
4.6.6	Montage	21
4.6.7	Microscope à fluorescence.....	21
5	Résultats.....	22
5.1	Données démographiques	22
5.2	Résultats de la quantification par Western Blot	22
5.3	Localisation des enzymes par immunofluorescence	24
6	Discussion.....	28
6.1	Stress oxydatif et les défenses anti-oxydantes chez les RCIU versus contrôles.....	28
6.2	Différence entre filles et garçons.....	29
6.3	Différents types de biais.....	30
6.3.1	Erreurs aléatoires	30
6.3.2	Biais de sélection	30
7	Conclusion et perspectives.....	31
8	Remerciements.....	32
9	Références bibliographiques	32

1 Liste des abréviations

Ctrl	Contrôle
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
NO	Oxyde nitrique (ou monoxyde d'azote)
SGA	Petit poids pour l'âge gestationnel. (<i>En anglais : small for gestational age</i>)
PKG	Protéine kinase G
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
ROS	Espèces réactives dérivées de l'oxygène. (<i>En anglais : reactive oxygen species</i>)
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
sGC	Guanylate cyclase soluble
SOD	Superoxyde dismutase
VO	Veine ombilicale

2 Introduction

2.1 Définition

Un retard de croissance intra-utérin (RCIU) est un trouble développemental résultant de conditions défavorables au développement du fœtus, qui survient dans approximativement 10% des grossesses à travers le monde, principalement dans les pays à bas revenus, avec une prédominance en Asie centrale (1). Un processus pathologique conduit à un trouble de la vitesse de croissance in utero dont l'origine peut être maternelle, placentaire ou fœtale (2). Le RCIU est défini comme une incapacité du fœtus à atteindre son plein potentiel de croissance, ce qui résulte souvent en un poids de naissance inférieur au 10^{ème} percentile par rapport à l'âge gestationnel mais est défini principalement par la présence d'une cassure de la courbe de croissance due à un processus pathologique durant la vie fœtale (3). Il peut survenir précocement et être suspecté par un poids fœtal estimé par ultrason au 1^{er} trimestre inférieur au 10^{ème} percentile (2), ou plus tardivement. Un trouble de la croissance du fœtus est également à rechercher chez une mère ayant des facteurs de risque (antécédent de grossesse avec RCIU, maladies chroniques etc.), lorsque la mesure de la hauteur utérine est inférieure à la norme en fonction de l'âge gestationnel, ou face à une augmentation des indices de résistance de l'artère utérine et une diminution du flux sanguin dans le cordon ombilical lors du contrôle morphologique de routine à l'échographie Doppler de l'artère utérine, entre la 20^{ème} et 22^{ème} semaines de gestation. Toute suspicion doit donner lieu à un suivi particulier pour confirmer ou non le RCIU.

Le RCIU est une cause importante de morbidité et mortalité périnatales. Il constitue d'ailleurs la deuxième cause de décès périnatale après la prématurité. De plus, les enfants nés avec un RCIU ont un risque augmenté de développer des troubles neurologiques, ainsi que des maladies cardiovasculaires et métaboliques à l'âge adulte.

Des études ont montré qu'un processus pathologique ou une agression externe durant le développement intra-utérin peut être à l'origine d'une altération permanente des fonctions biologiques de l'individu et conduire à des maladies non transmissibles à l'âge adulte, telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'hypertension artérielle ou encore l'obésité, souvent après une longue phase de latence (4,5). En effet, le développement du fœtus est une période critique et de grande vulnérabilité qui requiert un environnement intra-utérin favorable, ainsi qu'une nutrition et un apport d'oxygène adéquats via le placenta. L'apparition de certaines maladies chroniques à l'âge adulte liées à des conditions de vie intra-utérines et périnatales défavorables pourrait être favorisée par des modifications épigénétiques.

Les causes maternelles notoires sont l'hypertension artérielle, certains médicaments avec effets antiépileptiques, les immunosuppresseurs ou les antidépresseurs ainsi que d'autres facteurs de risque tels que le tabac, l'alcool ou la malnutrition (6). Quant aux facteurs de risque liés au fœtus, les malformations, les grossesses multiples ou les infections ont été identifiés comme des causes pouvant engendrer un RCIU.

Cependant, malgré l'identification de certaines conditions favorisant sa survenue, les mécanismes conduisant au retard de croissance restent mal compris. De plus, il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour empêcher ou limiter le développement d'un RCIU. Des moyens de prévention existent, mais sont actuellement essentiellement basés sur l'éviction de certains facteurs de risque maternels (7).

Une insuffisance placentaire, c'est-à-dire une altération des échanges utéroplacentaires, a été documentée chez presque tous les cas de RCIU et engendre une diminution de l'apport en nutriments et en oxygène au fœtus, soulignant l'implication du placenta dans le processus physiopathologique du RCIU (8). La contribution du placenta au développement d'un RCIU est largement reconnue (6). Elle pourrait néanmoins être assortie d'une altération de la circulation fœto-maternelle au niveau du cordon ombilical. Le sang fœtal désaturé en oxygène est drainé par les deux artères ombilicales vers le placenta alors que l'apport en sang oxygéné vers le fœtus se fait par l'unique veine ombilicale.

Une corrélation entre le poids à la naissance et celui du placenta a également été observée. Les nouveau-nés avec un retard de croissance avaient un placenta de poids inférieur à la norme pour l'âge gestationnel (9,10), ce qui a également été démontré dans l'étude de Peyter AC et al (6).

De ce fait, ce travail se base sur l'hypothèse qu'une insuffisance placentaire retrouvée chez les RCIU est associée à un dysfonctionnement au niveau du cordon ombilical, tout particulièrement au niveau de la veine ombilicale puisque c'est elle qui amène les éléments nutritifs et l'oxygène au fœtus.

Les études précédentes du projet, dont fait partie ce travail, ont mis en évidence des altérations au niveau de la relaxation du muscle lisse induite par le NO et de la structure de la VO, chez les nouveau-nés avec un RCIU (6).

2.2 Altérations structurelles

Il a été observé, à l'histologie, que la surface totale de la coupe transversale de la veine ombilicale de nouveau-nés avec un RCIU, ainsi que la surface du muscle lisse sont significativement plus petites comparées aux contrôles aussi bien chez les filles que chez les garçons (6). Il est intéressant de noter que la diminution du diamètre de la VO peut être mesurée par ultrason. Plus la lumière de la VO est rétrécie dans le RCIU, plus le pronostic est sévère avec un risque augmenté de mortalité périnatale chez les fœtus ayant une surface de la VO mesurée à l'ultrason inférieure ou égale au 10^{ème} percentile pour l'âge gestationnel (11,12).

2.3 Altérations fonctionnelles

L'intégrité du tissu vasculaire, et en particulier de l'endothélium, est essentielle pour la régulation de la contraction et dilatation des vaisseaux. L'endothélium contrôle également le recrutement des cellules du système immunitaire en cas de réaction inflammatoire et celui des plaquettes pour leur adhésion et agrégation en cas de lésions. Il permet aussi la migration et prolifération des cellules musculaires lisses, ce qui explique que le tissu endothélial influence l'épaisseur du tissu musculaire lisse sous-jacent.

Le monoxyde d'azote (NO), provenant de l'endothélium, est un élément clé de la relaxation vasculaire dans tout l'organisme. C'est pourquoi, de nombreuses études ont été menées pour comprendre les mécanismes dysfonctionnels dans la cascade de signalisation conduisant à la vasorelaxation induite par le NO en cas de RCIU. Il joue également un rôle important dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la prévention du recrutement des leucocytes, le contrôle de la prolifération exagérée de l'intima, ainsi que dans la régulation de la tension artérielle et du transport d'oxygène aux tissus (13).

Du point de vue fonctionnel, une différence entre filles et garçons avec un RCIU a été observée, notamment au niveau de la réactivité de la veine ombilicale. Les filles avec un RCIU avaient une réduction de la vasorelaxation induite par le NO par rapport aux contrôles, tandis que les garçons avec un RCIU présentaient une altération de la vasoconstriction par rapport à ceux ayant une croissance harmonieuse (4,6).

En résumé, les filles et les garçons avec un RCIU présentaient des anomalies structurelles similaires alors que les altérations fonctionnelles étaient différentes en fonction du sexe du fœtus.

La fonction vasculaire a été étudiée au niveau de la voie du NO/GMPc, qui est l'une des principales voies responsables de la relaxation vasculaire. Le NO est une molécule gazeuse

qui est synthétisée, de façon endogène, dans l'endothélium par la NO synthase endothéliale (eNOS). Comme illustré dans la figure 1, la eNOS est activée par une augmentation de la concentration intracellulaire de ions calcium dans l'endothélium, qui servent de co-facteurs à la calmoduline pour le transfert des électrons. Le NO et la L-citrulline sont les produits de l'oxydation de la L-arginine par la NOS. Cette réaction requiert la présence de plusieurs co-facteurs : du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène (NADPH), des flavines (flavin adénine dinucléotide (FAD) et flavin mononucléotide (FMN)), un noyau hème et de la tétrahydrobioptérine (BH4).

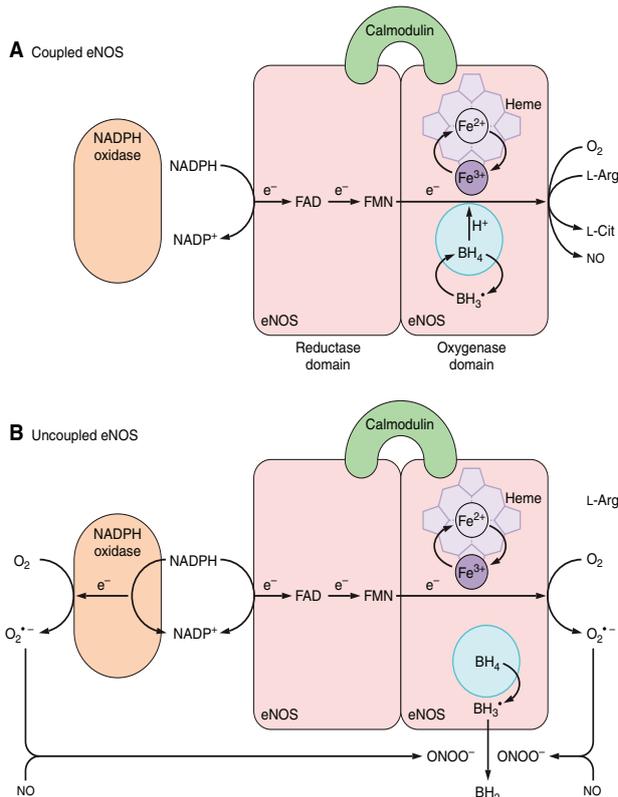
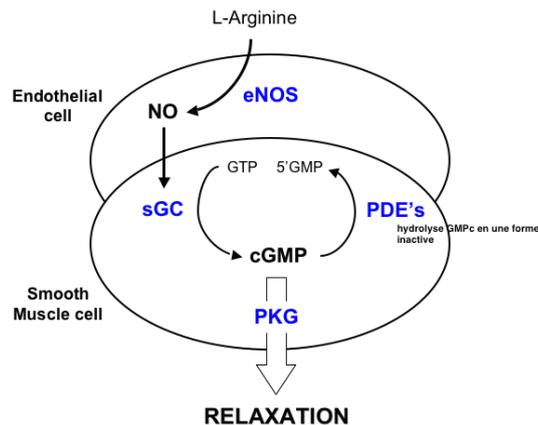


Figure 1 : Représentation schématique du découplage de la eNOS.

Illustration de la eNOS couplé (A). La formation du NO et de la L-citrulline est possible grâce à l'oxydation de la L-arginine. Cette réaction nécessite l'oxydation du NADPH, la présence du FAD et FMN pour le transport de l'électron vers le fer de l'hème et la BH4 qui est un cofacteur de la eNOS et qui sert à transformer l'O2 et la L-arginine en NO et L-citrulline en donnant un électron et un proton. La calmoduline est activée par la présence de ions calcium et est nécessaire pour contrôler le flux d'électrons. En cas de découplage de la eNOS (B), notamment à cause d'un stress oxydatif où le peroxyde de nitrite (ONOO-) est élevé, la BH4 est oxydée en radical BH3 puis en BH2 ne pouvant ainsi plus catalyser la transformation de l'O2 plus L-arginine en NO plus L-citrulline. L'électron libéré par l'oxydation du NADPH est transféré à l'O2 formant ainsi du superoxyde qui se lie au NO pour former du peroxyde de nitrite qui contribue au maintien du découplage de la eNOS.

Source : Morton JS, Cooke C-L, Davidge ST Physiol Rev. 2016 (14).

La L-arginine est utilisée comme substrat par la eNOS pour produire du NO (figure 2), qui diffuse ensuite dans le muscle lisse afin d'activer la guanylate cyclase soluble (sGC). A son tour, la sGC permet la transformation de la guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). L'augmentation de GMPc conduit entre autres à l'activation de la protéine kinase G (PKG), qui induit la vasorelaxation via une cascade de phosphorylation/déphosphorylation de protéines. A noter que l'activité du GMPc est limitée par les phosphodiésterases (PDE). En effet, en inactivant le GMPc, les PDE participent à l'inhibition de la relaxation des vaisseaux (figure 2).



Source : schéma utilisé avec l'autorisation de Peyter AC, Laboratoire de recherche en Néonatalogie, CHUV, Lausanne.

Figure 2 : La relaxation dépendante de la voie NO/GMPc. Schéma de la cascade d'activation de la vasorelaxation induite par la voie NO/GMPc.

La fonction vasculaire a d'abord été étudiée au niveau du tissu musculaire. Il a été observé que l'activité de la sGC est augmentée chez les filles avec un RCIU ce qui devrait favoriser la vasorelaxation mais semble être compensée par une dégradation intense du GMPc par les PDE, entraînant une dysfonction de la vasorelaxation. De plus, une diminution de la quantité relative de PKG est observée dans la VO des filles RCIU par rapport aux contrôles, ce qui contribue probablement à l'altération de la relaxation induite par le NO. Quant aux garçons avec un RCIU, aucune modification de la quantité de ces protéines n'a été observée. Par ailleurs, une meilleure relaxation du muscle lisse est observée en présence d'inhibiteurs des PDE, aussi bien chez les garçons que chez les filles. En effet, l'inhibition des PDE empêche la transformation du GMPc en 5'GMP, sa forme inactive, augmentant ainsi la biodisponibilité du GMPc pour la relaxation vasculaire.

Il a également été mis en évidence, qu'en présence d'un inhibiteur non-spécifique des PDE, la veine ombilicale des filles avec un RCIU se relaxe aussi bien que celle des contrôles, ce qui suggère que les PDE jouent un rôle important dans la vasorelaxation et pourraient être un cible thérapeutique à investiguer puisque leur inhibition restaure la relaxation vasculaire chez les RCIU.

Ces observations suggèrent que le RCIU est associé à des altérations au niveau du muscle lisse de la VO. Cependant, il est fort probable qu'il soit également associé à une dysfonction endothéliale. D'autant plus que l'endothélium joue un rôle important dans la régulation de la vasorelaxation ainsi que dans la prolifération et migration des cellules musculaires lisses.

Une dysfonction endothéliale peut notamment être causée par une dysrégulation du stress oxydatif. Certaines constatations supposent fortement l'implication des entités anti- et pro-oxydantes dans les mécanismes engendrant un RCIU. Par exemple, il a été observé que les

femmes soumises à des conditions qui augmentent le stress oxydatif telles que l'hypoxie (tabagisme, séjour en haute altitude, anémie, maladies pulmonaires) ont un risque plus élevé d'avoir une grossesse menant à un RCIU (15,16). D'autres évoquent que le stress oxydatif joue un rôle important dans la genèse des maladies cardiovasculaires qui peuvent se développer plus tard chez les RCIU (17). En effet, l'augmentation du stress oxydatif, donc de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS), conduit à la diminution de la biodisponibilité du NO pour la vasorelaxation par l'augmentation de la formation des superoxydes. Le superoxyde va réagir avec le NO pour former du peroxyde d'azote, ce qui va contribuer au découplage de la eNOS et donc au maintien du stress oxydatif et à la diminution de la disponibilité du NO pour la vasorelaxation (figure 1). La dysfonction endothéliale engendrée par une baisse de la bioactivité du NO conduit à l'augmentation des risques cardiovasculaires et plus particulièrement à l'augmentation de l'athérosclérose (18). De ce fait, nous pouvons supposer, étant donné que les risques d'évènements cardiovasculaires sont augmentés chez les RCIU, que le stress oxydatif induit par une augmentation de l'activité des entités pro-oxydantes (NADPH, Xanthine oxydase, eNOS découplée, activité mitochondriale) ou par une diminution de celle des entités anti-oxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et paraoxanase) pourrait participer au développement des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte chez des individus ayant présenté un RCIU.

Ce travail est focalisé sur les mécanismes qui peuvent engendrer une augmentation du stress oxydatif impliqué dans les dommages tissulaires et les altérations au niveau de l'endothélium et, plus spécifiquement, à la mise en évidence d'une éventuelle différence au niveau des défenses anti-oxydantes dans la veine ombilicale en cas de RCIU.

2.4 Stress oxydatif

Par définition, le stress oxydatif est un état de déséquilibre entre les éléments pro-oxydants et anti-oxydants en faveur d'une augmentation des intermédiaires réactifs conduisant à des dommages tissulaires.

Les composés réactifs du stress oxydatif, à savoir les ROS principalement et les espèces réactives dérivées de l'azote (RNS), sont naturellement présents dans le corps humain suite à une production endogène ou à un apport exogène, comme par exemple les rayons ultraviolets, la pollution, les xénobiotiques ou encore les métaux lourds (19). Ils sont généralement bien neutralisés grâce à un système antioxydant qui empêche l'activité aberrante des ROS et RNS. Les dommages causés par le stress oxydatif sont typiquement dus à un déséquilibre entre la production de ROS (et dans une moindre mesure de RNS) par les enzymes pro-oxydantes (la NADPH oxydase, xanthine oxydase et la production par la chaîne respiratoire mitochondriale) et leur élimination par le système anti-oxydant (les superoxyde dismutases, la glutathion peroxydase, l'hème oxygénase, le système thioredoxin peroxydase/ peroxyredoxine, la catalase, et la paraoxonase). L'augmentation du

stress oxydatif peut donc être causée par l'augmentation de l'activité des entités pro-oxydantes et/ou par la diminution de celle des entités anti-oxydantes.

Les ROS sont des espèces chimiques très réactives à cause de leur électron libre et sont capables d'oxyder des composés biologiques comme les lipides, protéines ou encore l'ADN induisant de ce fait la destruction de l'intégrité des membranes cellulaires et celle des cellules. Les principales ROS sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxyl (OH^\bullet) dont la source est principalement la NADPH oxydase (20). Trois autres enzymes pro-oxydantes sont également impliquées dans la génération de ROS : la xanthine oxydase, les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale et la eNOS découplée (18). Le H_2O_2 est directement produit dans les cellules par l'action des enzymes oxydantes ou par la dismutation des O_2^- , alors que la présence des O_2^- est accrue en présence d'une dysfonction de la chaîne mitochondriale (21).

Le stress oxydatif et les conditions favorisant l'installation d'une inflammation sont donc des éléments essentiels qui conduisent à des dommages tissulaires et à l'altération de la fonction de l'endothélium vasculaire. La synthèse du NO, et plus particulièrement sa biodisponibilité, est fortement diminuée par le stress oxydatif, ce qui entraîne une altération de la vasorelaxation (22). Les ROS peuvent également engendrer des dommages au niveau des vaisseaux sanguins, notamment, la prolifération et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses.

Plusieurs études se sont intéressées aux effets de l'hypoxie sur la réactivité vasculaire. Rueda-Clausen CF et al ont démontré qu'une hypoxie peut induire une augmentation du stress oxydatif et particulièrement la formation de peroxynitrite ($ONOO^-$) (23), ce qui conduit à l'activation de la NADPH oxydase et de la xanthine oxydase, puis à la formation de superoxydes (24).

L'augmentation du stress oxydatif en cas de RCIU mentionnée dans la littérature, par exemple au niveau du plasma des femmes avec une grossesse compliquée avec un RCIU, du placenta et du cordon ombilical (25), laisse fortement supposer une implication des composants du stress oxydatif dans le processus conduisant à un RCIU, d'où l'intérêt de diriger des travaux de recherche dans ce sens.

2.4.1 Entités pro-oxydantes

NADPH oxydase

La NADPH oxydase est la source la plus importante de ROS dans l'organisme (18). C'est un complexe enzymatique membranaire qui contribue à la formation d' O_2^- par l'intermédiaire de NADPH, un donneur d'électrons. Chez l'homme, 7 isoformes ont été recensées : la Nox 1,2,3,4,5 et DUOX 1 et 2 (26). Ces isoformes sont exprimées dans la couche musculaire lisse des vaisseaux ainsi dans la couche endothéliale (18).

Il est intéressant de noter qu'un lien a été observé entre la présence augmentée des

NADPH oxydases et la recrudescence de l'athérogenèse (27), ce qui suppose l'implication de la NADPH oxydase dans la genèse de maladies cardiovasculaires.

Xanthine Oxydase

La xanthine oxydase (XO) contribue également à la production de ROS et participe à la génération de maladies cardiovasculaires par interaction avec la voie de signalisation du NO (28). Il a été observé que la XO est une source importante de superoxyde dans les artères coronaires (27). Elle est principalement activée lors des lésions engendrées suite à une reperfusion après une ischémie (29). Dans une étude randomisée en double aveugle, des chercheurs ont montré que les inhibiteurs de la XO tels que l'allopurinol améliorent la fonction endothéliale évaluée par pléthysmographie au niveau des veines de l'avant-bras chez des patients souffrant de cardiopathie classe NYHA II-III (selon la classification *New York Heart Association*) (30).

En résumé, l'ensemble des entités pro-oxydantes induisent une augmentation des ROS qui favorisent la production de peroxynitrite par interaction avec le NO. Il en résulte donc une diminution de la biodisponibilité du NO pour la vasodilatation (14), ainsi qu'une augmentation du risque de dommages tissulaires.

2.4.2 Entités anti-oxydantes

Les principales défenses anti-oxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase et la catalase (31).

Superoxyde dismutase

Il existe trois isoformes de SOD : la Cu-Zn-SOD (SOD1) est présente sous forme soluble et se trouve principalement dans le cytoplasme, mais également dans l'espace inter-membranaire mitochondrial ; la Mn-SOD (SOD2) est localisée dans la matrice mitochondriale ; et la EC-SOD (SOD3) se trouve, quant à elle, dans la matrice extracellulaire, à la surface cellulaire et dans le fluide extracellulaire (18). Les trois isoformes ont pour fonction de catalyser la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène. La SOD joue un rôle clé dans la défense anti-oxydante. Elle est impliquée dans les mécanismes de protection cardiovasculaire (18,22). En dégradant les anions superoxydes, les SOD permettent de maintenir le niveau de NO (32), ce qui suggère leur implication dans la fonction endothéliale. A noter, cependant, que cette étude a été faite sur l'endothélium artériel et non veineux. Il est également possible que chaque isoforme ait une caractéristique différente dans la défense contre le stress oxydatif. En effet, Förstermann U a montré qu'en inactivant le gène codant pour la SOD1 (SOD1^{-/-}) chez la souris, le nombre de complications s'étant développé suite à la reperfusion en cas d'ischémie du myocarde était plus important (31), suggérant que la SOD1 joue un rôle important contre les effets délétères de l'hypoxie au niveau tissulaire.

Catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), souvent produit à la suite de la dégradation des anions superoxydes par les SOD, en une molécule d'oxygène (O_2) et deux molécules d'eau (H_2O) ayant ainsi un rôle primordial pour contrer les effets délétères en cas de production augmentée de superoxyde.

La régulation du stress oxydatif dans les vaisseaux est représentée ci-dessous (figure 3) :

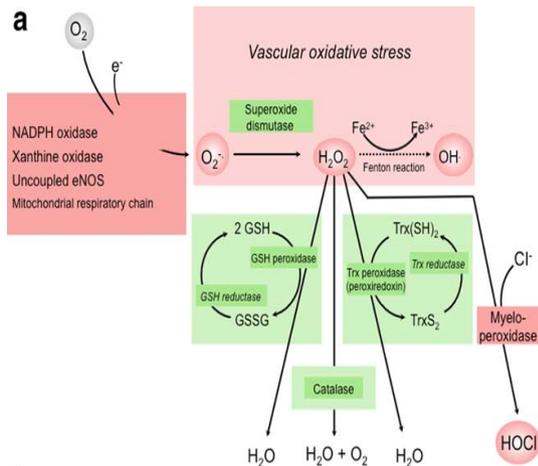


Figure 3 : Régulation du stress oxydatif dans les vaisseaux.

En cas de stress oxydatif, l'oxygène (O_2) plus un électron sont transformés en superoxyde (O_2^-), issu de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les sources de ce superoxyde sont notamment la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et la eNOS découplée. Ce réactif est rapidement neutralisé par les superoxyde dismutases et transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui à son tour peut soit subir une conversion spontanée en radical hydroxyl (OH^\bullet), un composé extrêmement réactif, soit être neutralisé en eau (H_2O) et oxygène (O_2) grâce aux antioxydants comme la glutathion peroxydase, la catalase ou encore la thioredoxine peroxydase.

Source : Förstermann U. Physiol. 2010 (31).

Etant donné que les SOD jouent un rôle primordial dans la prévention de l'inactivation du NO par l'anion superoxyde et qu'elles font partie des principaux mécanismes de détoxification des ROS, nous nous sommes intéressés à étudier l'expression des trois isoformes de la SOD dans la veine ombilicale de nouveau-nés à terme avec un RCIU et ceux qui ont suivi une courbe de croissance harmonieuse.

3 But du travail

Le but de ce travail de Master consiste à mettre en évidence une éventuelle différence dans la présence d'une ou de plusieurs isoformes de la superoxyde dismutase (SOD1, SOD2, SOD3) dans la VO, en comparant les échantillons de filles et de garçons avec ou sans RCIU. Une quantité d'enzymes diminuée ou une altération de leur activité pourrait participer à une dysfonction endothéliale. Ceci pourrait entraîner une altération de la circulation fœto-maternelle ainsi qu'une baisse de l'apport en nutriments et en oxygène aux fœtus, favorisant ainsi le développement d'un RCIU.

L'originalité de ce travail consiste dans le fait qu'il n'existe, à notre connaissance, pas encore d'étude ayant analysé l'expression des trois isoformes de la SOD séparément dans la veine

ombilicale, en particulier en cas de RCIU. Une autre particularité est l'étude d'une possible influence du sexe sur l'expression de ces isoformes.

4 Méthodologie

4.1 Echantillons

Les échantillons biologiques ont été prélevés dans le cadre d'un projet de recherche financé, entre autres, par le Fonds National Suisse pour la recherche scientifique (FNS ; subside 32003B_138491). Cette étude a été approuvée par la Commission cantonale d'éthique de la recherche sur l'être humain (protocole n°134/08).

4.2 Critères d'inclusion et d'exclusion

Etant donné que la récolte d'échantillons pour ce projet ne nécessitait aucune intervention supplémentaire sur la mère ou le nouveau-né par rapport à leur prise en charge médicale habituelle, la commission d'éthique a autorisé l'utilisation du consentement tacite en vigueur au CHUV à l'époque où ce projet de recherche avait été initié.

Le but de ce travail est de comparer la VO de nouveau-nés avec un poids à la naissance approprié pour l'âge gestationnel (groupe contrôle ou Ctrl), c'est-à-dire entre le P10 et P90, avec la VO de nouveau-nés dont le poids de naissance était faible par rapport à leur âge gestationnel, c'est-à-dire en dessous du P10. Les échantillons ont donc été classés selon le poids des nouveau-nés à leur naissance.

Les nouveau-nés ayant un poids à la naissance en dessous du P10 ont été classés comme ayant un RCIU s'il y avait une cassure de leur courbe pondérale durant la vie anténatale et comme constitutivement petits par rapport à leur âge gestationnel (en anglais : small for gestationnel age ou SGA) en absence de cassure. Précisons toutefois que, dans cette étude, les informations prénatales permettant de faire la distinction entre RCIU et SGA n'étaient pas toujours disponibles, de sorte qu'il était difficile de déterminer la présence ou non d'une cassure de la courbe de croissance. C'est pourquoi, il est probable que le groupe « RCIU » contienne un mélange de RCIU et SGA. De même, il est possible que le groupe « Ctrl » contienne aussi des nouveau-nés ayant subi un ralentissement de leur croissance intra-utérine sans que leur poids de naissance soit inférieur au P10.

Cette étude s'est également intéressée aux différences entre les filles et les garçons. Raison pour laquelle, les échantillons ont été séparés en fonction du sexe.

Les informations médicales de la mère de chaque donneur ont été enregistrées dans une base de données créée pour cette étude (dans la partie résultats, table 2, page 22).

Les cordons ombilicaux ont été récoltés juste après la naissance chez des enfants nés à la Maternité du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois à Lausanne, entre juin 2009 et juillet 2013. Pour respecter les critères d'inclusion, les fœtus devaient être issus d'une grossesse unique et être nés à terme (≥ 37 semaines de gestation).

Les critères d'exclusion regroupent les femmes ayant une grossesse multiple, une pré-éclampsie, une sérologie positive pour le VIH ou l'hépatite A, B ou C, les nouveau-nés avec un poids à la naissance supérieur au P90, un cordon ombilical ne contenant qu'une seule artère ombilicale et les nouveau-nés présentant des complications comme des malformations, un syndrome génétique ou une infection congénitale (par exemple CMV, toxoplasmose). En respectant ces critères, il est possible d'étudier les mécanismes dysfonctionnels dans la VO lors d'un RCIU sans que ces dysfonctions soient dues à une maladie ou à un autre évènement défavorable sous-jacent.

Les échantillons des nouveau-nés ont été classés selon les informations récoltées après la naissance en quatre groupes expérimentaux :

- Groupe 1 : Ctrl, P10<PN<P90, fille
- Groupe 2 : Ctrl, P10<PN<P90, garçon
- Groupe 3 : RCIU, PN<P10, fille
- Groupe 4 : RCIU, PN<P10, garçon

Pour chaque donneur, un segment de cordon d'environ 10-15 cm a été prélevé par une sage-femme dans la partie proximale du cordon (proche du fœtus), c'est-à-dire la seule portion innervée du cordon ombilical, juste après la naissance, puis conservés à 4°C dans une solution physiologique de Krebs « désoxygénée » (118.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 25.0 mM NaHCO₃, and 11.1 mM glucose), jusqu'à la dissection qui a eu lieu dans les 24 heures après la naissance. La VO a été disséquée, en prenant soin d'éliminer le plus possible la gelée de Wharton qui l'entoure. Les échantillons de 40 patients par groupe ont été homogénéisés pour l'analyse de protéines puis congelés pour des expériences ultérieures. Sur certains cordons ombilicaux, un segment de 1 cm de long a été prélevé avant la dissection de la VO, afin de pouvoir faire des coupes histologiques.

4.3 Western Blot

La quantité relative des différentes isoformes de la SOD (SOD1, SOD2, SOD3) contenue dans les échantillons protéiques extraits des VO des 4 groupes d'étude a été évaluée par Western blot en utilisant des anticorps fluorescents.

4.3.1 Extraction des protéines

La partie proximale de la veine ombilicale de 40 nouveau-nés par groupe a été prélevée afin d'en extraire les protéines. Les protéines d'intérêt étant situées à l'intérieur des cellules, il est important de procéder à une lyse cellulaire afin de pouvoir les extraire.

L'extraction des protéines a été réalisée en deux étapes : une extraction mécanique par broyage cryogénique des tissus, suivie d'une lyse cellulaire chimique en resuspendant la poudre obtenue dans un tampon de lyse, dont les composants importants sont les suivants:

- Du CHAPS, un détergent doux, qui permet d'extraire les protéines membranaires.
- Des inhibiteurs de protéases (AEBSF, leupeptine, pepstatine et aprotinine), et des inhibiteurs de phosphatases (sodium orthovanadate et NaF), afin d'éviter la dégradation des protéines par ces enzymes.
- Du dithiothréitol (DTT), utilisé comme agent réducteur participant à la dénaturation des protéines en cassant les ponts disulfures S-S qui sont essentiels pour la structure tertiaire de ces protéines. L'ajout de beta-mercapto-éthanol et une étape de chauffage participent également à la dénaturation des protéines. Il est nécessaire de dénaturer les protéines, pour faciliter leur migration à travers le gel de polyacrylamide, mais aussi pour favoriser leur reconnaissance par les anticorps primaires, qui sont dirigés contre la forme dénaturée des protéines d'intérêt.

4.3.2 Dosage des protéines

Une fois les protéines extraites, elles ont été dosées selon la méthode colorimétrique BCA Protein Assay.

Principe 1 : Cette méthode consiste à créer un environnement alcalin dans lequel les protéines vont réduire le Cu^{2+} en Cu^{+} afin de former un complexe coloré avec le sel de l'acide bicinchoninic (BCA) dont l'absorbance est mesurée à 562 nm.

Principe 2 : L'absorbance est proportionnelle à la concentration de protéine. Pour connaître les concentrations de protéines dans un échantillon, il est d'abord nécessaire de procéder à un étalonnage avec des échantillons contenant des concentrations graduelles connues de protéines (ici, nous avons utilisé de l'albumine de sérum bovin (*en anglais : bovin serum albumin, BSA*)). Ceci permet d'obtenir une courbe standard des absorptions en fonction des concentrations.

Méthode : les échantillons ont été dilués 10 fois avec de l'eau afin de réduire le plus possible la concentration de DTT contenu dans le tampon de lyse, qui interfère dans la réaction chimique permettant la quantification des protéines dans les échantillons. La réaction a ensuite été initiée par l'ajout de 100 μl de réactifs du kit puis incubation à 37 °C pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 562 nm (longueur d'onde correspondant à l'absorbance du composé coloré formé par la réaction chimique du kit). Les concentrations de protéines dans les échantillons testés ont ensuite été quantifiées par régression linéaire en se basant sur la courbe standard de BSA.

4.3.3 SDS-Page

Cette technique consiste à séparer les protéines dénaturées et les faire migrer en fonction de leur masse moléculaire, sur un gel de polyacrylamide soumis à un champ électrique. La masse moléculaire attendue des protéines d'intérêt est de 23 kDa pour la SOD1, 22 kDa pour la SOD2 et 32kDa pour la SOD3. Le sodium dodecyl sulfate (SDS) est un composant

essentiel du SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page). C'est un détergent anionique qui solubilise les protéines en détruisant leur structure tertiaire et secondaire grâce à leurs liaisons avec les sous-unités polypeptidiques. Il permet également de procurer un environnement riche en charges négatives, proportionnelles à la masse moléculaire des protéines, afin d'éviter les interactions et prévenir leur précipitation. Le résultat est la formation de protéines linéaires qui vont migrer en fonction de leur masse moléculaire.

Le pourcentage d'acrylamide choisi pour faire le gel de séparation modifie la structure des « mailles » du gel et la capacité à ralentir la migration des protéines sous l'effet du champ électrique. Il a donc été choisi en fonction de la masse moléculaire des protéines. Ainsi, pour la SOD1 et SOD2 qui ont un faible poids moléculaire, des gels de séparation à 15 % ont été préparés. Pour la SOD 3, nous avons utilisé un gel de séparation à 10%.

Le gel de polyacrylamide a été préparé selon les compositions de la table 1.

	Gel de concentration (pour 2 gels, 1,5 mm)	Gel de séparation (pour 2 gels, 1,5 mm)	
	4 %	10 %	15 %
H2O	6.1 mL	8.2 mL	4.735 mL
Tris-HCL 0,5M, pH 6.8	2.5 mL	5 mL	5 mL
SDS 20%	50 microL	100 microL	100 microL
Protogel 37,5 :1 30% Acrylamide	1,3 mL	6.6 mL	10 mL
APS 10%	100 microL	150 microL	150 microL
TEMED	10 microL	15 microL	15 microL

Table 1 Composition des gels de concentration et séparation avec les dosages en fonction du pourcentage d'acrylamide.

Le gel de concentration est coulé par-dessus le gel de séparation et un peigne de 1,5 mm d'épaisseur y est déposé afin de créer 10 compartiments, dont 8 pour les échantillons, 1 pour le standard, et 1 dernier pour le marqueur de poids moléculaire (Précision Plus Protein Dual Color Standards). Le standard est un échantillon composé d'un mélange de 3 veines de garçons contrôles et 3 veines de filles contrôles. Il permet de comparer les gels entre eux.

Une fois que les deux parties ont été coulées, les gels ont ensuite été placés dans un compartiment dans lequel un tampon de migration a été ajouté.

Tampon de migration 5 X et conservé à 4°C

- 15 g Tris
 - 72 g Glycine
 - 25 ml SDS 20%
- } Dilué avec H2O dans un volume total de 1 litre.

Le gel de concentration a un pH plus bas, ainsi qu'une concentration plus faible de polyacrylamide, ce qui permet aux protéines de se concentrer au fond du puits avant de

pénétrer dans le gel de séparation, qui est plus dense. Quant au gel de séparation, il contient un pH plus élevé et une concentration plus grande de polyacrylamide, permettant de séparer les protéines selon leur masse moléculaire. A noter que 3 gels différents ont été préparés par isoforme de la SOD et par groupe (donc différents gels ont été utilisés pour les filles et les garçons).

Préparation des échantillons à charger

Le volume d'échantillon protéique nécessaire a d'abord été déterminé en testant la saturation du signal à l'Odyssey pour chacune des SOD avec un gradient de concentration de 20, 40, 60, 80 microgrammes de protéines. Les quantités relatives quantifiées à l'aide d'image J pour chacune des SOD à 20, 40, 60, 80 microgrammes ont été reportées sur un graphe et alignées sur une courbe de tendance linéaire. La validité des valeurs a été vérifiée avec le coefficient de détermination R^2 .

La quantité avant saturation et/ou la plus économe était à 40 μg de protéines pour les trois isoformes de la SOD.

Nous avons calculé la quantité d'échantillons et d'eau à charger dans chaque compartiment pour un volume final de 40 μL /puits contenant 40 μg de protéines et 10 μL de Laemmli 4 X. Le Laemmli contient notamment du Bromophenol Blue 0.1%, afin de colorer en bleu les échantillons et pouvoir suivre le front de migration ; du 2-Mercaptoéthanol, qui maintient la dénaturation des protéines en empêchant la reformation des ponts disulfures et de ce fait la reformation de la structure tertiaire de la protéine ; et du glycérol, qui permet de rendre les échantillons plus denses que le tampon de migration ce qui leur permet de descendre facilement au fond des puits du gel.

Les échantillons ont ensuite été dénaturés par chauffage pendant 5 min à 95°C puis chargés dans 9 puits (dont 1 où se trouvait le standard). Le marqueur de poids moléculaire (Précision Plus Protein Dual Color Standards) permettant de visualiser que le gradient de masse moléculaire a été chargé dans le puit restant (figure 4).

Un champ électrique faisant migrer les protéines, chargées négativement, vers le pôle positif (anode) a été appliqué durant 1h30 à une intensité constante de 0,05A.

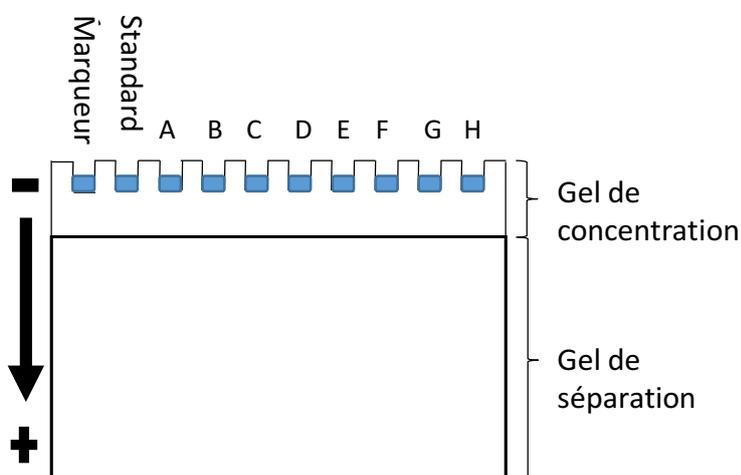


Figure 4 : Représentation schématique du gel de concentration et du gel de séparation. Les échantillons A à D sont les échantillons des nouveau-nés Ctrl et les échantillons E à H sont les nouveau-nés avec un RCIU. Le marqueur sert d'indicateur de migration et de poids moléculaire pour les échantillons. Le standard constitué d'échantillons provenant des différents groupes permet de pouvoir comparer les gels entre eux.

4.3.4 Transfert sur membrane

Après l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose pour pouvoir ensuite être marquées par des anticorps.

Principe

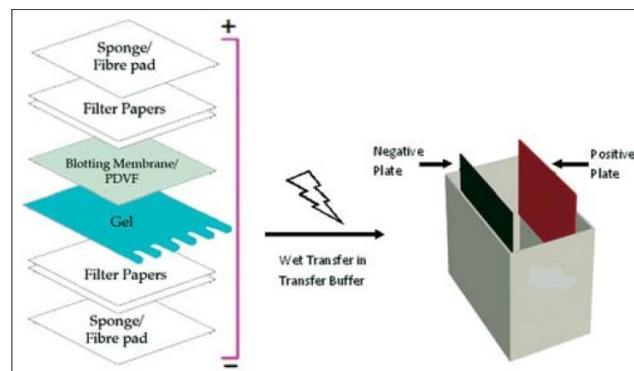
Tout comme lors de la migration, les protéines chargées négativement migrent vers l'anode grâce à un champ électrique.

Le transfert a été effectué sur une membrane de nitrocellulose car ce type de membrane engendre moins de bruit de fond en Odyssey que les membranes polyvinylidene difluoride.

Les gels ont été montés en « sandwich » (figure 5) en plaçant la membrane entre le gel et l'anode et mis dans une cuve contenant un tampon de transfert composé de :

- Tris 25 mM
- Glycine 450 mM
- Méthanol 20%

Le montage a ensuite été placé dans un bac contenant des glaçons et de l'eau pour maintenir l'environnement du transfert à environ 4 °C afin d'éviter tout risque de surchauffe. Le transfert a été effectué durant la nuit (pendant environ 16h) à une tension constante de 30 Volts.



Source : Mahmood T, Yang P-C. North Am J Med Sci. 2012 (33).

Figure 5: Montage en sandwich du gel. La membrane est placée du côté de la migration vers le pôle + afin que les protéines puissent migrer dessus. Les papiers buvard et les éponges servent à maintenir le montage en place et éviter au maximum les bulles. Les éponges sont conçues de manière à offrir la meilleure homogénéité du courant possible.

4.3.5 Blocage

La nitrocellulose est un dérivé de la cellulose ayant une forte affinité pour toutes les protéines y compris les anticorps. Afin de minimiser ces interactions et limiter le bruit de fond, la membrane a été incubée pendant 30 min dans une solution de blocage contenant de la caséine fraîchement préparée avant l'utilisation. La caséine est une phosphoprotéine

contenue dans la partie non grasse du lait qui va recouvrir les espaces restés libres sur la membrane et ainsi prévenir la liaison future et non souhaitée d'un anticorps n'importe où sur la membrane. Les anticorps vont ainsi se fixer « uniquement » sur les protéines contre lesquelles ils sont dirigés et les liaisons non-spécifiques, anticorps-membrane, sont grandement diminuées.

4.3.6 Immunomarquage

Des anticorps monoclonaux issus du sérum de souris (anticorps anti-SOD1 et anti-SOD-3) et de celui du lapin (anticorps anti-SOD2) ont été utilisés pour l'immunomarquage.

La membrane a d'abord été incubée dans la solution contenant les anticorps primaires dilués dans la caséine 1x (H₂O) et du tween 0.1% pendant 16h à 4°C (durant la nuit).

La concentration des anticorps a été choisie en fonction de leur fiche technique et en essayant différentes concentrations dans la gamme conseillée afin de trouver la concentration optimale nécessaire pour pouvoir quantifier l'ensemble des protéines d'intérêt.

La concentration des anticorps retenue était :

SOD 1 : 1/5000 ; SOD 2 : 1/500 ; SOD 3 : 1/500

Un lavage de la membrane avec une solution TBST (contenant du Tris 10mM pH 8.0, du NaCl 150 mM et du Tween-20 0.05%) permet d'éliminer les anticorps non fixés sur des protéines d'intérêt. Le Tween est en effet un détergent doux qui va avoir tendance à retirer ce qui est faiblement maintenu comme par exemple des liaisons non spécifiques.

La membrane a ensuite été plongée pendant 1h à température ambiante dans une solution contenant de la caséine 1X (H₂O) et des anticorps secondaires polyclonaux (issus du sérum d'âne) marqués par un fluorochrome. Deux types d'anticorps secondaires ont été utilisés :

- 1) Anticorps secondaire anti-mouse utilisé pour SOD 1 et 3
- 2) Anticorps secondaire anti-rabbit utilisé pour SOD 2

La même procédure a été appliquée pour marquer l'actinine sur la membrane en utilisant un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome réagissant à une longueur d'onde différente de celui qui a été utilisé pour la SOD qui se trouve sur la même membrane.

De cette façon, la couleur de l'actinine était distincte de celle de la SOD sur chaque membrane afin d'éliminer des erreurs d'interprétation dues à d'éventuels artéfacts.

Le fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire émet une lumière d'une longueur d'onde de 800 nm (correspondant à la couleur verte) pour l'anticorps anti-mouse et de de 700 nm (correspondant à la couleur rouge) pour l'anticorps anti-rabbit.

4.4 Révélation Odyssey et quantification

Les membranes ont été scannées à l'aide d'un scanner LI-COR Odyssey. Le principe de ce scanner est que lorsqu'un électron est excité à une certaine longueur d'onde et de ce fait, absorbe l'énergie d'un photon, il devient instable et émet de l'énergie sous forme

lumineuse pour retourner à son état basal, plus stable. Lors de ce processus, une partie de l'énergie est perdue, ce qui signifie que le photon émis a moins d'énergie que le photon absorbé et que la longueur d'onde émise est plus grande que la longueur d'onde absorbée. La couleur qui s'affiche varie en fonction du fluorochrome conjugué à l'anticorps secondaire et de la longueur d'onde dans le spectre de lumière visible. Ces bandes protéiques ont ensuite été quantifiées par le logiciel image J et les valeurs reportées sur un tableau Excel ad-hoc.

Afin d'évaluer la reproductibilité des gels, la moyenne pour chaque groupe a été calculée à partir des résultats obtenus des 3 membranes par groupe et par isoforme de la SOD. Ces résultats ont ensuite été utilisés pour les analyses statistiques.

4.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Les moyennes des groupes par isoforme de la SOD ont été utilisées pour comparer les groupes entre eux grâce à la méthode « 2-way Anova », qui a comparé les Ctrl avec les RCIU et les filles avec les garçons. Nous avons également utilisé le « Tukey's multiple comparison test » pour la comparaison multiple (fille Ctrl vs fille RCIU ; fille Ctrl vs garçon Ctrl ; fille Ctrl vs garçon RCIU ; garçon RCIU vs garçon Ctrl ; garçon RCIU vs fille RCIU ; garçon RCIU vs fille RCIU). Une différence significative était retenue si $P < 0.05$.

4.6 Immunofluorescence sur coupes histologiques

Une fois ces protéines quantifiées par Western blot, leur localisation tissulaire a été déterminée par immunofluorescence indirecte, afin d'étudier la répartition de ces enzymes anti-oxydantes dans la veine ombilicale.

4.6.1 Préparation des coupes

Des segments de 1 cm de cordons ombilicaux ont été fixés avec de la paraformaldéhyde 4%, puis inclus dans la paraffine. Pour cela, il a d'abord été nécessaire de déshydrater les échantillons avec des bains d'éthanol à des degrés croissants puis avec du xylène avant de les mettre dans la paraffine chauffée à 60°C. Le but de la paraffine, un composé chimiquement neutre, est de remplacer l'eau dans les tissus et d'améliorer leur tenue pour faciliter leur découpe au microtome. Des coupes d'une épaisseur de 5 μm ont été préparées à partir de l'échantillon de VO et disposées de façon à avoir deux coupes par lame.

4.6.2 Déparaffinage et réhydratation

Au moment de l'utilisation des coupes pour marquer les protéines d'intérêt, un déparaffinage a été effectué en chauffant d'abord les coupes pendant 10 min afin de faire fondre la paraffine, suivi par des bains successifs de xylène et d'éthanol, titré de façon

décroissante de 100% à 70%, pour enlever la paraffine. Les coupes ont ensuite été réhydratées avec de l'eau pure.

4.6.3 Perméabilisation et blocage

Suite au déparaffinage, les coupes ont été lavées et les membranes perméabilisées avec une solution de tampon phosphate salin (PBS) contenant du Triton X-100. Cette étape permet à la membrane cellulaire de laisser entrer les anticorps à l'intérieur de la cellule.

Afin de diminuer les liaisons aspécifiques et donc le bruit de fond, notamment entre les protéines du tissu et les anticorps, il est nécessaire de bloquer les sites de liaison. Pour le blocage, nous avons utilisé du sérum 4% (dilué avec du PBS) de l'espèce à partir duquel l'anticorps secondaire a été développé (dans notre cas il s'agissait de sérum de chèvre).

4.6.4 Anticorps primaires

Les anticorps primaires utilisés sont identiques à ceux du Western blot. Une incubation dans 150 µl d'anticorps primaires dans la solution de blocage a été réalisée toute la nuit à 4°C (dans une boîte humide afin d'éviter le dessèchement des coupes).

Le principe est que les anticorps primaires, ayant une affinité plus grande que les protéines contenues dans la solution de blocage, se fixent sur les épitopes des antigènes d'intérêt.

4.6.5 Anticorps secondaires

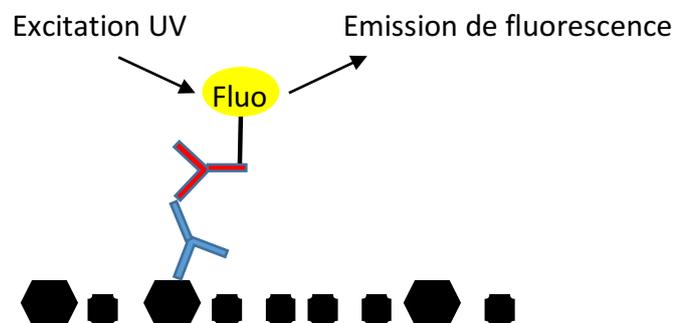
Les anticorps secondaires utilisés sont issus du sérum de chèvre et chacun est hautement spécifique aux anticorps de l'espèce à partir de laquelle a été généré l'anticorps primaire.

Il est conjugué à un fluorochrome qui émet de la lumière lorsqu'il est excité à 488nm.

Après un lavage par du PBS et Triton X-100, les coupes ont été incubées pendant 45 min avec une solution contenant l'anticorps secondaire adéquat dilué dans la solution de blocage. A partir de cette étape, les coupes ont été protégées de la lumière pour éviter un phénomène de quenching, c'est-à-dire pour éviter d'exciter les électrons du fluorochrome (figure 6).

Figure 6 : Illustration du principe de l'immunofluorescence indirecte.

L'anticorps primaire est représenté en bleu et l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome en rouge. L'excitation du fluorochrome par de la lumière UV produit une émission de lumière fluorescente.



4.6.6 Montage

Pour le montage des coupes, nous avons utilisé du VECTASHIELD Hard Set (un vecteur protecteur de fluorescence) + DAPI (un marqueur fluorescent de l'ADN) avant de déposer les lamelles transparentes sur les plaques tout en évitant la formation de bulles. Le tout a été séché durant la nuit dans un environnement à 4°C en prenant garde de protéger les coupes de la lumière, puis, pour les préserver à long terme, nous les avons scellées avec du vernis à ongle.

4.6.7 Microscope à fluorescence

Le principe de l'immunofluorescence est presque identique à celui du système de révélation par le scanner Li-cord Odyssey expliqué précédemment : le microscope envoie une énergie lumineuse à une certaine longueur d'onde qui va exciter les électrons du fluorochrome conjugué à l'anticorps secondaire et récolte l'énergie lumineuse à une autre longueur d'onde.

La grande différence entre l'Odyssey et l'immunofluorescence est que l'Odyssey n'utilise que deux longueurs d'ondes de l'infrarouge (700 et 800nm) alors que le microscope peut en général détecter du signal allant des ultra-violetes au rouge lointain.

Pour l'acquisition des images au microscope à fluorescence, nous avons utilisé deux canaux de longueurs d'onde différentes : le **DAPI**, un canal émettant à une longueur d'onde de 360 nm et qui permet de marquer en bleu l'ADN dans le noyau et la **GFP**, un canal qui excite les fluorochromes des anticorps secondaires mais aussi toutes les protéines intrinsèquement fluorescentes à 488 nm. Dans cette expérience, l'auto-fluorescence des tissus est vert.

Afin de distinguer le marquage des SOD de l'auto-fluorescence et des potentiels signaux non spécifiques de l'anticorps secondaire, nous avons comparé les coupes avec des contrôles négatifs, c'est-à-dire des coupes qui n'ont pas été incubées avec l'anticorps primaire, mais uniquement avec l'anticorps secondaire.

5 Résultats

5.1 Données démographiques

Le tableau 2 résume les caractéristiques de la population étudiée dans ce travail, répartie en 4 groupes d'étude.

	Filles		Garçons	
	Ctrl	RCIU	Ctrl	RCIU
Nombre de patients inclus	40	40	43	41
Age gestationnel (semaines)	39.6 +/- 0.9	39.3 +/- 1	39.4 +/- 1	39.3 +/- 1.1
Poids naissance (grammes)	3358 +/- 297	2617 +/- 241 *‡	3448 +/- 313	2744 +/- 220 *‡
Taille naissance (cm)	49 +/- 1.6	46 +/- 1.6 *‡	49 +/- 1.8	47 +/- 1.6 *‡
Périmètre crânien (cm)	34.5 +/- 1.08 ‡	32.7 +/- 1.1 *‡	35.1 +/- 1.1 ‡	33.9 +/- 1.06 *‡
Poids placenta (grammes)	638.59 +/- 133.5	452.22 +/- 75.1 *	636.82 +/- 121.1	444.38 +/- 84.6 *
Indice pondéral (g/cm3)	2.80 +/- 0.2	2.6 +/- 0.2 *	2.77 +/- 0.22	2.57 +/- 0.19 *
Age maternel (années)	31 +/- 6	30 +/- 5	31 +/- 6	30 +/- 5

Table 2 Données démographiques relatives à l'ensemble des mères et nouveau-nés dont les échantillons ont été utilisés dans ce travail.

* différence significative entre RCIU et Ctrl, ‡ différence significative entre filles et garçons ($p < 0.05$).

Aucune différence n'est relevée entre les groupes en ce qui concerne l'âge gestationnel, ainsi que l'âge maternel au moment de l'accouchement.

Comme attendu, les paramètres de croissance (poids corporel, taille, périmètre crânien, indice pondéral) sont tous significativement réduits dans le groupe RCIU par rapport au groupe Ctrl, pour chaque sexe.

5.2 Résultats de la quantification par Western Blot

Les résultats ont été obtenus par Western blot en évaluant la quantité de protéines spécifiques contenues dans 40 échantillons répartis de façon aléatoire dans 4 « pools » de 10 échantillons par groupe d'étude (fille Ctrl, fille RCIU, garçon Ctrl, garçon RCIU).

La **figure 7** correspond aux résultats de la quantification de la Cu-Zn SOD (SOD 1) dont le poids moléculaire (PM) est de 23 kDa et de l'actinine dont le PM est de 43 kDa. Une différence significative a été observée entre les garçons Ctrl et les filles Ctrl ($P=0.005$), alors que les résultats pour les filles RCIU et garçons RCIU ne montrent pas de différence significative. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes RCIU et Ctrl, autant chez les filles que chez les garçons.

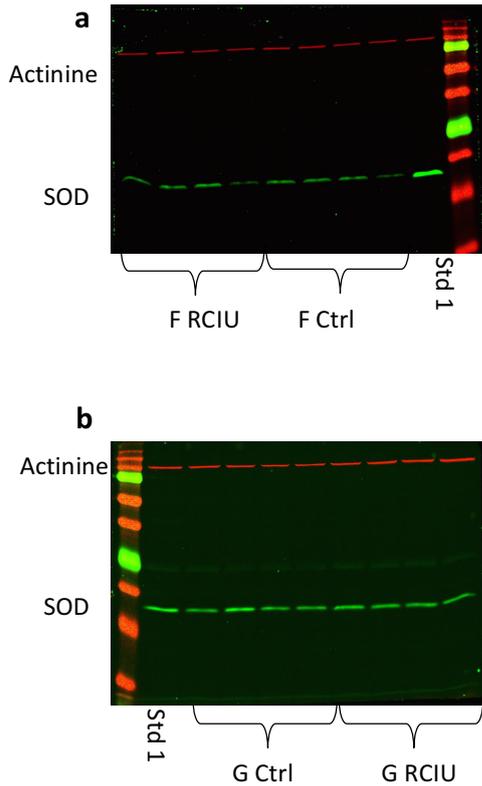
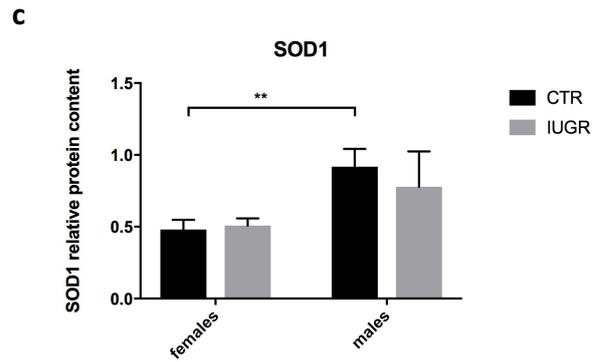


Figure 7 : Résultats de la quantification de la SOD1 par Western blot. La figure 1a correspond à la quantification de la protéine chez les filles Ctrl et RCIU et est représentative des trois Western blot qui ont été faits. La figure 1b correspond à la quantification de la protéine chez les garçons Ctrl et RCIU et est également représentative des 3 Western blot. La figure 1c représente les moyennes obtenues pour chaque groupe à partir des 3 Western blot.

** différence significative ($P < 0.01$).



La **figure 8** correspond aux résultats de la quantification de la Mn-SOD (SOD2) (PM=22 kDa) et de l'actinine. Aucune différence significative entre les groupes n'a été relevée, autant entre les filles et les garçons qu'entre les RCIU et Ctrl.

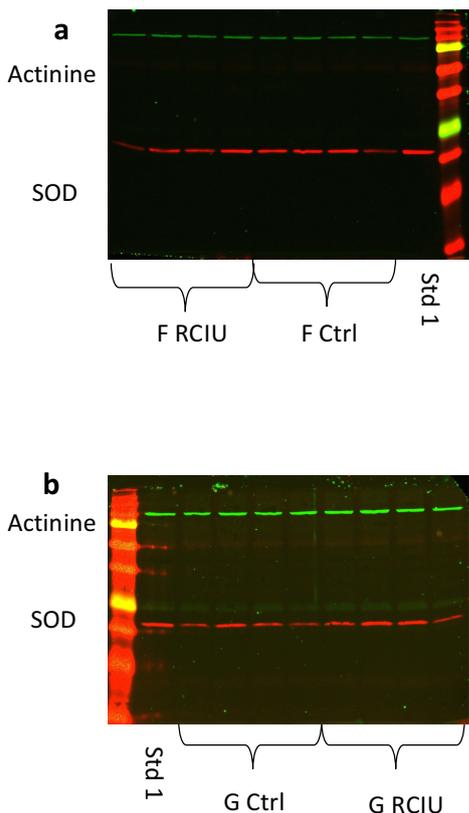
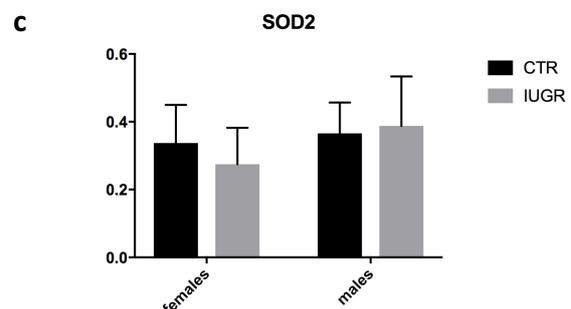


Figure 8 : Résultats de la quantification de la SOD2 par Western blot. La figure 1a correspond à la quantification de la protéine chez les filles Ctrl et RCIU et est représentative des trois Western blot qui ont été faits. La figure 1b correspond à la quantification de la protéine chez les garçons Ctrl et RCIU et est également représentative des 3 Western blot. La figure 1c représente les moyennes obtenues pour chaque groupe à partir des 3 Western blot.



La **figure 9** correspond aux résultats de la quantification de la EC-SOD (SOD3) (PM=32 kDa) et de l'actinine. Une différence significative a été observée entre les filles Ctrl et les garçons Ctrl ($P=0.001$) ainsi qu'entre les filles RCIU et les garçons RCIU ($P=0.0004$). Cependant, les résultats étaient comparables entre le groupes RCIU et Ctrl, autant chez les filles que chez les garçons.

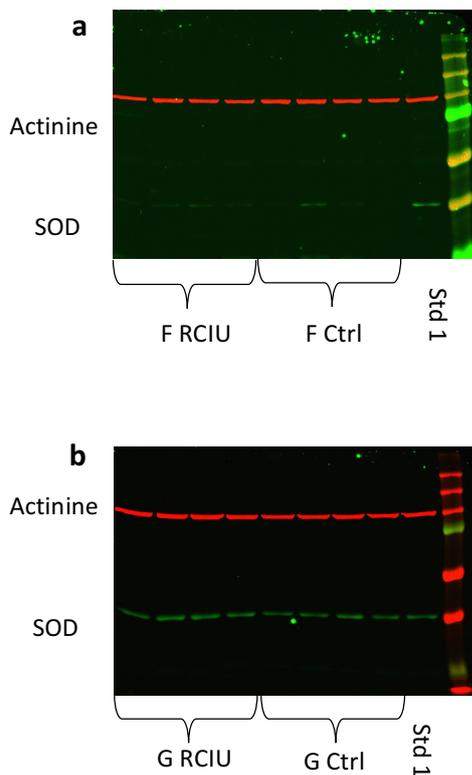
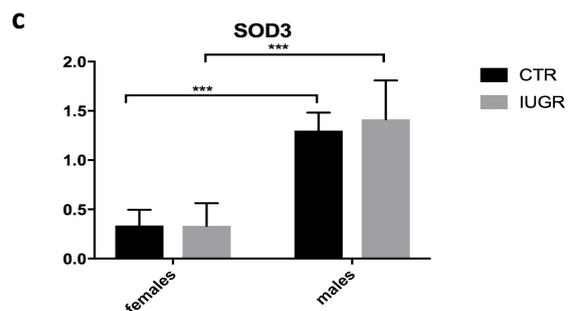


Figure 9 : Résultats de la quantification de la SOD3 par Western blot. La figure 1a correspond à la quantification de la protéine chez les filles Ctrl et RCIU et est représentative des trois Western blot qui ont été faits. La figure 1b correspond à la quantification de la protéine chez les garçons Ctrl et RCIU et est également représentative des 3 Western blot. La figure 1c représente les moyennes obtenues pour chaque groupe à partir des 3 Western blot.
*** différence significative ($P < 0.01$)



Les résultats que nous avons obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence une différence significative entre les RCIU et les Ctrl. Par contre, ils ont démontré qu'il existe une différence significative dans l'expression de la SOD entre les filles et les garçons.

5.3 Localisation des enzymes par immunofluorescence

Cette technique de marquage a été utilisée afin d'étudier la localisation tissulaire des SOD, et de mettre en évidence une éventuelle différence entre les Ctrl et RCIU ainsi qu'entre les filles et les garçons.

Les échantillons de VO utilisés pour l'immunofluorescence n'étaient pas toujours les mêmes que ceux utilisés pour la quantification par Western blot. De plus, comme les échantillons ont été répartis en 4 « pools » pour chaque groupe, une comparaison directe entre les résultats obtenus par ces deux techniques n'aurait de toute façon pas été possible, puisque nous n'avons pas toujours utilisé le même « pool » d'échantillons.

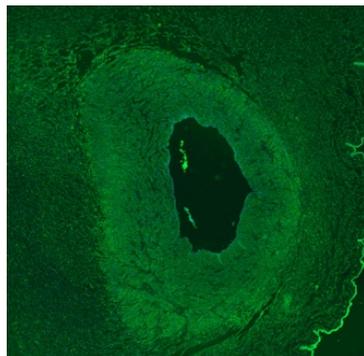
Les anticorps utilisés pour l'immunofluorescence étaient les mêmes que ceux pour la quantification par Western blot. Les anticorps anti-SOD1 et anti-SOD2 ont bien fonctionné dans cette expérience (figure 10 et 11) ; mais il n'en n'a pas été de même pour l'anticorps anti-SOD3. En effet, dans tous les groupes, le marquage visible sur les coupes exposées à l'anticorps primaire anti-SOD3 ne se différencie pas des contrôles négatifs (voir figure 12) ; ces derniers correspondent aux coupes ayant été exposées à l'anticorps secondaire en absence d'anticorps primaire, afin d'évaluer l'éventuel marquage non-spécifique dû à l'anticorps secondaire.

La détection par immunofluorescence des SOD1 et SOD2 ne met pas en évidence de différence notable au niveau de l'intensité du marquage entre les différents groupes. Il est toutefois important de souligner que la détection de protéines par immunofluorescence sur coupes histologiques n'est pas une technique quantitative et ne permet de mettre en évidence que des différences très marquées au niveau de l'expression des protéines d'intérêt.

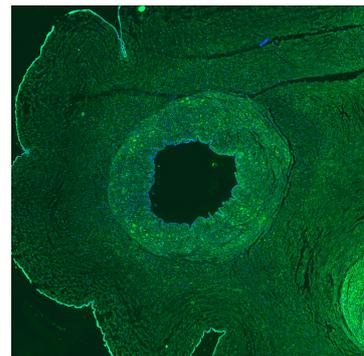
La comparaison des VO après exposition de ces coupes aux anticorps anti-SOD 1 et anti-SOD2 n'a pas montré de différence dans la localisation des ces enzymes entre les RCIU et Ctrl, ni entre filles et garçons. Par contre, la SOD1 semble être localisée préférentiellement dans la média veineuse, alors que la SOD2 se trouve préférentiellement dans l'adventice. Ce phénomène s'observe dans tous les groupes.

(A noter que la version imprimée ne permet pas de visualiser le marquage que nous distinguons sur l'écran).

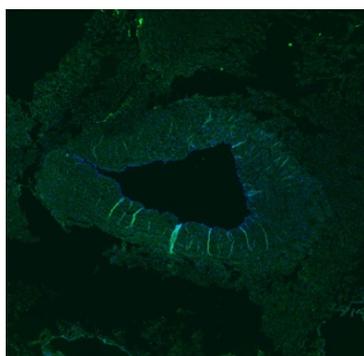
Figure 10 : Coupes transversales avec grossissement 10 X de la VO marquées par l'anticorps anti-SOD1. Fille Ctrl (a), fille RCIU (c), garçon Ctrl (e) et garçon RCIU (g) et les contrôles négatifs, c'est-à-dire sans anticorps primaire, en dessous : fille Ctrl (b), fille RCIU (d), garçon Ctrl (f) et garçon RCIU (h).



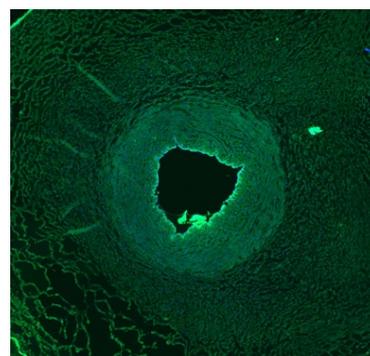
a) F Ctrl, anticorps anti-SOD1.
Coupe n° 170.23



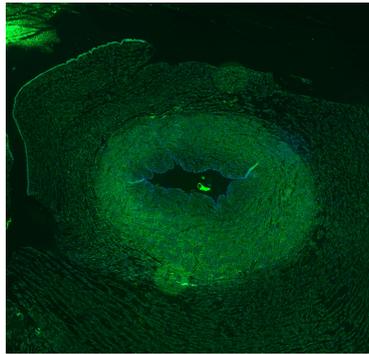
c) F RCIU, anticorps anti-SOD1.
Coupe n° 189



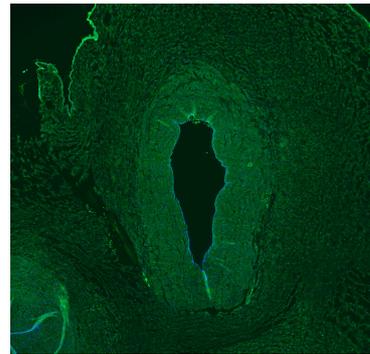
b) F Ctrl, négatif. Coupe n° 163.9



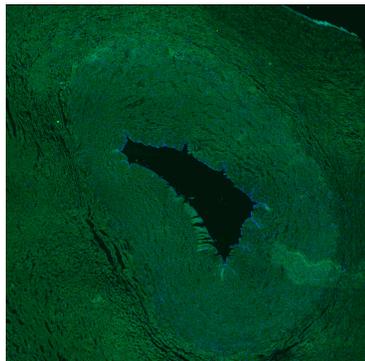
d) F RCIU, négatif. Coupe n° 188.15



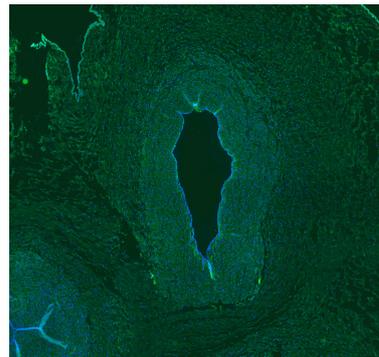
e) G Ctrl, anticorps anti-SOD1.
Coupe n° 180.4



g) G RCIU, anticorps anti-SOD1.
Coupe n° 234.7

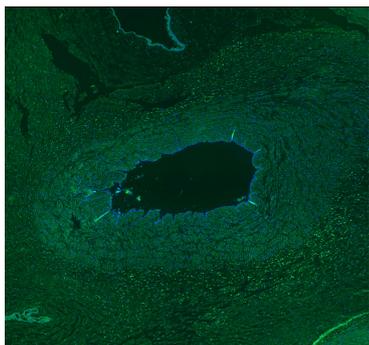


f) G Ctrl, négatif. Coupe n° 166.2

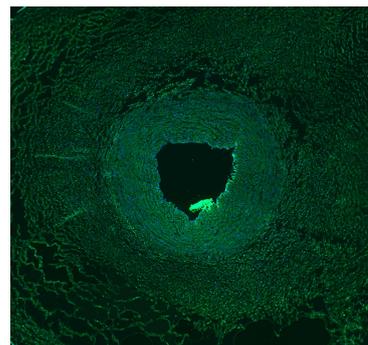


h) G RCIU, négatif. Coupe n° 234.8

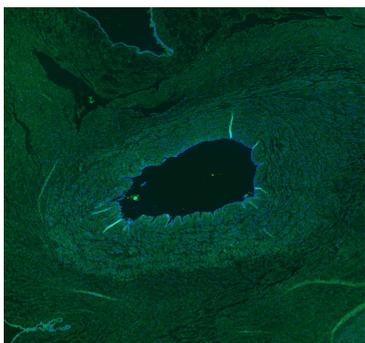
Figure 11 : Coupes transversales avec grossissement 10 X de la VO marquées par l'anticorps anti-SOD2. Fille Ctrl (a), fille RCIU (c), garçon Ctrl (e) et garçon RCIU (g) SOD2 et les contrôles négatifs, c'est-à-dire sans anticorps primaire, en dessous : fille Ctrl (b), fille RCIU (d), garçon Ctrl (f) et garçon RCIU (h).



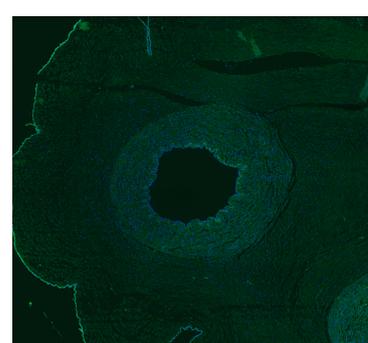
a) F Ctrl, anticorps anti-SOD2.
Coupe n° 163.11



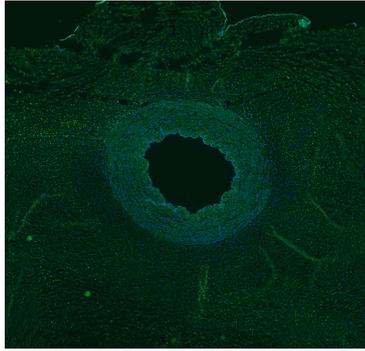
c) F RCIU, anticorps anti-SOD2.
Coupe n° 188.15



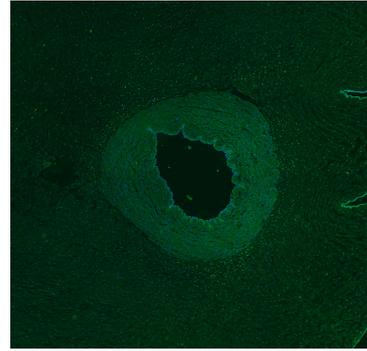
b) F Ctrl, négatif. Coupe n° 163.11



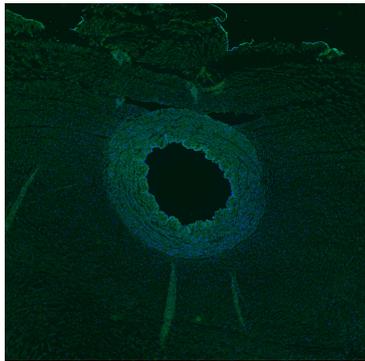
d) F RCIU, négatif. Coupe n° 189



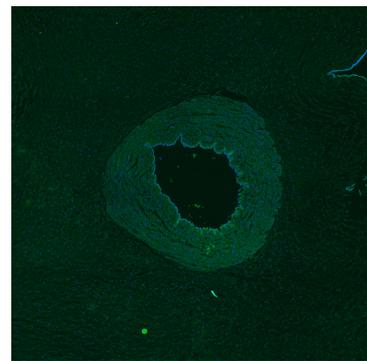
e) G CTRL, anticorps anti-SOD2.
Coupe n° 191.14



g) G RCIU, anticorps anti-SOD2.
Coupe n° 199.4

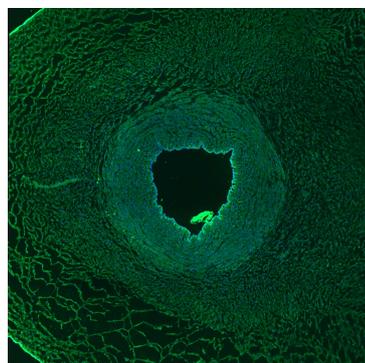


f) G Ctrl, négatif. Coupe n° 191.14

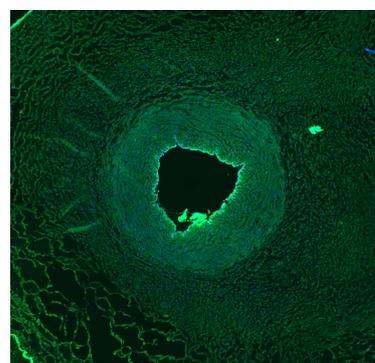


h) G RCIU, négatif. Coupe n° 199.4

Figure 12 : Coupes transversales avec grossissement 10 X de la VO marquées par l'anticorps anti-SOD3. Fille RCIU (a) qui a été marquée par l'anticorps anti-SOD3 et le contrôle négatif, c'est-à-dire sans anticorps primaire, à droite (b). Malheureusement, en comparant avec le contrôle négatif, nous observons que l'anticorps primaire anti-SOD3 n'a pas fonctionné en immunofluorescence. Des résultats similaires ont été obtenus dans tous les groupes, à savoir pas de différence entre les contrôles négatifs et les coupes exposées à l'anticorps primaire.



a) F Ctrl, anticorps anti-SOD3.
Coupe n° 188.14



b) F Ctrl, négatif. Coupe n° 188.15

6 Discussion

6.1 Stress oxydatif et les défenses anti-oxydantes chez les RCIU versus contrôles

Ce travail nous permet de constater que les résultats de la quantification par Western blot des SOD1, SOD2, et SOD3 dans la veine ombilicale sont comparables chez les RCIU et Ctrl. Ces observations semblent aller dans le même sens qu'une étude qui a montré une expression similaire de la SOD au niveau des échantillons du myomètre utérin récoltés chez les femmes ayant eu une grossesse compliquée d'un RCIU et chez celles qui ont eu une grossesse harmonieuse (34). Cette étude s'est intéressée aux mécanismes mis en place dans le microenvironnement fœtal pour contrer les effets du stress oxydatif chez les RCIU mais n'a pas mis en évidence l'implication de la SOD, du moins pas au niveau du myomètre.

Certaines études randomisées ont montré un niveau de stress oxydatif augmenté chez les RCIU, notamment dans le plasma des femmes avec une grossesse compliquée d'un RCIU (25,35) ainsi que dans le cordon ombilical et le placenta (25). Partant de ces observations, l'implication du stress oxydatif dans la fonction vasculaire chez les RCIU est fortement suspectée et il serait intéressant de chercher si d'autres paramètres de la régulation du stress oxydatif sont modifiés. Pour cela, les hypothèses ci-dessous permettraient de poursuivre les recherches afin de déterminer si les mécanismes engendrant un RCIU sont dus, entre autres, à un dysfonctionnement dans la régulation du stress oxydatif :

- Quantifier les ROS. Il n'est pas possible de déterminer le sens de la régulation du stress oxydatif uniquement avec les entités anti- ou pro-oxydantes. En effet, une augmentation des protéines anti-oxydantes, par exemple, pourrait être observée aussi bien en cas de stress oxydatif augmenté (leur expression serait alors augmentée pour essayer de contrer le mécanisme augmentant la production des radicaux libres de l'oxygène) que diminué (dans ce cas, l'augmentation de l'expression des protéines anti-oxydantes serait suffisante pour lutter contre les ROS).
- Quantifier la catalase. Celle-ci joue un rôle important dans la réaction anti-oxydante, en transformant le peroxyde d'hydrogène formé par la dismutation du superoxyde en H₂O et O₂. Nous n'avons pas observé de différence au niveau de la SOD, il s'agirait donc de voir s'il en existe au niveau de la catalase.
- Etudier la relaxation endothélium-dépendante dans des chambres à organes en présence de différents agents pharmaceutiques afin de comparer leur effet sur la vasoréactivité entre les Ctrl et les RCIU. Il serait par exemple intéressant de faire cette étude en présence d'anti-oxydants. L'utilisation d'inhibiteurs de la XO pourrait également être une idée; en effet une amélioration de la fonction endothéliale a pu être mise en évidence en présence de ces inhibiteurs au niveau de la veine (30) (comme expliqué dans la partie 2.4.1).
- Si la suite des recherches sur la fonction endothéliale met en évidence un découplage de la eNOS, il serait alors judicieux de quantifier la BH₄, dont le déficit pourrait en être une des causes.

Quant aux résultats observés sur les images d'immunofluorescence, la localisation de la SOD1 et celle de la SOD2 au niveau de la VO sont comparables entre les groupes.

Les résultats obtenus, dans le cadre de ce travail, suggèrent que la SOD1, SOD2 et la SOD3 ne sont probablement pas impliquées dans le processus menant à une altération de la vasoréactivité de la VO chez les nouveau-nés avec un RCIU. Il est important, toutefois, de relever qu'une absence de différence au niveau de la quantité d'enzymes présente ne signifie pas forcément qu'il n'y a pas de différence au niveau de leur activité. Dans l'idéal, il faudrait pouvoir mesurer l'activité des SOD dans la VO des différents groupes.

Nos observations ne vont pas dans le même sens que celles de Schneider D et al. Ce groupe de chercheurs s'est intéressé aux entités anti- et pro-oxydantes dans le cordon ombilical des RCIU et a trouvé une présence diminuée de la SOD1 et SOD2 dans la couche musculaire et endothéliale des artères ombilicales et du chorion en cas de RCIU, suggérant de ce fait leur implication dans la fonction vasculaire (36). Cependant, il faut souligner que nous nous sommes intéressés à la VO, alors que l'étude ci-dessus met en évidence des différences au niveau des artères ombilicales.

6.2 Différence entre filles et garçons

Outre la comparaison de l'expression des SOD1, SOD2 et SOD3 dans la VO des nouveau-nés avec un RCIU et celle des Ctrl, ce travail nous a permis de mettre en évidence un phénomène tout à fait intéressant. En effet, nous avons constaté une différence significative dans l'expression de la SOD 1 entre les filles et les garçons Ctrl ($P < 0.005$) ainsi que dans l'expression de la SOD 3 aussi bien entre les filles et les garçons Ctrl ($P < 0.005$) que les RCIU ($P < 0.005$). Ces résultats suggèrent fortement l'existence d'une différence dans la régulation du statut oxydatif en fonction du sexe. Cette hypothèse va dans le sens d'un groupe de chercheurs américains qui a montré, chez des patients souffrant de maladie artérielle périphérique, une différence dans la production de ROS dans l'endothélium des artères en fonction du sexe, celle-ci étant augmentée chez les femmes ayant participé à leur étude (37).

Une différence entre les sexes avait déjà été observée au niveau de la réactivité vasculaire dans l'étude de Peyter et al. (6). En effet, chez les filles avec un RCIU, l'altération fonctionnelle concernait la diminution de la vasorelaxation induite par le NO, alors que chez les garçons, l'altération se trouvait au niveau de la vasoconstriction. Cette observation tend à suggérer une différence au niveau de la régulation du tonus vasculaire en fonction du sexe.

De façon plus générale et au vu des résultats obtenus, il est important de souligner qu'il existe très peu de recherches dans la littérature qui sont menées en distinguant les sexes.

La plupart des expériences réalisées chez l'animal se limitent aux mâles. Quant aux études humaines, elles considèrent souvent les hommes et les femmes comme un seul groupe.

Les compréhensions biophysiologicals sont extrapolées pour les deux sexes et les traitements appliqués dans le cas des maladies cardiovasculaires, par exemple, sont identiques pour les hommes et les femmes. Pourtant, nous réalisons de plus en plus qu'il existe une différence notoire dans la genèse de ces maladies. De ce fait, des recherches plus approfondies devraient être entreprises pour mieux comprendre ces différences afin de proposer une meilleure prise en charge thérapeutique, plus adaptée, en fonction du sexe de l'individu.

6.3 Différents types de biais

6.3.1 Erreurs aléatoires

Les erreurs aléatoires sont souvent présentes dans un échantillonnage. Afin que ces erreurs tendent à s'annuler, nous avons choisi de travailler avec un grand nombre d'échantillons répartis par « pool » (40 échantillons par groupe, répartis aléatoirement en 4 « pools » de 10 échantillons), afin de limiter l'effet de la variabilité individuelle et de ne mettre en évidence que les différences présentes dans la majorité des cas de chaque groupe.

6.3.2 Biais de sélection

Dans ce travail, nous pouvons identifier au moins quatre biais de sélection :

- Certaines informations concernant les données prénatales étaient manquantes. Par exemple, celles sur la cassure de la courbe de croissance. Il se peut donc que les groupes RCIU contiennent des échantillons de nouveau-nés avec un poids à la naissance inférieur au 10^{ème} percentile sans cassure de la courbe de croissance (les SGA) et que les groupes contrôles contiennent des échantillons de nouveau-nés avec une cassure de la courbe de croissance sans avoir un poids à la naissance en dessous du 10^{ème} percentile (c'est-à-dire les RCIU).
- Lors du recrutement des femmes donneuses, aucune distinction n'a été faite sur leur origine ethnique. Or, certaines études se sont intéressées aux différences dans le statut oxydatif en fonction de l'ethnie et ont observé un niveau de stress oxydatif plus élevé chez les afro-américaines comparées aux caucasiennes (38).
- Le profil anti-oxydant varie en fonction de l'âge gestationnel avec une augmentation observée des SOD, catalase et glutathion peroxydase chez les enfants nés à terme (> 37 SG) comparés à ceux qui sont nés avant la 37^{ème} semaines de gestation (39). Même si aucune étude n'a clairement quantifié le niveau de stress oxydatif entre la 37^{ème} et 42^{ème} semaine de gestation, il n'est pas impossible que le statut oxydatif continue à évoluer au cours de cette période. Néanmoins, les données démographiques récoltées ont montré que les 4 groupes étudiés dans ce travail ne présentent pas de différence significative au niveau de leur âge gestationnel au moment de la naissance.

- Aucune information sur le père n'a été relevée lors de la récolte des cordons. Ceci implique que ni l'origine ethnique, ni les antécédents de maladies chez le père n'ont été pris en compte, alors que ces éléments pourraient influencer les résultats.
- Aucun critère d'inclusion ou d'exclusion concernant le type d'accouchement (césarienne ou accouchement par voie basse, avec ou sans matériel d'extraction etc.) n'a été posé. Or, il est tout à fait possible que le niveau de stress oxydatif varie selon les différentes techniques et le déroulement de l'accouchement.

Afin de minimiser les biais, les échantillons idéaux de VO pour étudier les mécanismes conduisant à un RCIU seraient ceux récoltés chez des jumeaux monozygotes dont un des jumeaux aurait un RCIU. L'avantage serait d'éliminer des biais importants grâce à un environnement maternel et un génome d'ADN identiques.

7 Conclusion et perspectives

Il s'agit, à notre connaissance, de la première étude cherchant à quantifier les différentes isoformes de la SOD dans la veine ombilicale des enfants nés avec un RCIU et ceux avec une croissance harmonieuse.

Aucune différence dans l'expression des trois isoformes de la SOD impliquées dans la protection contre le stress oxydatif n'a pu être démontrée entre les RCIU et les contrôles à travers l'expérience qui a été réalisée dans le cadre de ce travail, contrairement à notre hypothèse de départ. Cependant, nous avons observé une différence entre les filles et les garçons avec une expression plus élevée de la SOD 1 ($P < 0.005$) et la SOD3 ($P < 0.005$) chez les garçons, aussi bien chez les RCIU que les Ctrl, confirmant l'importance de poursuivre séparément les recherches en fonction du sexe.

La suite du projet consistera notamment à quantifier les ROS et la catalase, afin de déterminer s'il y a une altération dans la régulation du stress oxydatif. Il s'agira également d'étudier la relaxation endothélium-dépendante en présence de certains agents pharmacologiques, afin mettre en évidence la présence d'une éventuelle dysfonction endothéliale dans la VO en cas de RCIU.

8 Remerciements

Un remerciement tout particulier à la Docteure Anne-Christine Peyter à qui j'adresse toute ma gratitude pour avoir partagé ses connaissances d'experte et pour son soutien fondamental tout au long de ce travail de Master.

Un grand merci à Steeve Menetrey et Manon Beaumann qui ont toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au laboratoire ainsi que pour leur disponibilité et les corrections apportées lors de la rédaction de ce mémoire.

Une attention particulière à la Docteure Catherine Zydorczyk que je remercie profondément d'avoir partagé son grand savoir scientifique, en particulier sur le sujet du stress oxydatif.

Un grand merci également à la Docteure Sandrine Gremlich-Irrausch, pour les conseils lors de ma défense orale.

Merci enfin aux Professeurs Jean-François Tolsa et Yvan Vial, respectivement tuteur et expert de ce travail de Master, pour leurs judicieux conseils qui ont alimentés ma réflexion.

9 Références bibliographiques

1. **Saleem T, Sajjad N, Fatima S, Habib N, Ali SR, Qadir M.** Intrauterine growth retardation--small events, big consequences. *Ital J Pediatr.* 2011 Sep 7;37:41.
2. **Lausman A, Kingdom J, Gagnon R, Basso M, Bos H, Crane J, et al.** Intrauterine Growth Restriction: Screening, Diagnosis, and Management. *J Obstet Gynaecol Can.* 2013 Aug 1;35(8):741–8.
3. **Masson E.** Retard de croissance intra-utérin et fœtus petits pour l'âge gestationnel [Internet]. EM-Consulte. [cited 2018 Dec 1]. Available from: <http://www.em-consulte.com/article/989587/retard-de-croissance-intra-uterin-et-f?us-petits->
4. **Zydorczyk C, Armengaud JB, Peyter AC, Chehade H, Cachat F, Juvet C, et al.** Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: cardiovascular and renal consequences and preventive approaches. *J Dev Orig Health Dis.* 2017 Aug;8(4):448–64.
5. **Ligi I, Grandvuillemin I, Andres V, Dignat-George F, Simeoni U.** Low Birth Weight Infants and the Developmental Programming of Hypertension: A Focus on Vascular Factors. *Semin Perinatol.* 2010 Jun 1;34(3):188–92.
6. **Peyter A-C, Delhaes F, Baud D, Vial Y, Diaceri G, Menétrey S, et al.** Intrauterine growth restriction is associated with structural alterations in human umbilical cord and decreased nitric oxide-induced relaxation of umbilical vein. *Placenta.* 2014 Nov;35(11):891–9.
7. **Romo A, Carceller R, Tobajas J.** Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology. *Pediatr Endocrinol Rev PER.* 2009 Feb;6 Suppl 3:332–6.
8. **Cetin I, Alvino G.** Intrauterine Growth Restriction: Implications for Placental Metabolism and Transport. A Review. *Placenta.* 2009 Mar 1;30:77–82.
9. **Hasegawa J, Arakawa K, Nakamura M, Matsuoka R, Ichizuka K, Katsufumi O, et al.**

- Analysis of placental weight centiles is useful to estimate cause of fetal growth restriction. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011 Nov 1;37(11):1658–65.
10. **Wallace JM, Bhattacharya S, Horgan GW.** Gestational age, gender and parity specific centile charts for placental weight for singleton deliveries in Aberdeen, UK. *Placenta.* 2013 Mar 1;34(3):269–74.
 11. **Ghezzi F, Raio L, Duwe DG, Cromi A, Karousou E, Dürig P.** Sonographic umbilical vessel morphometry and perinatal outcome of fetuses with a lean umbilical cord. *J Clin Ultrasound.* 2005 Jan 1;33(1):18–23.
 12. **Raio L, Ghezzi F, Naro ED, Duwe DG, Cromi A, Schneider H.** Umbilical Cord Morphologic Characteristics and Umbilical Artery Doppler Parameters in Intrauterine Growth–Restricted Fetuses. *J Ultrasound Med.* 2003 Dec 1;22(12):1341–7.
 13. **Li H, Förstermann U.** Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 190(3):244–54.
 14. **Morton JS, Cooke C-L, Davidge ST.** In Utero Origins of Hypertension: Mechanisms and Targets for Therapy. *Physiol Rev.* 2016 Apr;96(2):549–603.
 15. **Lueder FL, Kim S-B, Buroker CA, Bangalore SA, Ogata ES.** Chronic maternal hypoxia retards fetal growth and increases glucose utilization of select fetal tissues in the rat. *Metabolism.* 1995 Apr 1;44(4):532–7.
 16. **Jensen GM, Moore LG.** The effect of high altitude and other risk factors on birthweight: independent or interactive effects? *Am J Public Health.* 1997 Jun;87(6):1003–7.
 17. **Webster RP, Roberts VHJ, Myatt L.** Protein Nitration in Placenta – Functional Significance. *Placenta.* 2008 Dec 1;29(12):985–94.
 18. **Li H, Horke S, Förstermann U.** Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014 Nov;237(1):208–19.
 19. **Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C.** Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci IJBS.* 2008 Jun;4(2):89–96.
 20. **Touyz RM, Schiffrin EL.** Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004 Oct 1;122(4):339–52.
 21. **Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC.** Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol.* 2013 Jul;87(7):1157–80.
 22. **Förstermann U, Sessa WC.** Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012 Apr 1;33(7):829–37.
 23. **Rueda-Clausen CF, Stanley JL, Thambiraj DF, Poudel R, Davidge ST, Baker PN.** Effect of prenatal hypoxia in transgenic mouse models of preeclampsia and fetal growth restriction. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* 2014 Apr;21(4):492–502.
 24. **Rathore R, Zheng Y-M, Niu C-F, Liu Q-H, Korde A, Ho Y-S, et al.** Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2008 Nov 1;45(9):1223–31.
 25. **Biri A, Bozkurt N, Turp A, Kavutcu M, Himmetoglu Ö, Durak İ.** Role of Oxidative Stress in Intrauterine Growth Restriction. *Gynecol Obstet Invest.* 2007;64(4):187–92.
 26. **Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ.** NADPH Oxidases in Vascular Pathology. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Sep 7;20(17):2794–814.
 27. **Guzik Tomasz J., Sadowski Jerzy, Guzik Bartłomiej, Jopek Andrew, Kapelak**

- Boguslaw, Przybyłowski Piotr, et al.** Coronary Artery Superoxide Production and Nox Isoform Expression in Human Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Feb 1;26(2):333–9.
28. **Berry CE, Hare JM.** Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol.* 2004 Mar 16;555(Pt 3):589–606.
 29. **Baudin B.** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio.* 2006Jan 1;2(1):43–52.
 30. **Farquharson CAJ, Butler R, Hill A, Belch JFJ, Struthers AD.** Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation.* 2002 Jul 9;106(2):221–6.
 31. **Förstermann U.** Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 2010 May 1;459(6):923–39.
 32. **Jung Oliver, Marklund Stefan L., Xia Ning, Busse Rudi, Brandes Ralf P.** Inactivation of Extracellular Superoxide Dismutase Contributes to the Development of High-Volume Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Mar 1;27(3):470–7.
 33. **Mahmood T, Yang P-C.** Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North Am J Med Sci.* 2012 Sep;4(9):429–34.
 34. **Biberoglu E, Biberoglu K, Kirbas A, Daglar K, Genc M, Avci A, et al.** Circulating and myometrial markers of oxidative stress in pregnant women with fetal growth restriction. *J Obstet Gynaecol Res.* 42(1):29–35.
 35. **Karowicz-Bilinska A, Kędziora-Kornatowska K, Bartosz G.** Indices of oxidative stress in pregnancy with fetal growth restriction. *Free Radic Res.* 2007 Jan 1;41(8):870–3.
 36. **Schneider D, Hernández C, Farías M, Uauy R, Krause BJ, Casanello P.** Oxidative stress as common trait of endothelial dysfunction in chorionic arteries from fetuses with IUGR and LGA. *Placenta.* 2015 May 1;36(5):552–8.
 37. **Gardner AW, Parker DE, Montgomery PS, Sosnowska D, Casanegra AI, Ungvari Z, et al.** Gender and racial differences in endothelial oxidative stress and inflammation in patients with symptomatic peripheral artery disease. *J Vasc Surg.* 2015 May 1;61(5):1249–57.
 38. **Fearheller DL, Park J-Y, Rizzo V, Kim B, Brown MD.** Racial differences in the responses to shear stress in human umbilical vein endothelial cells. *Vasc Health Risk Manag.* 2011;7:425–31.
 39. **Giuffrè M, Rizzo M, Scaturro G, Pitruzzella A, Gammazza AM, Cappello F, et al.** Oxidative stress markers at birth: Analyses of a neonatal population. *Acta Histochem.* 2015 May 1;117(4):486–91.