

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

**EFFET DU STRESS PRÉNATAL MATERNEL ENGENDRÉ PAR UNE
CATASTROPHE NATURELLE SUR L'AXE MÈRE-PLACENTA-FŒTUS :
IMPACT DU MOMENT DE L'EXPOSITION ET DU SEXE DU FŒTUS**

Par

Joey St-Pierre

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et Examineur interne	Jacques Bernier INRS – Institut Armand-Frappier
Examinatrice externe	Isabelle Ouellet-Morin Université de Montréal
Examineur externe	Yves Giguère Université Laval
Directrice de recherche	Cathy Vaillancourt INRS – Institut Armand-Frappier
Codirectrice de recherche	Suzanne King Université McGill

© Droits réservés de *Joey St-Pierre*, 2017

17 Décembre 2017

REMERCIEMENT

Je tiens, d'abord, à exprimer ma plus grande affection et ma gratitude envers ma directrice, Mme **Cathy Vaillancourt**, pour la confiance et le suivi serré au cours de ce parcours qui a duré plus de 7 ans. Tu as su mettre à profit mes capacités insoupçonnées du début à la fin. Ton soutien moral dans divers contextes m'a permis de m'épanouir en tant que scientifique, mais aussi en tant que personne. Ton œil critique et avisé m'a toujours bien guidé, malgré mes doutes souvent irrationnels. Merci d'avoir fait de moi un de tes protégés. Mes plus sincères remerciements à ma codirectrice, Mme **Suzanne King**, qui m'a confié la tâche primordiale et ardue de m'occuper de la collecte des précieux échantillons placentaires de la cohorte QF2011. Sans cette confiance, toute cette aventure n'aurait pas été possible, je n'aurais pas osé sortir de ma zone de confort et poursuivi l'aventure au doctorat.

Je remercie fortement chacun des membres du jury pour avoir accepté de participer à l'étape finale de mon doctorat. Merci au M. **Jacques Bernier** d'avoir accepté d'assumer le rôle de président de jury et d'évaluateur interne. Merci également aux évaluateurs externes, Mme **Isabelle Ouellet-Morin** et M. **Yves Giguère**.

Je ne peux pas passer sous silence l'énorme contribution de tous **mes collègues**, passés et présents, à mon apprentissage. C'est avec patience et dévouement qu'ils m'ont conseillé et aidé. Faire partie intégrante de votre groupe a su me motiver. Je tiens à remercier particulièrement **Laetitia Laurent** pour son écoute, son support moral, son aide et son encouragement au cours du doctorat.

Je tiens aussi à remercier les membres du projet QF2011 soit **Guillaume Elgeili** pour toute son aide avec les analyses statistiques. Aussi les collaborateurs australiens soient **Sue Kildea** ainsi que **Paul Dawson** pour leur aide précieuse en lors de la récolte des tissus placentaires en Australie.

Merci à tous **mes amis** pour votre appui indéfini, vous êtes synonyme de famille.

Je désire finalement porter un vibrant hommage à **ma famille et surtout mes parents**, pour leur support inconditionnel, sans qui je n'aurais pu atteindre ce niveau d'étude. Pour tout ce qu'ils ont fait pour mes frères et moi.

RÉSUMÉ

Le placenta humain régule le transfert du stress maternel au fœtus, notamment *via* l'activité de l'enzyme 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2). La 11 β -HSD2 convertit le cortisol maternel en cortisone inactive, protégeant ainsi le fœtus. Le stress maternel prénatal est associé à une diminution de l'activité de la 11 β -HSD2 placentaire et à une augmentation du cortisol fœtal ce qui peut altérer le développement du fœtus à court et long terme (programmation fœtale). De récentes observations permettent aussi d'émettre des hypothèses selon lesquelles le cortisol au niveau placentaire soit impliqué dans d'autres systèmes comme celui du transport du glucose, de la sérotonine placentaire ainsi que les fonctions endocrines placentaires. De plus, ces systèmes pourraient être impliqués dans le mécanisme de programmation fœtale observé en cas de stress maternel durant la grossesse. Les hypothèses de recherche sont : (1) Le stress prénatal maternel (PNMS) objectif ou subjectif dû à une catastrophe naturelle durant la grossesse est négativement corrélé à l'expression et à l'activité de la 11 β -HSD2 entraînant une augmentation du taux de cortisol placentaire menant à : (i) une diminution de l'expression des hormones placentaires régulées par le cortisol; (ii) une altération de l'expression des transporteurs du glucose (GLUTs) placentaires; et (iii) une altération du système sérotoninergique placentaire. Finalement, les effets du PNMS sont plus marqués dans les placentas de fœtus mâle que femelle et dépendent du moment auquel la mère est exposée au stress durant la grossesse (semaine de grossesse) et sont associés avec une altération de la croissance et du développement cérébral du fœtus à court et long terme (programmation). Dans ce projet, nous avons démontré que 1) le PNMS peut affecter le système de régulation des glucocorticoïdes placentaires en réduisant l'expression de l'ARNm de *NR3C1- β* ainsi que de *NR3C1- α* et de *HSD11B1* lorsque la mère est exposée à l'élément stressant en mi-grossesse ; 2) le PNMS peut influencer l'apport en glucose chez le fœtus en modifiant l'expression de différents transporteurs du glucose placentaire; 3) le PNMS est associé à une diminution de l'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT_{2A}; et 4) le moment auquel la mère est exposée au stress durant la grossesse module différemment l'expression de l'ARNm des gènes *CYP19A1*, *NR3C1- α* , *HSD11B1* et *MAOA* dans le placenta. D'autres recherches sont nécessaires afin d'établir un lien entre la modification des biomarqueurs placentaires observée et les effets de programmation fœtale.

Mots clés : Stress, grossesse, placenta, cortisol, sérotonine, hormones placentaires, glucose, programmation fœtale

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENT	iii
RÉSUMÉ.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
LISTE DES FIGURES :	xiii
LISTE DES TABLEAUX :	xv
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1. Placenta.....	1
1.1.1. Système Cortisol Placentaire	3
1.1.1.1. CRH et axe HPA	3
1.1.1.2. 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD) de type 1 et 2.....	5
1.1.1.3. Récepteurs aux glucocorticoïdes (GR)	9
1.1.2. Les transporteurs du glucose (GLUTs)	13
1.1.3. Hormones placentaires.....	14
1.1.3.1. Hormone chorionique gonadotrophine humaine.....	15
1.1.3.2. Hormone lactogène placentaire humaine	16
1.1.3.3. Hormone de croissance placentaire	17
1.1.3.4. Estrogènes.....	18
1.1.4. Système Sérotoninergique.....	19
1.1.4.1. Synthèse, dégradation et métabolisme de la sérotonine.....	20
1.1.4.2. Récepteurs de la sérotonine	22
1.1.4.3. Transporteur de la sérotonine	22
1.1.4.4. Grossesse, stress et sérotonine (voir revue St-Pierre et al. 2016 ; Annexe I).....	23
1.1.5. Dimorphisme sexuel placentaire	25
1.2. Stress.....	27
1.2.1. Mesures du stress	27
1.2.1.1. Stress objectif.....	27
1.2.1.2. Stress subjectif	29
1.3. Programmation foetale ou <i>Developmental origin of health and diseases</i>	33

1.3.1.	Stress prénatal et programmation fœtale	33
1.3.1.1.	Effet du stress prénatal sur les complications de grossesse.....	34
1.3.1.2.	Effet du stress maternel prénatal sur le développement cognitif, comportemental et psychologique de l'enfant.....	40
1.3.2.	Mécanismes impliqués dans la programmation fœtale	45
1.4.	Problématique, hypothèse et objectifs.....	51
CHAPITRE 2: A simple method to assess group difference in RT-qPCR reference gene selection using GeNorm: The case of the placental sex		55
CHAPITRE 3: Natural disaster-related prenatal maternal stress is associated with alterations in placental glucocorticoid system: The QF2011 Queensland Flood Study		65
CHAPITRE 4: Natural disaster-related prenatal maternal stress affects placental gene related to serotonin and estrogen system: The QF2011 Queensland Flood Study.....		117
CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE.....		153
CHAPITRE 6 : CONCLUSION GÉNÉRALE.....		161
RÉFÉRENCES.....		163
ANNEXE I: EFFECTS OF PRENATAL MATERNAL STRESS ON SEROTONIN AND FETAL DEVELOPMENT		199
ANNEXE II : RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES		207

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- 11 β -HSD : 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
- 5-HIAA : 5-hydroxyindol acétique
- 5-HT : sérotonine (5-hydroxytryptamine)
- 5-HT₂ : récepteurs de la sérotonine de type 2
- 5-HTP : 5-hydroxytryptophane
- AADC : acide L-amino décarboxylase
- AC : adénylate cyclase
- AP1 : protéine activatrice 1
- ASRS : échelle de mesure du spectre autistique (*autism spectrum rating scale*)
- ATCH : hormone corticotrope
- B-hCG : sous-unité bêta de la gonadotrophine chorionique humaine
- COSMOSS : *Composite Score for MOthers' Subjective Stress*
- CGB : Chorionic Gonadotropin Beta subunit (β -hCG)
- CRH : corticolibérine
- CSH1 : Chorionic Somatomammotropin Hormone 1 (hPL)
- CYP17 : 17, 20 lyase
- CYP19 : aromatasé cytochrome P450
- CYP19A1 : Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1 (aromatase)
- DEX : dexaméthasone
- DHEA : déshydropiandrostérone
- DNMT3a : l'ADN méthyl-transférase de type 3a
- DOHaD : Origine développementale de la santé et des maladies (*Developmental origin of health and diseases*)
- DSM : manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux
- E1 : estrone
- E2 : 17 β - estradiol
- E3 : estriol
- FSH : hormone folliculo-stimulante
- GA : acide glycyrrhizic

GH : hormone de croissance
GH2 : Growth Hormone 2 (pGH)
GLUT : transporteur du glucose
GnRH : gonadolibérine
GRE : élément de réponse au glucocorticoïde
GRH : somatolibérine
GR : récepteur des glucocorticoïdes
H6PDH : hexose-6-phosphate déshydrogénase
hCG : gonadotrophine chorionique humaine
HPA : hypothalamus-hypophyse-surrénales (*Hypothalamic–pituitary–adrenal*)
hPL : lactogène placentaire humaine (ou somatomammotrophine chorionique humain (hCS))
HSD11B1 : gène *Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 1* (11 β -HSD1)
HSD11B2 : gène *Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 2* (11 β -HSD2)
hsp-90 : *heat shock protein 90*
HTR2A : 5-hydroxytryptamine receptor 2A (5-HT_{2A})
HTR2B : 5-hydroxytryptamine receptor 2B (5-HT_{2B})
IES : Échelle d'impact de l'événement (*impact of event scale*)
IES-R : Échelle d'impact de l'événement - Révisée (*impact of event scale –revised*)
IL-1 β : interleukine 1 beta
IL-6 : interleukine 6
LH : hormone lutéinisante
LHCGR : récepteur à la LH et CG
L-Trp : L-tryptophane
MAO : monoamine oxydase
MAOA : Monoamine oxidase A (gene: MAOA)
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
MR : récepteur des minéralocorticoïdes
NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduite
NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite

NCOR : *nuclear receptor co-repressor*

NFκB : facteur de transcription kappa B

nGRE : éléments de réponse aux glucocorticoïdes négative

NR3C1-α : *Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-α* (GRα)

NR3C1-β : *Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-β* (GRβ)

OCT : transporteurs de cations organiques

PCA : analyse en composantes principales (*Principal component analysis*)

PDEQ : questionnaire des expériences de dissociation péritraumatique (*peritraumatic dissociative experiences questionnaire*)

PDI : Inventaire de détresse péritraumatique (*peritraumatic distress inventory*)

pGH : hormone de croissance placentaire (ou hormone de croissance variante (GHv))

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PKG : protéine kinase G

PLA2 : phospholipase A2

PLC : phospholipase C

PMTA : transporteur de monoamine de la membrane plasmique

PNMS : stress maternel prénatal

PR : prolactine

PTB : accouchement pré-terme

PTSD : trouble du stress post traumatique

QF2011 : *Queensland flood study*

QFOSS : *Queensland flood objective stress scale*

RCIU : restriction de croissance intra-utérine

RCPG : récepteurs couplés aux protéines G

SERT : transporteur de la sérotonine(ou5-HTT)

SGA : petit pour âge gestationnel (*small for gestational age*)

SLC2A1 : Solute Carrier Family 2 member 1 (GLUT1)

SLC2A3 : Solute Carrier Family 2 member 3 (GLUT3)

SLC2A4 : Solute Carrier Family 2 member 4 (GLUT4)

SLC6A4 : Solute Carrier Family 6 member 4 (SERT)

SNC : système nerveux central

SPIRAL : *Stress in Pregnancy International Research Alliance*

SRC : *steroid receptor coactivator*

TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

TPH : tryptophane hydroxylase

TPH2 : tryptophan hydroxylase type 2 (TPH2)

TSH : thyroestimuline

VMAT : transporteurs vésiculaires des monoamines

LISTE DES FIGURES :

CHAPITRE 1

- Figure 1.1 :** Villosité chorale humaine p.2
- Figure 1.2 :** Axe hypothalamus-hypophyse-surrénales chez la femme enceinte et non enceinte p.4
- Figure 1.3 :** Réactions catalysées par la 11 β -HSD-1 et -2 p.6
- Figure 1.4 :** Résumé des mécanismes proposés de régulation de 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2) placentaire p.7
- Figure 1.5 :** Schématisation du fonctionnement des récepteurs aux glucocorticoïdes p.11
- Figure 1.6 :** Isoformes des récepteurs des glucocorticoïdes suite à l'épissage alternatif et à différents sites d'initiation de la transcription pour le récepteur des glucocorticoïdes α p.12
- Figure 1.7 :** Synthèse des estrogènes par le placenta humain p.19
- Figure 1.8 :** Synthèse de la sérotonine à partir du L-tryptophane p.21
- Figure 1.9 :** Dimorphisme sexuelle dans les stratégies d'adaptations foeto-placentaire face au stress prénatal p.26
- Figure 1.10 :** Mécanisme proposé de la programmation fœtale p.47
- Figure 1.11 :** Mécanismes proposés de l'effet du stress prénatal maternel sur les systèmes des glucocorticoïdes et de la sérotonine placentaire et la programmation fœtale p.49

CHAPITRE 2

- Figure 1 :** Distribution of the Cq values obtained for 28 reference genes candidates, from the reference genes H96 and H96 plus primePCR plates p.59
- Figure 2 :** a) GeNorm M results for all reference genes tested for all the placenta samples taken together b) GeNorm V value for all reference genes tested p.60
- Figure 3 :** GeNorm results for a) male placentas and b) female placentas p.61
- Figure 4 :** Results from multiplication of the GeNorm M value with the difference of average of Cq results between placental sexes (Δ Cq) p.61

Figure 5 :	HPRT1 mRNA expression levels normalized with different reference genes in human placenta. RPS18 has significantly different Cq values between sexes	p.62
CHAPITRE 3		
Figure 1 :	Significant moderation of the effect of subjective distress (COSMOSS) on placental A-B) glucocorticoid receptor α (NR3C1- α), and C-D) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD11B1) mRNA levels by timing of exposure in gestation	p.95
Figure S1 :	Significant correlation between predictors and mRNA level of genes tested	p.102
Figure S2 :	Significant moderation of the effect of PTSD-like symptoms (IES-R) on placental A-B) glucocorticoid receptor α (NR3C1- α), and C-D) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD11B1) mRNA levels by timing of exposure in gestation	p.105
CHAPITRE 4		
Figure 1 :	Significant moderation by timing of exposure during pregnancy of the effect of objective hardship (QFOSS) on placental (A-B) monoamine oxidase A (MAOA) for male placentas, and (C-D) aromatase (CYP19A1) for female placentas mRNA levels	p.141
ANNEXE I		
Figure A1	Schéma des médiations significatives de l'expression placentaire de l'ARNm influençant l'effet du PNMS sur les troubles du comportement de l'enfant	p.208

LISTE DES TABLEAUX :

CHAPITRE 1

Tableau 1.1 :	Hormones et facteurs de croissance produites par le placenta	p.15
Tableau 1.2 :	Études démontrant un lien entre le stress durant la grossesse et les effets sur la grossesse et l'enfant à la naissance	p.36
Tableau 1.3 :	Études démontrant un lien entre le stress durant la grossesse et les effets sur les troubles chez les enfants	p.43

CHAPITRE 2

Table 1 :	List of candidate reference genes included in the reference gene H96 and H96 plus prime PCR plates with RefSeq number.	p.59
------------------	--	------

CHAPITRE 3

Table 1 :	Characteristics of the cohort	p.91
Table 2 :	Pearson's product moment correlations between placental mRNA level of genes tested separated by fetal sex	p.92
Table 3 :	Pearson's product moment correlations (r) between predictors and placental mRNA level of genes implicated in glucocorticoid (GC) promoting and inhibiting signal, and glucose transport in placentas for males (n=51) and females (n=45)	p.93
Table 4 :	Significant hierarchical multiple linear regression results of prenatal stress effects and timing of exposure to flood on placental mRNA level of genes tested for male placentas	p.94
Table S1 :	Primer sequences of genes analyzed by RT-qPCR	P.96
Table S2 :	Descriptive statistics for placental biomarkers for A) male placentas and B) female placentas	p.97
Table S3 :	Comparison of mRNA level, protein expression and 11 β -HSD2 activity between male and female placentas	p.98
Table S4 :	A) Interaction effect (R ² change) of the timing of the stressful event on the effect of stress on NR3C1 – α and HSD11B1 for male placentas. B) Standardized coefficients from hierarchical multiple linear regression of subjective stress measures on placental NR3C1- β and NR3C1 – α for male placentas only following significant COSMOSS effect	p.99

Table S5 :	Standardized coefficients (adjusted for covariates) from hierarchical multiple linear regression of stress measures effect on placental glucocorticoid system and glucose transporters	p.100
Table S6	Interaction effect (R2 change) of the timing of the stressful event on the effect of stress on placental glucocorticoid system and glucose transporters separated by fetal sex	p.101
CHAPITRE 4		
Table 1 :	Cohort characteristics	p.142
Table 2 :	Pearson's product moment correlation (r) between placental mRNA level of genes analyzed separated by fetal sex	p.143
Table 3 :	Pearson's product moment correlation (r) between placental mRNA level of genes of the cortisol system with placental serotonin system and hormones separated by fetal sex	p.144
Table 4 :	Pearson's product moment correlations (r) between predictors and placental mRNA level of genes in serotonin system and hormones as well as confounders used for hierarchical multiple regression	p.145
Table 5 :	Significant hierarchical multiple linear regression of stress measures effect on placental mRNA level of HTR2A for male or female placentas	p.146
Table 6 :	Significant hierarchical multiple linear regression of stress measures and timing interaction on placental mRNA level of MAOA for males and CYP19A1 for females	p.147
Table S1 :	Primer sequences	p.148
Table S2 :	Standardized coefficients from hierarchical multiple linear regression of subjective stress measures on placental HTR2A for male placentas only, following significant COSMOSS effect	p.149
Table S3 :	Hierarchical multiple linear regression of stress measures effect on placental mRNA level of genes tested for either male, or female placentas	p.150
Table S4 :	Interaction effect (R2 change) of the timing of the stressful event on the effect of stress on placental serotonin system and hormones mRNA level separated by fetal sex	p.151

CHAPITRE 5

Tableau 5.1 :	Résumé des résultats significatifs obtenus pour l'effet du PNMS sur les biomarqueurs placentaires	p.153
----------------------	---	-------

ANNEXE II

Tableau A1	Corrélation Pearson entre le taux d'ARNm de HSD11B2 placentaire et l'IMC des enfants à 16 mois, 30 mois et 4 ans séparés selon le sexe de l'enfant.	p.207
-------------------	---	-------

Tableau A2	Modèles de régression linéaires prédisant la méthylation de l'ADN des gènes placentaires séparés par sexe du fœtus	p.209
-------------------	--	-------

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. Placenta

Le placenta est un organe transitoire qui assure le développement du fœtus. Chez l'humain, il est caractérisé par l'intensité de l'invasion trophoblastique dans la paroi utérine ainsi que par la spécificité de ses fonctions hormonales. Organe endocrine, le placenta produit et sécrète diverses hormones peptidiques et stéroïdiennes (Guibourdenche *et al.*, 2009a; Malassiné, 2001). Les fonctions principales du placenta sont de permettre l'adaptation de la physiologie de la mère à la grossesse, de protéger le fœtus contre le rejet immunitaire et d'assurer les échanges mère-fœtus (apport de nutriments et élimination des déchets physiologiques). Le placenta est un organe primordial dans le développement du fœtus et pour que celui-ci se développe dans les meilleures conditions possible à court ainsi qu'à long terme (Tsatsaris *et al.*, 2006).

Le placenta se développe lorsque le blastocyste s'implante dans la paroi utérine. Plus précisément, le blastocyste est le précurseur de l'embryon et du placenta et possède l'ADN du fœtus. Lors de l'implantation dans la paroi utérine, les cytotrophoblastes (mononucléés) fusionnent et forment le syncytiotrophoblaste (multinucléé). Le syncytiotrophoblaste précoce est très invasif et permet l'ancrage du blastocyste dans la paroi utérine (Alsat *et al.*, 1999). Par la suite, des lacunes se forment à l'intérieur du syncytiotrophoblaste permettant à celui-ci de digérer la matrice endométriale jusqu'à atteindre les vaisseaux sanguins de l'endomètre. Durant cette même période, les cytotrophoblastes villositaires prolifèrent et entourent le syncytiotrophoblaste autour de l'espace lacunaire maintenant rempli de sang maternel. À leur tour, les cytotrophoblastes sont envahis par une matrice mésenchymateuse comprenant les capillaires fœtaux, formant alors les villosités flottantes (Figure 1.1) (Alsat *et al.*, 1999; Tsatsaris *et al.*, 2006). D'autre part, les cytotrophoblastes de type extra-villositaire, situés à la base de la villosité crampon, continuent de proliférer dans la matrice endométriale. Ces derniers envahissent les artères spiralées de l'endomètre, permettant un contrôle autonome de la vasoconstriction des muscles lisses des artères spiralées utérines maternelles (Figure 1.1) (Malassine & Cronier, 2002). Cette caractéristique permet d'annuler l'effet des hormones sur la vasoconstriction des muscles lisses durant la grossesse, car les cellules musculaires et endothéliales des artères spiralées sont alors remplacées par les cytotrophoblastes extra-villositaires, insensibles aux facteurs de vasoconstriction. De plus, les cytotrophoblastes extra-villositaires, directement en contact avec le sang maternel,

permettent d'empêcher le rejet de l'unité fœto-placentaire par la mère, via notamment, la sécrétion de diverses cytokines (Tsatsaris *et al.*, 2006).

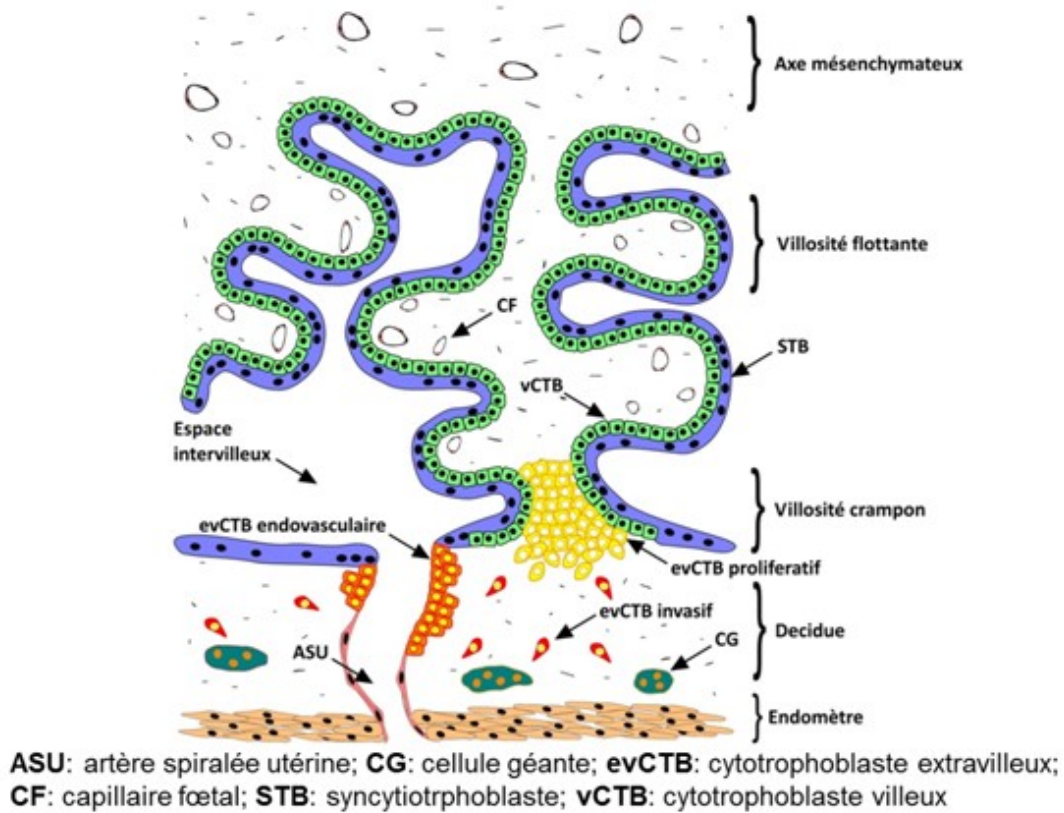


Figure 1.1. Villosité chorale humaine, tiré de (Vaillancourt *et al.*, 2009).

Un des rôles du placenta est de permettre les échanges entre la mère et le fœtus. Le syncytiotrophoblaste, qui forme une couche multinucléée (syncytium) continue et polarisée, comprend une panoplie de transporteurs (actifs et passifs) permettant un contrôle très précis des échanges entre la mère et le fœtus (e.g. glucose, acides aminés, oxygène, acides gras, hormones) (Bell & Ehrhardt, 2002; Tsatsaris *et al.*, 2006). Plusieurs facteurs tels que le stress maternel durant la grossesse, les contaminants environnementaux ou la nutrition de la mère peuvent affecter ces échanges (Avishai-Eliner *et al.*, 2002; Bale, 2011; Bell & Ehrhardt, 2002; Lafond *et al.*, 2004; Tsatsaris *et al.*, 2006). Le syncytiotrophoblaste produit également diverses hormones essentielles au maintien de la grossesse et au développement du fœtus. Par exemple, des hormones peptidiques, telles que la gonadotrophine chorionique humaine (hCG), la lactogène placentaire humaine (hPL), l'hormone de croissance placentaire (pGH) et des hormones stéroïdiennes comme la progestérone et les estrogènes.

1.1.1. Système Cortisol Placentaire

Chez l'humain en dehors de la période de grossesse, l'hypothalamus produit la corticolibérine (CRH) qui contrôle la sécrétion de l'hormone corticotrope (ACTH) par l'hypophyse, qui à son tour contrôle la libération des glucocorticoïdes (cortisol chez l'humain ou corticostérone chez les rongeurs; les hormones du stress) par les glandes surrénales (Tsigos & Chrousos, 2002) (Figure 1.2.). Le cortisol exerce diverses fonctions sur le métabolisme, entre autres, en inhibant la production par l'hypophyse des gonadotrophines (hormone folliculostimulante, ou FSH et hormone lutéinisante, ou LH) et de l'hormone de croissance (Tsigos & Chrousos, 2002). En situation de stress, la fréquence de pulsations de sécrétion de CRH augmente la production d'ACTH et la production de cortisol par les cellules de la zone réticulée des glandes surrénales (Tsigos & Chrousos, 1994).. Le cortisol est aussi l'effecteur final de la réponse au stress et est essentiel au maintien de l'homéostasie en exerçant un rétrocontrôle au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse, inhibant la libération de CRH et d'ACTH respectivement (Figure 1.2.) (Tsigos & Chrousos, 2002).

1.1.1.1. CRH et axe HPA

Au cours de la grossesse, l'axe HPA est modifié. Un nouvel organe entre en jeu : le placenta. Le placenta est un important producteur de CRH, identique à la CRH produite par l'hypothalamus. Cette sécrétion de CRH est en partie responsable de la modification de la régulation de l'axe HPA chez la femme enceinte (Figure 1.2.) (Wadhwa *et al.*, 2004). La CRH placentaire est modulée par une boucle de rétrocontrôle positive, c'est-à-dire que sa synthèse est induite par l'augmentation des différents facteurs de la réponse biologique au stress, tels que les catécholamines, le cortisol, certaines cytokines et l'hypoxie (Wadhwa, 2005). L'augmentation de la CRH durant la grossesse normale a pour effet d'induire la différenciation cellulaire afin de permettre notamment le développement de l'axe HPA chez le fœtus (Wadhwa *et al.*, 2004). La CRH est aussi importante pour l'implantation du placenta dans la paroi utérine, l'immunomodulation du système immunitaire maternel ainsi que pour la préparation à l'accouchement (Rainey *et al.*, 2004). Par contre, bien que la CRH placentaire augmente de façon significative durant la grossesse, la réponse au stress est toujours présente chez la femme enceinte (Campbell *et al.*, 1987; Rainey *et al.*, 2004; Wadhwa *et al.*, 1997). La production de CRH par l'hypothalamus, d'ACTH par l'hypophyse et de cortisol par les surrénales peuvent être augmentés par le stress chez la femme enceinte et causer des problèmes de grossesse et de développement chez le fœtus (revue dans (Wadhwa, 2005; Wadhwa *et al.*, 1997)).

Une étude a démontré un lien entre une haute concentration de CRH sanguine chez la mère et l'accouchement prématuré (Wadhwa *et al.*, 1998). Des taux anormalement élevés de CRH sanguin entraînent une augmentation de la concentration sanguine maternelle de cortisol, comme en cas de stress prénatal. De fortes concentrations de cortisol peuvent altérer notamment le développement du système nerveux central (SNC) et la croissance du fœtus (Seckl & Holmes, 2007). Plusieurs études tendent à démontrer qu'une exposition à des concentrations élevées de cortisol augmente les risques de restriction de croissance intra-utérine (RCIU), d'accouchements prématurés (PTB) et d'altération du développement de l'axe HPA du fœtus (Gur *et al.*, 2004; Michael & Papageorgiou, 2008). Pour réguler la quantité de cortisol qui atteint le fœtus, le placenta possède une barrière enzymatique qui catalyse la réaction de transformation du cortisol actif en cortisone inactive; la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2) (Seckl, 2004a).

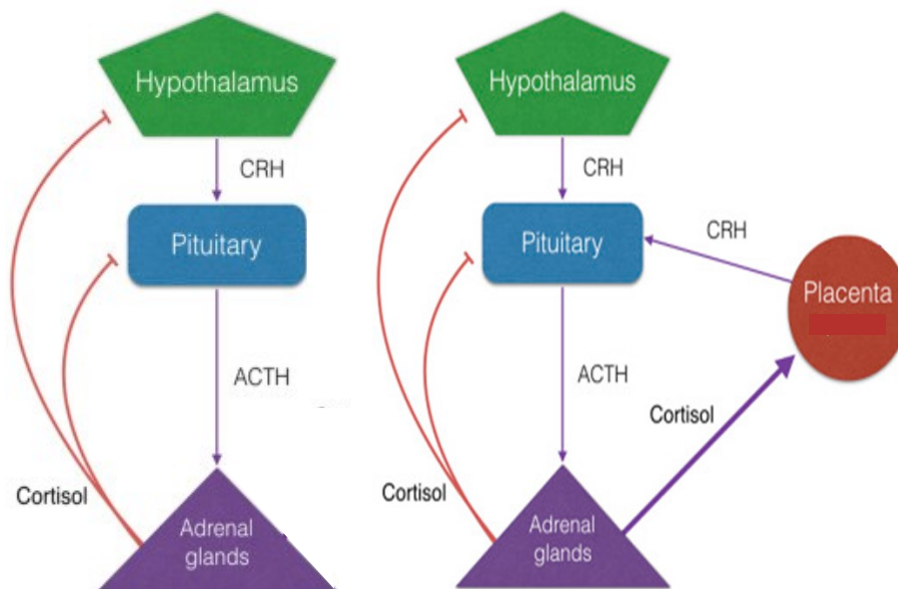


Figure 1.2. Axe hypothalamus-hypophyse-surrénales chez la femme enceinte et non enceinte, tiré de (St-Pierre *et al.*, 2016a). En situation de stress hors période de grossesse (gauche), l'hypothalamus produit la CRH qui induit la production d'ACTH par l'hypophyse qui à son tour stimule la production de cortisol par les glandes surrénales. Le cortisol par rétrocontrôle négatif, inhibe la production de CRH et d'ACTH. Chez la femme enceinte (droite), le cortisol induit la production de CRH placentaire, causant une augmentation de cortisol tout au long de la grossesse. CRH : corticolibérine ; ATCH : hormone corticotrope.

1.1.1.2. 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD) de type 1 et 2

Les enzymes 11 β -HSD-1 et -2 transforment la cortisone en cortisol et le cortisol en cortisone, respectivement (Figure 1.3). Plus spécifiquement, la 11 β -HSD1 catalyse la réaction de transformation de la cortisone en cortisol en utilisant la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite (NADPH) comme cofacteur. La réaction catalysée par la 11 β -HSD1 est réversible, elle peut donc également transformer le cortisol en cortisone, mais avec une moins grande affinité et en utilisant la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺) comme cofacteur (Figure 1.3) (Draper & Stewart, 2005). La 11 β -HSD1 est exprimée dans l'épithélium de l'endomètre, le chorion, l'amnion et le trophoblaste, mais son rôle principal est de fournir le cortisol à partir de la cortisone, notamment dans le foie, les tissus adipeux et les glandes surrénales (Krozowski *et al.*, 1999; Michael & Papageorghiou, 2008). Une étude réalisée sur la 11 β -HSD1 purifiée suggère une activité bidirectionnelle (Leckie *et al.*, 1998), tandis que d'autres études ont démontré soit, seulement une activité 11 β -déshydrogénase ou encore, seulement une activité 11 β -réductase (résumé dans (Odermatt & Nashev, 2010)). Ces résultats contradictoires pourraient être attribués à la préparation cellulaire qui diffère entre les études. En effet, la 11 β -HSD1, qui est localisé spécifiquement sur la membrane du réticulum endoplasmique faisant face à la lumière, est située près d'autres enzymes produisant le NADPH comme l'hexose-6-phosphate déshydrogénase (H6PDH). L'activité de la 11 β -HSD1 est hautement dépendante du NADPH et grâce à la H6PDH, le ratio NADPH/NADP⁺ est élevé dans la lumière du réticulum endoplasmique favorisant une activité réductase de la 11 β -HSD1 (Odermatt & Nashev, 2010). Ainsi, la 11 β -HSD1 peut avoir une activité bidirectionnelle *in vitro*, mais aurait une activité plutôt de 11 β -réductase, *in vivo* ou dans les cellules intactes lorsque celle-ci est à proximité de la H6PDH (Draper & Stewart, 2005; Odermatt & Nashev, 2010).

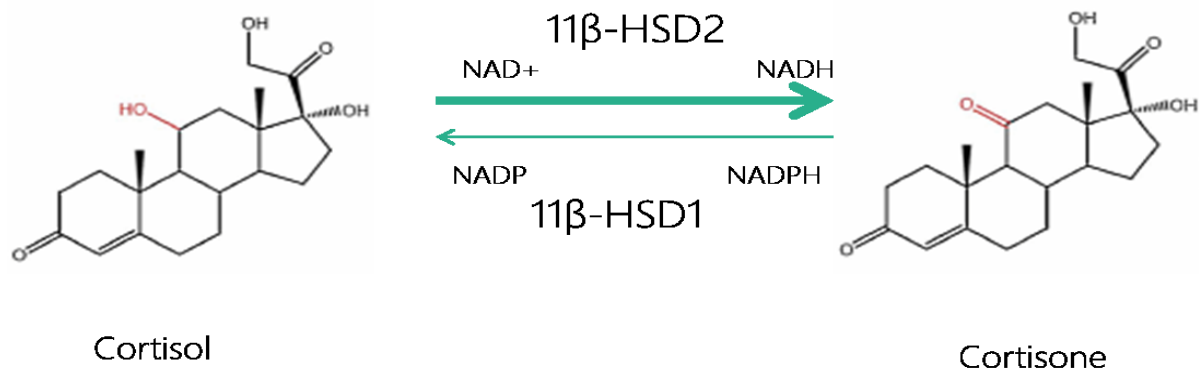


Figure 1.3. Réactions catalysés par la 11 β -HSD-1 et -2 (D'après (Murphy *et al.*, 2007)). 11 β -HSD2 : 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 ; 11 β -HSD1 : 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 ; NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide ; Nicotinamide adénine dinucléotide réduite.

La 11 β -HSD2, hautement exprimée dans le placenta, est située à la surface cytoplasmique de la membrane du réticulum endoplasmique et peut être régulée à différents étapes (Draper & Stewart, 2005; Gomez-Sanchez *et al.*, 2009). Par exemple, au niveau de i) l'expression génique par la méthylation de l'ADN génomique, ii) l'expression protéique par dégradation de l'ARNm ou par des modifications post-traductionnelles, et iii) au niveau de son activité par action directe sur le site catalytique (Figure 1.4.) (revue dans (Causevic & Mohaupt, 2007)). De plus, l'expression de la 11 β -HSD2 présente une régulation complexe variant en fonction de l'espèce, du tissu ou des conditions d'expérimentation *in vitro* (Causevic & Mohaupt, 2007; Draper & Stewart, 2005; Seckl & Holmes, 2007). Des études ont montré que la progestérone (et ses métabolites) ainsi que les catécholamines diminuent l'expression de la 11 β -HSD2 *in vitro* (Heiniger *et al.*, 2001; Odermatt *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2001). De plus, lors de complications de grossesses associées à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, tels que l'interleukine (IL)-1 β , IL-6, et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), une diminution de l'expression, et indirectement de l'activité, de la 11 β -HSD2 placentaire ont été observées (Kossintseva *et al.*, 2006). À l'opposé, les glucocorticoïdes (*e.g.* dexaméthasone, cortisol), l'acide rétinoïque, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), l'angiotensine et la protéine kinase A (PKA) augmentent l'expression de la 11 β -HSD2 (Kossintseva *et al.*, 2006; Seckl & Holmes, 2007; Tremblay *et al.*, 1999; Tzschoppe *et al.*, 2011; Van Beek *et al.*, 2004). La région promotrice du gène de la 11 β -HSD2 (*HSD11B2*) possède une séquence élément de réponse au glucocorticoïde (GRE) de réponse négative sur lequel le récepteur des glucocorticoïdes (GRs) se lie (avec l'aide des facteurs de transcription *nuclear factor-kappa B* (NF κ B) et de la protéine activatrice 1 (AP1))

induisant la méthylation de l'ADN. Cette méthylation pourrait empêcher les GRs de se lier aux GRE positif des glucocorticoïdes (Surjit *et al.*, 2011). Le fait que le cortisol puisse induire ou réprimer l'expression des gènes dépend de plusieurs facteurs. En effet, la réactivité au cortisol est modulée par la présence de différents isoformes et aussi par l'abondance de co-facteurs spécifiques à la répression ou à l'induction de l'expression des gènes cibles (Bellavance & Rivest, 2014). Ces mécanismes pourraient expliquer en partie les études montrant une baisse de l'expression et de l'activité de la 11 β -HSD2 placentaire dans les cas de stress maternel (*i.e.* excès de cortisol). De la même manière, ceci pourrait expliquer le mécanisme d'action de l'acide glycyrrhizique (GA), qui diminue l'expression de la 11 β -HSD2 *in vivo* dans les reins de rats (Tanahashi *et al.*, 2002). En effet, le GA, qui est reconnu pour inhiber la 11 β -HSD2 au niveau de son site catalytique, mais pas au niveau de son expression, induirait une augmentation du cortisol cellulaire (St-Pierre *et al.*, 2016a). Cette hausse de cortisol activerait les GRs qui en se liant aux GRE négatifs situés sur le promoteur du gène *HSD11B2* inhiberaient son expression (Kratschmar *et al.*, 2011; Tanahashi *et al.*, 2002).

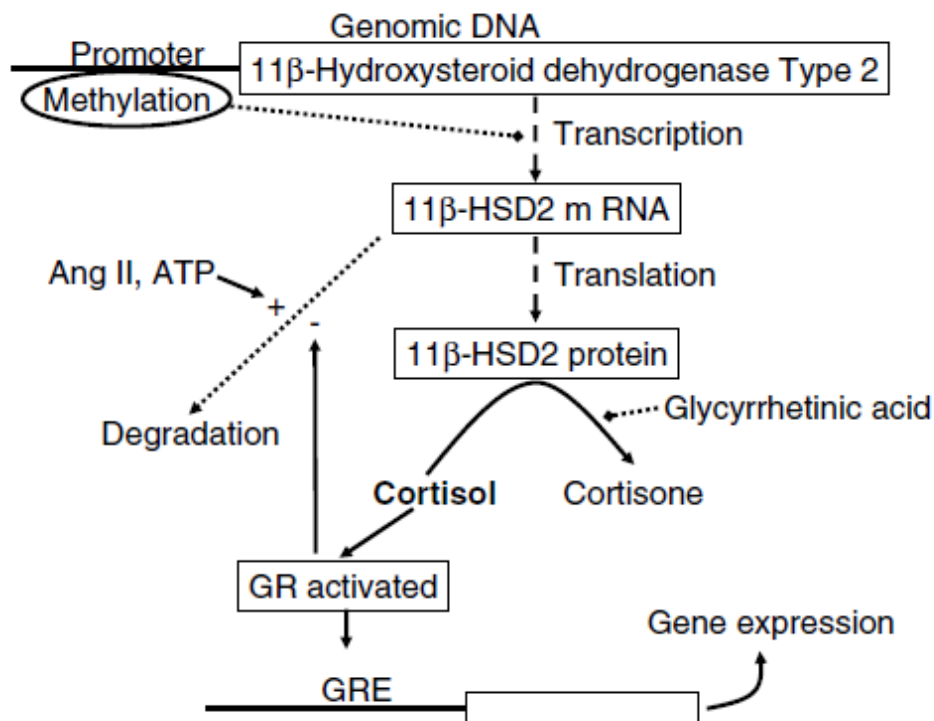


Figure 1.4. Résumé des mécanismes proposés de régulation de 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2) placentaire (D'après(Causevic & Mohaupt, 2007)). La 11 β -HSD2 peut avoir une transcription réduite de son ARNm suite à la méthylation de son promoteur. L'angiotensine II (Ang II) et l'adénosine triphosphate (ATP) augmentent la dégradation de l'ARNm de la 11 β -HSD2 alors que l'acide glycyrrhizique inhibe son activité catalytique. Le glucocorticoïde récepteur (GR) activé inhibe la dégradation de l'ARNm de la 11 β -HSD2.

L'altération de l'expression ou de l'activité de la 11 β -HSD2 placentaire, majoritairement exprimée dans le syncytiotrophoblaste, peut avoir différentes conséquences sur la grossesse (Austin *et al.*, 2005; Mandl *et al.*, 2006; Michael & Papageorgiou, 2008; O'Donnell *et al.*, 2009). Plus précisément, une diminution de l'expression et de l'activité de la 11 β -HSD2 placentaire induit une augmentation du taux de cortisol cytosolique et par conséquent du cortisol sanguin. La 11 β -HSD2 réduit l'activation des GRs et également celle des récepteurs des minéralocorticoïdes (MRs) qui sont exprimés, fonctionnels et peuvent être activés par les glucocorticoïdes, comme le cortisol, de la même façon que par son ligand naturel, l'aldostérone, dans le trophoblaste humain (Arriza *et al.*, 1987; Driver *et al.*, 2003). L'activation des MRs affecte la transcription de gènes qui sont responsables de la prolifération cellulaire et de l'homéostasie hémodynamique alors que les gènes régulés par les GRs sont surtout des gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique (revu dans (Gomez-Sanchez & Gomez-Sanchez, 2014)). Bien que le cortisol ait une haute affinité pour les MRs (*i.e.* 77 nM), le fait que ces derniers soient jumelés à la 11 β -HSD2 à la surface du réticulum endoplasmique des cellules placentaires, réduit le taux de cortisol actif, ce qui par conséquent, permet à l'aldostérone de s'y lier préférentiellement afin de contrôler la croissance cellulaire et l'homéostasie hémodynamique (Lan *et al.*, 1982). Par contre, en situation de baisse d'expression ou d'activité de la 11 β -HSD2 placentaire, le cortisol plus actif peut induire à la fois les MRs et les GRs (Gennari-Moser *et al.*, 2011). Cette activation excessive des MRs cause le syndrome d'apparence d'excès de minéralocorticoïdes, menant à des troubles de la pression sanguine durant la grossesse (Escher, 2009). Pour déterminer l'effet d'une altération de l'expression de la 11 β -HSD2 placentaire, l'équipe de Wyrwoll a comparé les placentas de souris invalidés pour le gène codant la 11 β -HSD2 (l'accouplement de souris hétérozygotes pour la mutation *HSD11B2*^{+/-} génère des souris de génotype sauvages (+/+), hétérozygotes (+/-) ou mutantes (-/-)). L'absence de 11 β -HSD2 cause une augmentation du transport et des transporteurs d'acides aminés, favorisant le maintien de la croissance placentaire au début de la gestation (Wyrwoll *et al.*, 2009). En revanche, vers la fin de la gestation, une baisse du transport de glucose placentaire est observée. Cet effet pourrait être impliqué dans la réduction de la masse des fœtus knock-out *HSD11B2*^{-/-} comparés aux souris sauvages (Wyrwoll *et al.*, 2009). Bien que le placenta murin soit un bon modèle pour certaines fonctions placentaires, il reste cependant très différent du placenta humain (Rossant & Cross, 2001).

L'importance d'une régulation précise du cortisol est mise en évidence dans les cas de restriction de croissance intra-utérine (RCIU). En effet, plusieurs études ont démontré le lien entre la baisse de l'activité de la 11 β -HSD2 placentaire et la RCIU chez l'humain (Murphy *et al.*, 2002; Seckl,

2004a; Shams *et al.*, 1998). Il a également été mis en lien la concentration de cortisol urinaire élevée chez la mère et une baisse du poids de l'enfant à la naissance (Field *et al.*, 2006). De plus, l'étude des souris *HSD11B2*^{-/-} a démontré non seulement qu'une activité réduite de la 11 β -HSD2 diminue le poids des fœtus à la naissance par rapport au type sauvage, mais affecte aussi leur comportement (Wyrwoll *et al.*, 2009). En effet, les souris *HSD11B2*^{-/-} présentent un comportement plus anxieux que les souris sauvages (Holmes *et al.*, 2006). Un lien entre la prise de glucocorticoïdes endogènes chez l'humain durant le premier trimestre de la grossesse et la réduction du poids à la naissance a également été rapporté, alors que durant le dernier trimestre de la grossesse, la prise de glucocorticoïdes endogènes n'affecte pas le poids à la naissance (Crowther & Harding, 2007; Gur *et al.*, 2004). D'autres études ont aussi démontré un lien entre une déficience en 11 β -HSD2 placentaire et une programmation de la pression sanguine chez les enfants de 3 ans (Huh *et al.*, 2008). De plus, un haut taux de *HSD11B2* placentaire a été relié à des troubles de la régulation chez les bébés de moins de 2 semaines (*e.g.* prise alimentaire, sommeil, pleurs.) (Räikkönen *et al.*, 2015). Cependant, les études démontrant un lien entre la programmation fœtale et la baisse d'expression ou d'activité de la 11 β -HSD2 semblent être médiées par un faible poids à la naissance ou à la prématurité (Jansson & Powell, 2007; Konstantakou *et al.*, 2017). La programmation fœtale se définit comme étant issue de perturbations (stress, mauvais apport de nutriments) durant la période fœtale qui serait à l'origine de certaines maladies ou anomalies du développement chez l'enfant jusqu'à l'âge adulte. Ce phénomène est décrit en détail à la section 1.3.

1.1.1.3. Récepteurs aux glucocorticoïdes (GR)

Les glucocorticoïdes (*i.e.* le cortisol chez les humains) effectuent leur action en se liant aux récepteurs des glucocorticoïdes (GR). La séquence de liaison des GR est présente dans environ 20% des séquences promotrices du génome humain (Oakley & Cidlowski, 2013). Ainsi, le cortisol régule une multitude de fonctions dont la croissance, la reproduction, les fonctions immunes et inflammatoires (revu dans (Kadmiel & Cidlowski, 2013)). Les GRs font partie de la grande famille des récepteurs aux stéroïdes et agissent comme facteur de transcription lorsqu'ils sont liés au cortisol (ou à un glucocorticoïde de synthèse) (Figure 1.5.). Le GR est une protéine modulaire contenant un domaine de trans-activation N-terminal (NTD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), une région de liaison au ligand (LBD) ainsi qu'une région de pont entre le DBD et LBD (Figure 1.6.). Le gène codant les GRs humain est composé de 9 exons codants (Figure 1.6.). Les exons 2 à 9 peuvent générer différents isoformes grâce à l'épissage alternatif : GR α , GR β , GR- γ , GR-A, GR-P (Figure 1.6.). De plus, l'exon 2 contient 8 sites d'initiation de la transcription menant

donc à 8 différents isoformes de GR α (GR- α -A, B, C1-3, D1-3 ; Figure 1.6.) (Oakley & Cidlowski, 2013). Bien que le GR α -A soit le plus étudié, tous les GR α possèdent la capacité de translocation au noyau et peuvent alors agir comme facteur de transcription (Oakley & Cidlowski, 2013). Par contre, GR- γ , GR-A, GR-P ont une activité de transcription faible (Beger *et al.*, 2003; Haarman *et al.*, 2004).

Le GR α se trouve dans le cytoplasme des cellules liées à deux *heat shock protein* (hsp)-90 ainsi qu'à d'autres protéines chaperonnes (Figure 1.5.). La liaison du cortisol au GR- α induit un changement de conformation du récepteur qui se détache des hsp-90 et des autres protéines chaperonnes (Figure 1.5.). Par la suite, le GR α est phosphorylé par la *p38 Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) sur 2 sérines (S211 et S226) et est transloqué dans le noyau où il se lie à une séquence GRE sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère (Figure 1.5.) (Mercado *et al.*, 2012). L'activation de GR α induit la transcription génique par la liaison du complexe GR α /cortisol aux séquences GRE et implique le recrutement de co-activateurs tels que les *steroid receptor coactivator* (SRC) -2 et -3 pour exercer son action génomique. Le GR α peut aussi induire la répression de la transcription en se liant à des éléments de réponse négatif aux glucocorticoïdes (nGRE). Ceci implique le recrutement de co-répresseurs (tels que les *nuclear receptor co-repressor* (NCOR) -1 et -2) qui vont permettre d'inhiber la transcription des gènes cibles (Surjit *et al.*, 2011).

Le GR β est incapable de lier le cortisol (ou d'autres glucocorticoïdes) et d'activer les promoteurs des gènes contenant des GREs. Son rôle est principalement de moduler l'effet de l'activation de GR α par les glucocorticoïdes. En effet, GR β se dimérise avec GR α et ainsi inhibe son action sur la transcription génique (Figure 1.5.) (Yudt *et al.*, 2003). Les différents mécanismes de régulation de l'action des glucocorticoïdes illustrent leur importance dans l'organisme ainsi que leur spectre d'action diversifié.

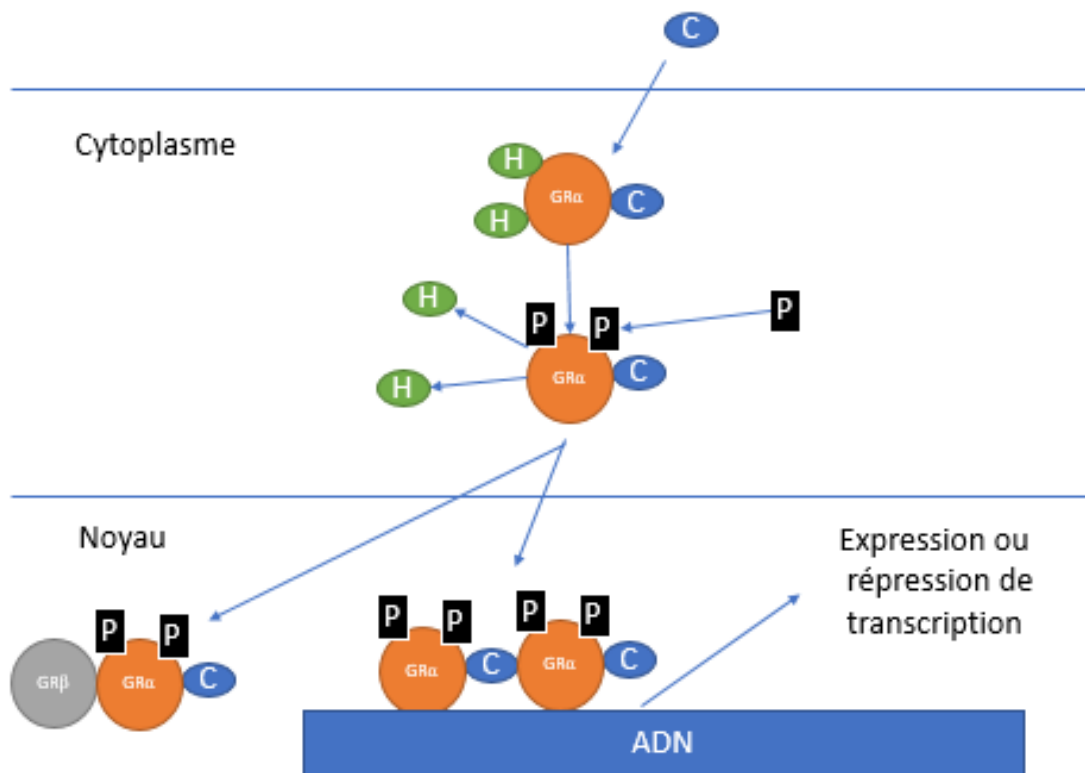


Figure 1.5. Schématisation du fonctionnement des récepteurs aux glucocorticoïdes (GRs). L'expression ou la répression génique dépend du site de liaison des GRs sur l'ADN du gène régulé et du recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs. C : cortisol ; GR α : récepteur aux glucocorticoïdes α ; H : *Heat Shock Protein 90* ; P : Phosphate ; GR β : récepteur aux glucocorticoïdes β .

Au niveau du placenta humain, les glucocorticoïdes sont importants et nécessaires entre autres pour la production de CRH. En effet, Wang *et al.* ont montré que le cortisol, par l'action des GRs, augmente l'expression de CRH placentaire (Wang *et al.*, 2012a). Le placenta exprime plusieurs types de GRs : GR α -A, GR α -C, GR α -D1-3, GR β , GR-A, GR-P (Johnson *et al.*, 2008). De plus, au niveau du placenta humain, il est important de noter que l'expression des GRs est influencée, entre autres, par le sexe du fœtus et que ceux-ci seraient impliqués dans les différences de réponse au stress prénatal maternel (PNMS) selon le sexe du fœtus (Saif *et al.*, 2014b; Saif *et al.*, 2015). En outre, les auteurs ont démontré une augmentation de GR β dans le noyau des cellules de placentas de fœtus garçons, amenant à spéculer que la résistance au cortisol des placentas de fœtus garçons serait modulée par cette augmentation de GR β (Saif *et al.*, 2014b). De plus, il est également à noter que d'autres isoformes de GRs ont été découverts dans le placenta humain, mais ceux-ci n'ont pas encore été caractérisés (Saif *et al.*, 2015). Ces études

démontrent l'importance de bien comprendre le système des différents GRs dans le placenta ainsi que leur rôle dans l'adaptation placentaire au stress durant la grossesse et potentiellement dans la programmation foetale.

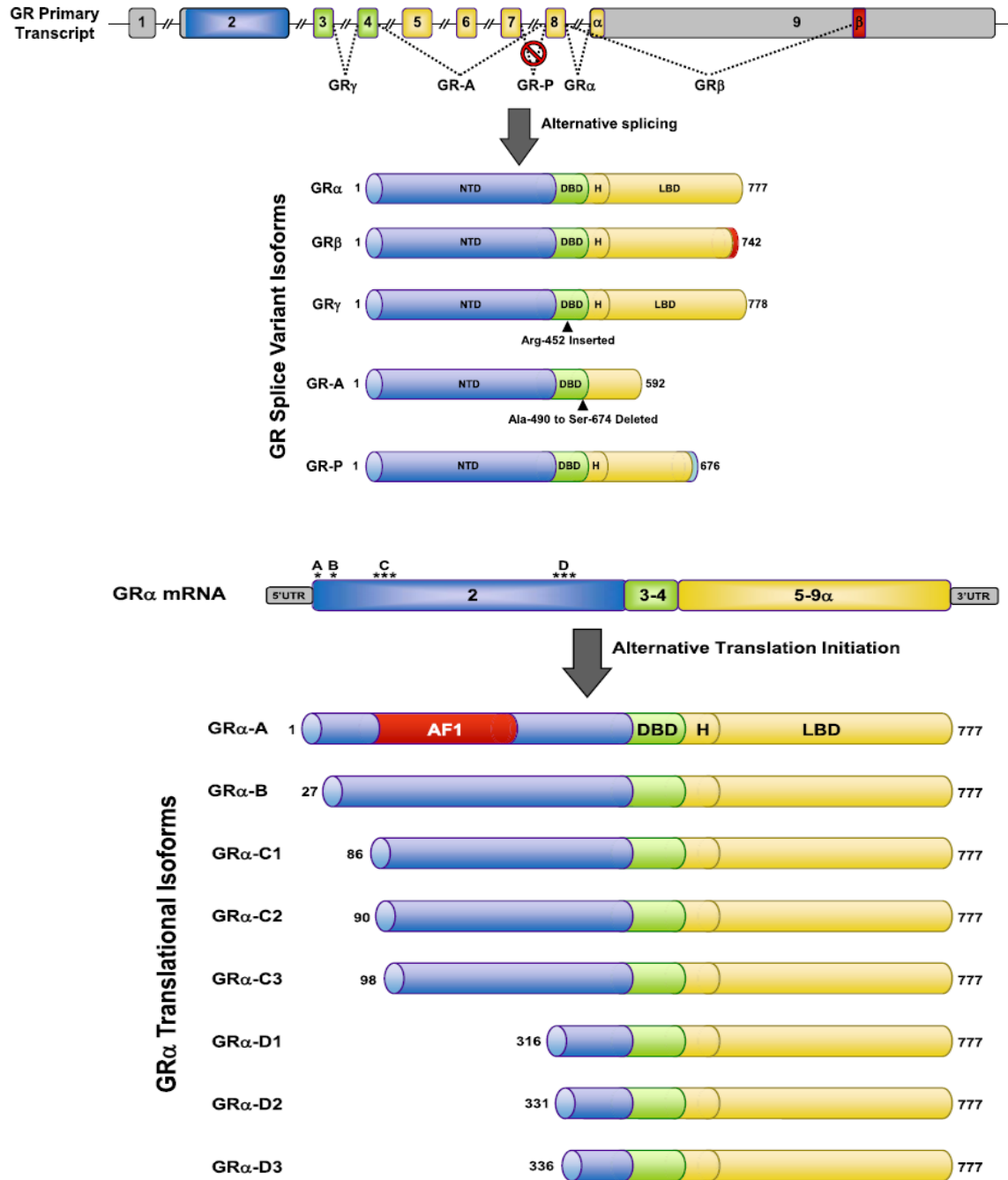


Figure 1.6. Isoformes des récepteurs des glucocorticoïdes suite à l'épissage alternatif et à différents sites d'initiation de la transcription pour le récepteur des glucocorticoïdes α (GR α) NTD : domaine de trans-activation N-terminal ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; LBD : région de liaison au ligand ; H : région de pont ; UTR : Région non-transcrite ; AF1 : région de fonction activatrice 1. (Tiré de (Oakley & Cidlowski, 2013)).

1.1.2. Les transporteurs du glucose (GLUTs)

Le glucose constitue un nutriment essentiel non seulement pour la croissance du fœtus, mais aussi pour le placenta (Hay, 2006). Le transport transplacentaire du glucose est contrôlé par les protéines de transport spécifiques au glucose (GLUTs). La famille des GLUTs comprend 14 membres, soit GLUT1 à GLUT14, qui sont tous exprimés dans le tissu placentaire (Novakovic *et al.*, 2013). Plus spécifiquement, GLUT1 et 3 (gènes *SLC2A1* et *SLC2A3*) sont exprimés à la fois dans le syncytiotrophoblaste et le cytotrophoblaste alors que GLUT4 (gène *SLC2A4*) est retrouvé seulement dans le syncytiotrophoblaste (Ericsson *et al.*, 2005c). En revanche, peu d'information au sujet des autres membres des GLUTs dans le placenta a été rapporté (Novakovic *et al.*, 2013). Les GLUTs sont des transporteurs qui facilitent la diffusion du glucose au travers de la membrane plasmique, suivant le gradient de concentration. L'apport du glucose est donc contrôlé par l'expression à la surface des cellules des GLUTs et non par l'activité directe du transporteur (Lager & Powell, 2012; Olson & Pessin, 1996). Le syncytiotrophoblaste exprime les GLUTs sur les membranes apicales (côté maternel) et basales (côté fœtal) permettant l'échange du glucose du sang maternel au sang fœtal. La membrane apicale exprime davantage de GLUTs que la membrane basale (Baumann *et al.*, 2002). Cette différence permet au syncytiotrophoblaste de conserver le glucose nécessaire à son fonctionnement (correspondant au tiers de la quantité de glucose total) (Lager & Powell, 2012).

L'expression de GLUT1, qui est le transporteur du glucose le plus exprimé dans le placenta à terme, augmente tout au long de la grossesse sur la membrane villositaire du syncytiotrophoblaste ainsi que dans les cytotrophoblastes (Ericsson *et al.*, 2005b). GLUT3, co-localisé avec GLUT1, est plus faiblement exprimé que GLUT1 dans le placenta à terme, mais plus exprimé dans le trophoblaste au début de la grossesse (Brown *et al.*, 2011). En début de grossesse, GLUT4 est impliqué dans le transport du glucose dépendant de l'insuline et de la concentration de glucose sanguine. À terme, GLUT4 a été détecté dans les membranes périmitochondriales du syncytiotrophoblaste, mais en plus faible quantité (Ericsson *et al.*, 2005c). Le rôle dans le placenta des autres membres des GLUTs demeure inconnu (Novakovic *et al.*, 2013). La régulation du transport du glucose varie au cours de la grossesse et est hormono-dépendante. Par exemple, la pGH n'a pas d'effet sur les GLUTs en début de grossesse, mais stimule l'expression placentaire de GLUT1 en fin de grossesse (Ericsson *et al.*, 2005a). Le CRH, *via* une action autocrine et paracrine, augmente l'expression placentaire de GLUT1, tandis qu'elle diminue celle de GLUT3, dans les primocultures de trophoblastes de placentas à terme, favorisant le transport

transplacentaire du glucose *via* GLUT1 (Gao *et al.*, 2012; Wadhwa *et al.*, 1997). Les taux de glucose influencent également l'expression des GLUTs. Un milieu riche en glucose diminue l'expression de GLUT1 dans les primocultures de trophoblastes à terme alors qu'un milieu faible en glucose augmente son expression (Illsley *et al.*, 1998).

Les glucocorticoïdes tels que le cortisol inhibent l'expression de GLUT1 et GLUT3 dans le placenta de rat et dans les primocultures de trophoblaste humain (Hahn *et al.*, 1999). Dans le cas de stress durant la grossesse chez les rats, une diminution de l'expression de GLUT1 ainsi qu'une augmentation de l'expression de GLUT3 et GLUT4 a été observée (Mairesse *et al.*, 2007b). D'autres études n'ont démontré aucune différence d'expression des GLUTs dans les placentas de RCIU comparés à ceux de grossesses normales (Jansson *et al.*, 1993; Jansson *et al.*, 2002). Il apparaît donc que les transporteurs du glucose pourraient être modulés en partie par le stress (et les glucocorticoïdes) durant la grossesse et pourraient donc être impliqués dans le mécanisme de programmation fœtale.

1.1.3. Hormones placentaires

Le placenta est un organe endocrine qui produit les hormones nécessaires à l'établissement et au maintien de la grossesse ainsi qu'à la croissance du fœtus (Malassiné *et al.*, 2000). La majorité des hormones placentaires sont produites au niveau du trophoblaste villositaire. Le syncytiotrophoblaste produit entre autres, la hCG, la hPL, la pGH, le CRH, le cortisol et les estrogènes, tandis que le cytotrophoblaste produit entre autres la somatolibérine (GRH), la gonadolibérine (GnRH) ainsi que la thyrolibérine, en plus de la CRH. Les cellules de la décidue produisent entre autres les prolactines, la relaxine et les prostaglandines. Les hormones produites par les différentes composantes placentaires sont présentées dans le Tableau 1.1. Dans les sections suivantes, nous décrivons en détail seulement les hormones qui ont été étudiées dans le présent projet doctoral.

Tableau 1.1. Hormones et facteurs de croissance produits par le placenta.

Cytotrophoblaste	Syncytiotrophoblaste	Décidue
Corticolibérine (CRH)	Estrogènes :	Prolactines
Somatolibérine (GRH)	Estradiol	Relaxine
Gonadolibérine (GnRH)	Estriol	Prostaglandines
Thyréolibérine (TRH)	Estrone	Rénine
Somatostatine (SRIF)	Progesterone	Protéine de liaison à l'IGF
Inhibine	Hormone de croissance placentaire (pGH)	Sérotonine
Activine	hormone chorionique gonadotrope (hCG)	
Neuropeptide Y	somatomammotrophine chorionique (hPL)	
Enképhaline	CRH	
Dynorphines	Leptine	
Facteur natriurétique auriculaire	Urocortine	
	Sérotonine	
Protéine hormonale reliée à la parathyroïde (PTHrP)		
Leptine		
Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)		
<i>Insulin-like growth factor</i> (IGF) I et II		
Érythropoïétine		
Rénine		
Relaxine		
Sérotonine		

1.1.3.1. Hormone chorionique gonadotrophine humaine

L'hormone chorionique gonadotrophine humaine (hCG, gène *CGB*) est la première hormone peptidique produite par le trophoblaste au début de la gestation. Elle permet de rapidement prévenir l'organisme maternel de la grossesse. La hCG placentaire est constituée de deux sous-unités, α et β . La sous-unité α est identique à la sous-unité α de la LH, de la FSH et de la thyrostimuline (TSH) alors que la sous-unité β est propre à la hCG (Évain-Brion, 2010). La sous-unité β libre de la hCG (β -hCG) placentaire est détectable dans la circulation maternelle dès la deuxième semaine de grossesse, et atteint une concentration maximale vers 10-12 semaines

puis diminue graduellement, tandis que la sous-unité α augmente progressivement jusqu'à terme. La hCG, produite par le syncytiotrophoblaste, est sécrétée à 99% dans la circulation maternelle. Le rôle principal de la hCG est de stimuler la sécrétion de progestérone, nécessaire à l'implantation et à la modulation du système immunitaire, par le corps jaune durant les 6 premières semaines de la grossesse (Czyzyk *et al.*, 2017). La hCG joue aussi multiples rôles à l'interface mère-fœtus dont entre autres, induire l'angiogenèse dans l'endothélium utérin (Zygmunt *et al.*, 2002), maintenir le myomètre quiescent (Ambrus & Rao, 1994), réduire l'activité des cellules T, Treg, B et dendritiques maternelles (immunotolérance) (Bansal *et al.*, 2012; Kane *et al.*, 2009; Muzzio *et al.*, 2014; Schumacher *et al.*, 2013). La hCG médie ces effets via l'activation du récepteur à la LH et hCG (LHCGR). L'activation du récepteur LHCGR par la hCG active les voies de signalisation adénylate cyclase (AC), phospholipase C (PLC) et les canaux calciques, qui vont induire la production des seconds messagers (Strauss *et al.*, 1992). Plusieurs études ont démontré le rôle primordial de l'hCG et de son récepteur dans la formation du syncytiotrophoblaste (syncytialisation) via l'activation de la voie AMPc-PKA (Cronier *et al.*, 1994; Évain-Brion, 2010; Fournier *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 1993). La stimulation de la sécrétion de la hCG *in vitro* par la forskoline (activateur direct de l'AC) induit l'expression de la 11 β -HSD2 dans les cellules BeWo, un modèle de trophoblaste (St-Pierre *et al.*, 2016a). De plus, il est connu que la hCG permet le maintien de l'expression de la 11 β -HSD2 par la voie p38 MAPK et que les variations de l'expression de 11 β -HSD2 par le cortisol sont médiées par la hCG (Ni *et al.*, 2009; Shu *et al.*, 2014). Par contre, le rôle de la hCG dans le stress sur la grossesse reste encore peu connu. Il est donc crucial de cerner l'effet d'un stress durant la grossesse sur la production de hCG, car non seulement elle peut être un indicateur de la différenciation des cellules placentaires (et d'une bonne santé de grossesse), mais aussi car la hCG est co-exprimée dans le syncytiotrophoblaste avec la 11 β -HSD2.

1.1.3.2. Hormone lactogène placentaire humaine

La hPL (aussi appelée somatomammotrophine chorionique humaine ou hCS) appartient à la même famille d'hormone polypeptidique que la GH et la prolactine (PRL) hypophysaire. La hPL est sécrétée dans le sang de la mère dès la cinquième semaine de grossesse et augmente tout au long de la grossesse pour atteindre un pic à terme (Évain-Brion, 2010). Cette hormone représente 7-10% de la production protéique du placenta à terme (sécrétion par jour de 1 à 3 g) et est également sécrétée, en concentration beaucoup plus faible (300 à 1000 fois moins) dans le sang fœtal. La biosynthèse de la hPL est localisée dans le placenta. Plus spécifiquement, elle est détectée exclusivement dans le syncytiotrophoblaste après la sixième semaine de grossesse.

Cette hormone joue un rôle crucial dans la croissance et le développement du fœtus, de façon directe et indirecte (action sur le métabolisme de la mère), sur le métabolisme du fœtus et sur la régulation des transports transplacentaires. Cependant, ce rôle essentiel demeure controversé. En effet, bien que les récepteurs de la hPL aient été identifiés dans le foie fœtal, sa présence durant la grossesse ne semble pas être indispensable, car même en cas de délétion génétique, la grossesse reste normale (Handwerger & Freemark, 2000). Le principal effet de la hPL sur la physiologie maternelle est anabolique (comme la GH hypophysaire). En effet, la hPL diminue la sensibilité à l'insuline, diminue l'utilisation du glucose maternel et favorise la lipolyse (Costa, 2016). Ainsi, des changements métaboliques chez la mère sont favorisés ce qui permet au placenta et au fœtus d'utiliser davantage de glucose pour la croissance même en cas de malnutrition maternelle (Gurtunca & Sperling, 2017). La hPL a aussi des effets lutéotrophique, mammothrophique et lactogénique (Breckwoldt & Keck, 2003; Handwerger & Freemark, 2000).

L'effet du stress maternel durant la grossesse sur la hPL a été mis en évidence par Lange et Anthonsen. Les auteurs ont démontré une diminution du taux de hPL dans le sang maternel suite à l'injection de dexaméthasone (Lange & Anthonsen, 1980). Cette altération de hPL pourrait être impliquée dans la réduction de croissance du fœtus et des problèmes métaboliques après la naissance (Lange & Anthonsen, 1980; Newbern & Freemark, 2011). Chez les chèvres, l'injection de bétaméthasone (un glucocorticoïde de synthèse) diminue le niveau de hPL placentaire et maternelle (Braun *et al.*, 2007). Ceci suggère que la diminution de la production de hPL en situation de stress maternelle pourrait être associée avec une RCIU ou un faible poids à la naissance. Il est donc essentiel de mieux comprendre l'effet d'un stress durant la grossesse sur la hPL et son rôle possible dans la programmation fœtale.

1.1.3.3. Hormone de croissance placentaire

L'hormone de croissance placentaire (pGH aussi appelée hormone de croissance variant, GHv) exclusivement produite par le placenta diffère de la GH hypophysaire par 13 acides aminés. La pGH remplace la GH hypophysaire dans le contrôle du métabolisme maternel pendant la seconde partie de la grossesse. En effet, la GH hypophysaire est produite en concentration négligeable dès le 2^e trimestre de grossesse alors que la production de pGH augmente jusqu'à la fin de la grossesse. La pGH est sécrétée par le syncytiotrophoblaste et n'est pas détectée dans la circulation fœtale (Évain-Brion, 2010). Il a été suggéré que la pGH, comme la hPL, assurerait l'apport de glucose au fœtus lors de la chute de glycémie. En effet, la pGH est sécrétée en abondance lors d'une diminution de glucose dans le sang maternel permettant d'inhiber la capture

du glucose par les muscles de la mère, de stimuler la glucogénèse et la lipolyse ce qui favorise la disponibilité des nutriments pour la croissance du fœtus (Évain-Brion, 2010; Lacroix *et al.*, 2002). Une étude a démontré que le cortisol diminue l'expression de la pGH dans les cellules BeWo (Zeck *et al.*, 2008). De plus, la concentration de pGH dans le sang maternel a été corrélée avec le poids de l'enfant à la naissance (Zeck *et al.*, 2008). Il s'avère donc important de déterminer si un stress maternel prénatal affecte la pGH et par conséquent la croissance fœtale.

1.1.3.4. Estrogènes

Il existe 3 estrogènes naturels l'estrone (E1), l'estradiol (E2) et l'estriol (E3). Durant la grossesse, le placenta produit ces 3 formes d'estrogènes en importante quantité. Les estrogènes sont synthétisés par l'aromatase (CYP19, gène *CYP19A1*), l'enzyme limitante de la synthèse, à partir de précurseurs, l'androsténédione pour l'E1, la testostérone pour l'E2 et la 16 α -hydroxy-déshydropiandrosterone (DHEAS) pour l'E3 (Costa, 2016; Shozu *et al.*, 1991). La CYP19 est exprimée exclusivement dans le syncytiotrophoblaste au niveau placentaire (Évain-Brion, 2010). Les estrogènes produits dans le placenta sont transférés dans la circulation maternelle (Guibourdenche *et al.*, 2009b) ou agissent de manière autocrine/endocrine sur les trophoblastes (Albrecht *et al.*, 2000; Évain-Brion & Malassiné, 2010; Yashwanth *et al.*, 2006). Bien qu'une collaboration materno-fœto-placentaire est nécessaire pour la production d'estrogènes, les principales étapes de la production des estrogènes ont lieu dans le fœtus et le trophoblaste. Les étapes limitantes menant à la production des estrogènes placentaires pendant la grossesse sont schématisées dans la Figure 1.7. Le placenta n'exprimant pas la 17 α -hydroxylase ou la 17, 20 lyase (CYP17) est incapable de produire des estrogènes à partir de la prégnénolone ou de la progestérone (Costa, 2016). Ainsi, la production d'estrogènes par le placenta est dépendante du précurseur DHEAS produit par les surrénales maternelles ou fœtales (Évain-Brion, 2010; Kumar & Magon, 2012). L'E2, l'estrogène le plus abondant durant la grossesse, a pour rôle entre autres de promouvoir l'implantation en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales en plus de promouvoir l'angiogenèse, la vasodilatation (Corcoran *et al.*, 2014; Groothuis *et al.*, 2007) ainsi que la syncytialisation (Malassine & Cronier, 2002). De plus, les estrogènes et la progestérone, sont responsables de l'augmentation de volume de l'hypophyse durant la grossesse modulant ainsi la production de PRL par l'hypophyse (Kletzky *et al.*, 1980; Schock *et al.*, 2016).

L'E2 stimule la production de l'ATCH par l'hypophyse maternelle en fin de grossesse augmentant ainsi le taux de cortisol (Wood, 2005). Il a aussi été démontré que les estrogènes diminuent

l'activité de la 11 β -HSD2 placentaire sur un modèle de primocultures placentaires humaines (Sun *et al.*, 1998). Donc, malgré les études suggérant une interaction entre les estrogènes et le système du cortisol placentaire, l'effet d'un stress prénatal maternel sur la production placentaire d'estrogène n'a jamais été étudié. Enfin, il est intéressant de noter que la sérotonine, via l'activation du récepteur 5-HT_{2A} *in vitro* stimule l'activité de CYP19 dans les cellules BeWo (Klempan *et al.*, 2011)

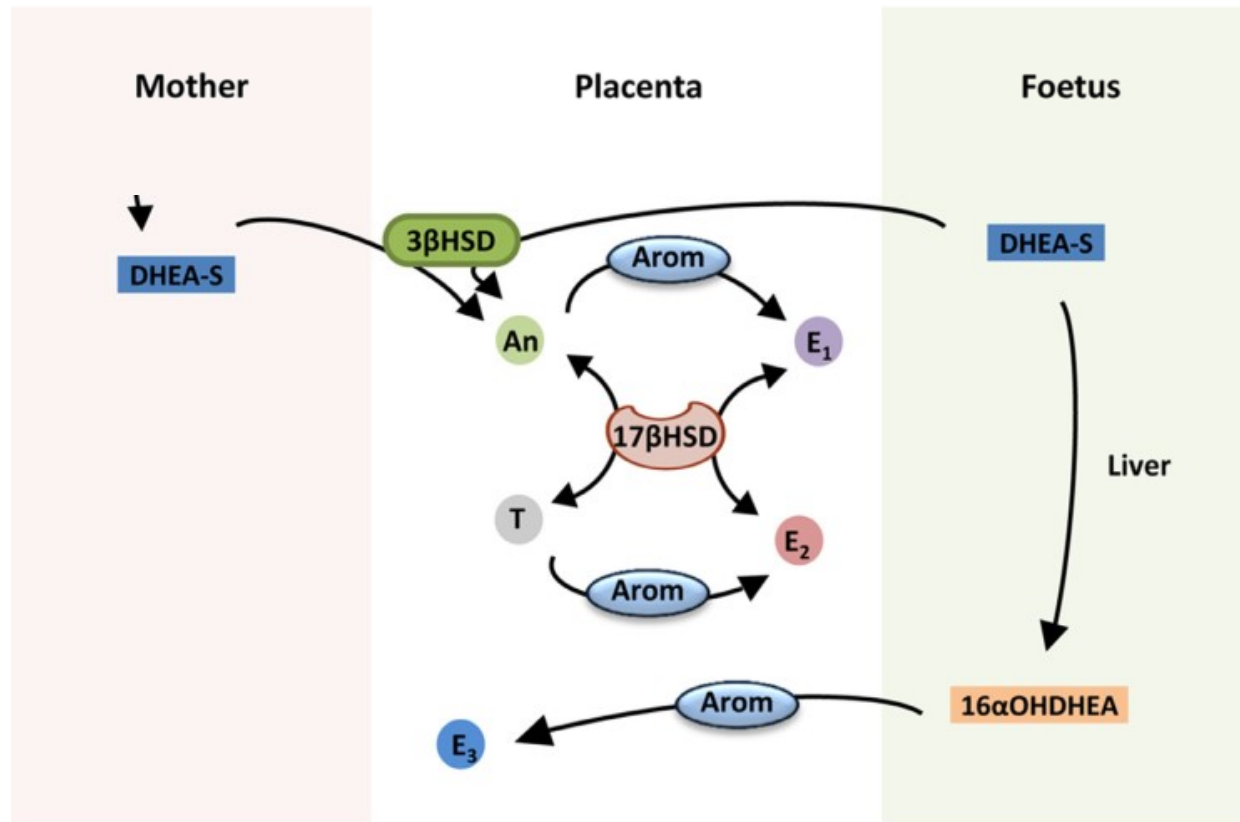


Figure 1.7. Synthèse des estrogènes par le placenta humain (adapté de (Costa, 2016)). Le placenta humain ne peut pas produire les estrogènes seuls il requiert les précurseurs DHEA-S produits par le fœtus ou la mère pour synthétiser l'E1 et l'E2 alors que le 16 α -OHDHEA (fœtal) est nécessaire à la production d'E3. An : androsténédione ; Arom : aromatasase ; 3 et 17 β HSD : 3 et 17 β - hydroxystéroïde déshydrogénase ; T : testostérone ; E1 : estrone ; E2 : estradiol ; E3 : estriol ; DHEA-S : sulfate de déshdropiandrosterone ; 16 α OHDHEA : 16 α -hydroxy- sulfate de déshdropiandrosterone.

1.1.4. Système Sérotoninergique

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est un neuromédiateur qui a aussi un rôle d'hormone (Pour revue (Richard Green, 2006)). Elle a été découverte et caractérisée par Rapport et collaborateurs en 1948 dans le sérum bovin (Rapport *et al.*, 1948). Son nom provient de sa

présence dans le sérum (séro) et de sa propriété vasoconstrictrice tonifiante (tonine). En parallèle, Vitto Erspamer caractérisait l'action de l'entéramine chez les vertébrés, les octopodes et les mollusques (Erspamer & Asero, 1952). Finalement, dû à leurs effets vasoconstricteurs des muscles lisses, il a été démontré que l'entéramine et la sérotonine étaient la même molécule (Richard Green, 2006). En raison de sa découverte dans le cerveau des mammifères, le rôle de neuromédiateur de la sérotonine a été établi en 1954 (Gaddum & Hameed, 1954; Richard Green, 2006). La sérotonine est associée à plusieurs fonctions physiologiques et comportementales, notamment l'appétit, l'humeur, la mémoire et le sommeil (Baou *et al.*, 2016; Richard Green, 2006). En plus des fonctions de neuromédiateur et d'hormone, la sérotonine est aussi un agent mitogène puissant et un régulateur du système immunitaire chez les mammifères (Baganz & Blakely, 2013; Fanburg & Lee, 1997; Shajib & Khan, 2015).

1.1.4.1. Synthèse, dégradation et métabolisme de la sérotonine

La sérotonine est produite à partir de l'acide aminé essentiel, le L-tryptophane (L-Trp) en deux étapes (Figure 1.8). L'étape limitante dans la production de la sérotonine est l'ajout d'un groupement hydroxyle au cycle benzoïque à partir du L-Trp pour obtenir le 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par la tryptophane hydroxylase (TPH) avec comme cofacteurs l'oxygène et le tétrahydroptéridine (Vrana *et al.*, 1993). La TPH est présente en deux isoformes, la TPH1 et la TPH2 (Walther *et al.*, 2003). Bien que les deux isoformes partagent 71% de séquence d'acides aminés, les gènes *TPH1* et *TPH2* se trouvent sur les chromosomes 11 et 12, respectivement (Pour revue (Sedlmayr *et al.*, 2014). La TPH1 est exprimée principalement dans les cellules non-neuronales alors que la TPH2 est spécifiquement exprimée dans le système nerveux central (Cote *et al.*, 2003; Walther *et al.*, 2003). La deuxième étape dans la production de la sérotonine est une réaction de décarboxylation catalysée par l'acide L-amino décarboxylase (AADC) (Figure 1.8.). L'AADC utilise le magnésium ainsi que les vitamines B3 et B6 comme cofacteurs (Boadle-Biber, 1993; Bonnin *et al.*, 2011; Jonnakuty & Gragnoli, 2008). Une fois la sérotonine produite, elle est emmagasinée par les transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT, présente dans le placenta) pour ensuite être relâchée dans le milieu extracellulaire (Hansson *et al.*, 1998), dégradée ou métabolisée (notamment en mélatonine) (Bottalico *et al.*, 2004).

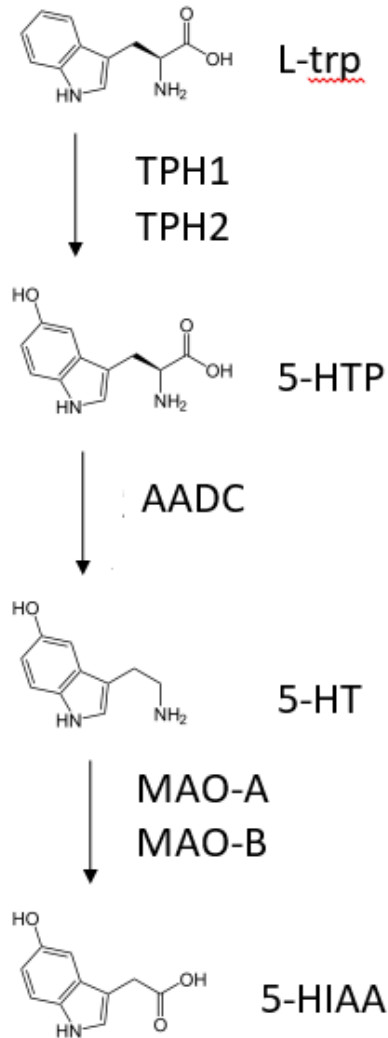


Figure 1.8. Synthèse de la sérotonine à partir du L-tryptophane. L'étape limitante dans la synthèse de la sérotonine (5-HT) est l'étape catalysée par les tryptophane hydroxylases (TPH-1 et -2) qui permettent l'hydroxylation du L-tryptophane (L-trp) en 5-hydroxytryptophane (5-HTP). Par la suite la 5-HTP est transformée par décarboxylation en 5-HT par l'enzyme non spécifique L-amino décarboxylase (AADC). La 5-HT est dégradée en acide 5-hydroxyindol acétique (5-HIAA) par les monoamine oxydase A et B (MAO-A et -B).

La sérotonine est dégradée par la monoamine oxydase (MAO) exprimée dans les mitochondries. La MAO dégrade la sérotonine en acide 5-hydroxyindol acétique (5-HIAA) qui est ensuite éliminé dans l'urine (Claustrat *et al.*, 2005). Il existe deux sous-types de MAO, la MAO-A et la MAO-B dont l'expression est tissu-dépendante. Par exemple, le placenta exprime presque uniquement la MAO-A alors que les neurones expriment seulement la MAO-B (Billett, 2004). De plus, la MAO-A dégrade beaucoup plus rapidement la sérotonine que la MAO-B (Hadden *et al.*, 2017; Youdim *et al.*, 2006).

1.1.4.2. Récepteurs de la sérotonine

À ce jour, 17 récepteurs distincts de la sérotonine ont été identifiés et classés selon leur homologie de séquence d'acides aminés en sept familles de 5-HT₁ à 5-HT₇ (Hoyer *et al.*, 1994; Jonnakuty & Gragnoli, 2008). Les récepteurs de la sérotonine sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (ou récepteurs couplés aux protéines G, RCPGs) à l'exception de la famille des récepteurs 5-HT₃ qui sont des canaux ions Na⁺/K⁺ (Hoyer *et al.*, 2002). Des études ont montré que des taux élevés de cortisol altèrent certains récepteurs de la sérotonine, dont le récepteur 5-HT_{2A}, récepteur qui joue un rôle crucial au niveau placentaire (voir section 1.1.4.4).

1.1.4.2.1. Les récepteurs sérotoninergiques de type 2

La famille des récepteurs 5-HT₂ contient trois membres, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. Ces trois récepteurs ont une homologie de séquence en acide aminé de 46% à 50% et partagent une cascade de signalisation similaire (Hoyer *et al.*, 2002). Les 5-HT₂ sont couplés à la protéine G_q et la voie de signalisation protéine kinase C (PKC)- phospholipase C (PLC). Ces récepteurs peuvent aussi activer la voie de la phospholipase A2 (PLA2) pour produire l'acide arachidonique entre autres, dans les neurones (Millan, 2005). Le récepteur 5-HT_{2A} est lié à certains troubles psychiatriques comme la schizophrénie, la dépression et l'anxiété (Masson *et al.*, 2012; Paquette & Marsit, 2014). Il a également été caractérisé pour son action contractile sur les muscles lisses ainsi que pour son action mitogène (facteurs de croissance) (Azmitia, 2001; Masson *et al.*, 2012). Le récepteur 5-HT_{2B} a été impliqué dans la différenciation des cellules de la crête neurale ainsi que du cœur et dans la croissance de plusieurs tissus, dont les vaisseaux sanguins pulmonaires et les veines du cordon ombilical (Masson *et al.*, 2012; Nebigil *et al.*, 2001). Le récepteur 5-HT_{2C} a été associé à la dépression, l'anxiété et l'obésité (Halford & Harrold, 2012; Millan, 2005). Au niveau du placenta, notre équipe a démontré que l'activation du récepteur 5-HT_{2A}, induit la prolifération cellulaire et active la production d'estrogène en augmentant l'expression et l'activité de la CYP19 (Klempan *et al.*, 2011; Sonier *et al.*, 2005; Thibeault *et al.*, 2014). Par contre, bien que 5HT_{2B} et 5HT_{2C} ont été caractérisés dans plusieurs tissus (dont le placenta par notre équipe, données non publiées) leurs rôles au niveau du placenta n'ont jamais été élucidés.

1.1.4.3. Transporteur de la sérotonine

Le transporteur de la sérotonine (SERT, gène *SLC6A4*) couplé en symport avec la sérotonine, le Cl⁻ et le Na⁻ et en antiport en relâchant le K⁺ dans le milieu extracellulaire (Coleman *et al.*, 2016).

SERT est exprimé dans de nombreux tissus comme le système nerveux central, le cœur, les intestins ainsi que le placenta (Gill *et al.*, 2008; Kish *et al.*, 2005; Ni & Watts, 2006; Viau *et al.*, 2009). Le SERT est localisé au niveau de la membrane basale (maternelle) et apicale (fœtale) du syncytiotrophoblaste ainsi que dans les cellules endothéliales des capillaires fœtaux dans le placenta humain (Balkovetz *et al.*, 1989; Bottalico *et al.*, 2004; Viau *et al.*, 2009). La sérotonine maternelle transportée au placenta par SERT du côté basal est rapidement dégradée par la MAO-A afin d'empêcher la vasoconstriction des artères utérines (Wu *et al.*, 2016). Le rôle de SERT localisé sur la membrane apicale du syncytiotrophoblaste n'a pas été reporté.

La sérotonine peut aussi emprunter d'autres voies que par SERT pour son transport intracellulaire. En effet, la sérotonine peut être transportée par les transporteurs de cations organiques (OCT1, OCT2 et OCT3) et par le transporteur de monoamine de la membrane plasmique (PMTA) (Coleman *et al.*, 2016; Hansson *et al.*, 2009; Roth *et al.*, 2012; Sata *et al.*, 2005). Ces transporteurs sont présents à la surface du syncytiotrophoblaste, mais ont une affinité moins importante pour la sérotonine que SERT (Hansson *et al.*, 2009; Rose'Meyer, 2013). SERT est connu pour être contrôlé par diverses kinases comme les PKC et les protéines kinases G (PKG), qui en phosphorylant la p38-MAPK peuvent augmenter la présence de SERT à la surface de la cellule, mais aussi phosphoryler SERT directement et ainsi induire son activité (Rose'Meyer, 2013; Zhu *et al.*, 2004). Ainsi, lorsque l'expression ou l'activité de SERT augmente, le taux de sérotonine extracellulaire diminue suite à la capture de la sérotonine par les cellules. Certaines mutations rares ont été identifiées chez l'humain associés soit à une augmentation du niveau de SERT ou encore à une augmentation de son activité, réduisant ainsi la sérotonine disponible pour l'activation de ses récepteurs (Prasad *et al.*, 2009; Prasad *et al.*, 2005). Ces variations ont été associées à un plus grand risque de trouble du spectre autistique ainsi qu'à des troubles obsessionnel-compulsif (Prasad *et al.*, 2009; Prasad *et al.*, 2005). Le transporteur de la sérotonine serait donc une composante importante du système sérotoninergique placentaire à étudier afin de mettre en évidence une potentielle association entre le stress prénatal et des troubles du spectre autistique.

1.1.4.4. Grossesse, stress et sérotonine (voir revue St-Pierre et al. 2016 ; Annexe I)

Le placenta, organe essentiel à la grossesse, contient toutes les composantes du système sérotoninergique. L'équipe de Bonin et collaborateurs a démontré que le placenta exprime l'enzyme limitante dans la synthèse de la sérotonine, la TPH1, et produit *de novo* sa propre sérotonine qui est essentielle au développement cérébral du fœtus (Bonnin *et al.*, 2011). Plus

récemment, notre équipe a démontré la présence de la TPH2 dans le placenta (Laurent *et al.*, 2017). En plus de la production de la sérotonine, le placenta exprime ses récepteurs (5-HT_{2A, B, C}; 5-HT_{1A}, 5-HT₇), son transporteur (5-HTT ou SERT) et la MAO-A (Huang *et al.*, 1998; Irge *et al.*, 2016; Viau *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010). La sérotonine produite durant la grossesse est donc contrôlée de façon très étroite par le placenta (St-Pierre *et al.*, 2016b). La sérotonine est connue pour être impliquée dans certains troubles de la grossesse comme les naissances prématurées, la prééclampsie et le diabète gestationnel et elle joue un rôle essentiel dans le développement et la programmation (Eke *et al.*, 2016; Sabolovic Rudman *et al.*, 2015; St-Pierre *et al.*, 2016b; Viau *et al.*, 2009). L'inactivation du gène *TPH1* chez les souris (Tph1 *-/-*) engendre des souriceaux plus petits et avec des malformations cardiaques (Cote *et al.*, 2007). De plus, la perturbation du système de la sérotonine est associée à des problèmes psychiatriques après la naissance comme l'anxiété, les troubles de l'attention et les troubles de régulation du comportement du nouveau-né (*e.g.* pleurs, sommeil) (Beaulieu *et al.*, 2008; Halmoy *et al.*, 2010; Hendricks *et al.*, 2003; Paquette *et al.*, 2013; Räikkönen *et al.*, 2015).

La sérotonine via l'activation de son récepteur 5-HT_{2A} placentaire régule la prolifération et l'invasion du trophoblaste et donc joue un rôle crucial dans le bien-être de la grossesse (Oufkir *et al.*, 2010; Oufkir & Vaillancourt, 2011; Sonier *et al.*, 2005). De plus, notre équipe a démontré une diminution de l'expression de 5HT_{2A} et SERT dans les placentas de grossesses compliquées par un diabète gestationnel comparé à ceux de grossesses normales (Viau *et al.*, 2009). Une diminution de la sérotonine maternelle et placentaire a aussi été observée dans les placentas de prééclampsie comparés aux placentas de grossesses normotensives (Lanoix *et al.*, 2012a; Middelkoop *et al.*, 1993). La sérotonine joue également un rôle direct sur l'embryogénèse, notamment sur le développement du cerveau et du cœur fœtal (Bonnin *et al.*, 2011; Cote *et al.*, 2007; Cote *et al.*, 2003; Nebigil *et al.*, 2000; Sari & Zhou, 2003). L'équipe de Bonin et collaborateurs a démontré que les taux de sérotonine fœtale des souris invalidés pour le gène *SLC6A4* étaient similaires aux souris témoins (Bonnin *et al.*, 2011). Ces résultats indiquent que la sérotonine maternelle n'est pas la source principale de sérotonine au début du développement fœtal. Étant donné que le placenta exprime fortement la MAO-A, il est probable que la sérotonine maternelle soit majoritairement dégradée dans le placenta et que la majorité de la sérotonine fœtale proviendrait de la production placentaire (Auda *et al.*, 1998; Billett, 2004; Bonnin *et al.*, 2011; Sivasubramaniam *et al.*, 2002).

La sérotonine joue également un rôle dans la réponse au stress. Par exemple, les niveaux de glucocorticoïdes sont proportionnellement inverses au niveau de sérotonine dans l'organisme notamment dans les cas de dépression (Pretorius, 2004). La sérotonine est aussi connue pour réguler le niveau d'ARNm du récepteur aux glucocorticoïdes *NR3C1*, du moins dans les modèles animaux et *in vitro* (Erdeljan *et al.*, 2005; Meaney *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 1990). La sérotonine fait l'objet de plus en plus de recherche afin de mieux cerner son implication dans le développement et la programmation fœtale (Bonnin & Levitt, 2011; Mina & Reynolds, 2014; Paquette & Marsit, 2014; Räikkönen *et al.*, 2015; St-Pierre *et al.*, 2016b). En outre, de plus en plus d'études suggèrent un lien entre un stress durant la grossesse et des altérations au niveau du système sérotoninergique placentaire (Bronson & Bale, 2015; Paquette *et al.*, 2013; Paquette & Marsit, 2014; Räikkönen *et al.*, 2015).

1.1.5. Dimorphisme sexuel placentaire

C'est en 1786 que pour la première fois une différence dans le risque de développer certaines complications de grossesse en fonction du sexe du fœtus a été décrite (Clark, 1786). Une différence dans la stratégie de survie du fœtus dépendant du sexe a été suggérée pour expliquer ce phénomène. En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que le risque de complications de grossesse comme la prééclampsie, un accouchement prématuré ou la RCIU augmente de 20% si le fœtus est de sexe masculin (Vatten & Skjærven, 2004). Chez les femmes souffrant d'asthme les fœtus filles montrent un ralentissement de croissance par rapport aux fœtus garçons (Clifton & Murphy, 2004). Le fait que les fœtus femelles ralentissent leurs croissances (sans RCIU) leurs permettraient de survivre à un manque d'oxygène ou de nutriments plus efficacement que les fœtus mâles (Figure 1.9.). L'exposition maternelle au bétaméthasone est associée à une plus grande activité de la 11 β -HSD2 placentaire chez les fœtus filles alors qu'aucun effet n'est observé chez les placentas de fœtus garçons. Ces données suggèrent que le placenta de fœtus femelle ajuste son métabolisme en fonction de la concentration de glucocorticoïdes, pour assurer le développement maximal du fœtus alors que ce n'est pas le cas pour le placenta de fœtus mâle (Clifton, 2010b; Clifton & Murphy, 2004). Le mécanisme proposé pour expliquer cette différence est une modulation de l'ARNm de *NR3C1* au niveau du promoteur 1A3. L'expression de ce promoteur demeure au même niveau en présence de glucocorticoïdes chez les placentas de fœtus garçons, mais son expression est diminuée dans les placentas de fœtus filles. La différence serait attribuée à la méthylation de ce promoteur spécifique dans le placenta de fœtus fille par rapport aux placentas de fœtus garçons (Hodyl *et al.*, 2010). Ces effets de sexe sont en partie due à une différence d'expression des gènes placentaires selon le sexe du fœtus et donc

dépendantes des chromosomes X ou Y, mais aussi par une différence dans la régulation de l'expression de divers gènes, protéines ou cytokines de manière non dépendante des chromosomes sexuels. En d'autres termes, beaucoup de gènes impliqués dans les différences d'adaptation ne sont pas localisés sur les chromosomes sexuels (Clifton, 2010b; Clifton & Murphy, 2004; Scott *et al.*, 2009). Il est donc important de considérer le sexe du fœtus comme paramètre dans toute étude concernant la physiologie placentaire. Cependant, le sexe du fœtus demeure un paramètre souvent laissé de côté dans les études de l'effet du stress prénatal sur les fonctions du placenta.

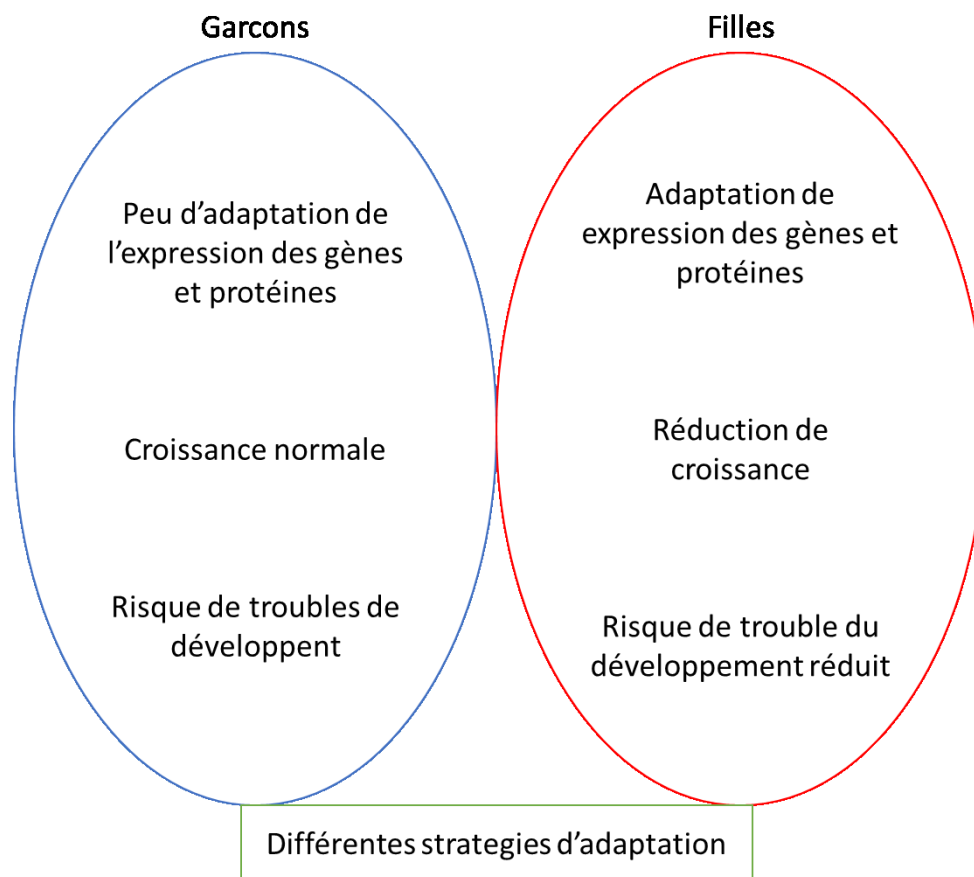


Figure 1.9. Dimorphisme sexuel dans les stratégies d'adaptations foeto-placentaire face au stress prénatal. (Tiré de (Clifton, 2010b)).

1.2. Stress

Le stress est défini par une menace (réelle ou virtuelle) à l'homéostasie d'un organisme (McEwen, 1999). Pour permettre à l'organisme de s'adapter à cette menace, les animaux ont développé plusieurs mécanismes de défense. Ces mécanismes impliquent entre autres, la réponse des catécholamines (dopamine, adrénaline, noradrénaline) et des glucocorticoïdes (cortisol) (Avishai-Eliner *et al.*, 2002; Pacak & Palkovits, 2001). La réponse aux catécholamines est la réponse de type rapide qui implique l'innervation de la zone médullaire des glandes surrénales (Tsigos & Chrousos, 2002). Cette réponse du système nerveux autonome est aussi connue comme la fonction de survie directe d'alarme ou de combat / fuite. En effet, suite à un événement perçu comme un stress, le système nerveux sympathique est activé et l'adrénaline et la noradrénaline sont rapidement sécrétées et activent la respiration et le rythme cardiaque pour permettre l'effort physique (cardiaque, musculaire), tout en diminuant la digestion et les autres systèmes dit non-essentiels à la survie à court terme (Jänig, 1989). Le stress chronique pour sa part implique l'activation de l'axe HPA comme mentionné à la section 1.1.1.1. Son produit final, le cortisol (ou corticostérone chez les rongeurs), produit par la corticosurrénale, active aussi les fonctions biologiques de survie, mais de façon moins intense que l'adrénaline et sur un plus long terme. En outre, le cortisol a une demi-vie beaucoup plus longue que l'adrénaline dans le sang (11 minutes pour l'adrénaline contre 75 minutes pour le cortisol) (Graignic-Philippe *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 1999; Hindmarsh & Charmandari, 2015).

1.2.1. Mesures du stress

Afin de bien comprendre les différents types de stress auxquels les individus sont exposés, il est important de bien connaître non seulement la réponse biologique, mais aussi les méthodes pour les mesurer. Il existe deux grands types de stress : les stress physiologiques et les stress psychologiques. Dans cette section, il sera question de stress psychologiques, qui sont des événements ou situations négatives ou dangereuses réelles ou perçues.

1.2.1.1. Stress objectif

Le stress objectif ou *objective hardship* est défini comme le stimulus engendrant la réponse de détresse chez les individus (Lazarus & Launier, 1978). Le stress objectif peut être chronique (ex : stress monétaire ou provoqué par un emploi) ou ponctuel (ex : stress engendré par la mort d'un

proche) et est indépendant de la réponse individuelle de détresse. C'est-à-dire que le stress objectif correspond à l'événement seulement et ne correspond pas à la réponse de l'individu par rapport à l'événement. Pour mesurer le stress objectif basé sur les événements de la vie, plusieurs échelles sont utilisées comme la *Social readjustment rating scale* ou *Life events inventory* (Holmes & Rahe, 1967; Williamson Jr *et al.*, 1989). Une autre méthode est d'analyser les résultats d'événements majeurs de la vie comme la mort d'un proche ou un accident d'automobile (Graignic-Philippe *et al.*, 2014). Pour étudier le stress objectif durant la grossesse et mesurer l'effet sur le développement de l'enfant, il est possible d'utiliser des modèles animaux. Bien que les modèles animaux de stress durant la grossesse soient utiles pour vérifier certains mécanismes ou émettre certaines hypothèses, les résultats du stress objectif subit par les animaux sont difficilement transférables aux humains (revu dans (Charil *et al.*, 2010)). Pour contourner ce problème, tirer avantage des catastrophes naturelles pour étudier le stress durant la grossesse et la programmation foetale chez l'humain est une approche intéressante. L'avantage d'utiliser une catastrophe naturelle pour étudier le stress objectif durant la grossesse est qu'il y a une grande variabilité au niveau de l'exposition dans la population (King *et al.*, 2005). C'est-à-dire qu'il est possible de faire une échelle d'exposition au stress dans la population cible. Pour mesurer ce stress objectif, un questionnaire est élaboré en prenant en compte les différents aspects de la catastrophe vécue par la personne tels que la menace (blessure ou danger), la perte (matérielle ou financière), la portée (nombre de jours sans électricité) et le changement (jours restés à l'extérieur de la maison) (King *et al.*, 2012; Laplante *et al.*, 2007a). Il est donc possible de mesurer les épreuves vécues par les personnes de façon quantitative. Cette façon de mesurer la catastrophe vécue (stress objectif) par les femmes enceintes a été utilisée dans trois études qui composent le programme *Stress in Pregnancy International Research Alliance* (SPIRAL) : *project Ice Storm*, *The Iowa floods* et *The Queensland Flood Study* (QF2011) (<https://www.mcgill.ca/spiral/home-page>). Un autre des avantages d'utiliser un événement stressant comme source de stress est de pouvoir lui assigner un moment précis de manifestation. La présence de périodes spécifiques de vulnérabilité durant le développement foetal met en évidence l'importance d'inclure le moment précis de l'événement stressant dans la recherche sur le stress durant la grossesse (Buss *et al.*, 2010). Bien que ces périodes de vulnérabilités soient assez connues, les résultats de recherche sur le stress durant la grossesse avec un événement stressant ponctuel sur le déroulement de la grossesse, le développement du foetus et de l'enfant sont parfois contradictoires (Graignic-Philippe *et al.*, 2014). L'effet du moment du stress durant la grossesse sera élaboré davantage dans la section 1.3. Une limitation de la mesure du stress objectif est qu'il est difficile de différencier entre des événements dit stressants et des

événements qui n'engendrent pas de réponse biologique chez l'individu. C'est-à-dire que dépendant des personnes, une épreuve mesurée objectivement peut sembler difficile alors qu'elle n'engendrera pas de réponse biologique chez l'individu (Hedegaard *et al.*, 1996). Généralement, les questionnaires utilisés ne font pas la distinction entre les événements engendrant une réponse chez la personne et le nombre d'événements subit par la personne (Graignic-Philippe *et al.*, 2014).

Pour le présent projet, la mesure du stress objectif a été effectuée avec un questionnaire des événements vécus par les femmes enceintes. Issu du questionnaire IF100 du projet *Iowa flood*, mais en ajoutant certaines questions permettant de représenter plus les événements vécus par les femmes enceintes durant l'inondation. Le nouveau questionnaire intitulé QFOSS (*Queensland flood objective stress scale*) a donc un score maximum de 200 points avec 50 points attribués à chacun des 4 thèmes soit : la menace, la perte, la portée et le changement (King *et al.*, 2015b).

1.2.1.2. Stress subjectif

Une différence importante entre les études animales et humaines sur le stress durant la grossesse est qu'il est possible de mesurer la détresse subjective chez l'humain par rapport à l'événement subit. Ceci est particulièrement important étant donné que la réponse individuelle à un événement particulier varie de personne en personne (Folkman, 2013). Pour évaluer la détresse subjective des individus par rapport à un ou plusieurs événements stressants, il existe différents questionnaires.

Échelle d'impact de l'événement - Révisée. Impact of event scale – Revised

L'Échelle d'impact de l'événement - Révisée (IES-R) (*Impact of event scale – Revised*) est le questionnaire auto-administré le plus populaire pour détecter le syndrome de stress post-traumatique entre autres, dans la recherche sur l'impact des catastrophes naturelles (Weiss, 1997b). L'IES-R comporte 22 items dont 7 portant sur l'hyperexcitation (*hyperarousal*) qui ne sont pas dans l'*impact of event scale* (IES) (Horowitz *et al.*, 1979). Les 22 items du questionnaire correspondent à 14 des 17 symptômes du trouble du stress post traumatique (PTSD) décrit dans le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM)-IV. Les questions évaluent la sévérité des symptômes d'intrusion, d'évitement et d'hyperéveil des sept derniers jours. C'est-à-dire la semaine avant l'administration du questionnaire. Par exemple « au cours de la dernière semaine, avez-vous eu des pensées par rapport à l'événement ». Ce questionnaire utilise une

échelle de pointage allant de 0 (pas du tout) à 4 (extrêmement) par question pour un score maximal de 88, avec un score de 22 et plus utilisé comme limite de symptôme de PTSD. Plus le score obtenu est élevé, plus la personne est affectée par les souvenirs de l'événement (Orsillo, 2001).

Inventaire de détresse péritraumatique

L'Inventaire de détresse péritraumatique (*Peritraumatic distress inventory*; PDI) est un questionnaire de mesure rétrospective de stress post-traumatique développé récemment par l'équipe de Brunet (Brunet *et al.*, 2001). Le PDI est un questionnaire d'auto-évaluation de 13 items qui permet de déterminer les réactions de détresse émotionnelle chez un individu lors d'un événement traumatique et immédiatement après (dans les minutes et heures qui suivent). Comme pour IES-R, le PDI utilise une échelle de 0 (pas du tout) à 4 (extrêmement) pour chaque question, mais à la différence de l'IES-R le score total est calculé en moyenne du score obtenu pour les 13 questions. Les personnes, qui obtiennent un score de 15 et plus, présentent une détresse péritraumatique significative et ainsi un risque plus élevé de développer un PTSD (Brunet *et al.*, 2003; Jehel *et al.*, 2005). Les questions portent sur le sentiment de menace à sa propre vie, la peur, l'horreur, la honte ainsi que la colère entre autres (Brunet *et al.*, 2001).

Questionnaire des Expériences de Dissociation Péritraumatique (*Peritraumatic dissociative experiences questionnaire*)

Le questionnaire des Expérience de Dissociation Péritraumatique (*Peritraumatic dissociative experiences questionnaire*, PDEQ) est un questionnaire de 10 items auto-administrés qui mesure rétrospectivement les expériences de dissociation traumatique vécues lors d'un événement et les quelques heures qui suivent celui-ci. La dissociation est un concept expliquant la façon de traiter l'information durant une expérience traumatique ou subséquemment (Birmes *et al.*, 2003). Les victimes d'une catastrophe naturelle décrivent parfois un sentiment de perte de perception du temps, des événements et des personnes. Comme si l'événement qui se déroulait était incompréhensible ou comme une rêve (Van Der Kolk, 1998). Le PDEQ permet de mesurer ce sentiment péri-traumatique de dissociation chez les personnes exposées au stress d'une catastrophe naturelle. Le PDEQ contient 10 questions ayant un score de 1 (pas du tout vrai) à 5 (extrêmement vrai), un score total de 15 ou plus indique une dissociation significative (Birmes *et al.*, 2005). Les personnes ayant une forte dissociation présentent un risque élevé de développer un PTSD (Birmes *et al.*, 2003).

Mesure de stress subjectif combiné

Dans le présent projet, afin d'évaluer le stress objectif de façon plus complète et de réduire le nombre d'analyses, une mesure de stress combinée a été utilisée. En utilisant l'analyse en composante principale (PCA), le *Composite Score for MOthers' Subjective Stress* (COSMOSS) a été calculé : $\text{COSMOSS} = 0.359 \times \text{IESR} + 0.396 \times \text{PDI} + 0.389 \times \text{PDEQ}$ (Simcock *et al.*, 2016). Nous avons obtenu une variable (composante) expliquant 76.7% de la variabilité de IESR, PDI et PDEQ. Les associations entre les différents facteurs pour la cohorte utilisée aux chapitres 4 et 5 sont : $r = 0.570$ (IESR - PDI), 0.590 (IESR - PDEQ) et 0.839 (PDI - PDEQ).

1.3. Programmation fœtale ou *Developmental origin of health and diseases*

L'origine fœtale des maladies de l'adulte, ou « hypothèse de Barker » a fait son apparition, il y a plus de 30 ans dans un trio d'articles dans la revue *The Lancet* par Barker et collaborateurs (Barker *et al.*, 1993; Barker & Osmond, 1986; Barker *et al.*, 1989a). Ces études émettent l'hypothèse selon laquelle « *an environment which produces poor fetal and infant growth is followed by an adult environment that determines high risk for ischemic heart disease* » (Barker, 2007). Cependant, en poussant la réflexion davantage et en analysant les données selon la malnutrition maternelle à différentes étapes de la grossesse, Baker et collaborateurs ont proposé que la malnutrition durant la grossesse programme le métabolisme du fœtus, entraînant un risque accru de problème métabolique, dont les maladies cardiaques à l'âge adulte (Barker, 2007). L'hypothèse est qu'il y aurait un problème d'adaptation entre l'environnement fœtal et l'environnement de vie de l'enfant. Ceci n'inclut pas uniquement la nutrition et les maladies cardiaques, mais aussi le stress maternel prénatal et la programmation neuro/développementale de l'enfant (Wadhwa *et al.*, 2009)

1.3.1. Stress prénatal et programmation fœtale

Le stress prénatal et la programmation fœtale ont été associés depuis plusieurs années (revu dans (Graignic-Philippe *et al.*, 2014)). Les études sur le stress durant la grossesse ont mis en lien des complications de la grossesse telles que le faible poids à la naissance et la prématurité. Une association entre le stress perçu durant la grossesse et les altérations comportementales chez l'enfant a été proposée (DiPietro, 2002).

Les études de programmation fœtale associée au stress prénatal ont surtout été réalisées chez les modèles animaux. L'utilisation de modèle animal permet aux chercheurs d'analyser une grande variété de stressseurs et d'étudier l'effet du stress à différent moment de la gestation sur la programmation du rejeton à court, moyen et long terme (Weinstock, 2008). Les études animales ont permis de démontrer un lien de cause à effet du PNMS sur des complications de grossesse et certaines altérations morphologiques, physiologiques et neurodéveloppementales du fœtus (Seckl, 1998; Seckl, 2004b; Weinstock, 2001). Par exemple, un stress prénatal subit au début de la gestation entraîne une réduction de la locomotion et de l'exploration chez les primates (Schneider *et al.*, 2002). Le début de la grossesse chez le primate correspond à la période de migration neuronale et donc une période de vulnérabilité pour le développement neuronal du

foetus (Stiles & Jernigan, 2010). Une autre étude a démontré des effets différents chez les souriceaux de mères stressées durant la dernière semaine de gestation : les chercheurs ont observé un comportement plus exploratoire chez les souriceaux dont les mères avaient été stressées en comparaison à ceux dont les mères n'avaient pas été stressées (Meek *et al.*, 2000). De plus, chez le rat, un stress maternel répété (chronique) durant la gestation engendre une réponse plus lente et prolongée de l'axe HPA (résorption niveaux de corticostérone plus lente suite à un stress) et une augmentation des comportements anxieux chez les femelles, tandis que chez les mâles une atténuation de leur réponse de l'axe HPA a été observée (Richardson *et al.*, 2006). Les résultats obtenus ici démontrent l'utilité de modèle animal pour notamment déterminer l'effet du moment de l'exposition au PNMS, mais aussi permet de faire subir exactement le même événement à plusieurs individus et ainsi outrepasser les variations génétiques que l'on retrouve dans les études chez les sujets humains.

Bien que les études du stress durant la grossesse sur les modèles animaux présentent des avantages intéressants pour la recherche, les molécules impliquées dans la réponse au stress ainsi que les voies de signalisation peuvent différer entre les animaux et les humains. Par exemple, chez les humains, le cortisol est le produit final de l'axe HPA alors que chez les modèles rongeurs, la corticostérone est le produit final (Raubenheimer *et al.*, 2006). La corticostérone est moins abondante chez l'humain et il n'y a pas de lien direct entre les niveaux de cortisol et de corticostérone (Koren *et al.*, 2012). Chez les humains la corticostérone est présente, mais fait partie du système rénine-angiotensine (Raubenheimer *et al.*, 2006).

1.3.1.1. Effet du stress prénatal sur les complications de grossesse

Les études prospectives sur le stress durant la grossesse démontrent un lien entre le stress perçu et un retard de développement chez l'enfant (Voir tableau 1.2). En effet, le stress perçu, l'anxiété ainsi que la détresse associée à des événements de vie ont été associées à la prématurité et de faible poids à la naissance pour l'âge gestationnel (*small for gestational age*, SGA) (Killingsworth *et al.*, 1997). Des résultats similaires ont été obtenus en contrôlant pour des facteurs de risques tels que l'éducation, les complications obstétriques, le nombre de grossesses précédentes, le tabac et l'alcool durant la grossesse (Copper *et al.*, 1996). De plus, le risque de donner naissance à un bébé de très faible poids est augmenté dans le cas de stress chronique maternel (Sable & Wilkinson, 2000). Un stress ponctuel au début de la grossesse comme l'exposition à un

tremblement de terre en Californie a aussi été associé à une gestation plus courte (Glynn *et al.*, 2001). Le stress engendré par une autre catastrophe naturelle (tempête de verglas de 1998 dans le sud-ouest du Québec) en début et à la mi-grossesse a aussi été associé à une durée plus courte de grossesse et un plus faible poids à la naissance par rapport aux bébés des mères exposées au 3^e trimestre (Dancause *et al.*, 2011). Une association avec un stress en début de grossesse (plutôt qu'à la fin) et un accouchement pré-terme a été observée chez les femmes enceintes présentant un niveau élevé de CRH sanguin à 33 semaines (Wadhwa *et al.*, 2004). De plus, une augmentation des concentrations de cortisol salivaire maternelle durant la grossesse a été liée à un faible poids et une faible taille à la naissance (Bolten *et al.*, 2011). Il est à noter que le stress durant la grossesse a été associé davantage à des conséquences pour le fœtus comme la plus courte durée de la grossesse ou le faible poids à la naissance plutôt qu'à des complications de grossesse directement (nécessité de césariennes, prééclampsie) bien que ces dernières aient aussi été observées en cas de stress durant la grossesse (Da Costa *et al.*, 1998; Magni *et al.*, 1986; Mulder *et al.*, 2002). Dans ce sens, une étude a montré une association entre le stress prénatal (événements de vie) et les fausses couches non associées à des anomalies chromosomiques (Neugebauer *et al.*, 1996). De plus, le stress relié au travail durant la grossesse a été associé à une augmentation du risque d'avortement spontané (Fenster *et al.*, 1995). C'est donc pour dire que le PNMS peut aussi engendrer un plus grand risque d'avortement spontané.

Tableau 1.2: Études démontrant un lien entre le stress durant la grossesse et l'effet sur la grossesse et l'enfant à la naissance

Reference	Mesure du stress	Nombre de participants (n)	Variable dépendante	Résultats
(Newton <i>et al.</i> , 1979)	Événements de vie	132	Naissance prématurée	Plus d'événements de vie pour les très prématurés que pour les prématurés et que les grossesses à terme
(Standley <i>et al.</i> , 1979)	Anxiété prénatale	73	Poids à la naissance, maturité motrice et alerte	Corrélation positive entre l'anxiété de grossesse et la maturité motrice chez l'enfant à 3 jours
(Berkowitz & Kasl, 1983)	Événements de vie	166 en bas de 37 semaines, 299 à 37 semaines et plus	Naissance prématurée	Plus d'événements de vie dans le groupe de gestation en bas de 37 semaines durant les deux premiers trimestres
(Norbeck & Tilden, 1983)	Événements de vie, anxiété, dépression, estime de soi	117	Complications de grossesse, complications de l'état de l'enfant	Haut stress et bas support social étaient plus à risque de troubles de grossesse et chez les enfants; bas stress et bas support était associé à des troubles à l'accouchement
(Newton & Hunt, 1984)	Événements de vie, anxiété	224	Poids à la naissance, naissance prématurée	Faible poids à la naissance, naissance prématurée étaient associés à plus d'événements de vie négatifs durant le 3 ^e trimestre, mais pas à l'anxiété
(Omer, 1986)	Événements de vie, détresse, support social et attitude envers la grossesse	113	Age gestationnel	Plus de dépression et d'anxiété pour les naissances prématurées, pas d'association pour les événements de vie et les naissances prématurées
(Aurelius <i>et al.</i> , 1987)	Événements de vie	109 femmes avec difficultés psychosociales, 255 sans difficultés psychosociales	Complications de grossesse, d'accouchement et chez l'enfant	Pas d'associations significatives
(Reeb <i>et al.</i> , 1987)	Événements stressants, dépression, travail durant la grossesse, support social	140	Faible poids à la naissance	Les événements stressants étaient liés à un faible poids à la naissance
(Stein <i>et al.</i> , 1987)	Événements de vie	483	Poids et âge gestationnel	Pas d'associations significatives avec les événements de vie
(Brooke <i>et al.</i> , 1989)	Santé générale, statut socioéconomique, stress psychosocial (anxiété,	1536	Poids à la naissance	Facteurs de stress étaient associés au faible poids à la naissance seulement si la cigarette durant la

	dépression, événements de vie, support social			grossesse n'était pas prise en compte
(Williamson Jr <i>et al.</i> , 1989)	Changement de vie, support social	513	Complications périnatales	Les changements de vie stressants étaient associés aux complications de grossesse (mort néonatale, faible poids à la naissance) au 2 ^e et 3 ^e trimestre
(Pagel <i>et al.</i> , 1990)	Événements de vie, anxiété, support social	100	Age gestationnel, poids à la naissance	Les événements de vie avant la grossesse étaient associés à un faible poids à la naissance, anxiété durant la grossesse à un faible âge gestationnel
(Mutale <i>et al.</i> , 1991)	Événements de vie, difficultés	92 faible poids, 92 contrôle	Poids et âge gestationnel	Naissance prématurée associé à plus d'événements de vie
(Rothberg & Lits, 1991)	Événements de vie 6 à 12 mois avant la grossesse, support psychosocial	43 avec support social, 43 sans support social	Poids à la naissance	Lien entre l'absence de support psychosocial et le faible poids à la naissance
(Collins <i>et al.</i> , 1993)	Événements de vie, support social, dépression	129	Poids à la naissance, complications de grossesse	Moins de complications, poids plus haut à la naissance et moins de dépression pour plus de support social
(Hedegaard <i>et al.</i> , 1993)	Santé générale, détresse psychologique	5872	Accouchement prématuré	Fort lien entre la détresse à 30 semaines et les accouchements prématurés
(Wadhwa <i>et al.</i> , 1993)	Anxiété, événements de vie, stress perçu,	90	Poids à la naissance, naissance prématurée	Anxiété et stress relié à un faible poids et à naissance prématurée
(Copper <i>et al.</i> , 1996)	Statut psychosocial	2593	Poids à la naissance, naissance prématurée	Le stress était associé avec un faible poids à la naissance et aux naissances prématurées
(Hedegaard <i>et al.</i> , 1996)	Événements de vie, stress perçu et santé générale	5834	Durée de la gestation, accouchements prématurés	Le nombre d'événements de vie n'avait pas d'effet, mais les événements de vie classifiés comme hautement stressants étaient associés avec un risque d'accouchement pré-terme
(Neugebauer <i>et al.</i> , 1996)	Événements de vie, positifs ou négatifs	181 fausses couches sans anomalies chromosomiques, 81 avec anomalies chromosomiques	Fausse couche avec ou sans anomalies chromosomiques	70% de femmes avec fausses couches sans anomalies chromosomiques ont rapporté des événements de vie négatifs contre 52% pour le groupe avec anomalies chromosomiques

(Rini <i>et al.</i> , 1999)	Anxiété, événements de vie, support social	230	Poids à la naissance, naissance prématurée	Gestation plus courte pour les femmes plus stressées, poids à la naissance plus élevé en lien avec davantage de support social
(Barbosa, 2000)	Événements de vie, support social	472	Âge gestationnel	Pas de lien entre la fréquence des événements de vie et l'âge gestationnel, risque de naissance prématuré s'il y a mort d'un proche durant la grossesse
(Sable & Wilkinson, 2000)	Stress perçu, événements de vie,	2378	Poids à la naissance	Si la femme se sent « presque toujours » stressée, le risque d'avoir un enfant de faible poids à la naissance est de 1,5 fois plus grand
(Da Costa <i>et al.</i> , 2000)	Stress, anxiété, dépression	80	Complications d'accouchement et poids à la naissance	Stress était lié à plus de complication d'accouchement, faible poids à la naissance associé à un mauvais support social au deuxième trimestre
(Erickson <i>et al.</i> , 2001)	Cortisol sanguin	59 naissances pré-terme, 166 naissances à terme	Âge gestationnel	Pas de différence en dessous de 24 semaines, 27-37 semaines : concentrations de cortisol plus élevé chez les mères ayant accouché avant terme
(Glynn <i>et al.</i> , 2001)	Événements de vie, moment d'un tremblement de terre durant la grossesse	40 femmes exposées à un tremblement de terre	Âge gestationnel, niveau de CRH	Le stress du tremblement de terre durant le début de la grossesse prédit une plus courte gestation, les risques obstétricaux et la CRH prédisent 24% de la variance de la durée de la gestation
(Ruiz <i>et al.</i> , 2001)	Cortisol sanguin	76	Accouchement pré-terme, âge gestationnel	Aucun lien entre le cortisol et l'âge gestationnel ou le risque d'accouchement pré-terme
(Rondó <i>et al.</i> , 2003)	Stress perçu, détresse psychosociale	865	Poids à la naissance, prématurité, retard de croissance intra-utérin	Détresse était associée à un faible poids à la naissance et aux naissances prématurées
(Wadhwa <i>et al.</i> , 2004)	CRH sanguin	232	Poids à la naissance, naissance prématurée, âge gestationnel	CRH à 33 semaines était associé à un plus haut risque d'accouchement prématuré et de retard de croissance
(Berle <i>et al.</i> , 2005)	Anxiété, dépression	680	Durée de gestation, poids à la naissance	Pas d'association entre la dépression ou l'anxiété et le poids à la naissance ou la durée de la gestation
(Dayan <i>et al.</i> , 2006)	Anxiété, dépression	681	Naissance prématurée	Dépression, mais pas l'anxiété était associée à

				un risque élevé d'accouchement prématuré
(Mercer <i>et al.</i> , 2006)	Cortisol sanguin	230	Âge gestationnel, accouchement pré-terme	Cortisol significativement relié au risque d'accouchement pré-terme
(Khashan <i>et al.</i> , 2008b)	Événements de vie sévères	1 382 952	Poids à la naissance	Événements de vie dans les 6 mois avant la grossesse étaient associés à un faible poids à la naissance
(Diego <i>et al.</i> , 2009)	Cortisol urinaire	40 dépressives, 40 non dépressives	Age gestationnel	Relation négative entre le cortisol maternel et l'âge gestationnel, après contrôle pour dépression
(Khashan <i>et al.</i> , 2009)	Événements de vie sévères	1.35 millions	Naissance prématurée	Événements de vie dans les 6 mois avant la grossesse étaient associés à un risque de naissance prématurée
(Goedhart <i>et al.</i> , 2010)	Cortisol sanguin	2810	Poids à la naissance, poids pour l'âge gestationnel	Relation négative entre le cortisol maternel et le poids à la naissance, plus de cortisol maternel associé au risque de faible poids pour l'âge gestationnel
(Nkansah-Amankra <i>et al.</i> , 2010)	Risque de complications de grossesse de la Caroline du Sud	8064	Naissance prématurée, âge gestationnel	Stress maternel était associé à un faible poids à la naissance et à un risque d'accouchement prématuré
(Zhu <i>et al.</i> , 2010)	Événements de vie stressant, séparé en trimestre	1800	Age gestationnel, poids à la naissance	Plus haut risque de naissance prématurée avec des événements stressants durant les deux premiers trimestres, plus haut risque de faibles poids à la naissance si le stress survient au premier trimestre
(Bolten <i>et al.</i> , 2011)	Cortisol salivaire, stress perçu, détresse prénatale	81	Poids à la naissance, âge gestationnel	Cortisol pas associé aux résultats de questionnaire de stress perçu ou de détresse, niveaux de cortisol élevé en début de grossesse était associés au faible poids et le cortisol en fin de grossesse était associé à la faible taille à la naissance
(Class <i>et al.</i> , 2011)	Mort du père ou d'un proche	2 618 777	Naissance prématurée, âge gestationnel, poids à la naissance	Stress durant les mois 5 et 6 était associé à un plus grand risque de naissance prématurée et un faible poids à la naissance
(Roy-Matton <i>et al.</i> , 2011)	Stress perçu, détresse psychologique, support social	303	Accouchement pré-terme, complications prénatales	Complications étaient liées au stress perçu entre 10 et 20 semaines de grossesse et de ces

				femmes, ceux ayant donné naissance prématurément avaient plus de stress entre 10 et 20 semaines, les femmes avec plus de complications avaient moins de support social à 25-30 semaines
(D'Anna-Hernandez <i>et al.</i> , 2012)	Cortisol salivaire	55	Poids à la naissance, âge gestationnel	Poids à la naissance lié à moins de cortisol salivaire en fin de grossesse, non significatif pour l'âge gestationnel
(Torche & Kleinhaus, 2012)	Exposition à un tremblement de terre	3874 exposées 7115 non-exposées	Naissance prématurée, âge gestationnel	Stress engendré par le tremblement de terre a été associé à une baisse de l'âge gestationnel et une augmentation de l'incidence de naissances prématurées L'effet était plus prononcé chez les filles que chez les garçons
(Baibazarova <i>et al.</i> , 2013)	Cortisol sanguin, cortisol amniotique, stress perçu, anxiété	303	Age gestationnel et poids à la naissance	Cortisol amniotique relié au poids à la naissance et à l'âge gestationnel, détresse corrélée au poids à la naissance, pas de corrélation avec le stress perçu ou anxiété et le poids à la naissance ou l'âge gestationnel, stress perçu et anxiété non corrélés aux mesures de cortisol

1.3.1.2. Effet du stress maternel prénatal sur le développement cognitif, comportemental et psychologique de l'enfant

De plus en plus d'études ont démontré des liens directs entre le stress prénatal et les altérations de comportement chez l'enfant (voir tableau 1.3). Une étude a démontré que les enfants dont les mères avaient subi des changements de vie négatifs étaient plus difficiles à vivre avec plus de pleurnichage à 3 et à 6 mois (Wurmser *et al.*, 2006). De plus, les bébés dont les mères avaient un niveau de cortisol plus élevé durant la grossesse étaient plus sujets au pleurnichage ainsi qu'à des expressions faciales négatives à 5 mois et présentaient des scores d'émotions plus élevés (*Infant Behavior Questionnaire*) et une plus grande activité à un très jeune âge (*Infant Characteristics Questionnaire*) (Davis *et al.*, 2007; De Weerth *et al.*, 2003). Une autre étude a démontré un lien entre les symptômes de dépression au 3^e trimestre et des problèmes de

sommeil ou d'alimentation à un très jeune âge chez le bébé (2 semaines) (Räikkönen *et al.*, 2015). Les résultats démontrent que la programmation fœtale peut se présenter à un très jeune âge, indépendamment du poids du fœtus et de la durée de la gestation. Le stress prénatal subjectif dû à une catastrophe naturelle (l'inondation de Brisbane de 2011 en Australie) prédit une moins bonne théorie de l'esprit à 30 mois (mesuré par scénarios de désirs diverses) (Simcock *et al.*, 2017). Le stress prénatal peut aussi avoir des conséquences sur le développement moteur des enfants. En effet, le stress engendré par une inondation est associé à un mauvais développement moteur chez les enfants de 6 et 16 mois, particulièrement si le stress survenait en fin de grossesse (Simcock *et al.*, 2016). De plus, l'anxiété a été associée à des altérations motrices chez les enfants de 3 mois (Van Batenburg-Eddes *et al.*, 2009). Un haut niveau de cortisol en fin de la grossesse a été associé à un mauvais développement cognitif et moteur à 3 mois et 8 mois (Huizink *et al.*, 2003). Une autre étude a démontré l'effet du stress durant la fin de la gestation sur le comportement de peur ainsi que sur le développement cognitif chez les enfants de 14 à 19 mois (Bergman *et al.*, 2007).

De point de vue biologique, le niveau de cortisol en fin de la gestation prédit le tempérament peureux ainsi que l'anxiété chez les enfants de 2 mois (Davis *et al.*, 2007). Les enfants dont les mères avaient un haut niveau de cortisol ou étaient anxieuses durant la grossesse ont de plus hauts risques d'avoir un comportement anxieux entre 6 et 9 ans (Davis & Sandman, 2012). Une étude intéressante réalisée par l'équipe de De Bruijn et collaborateurs démontre que le stress prénatal affecte les garçons et les filles différemment (de Bruijn *et al.*, 2009b). En effet, le stress (anxiété, dépression) au premier trimestre est associé à des problèmes internalisés chez les garçons entre 14 mois et 4,5 ans (de Bruijn *et al.*, 2009b). Par contre, pour les filles, l'anxiété et la dépression durant le 3^e trimestre étaient associés à des problèmes internalisés et externalisés (de Bruijn *et al.*, 2009b). La même équipe a identifié que davantage d'anxiété et de symptômes de dépression chez la mère étaient associés à un plus haut niveau de cortisol chez les filles entre 14 mois et 4,5 ans alors que cette association n'est pas observée chez les garçons (de Bruijn *et al.*, 2009a). Ces résultats suggèrent une adaptation distincte entre les garçons et les filles pour le stress durant la grossesse et différentes périodes de vulnérabilités durant la grossesse dépendant du sexe du fœtus. De plus, d'autres études ont montré un lien entre l'anxiété en fin de grossesse et certains problèmes apparaissant chez les enfants à différents âges : problèmes comportementaux à 4 et 7 ans (O'Connor *et al.*, 2002; O'Connor *et al.*, 2003); symptômes de déficit d'attention, d'anxiété et problèmes externalisés à 8 et 9 ans (Van Den Bergh & Marcoen,

2004); et programmation de l'axe HPA (plus haut taux de cortisol) à 10 ans (O'Connor *et al.*, 2005).

La programmation de comportement (déficit d'attention, anxiété) peut être considérée comme un avantage évolutif d'adaptation. En effet, dans une optique évolutive, un comportement plus anxieux permettrait aux individus de survivre ou d'avoir un comportement plus craintif en rapport avec ce que la mère a vécu comme environnement de grossesse, ou encore en ayant un comportement de déficit d'attention permettrait d'avoir une vigilance accrue pour la présence de prédateurs (Bergman *et al.*, 2007; Glover, 2011). Il a été suggéré que le stress durant la gestation peut être associé à la dépression à l'adolescence (Van Den Bergh *et al.*, 2008b), à un déficit d'attention de 6 à 12 ans (Grizenko *et al.*, 2012) et l'autisme de 4 à 12 ans (Beverdort *et al.*, 2005). Les troubles du spectre autistique chez les enfants ont également été associés avec la sévérité de l'exposition à un ouragan chez les femmes enceintes surtout en milieu et en fin de grossesse (Kinney *et al.*, 2008). Pour le risque de schizophrénie, une étude a démontré un lien entre le stress engendré par la mort d'un proche durant le 2^e et le 3^e trimestre de la grossesse (Huttunen & Niskanen, 1978) alors qu'une étude plus récente n'a trouvé cette association qu'au 1^{er} trimestre et non aux 2^e et 3^e trimestres (Khashan *et al.*, 2008a). Une étude rétrospective sur l'effet aux Pays-Bas de l'invasion allemande en 1940, durant la grossesse des femmes, a démontré que le risque de schizophrénie chez l'enfant était plus élevé si les femmes avaient été exposées à l'invasion au premier et deuxième trimestre (Van Os & Selten, 1998). De plus, il semblerait que les garçons soient plus susceptibles de développer des troubles affectifs que les filles suite à un stress maternel prénatal. En effet, des troubles affectifs ont été répertoriés chez les garçons de 10 à 30 ans, nés de mères exposées à des événements de vie négatifs (mort d'un proche ou maladie grave d'un proche) au deuxième et troisième trimestre, mais pas au premier trimestre de grossesse (Khashan *et al.*, 2011). L'anxiété maternelle est aussi connue pour atténuer la réponse du cortisol durant la journée (pointe de sécrétion de concentration moins élevée), cette atténuation a été associée aux symptômes de dépression chez les adolescentes de 14-15 ans et non chez les adolescents (Van den Bergh *et al.*, 2008a; Van Den Bergh *et al.*, 2008b). Cela suggère un dimorphisme sexuel dans la programmation fœtale : les filles seraient plus vulnérables à un stress subit en début de grossesse (réduction de croissance, gestation plus courte) alors que les garçons seraient plus susceptibles à des conséquences à plus long terme comme la schizophrénie (Markham & Koenig, 2011; Torche & Kleinhaus, 2012; Weinberger, 1995). D'autres études observent le contraire: plus de troubles dépressifs chez les filles (Gerardin *et al.*, 2011; Van Den Bergh *et al.*, 2008b). Il est donc important de prendre en compte le sexe du

foetus, la semaine de grossesse au moment de l'événement stresser ainsi que le fait que certains effets de programmation fœtale peuvent apparaître seulement à un âge plus avancé comme à la puberté ou à l'âge adulte. Sur le plan théorique, l'effet de programmation fœtale survient en raison du développement rapide et de la plasticité des systèmes physiologiques du fœtus (Welberg & Seckl, 2001), qui permet à divers agents environnementaux de modifier la sensibilité des systèmes en développement. La programmation serait donc plus susceptible de se produire pour un organe donné lors de son développement (Lupien et al., 2009). Enfin, il est important de noter que pour ce type d'études, souvent rétrospectives, il est difficile d'isoler un seul facteur contribuant à l'effet de programmation fœtale. La programmation fœtale est probablement le résultat d'une panoplie de facteurs influençant la santé de la mère durant la grossesse comme des facteurs génétiques, psychologiques, psychosociaux et environnementaux.

Tableau 1.3: Études démontrant un lien entre le stress durant la grossesse et les effets sur les troubles chez les enfants

Reference	Mesure du stress	Nombre de participants (n)	Variable dépendante	Age des enfants	Résultats
(Buitelaar <i>et al.</i> , 2003)	Cortisol salivaire	170	Développement cognitif et moteur, tempérament, comportement	3 et 8 mois	Haut cortisol en fin de grossesse lié à un moins bon développement cérébral à 3 mois et un moins bon développement moteur à 3 et 8 mois; aucun lien observé entre le cortisol et le tempérament ou le comportement
(De Weerth <i>et al.</i> , 2003)	Cortisol salivaire	17	Comportement, tempérament	1-20 semaines	Plus haut niveau de cortisol relié à des bébés plus irritables, négatifs et ce de façon plus importante de 1 à 7 semaines
(Huizink <i>et al.</i> , 2003)	Cortisol salivaire, anxiété	170	Développement cognitif et moteur	3 et 8 mois	Haut cortisol en fin de grossesse est lié à un moins bon développement moteur à 3 et 8 mois, moins bon développement cognitif à 3 mois, pas d'effet de cortisol en début et mi grossesse; plus d'anxiété de grossesse lié à un moins bon développement moteur et cérébral à 8 mois
(Gutteling <i>et al.</i> , 2004)	Cortisol salivaire	24	Réponse de cortisol face à un stresser	4 ans et 9 mois	Plus haut cortisol durant la grossesse est associé à un plus haut niveau de cortisol chez les enfants face à un événement stresser
(Gutteling <i>et al.</i> , 2005a)	Cortisol salivaire	29	Réponse de cortisol face à un stresser	5.3 ans	Haut niveau de cortisol durant la grossesse associé à un plus haut niveau de cortisol suite à un stresser chez les enfants

(Gutteling <i>et al.</i> , 2005b)	Cortisol salivaire	103	Tempérament, attention, problèmes comportementaux	27 mois	Aucun lien entre les concentrations de cortisol et le tempérament, l'attention ou le comportement des enfants
(Gutteling <i>et al.</i> , 2006)	Cortisol salivaire	112	Apprentissage et mémoire	6 ans et demi	Aucune association significative entre le cortisol maternel et l'apprentissage et la mémoire chez les enfants
(Wurmser <i>et al.</i> , 2006)	Changements de vie	86	Pleurnichage chez les enfants	6 semaines, 3 et 8 mois	Le stress de vie a été lié à davantage de pleurnichage chez les enfants
(Bergman <i>et al.</i> , 2007)	Événements de vie	106-123	Développement cérébral, peur	14-19 mois	Le stress prénatal prédisait un moins bon développement cérébral et la peur chez les enfants
(Davis <i>et al.</i> , 2007)	Cortisol salivaire	247	Réactions négatives	8 semaines	Cortisol en fin de grossesse relié aux réactions négatives, mais pas en mi ou début de grossesse
(Gutteling <i>et al.</i> , 2007)	Cortisol salivaire	110	Enfants gauchers ou droitiers	6 ans et demi	Aucune association significative entre le cortisol maternel et la préférence de main dominante chez les enfants
(Lewinn <i>et al.</i> , 2009)	Cortisol sanguin	832	QI : total, verbal, de performance	7 ans	Les enfants plus exposés au cortisol avaient un moins bon score sur l'échelle totale de QI, petite association négative entre cortisol et le test verbal, aucune association entre le cortisol et le QI de performance
(Van Batenburg-Eddes <i>et al.</i> , 2009)	Anxiété	2724	Développement neuromoteur	3 mois	L'anxiété durant la grossesse était liée à un moins bon développement neuromoteur
(Beijers <i>et al.</i> , 2010)	Cortisol salivaire	169	Maladies respiratoires, digestives et de peau	1 an	Plus petite baisse de cortisol durant la journée relié à plus de maladies respiratoires, maladies générales et maladies de peau reliées à plus de cortisol en fin de soirée,
(Davis & Sandman, 2010)	Cortisol salivaire	125	Développement cognitif et moteur	3, 6 mois, 1 an	Bas cortisol à 15 et haut cortisol à 37 semaines relié à un développement cognitif accéléré à pour 3, 6 mois et un an
(Rondó <i>et al.</i> , 2010)	Cortisol salivaire	130	Résistance vasculaire systémique,	5 à 7 ans	Corrélation positive entre le cortisol salivaire et la résistance vasculaire systémique
(Davis <i>et al.</i> , 2011)	Cortisol sanguin	116	Réponse à un stressueur; cortisol salivaire	1 journée	L'état de l'enfant durant le stress pas associé au cortisol maternel; cortisol maternel élevé au début de grossesse était associé à plus d'éveil durant la phase de retour à la normale; cortisol à 21 et 35 semaines lié à une plus grosse réponse de cortisol chez les enfants
(Rondó <i>et al.</i> , 2011)	Cortisol salivaire	130	Index d'élasticité des artères	5 à 7 ans	Corrélation négative entre l'élasticité des artères et le cortisol maternel
(Rothenberger <i>et al.</i> , 2011)	Cortisol salivaire	104	Tempérament	5 mois	Aucun lien entre le cortisol et le tempérament des enfants
(Tollenaar <i>et al.</i> , 2011)	Cortisol salivaire	173	Réponse de cortisol face à un stressueur	37.4 semaines	Pas d'associations entre le cortisol maternel et la réaction

					de cortisol chez l'enfant face à un stresseur
(Buss <i>et al.</i> , 2012)	Cortisol salivaire	65	Problèmes affectifs, volume de l'amygdale et de l'hippocampe	7 ans et demi	Cortisol maternel à la 15 ^e semaine lié à un plus gros volume de l'amygdale droite, mais pas de la gauche ni de l'hippocampe chez les filles; chez les garçons pas d'association entre le cortisol à la 15 ^e semaine et le volume de l'amygdale, mais tendance marginalement significative entre le cortisol et le volume de l'hippocampe; cortisol en mi et fin de grossesse pas lié au volume du cerveau chez les enfants; cortisol au début de grossesse lié à des problèmes affectifs chez les filles, mais pas chez les garçons; aucun lien entre le cortisol au 2 ^e et 3 ^e trimestre et les problèmes affectifs
(Davis & Sandman, 2012)	Cortisol salivaire	178	Problèmes d'anxiété	7.3 ans	Cortisol durant la grossesse associé à plus d'anxiété chez les enfants; pas d'effet du timing observé
(Räikkönen <i>et al.</i> , 2015)	Dépression	54	Problèmes de sommeil et d'alimentation	2 semaines	Plus haut niveau de dépression associé à des problèmes de sommeil et d'alimentation; cela serait en partie médié par des altérations au niveau du placenta des gènes impliqués dans la réponse aux glucocorticoïdes et au système de la sérotonine
(Simcock <i>et al.</i> , 2016)	Exposition au stress d'une catastrophe naturelle (inondation)	120-148	Développement moteur	2, 6, 16 mois	Association positive entre le stress maternel et le développement moteur à 2 mois; association négative à 6 et 16 mois si le stress était en fin de grossesse et si les femmes avaient eu une expérience négative de l'événement; pas de différence selon le sexe de l'enfant
(Simcock <i>et al.</i> , 2017)	Exposition au stress d'une catastrophe naturelle (inondation)	130	Théorie de l'esprit	30 mois	Le stress subjectif prédit une moins bonne théorie de l'esprit à 30 mois chez les enfants; l'appréciation cognitive modère l'effet chez les filles, mais pas chez les garçons

1.3.2. Mécanismes impliqués dans la programmation fœtale

Le mécanisme exact de l'effet du stress maternel prénatal sur le développement et la programmation fœtale fait encore l'objet de débat au sein de la communauté scientifique. L'exposition accrue aux hormones du stress pendant la grossesse demeure l'hypothèse dominante pour expliquer le mécanisme par lequel le stress maternel prénatal pourrait affecter le

développement du fœtus (Glover et al., 2010 ; Lupien et al., 2009; Matthews, 2002). Par contre, de plus en plus d'études suggèrent que d'autres mécanismes sont impliqués.

Le cortisol maternel explique 40 % de la variance dans le cortisol fœtal (Gitau *et al.*, 1998). Le cortisol est nécessaire au développement du fœtus, entre autres, en favorisant la production du surfactant pulmonaire fœtal en fin de grossesse, mais aussi plus précocement pour le développement cérébral et il peut affecter le développement de plusieurs régions du cerveau du fœtus si le niveau est anormal (e.g. hippocampe, amygdale, corps calleux; revu dans (Charil *et al.*, 2010)) (Garbrecht *et al.*, 2006a; Seckl & Holmes, 2007). Bien que le cortisol soit en moins grande concentration au niveau du fœtus qu'au niveau de la circulation sanguine maternelle, ceux-ci sont fortement corrélés (Gitau *et al.*, 1998). La différence de concentration de cortisol sanguin est attribuable à l'activité de la 11 β -HSD2 placentaire, qui a pour rôle de protéger le fœtus ayant une concentration anormalement élevée en cortisol et de permettre un développement optimal du fœtus (Challis & Connor, 2009; Chapman *et al.*, 2013; Michael *et al.*, 2003; Seckl, 2004a; Seckl & Chapman, 1997). Par contre, il a été démontré qu'en cas de stress prénatal maternel, l'expression et l'activité de la 11 β -HSD2 sont diminuées (Mina *et al.*, 2015; O'Donnell *et al.*, 2009; O'Donnell *et al.*, 2011b; Welberg *et al.*, 2005). Cette réduction, surtout si elle arrive en début de grossesse, laisserait le fœtus vulnérable à une augmentation du niveau de cortisol de manière directe, et indirecte via l'augmentation de cortisol au niveau placentaire (Cottrell & Seckl, 2009). Chez le rat, des études démontrent que les niveaux élevés de glucocorticoïdes *in utero* compromettent le bon développement du système nerveux, notamment au niveau de la densité des récepteurs aux glucocorticoïdes (hippocampe et cortex frontal) (Meaney *et al.*, 1996; Seckl, 1998) qui seraient associés, en partie, à la programmation observée au niveau cérébral chez les enfants (troubles émotionnels, cognitifs, moteurs) (Sandman *et al.*, 2012). Il a été postulé que le stress chronique réduit la capacité de la 11 β -HSD2 placentaire à s'adapter à un nouveau stressor, entraînant une augmentation des taux de cortisol traversant le placenta jusqu'au fœtus (Welberg *et al.*, 2005). Au niveau placentaire, un haut taux de cortisol permettrait l'activation du récepteur GR α qui pourrait à son tour influencer l'expression entre autres, des GLUTs (Mairesse *et al.*, 2007b; Saif *et al.*, 2014b). Le glucose est la première source d'énergie du fœtus et est essentiel au bon développement du fœtus. Une diminution du transport du glucose au fœtus par le placenta est associée à une altération de croissance du fœtus (Hahn *et al.*, 1999; Novakovic *et al.*, 2013; Sibley *et al.*, 1997). L'expression de GLUT1 (le transporteur du glucose principal pour le placenta) est régulée par les glucocorticoïdes *in vitro* dans des primocultures trophoblastiques humaines (Hahn *et al.*, 1999). D'autres hormones placentaires sont aussi en lien avec les glucocorticoïdes soit la hPL, la pGH et la β -hCG (Braun *et al.*, 2007;

Lange & Anthonsen, 1980; Ni *et al.*, 2009; Ringler *et al.*, 1989; Shu *et al.*, 2014). Ces hormones, toutes produites par le placenta, ont été peu étudiées ces dernières années et plus spécifiquement au niveau de l'effet du stress sur leur production par le placenta (Figure 1.10).

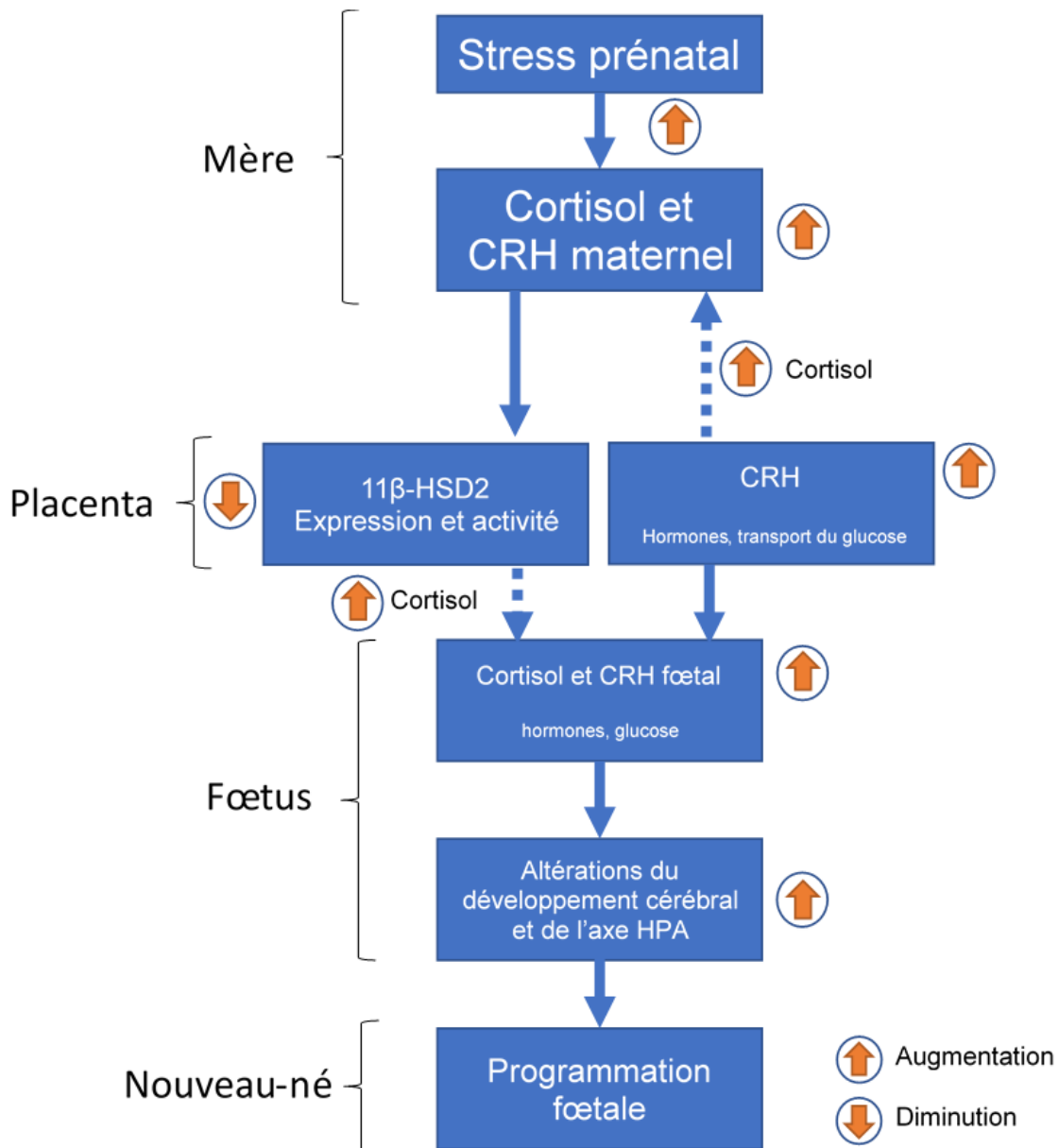


Figure 1.10: Mécanisme proposé de la programmation fœtale. Les flèches pointillées représentent une moins grande concentration de cortisol en situation normale. Par contre, en situation de stress prénatal, le cortisol est augmenté. Modifié de (Charil *et al.*, 2010).

Des études suggèrent également que l'augmentation de CRH placentaire induite par l'augmentation de cortisol maternel suite à un évènement stressueux induit l'accouchement préterme (McLean *et al.*, 1995; St-Pierre *et al.*, 2016b; Wadhwa *et al.*, 2001). Un des rôles de la CRH au niveau de la grossesse est entre autres de contrôler la cascade d'hormones déclenchant l'accouchement. En effet, au cours de la grossesse, le niveau de CRH est particulièrement élevé dans le sang maternel, les concentrations peuvent être 1000 à 10000 fois plus élevés par rapport à celles d'une femme non enceinte (Austin *et al.*, 2005). Ceci est dû en partie au fait que le cortisol, qui inhibe la CRH hypothalamique, stimule l'expression du gène CRH placentaire ce qui simultanément augmente les taux de CRH placentaire, d'ACTH et de cortisol pendant la grossesse (voir section 1.1.1.1). Près du terme de la grossesse, les taux de ces hormones de stress induisent l'accouchement (Wadhwa *et al.*, 2004). Il est donc plausible que l'activation prématurée de l'axe HPA par un stressueur induise une production accrue de CRH par le placenta et que cette augmentation soit liée à un risque accru d'accouchement prématuré et qu'à long terme cela soit lié à des troubles de développement apparaissant à un âge plus avancé.

Les GRs placentaires suscitent de plus en plus un intérêt pour la recherche sur l'effet du stress durant la grossesse et le développement fœtal. Ils s'avèrent être une cible intéressante pour expliquer le mécanisme placentaire de la programmation fœtale. Une étude de Hodyl *et al.* démontre que l'activité au niveau du gène des GRs placentaire est proportionnelle au niveau de cortisol dans le sang de la mère (Hodyl *et al.*, 2010). Lorsqu'on s'attarde aux différences entre les placentas de fœtus mâles et femelles, on observe une différence au niveau de la sensibilité au cortisol (les placentas femelles sont plus sensibles aux changements de concentration de glucocorticoïdes). Par contre, cette différence ne serait pas attribuable à un niveau de GR- α -A différent (Hodyl *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2009). Ceci signifie que la différence de réponse entre les placentas de différents sexes pourrait être attribuable à la distribution différente des autres isoformes de récepteurs, notamment le GR- β (voir section 1.1.1.3) (Clifton *et al.*, 2017). Bien que le GR- β soit important dans la régulation de l'effet du cortisol au niveau du placenta, son expression n'a jamais été étudiée dans les cas de PNMS. C'est pourquoi une piste de mécanismes qui différencie l'adaptation entre les placentas de garçons et de filles face au stress durant la grossesse, et par conséquent l'effet du développement fœtal qui est présent davantage chez les garçons que chez les filles, pourrait être l'expression différent des isoformes de GR placentaire selon le sexe du fœtus (Eriksson *et al.*, 2010) (Figure 1.11).

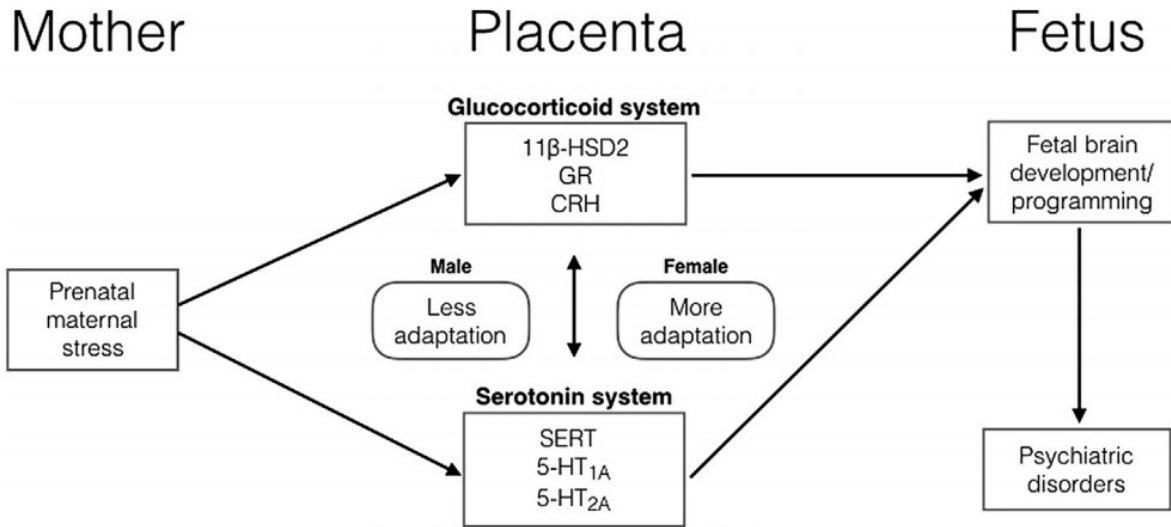


Figure 1.11: Mécanisme proposé de l'effet du stress prénatal maternel sur les systèmes des glucocorticoïdes et de la sérotonine placentaire et la programmation fœtale. (Tiré de (St-Pierre *et al.*, 2016b)).

Il a été démontré que la méthylation de certains gènes impliqués du système sérotoninergique placentaires est altérée en situation de stress durant la grossesse. En effet, Paquette et Marsit ont démontré que la méthylation de *HTR2A* (gène du récepteur 5-HT_{2A}) placentaire est modifiée dans les cas de troubles d'attention et de dextérité de mouvement à 2 ans (Paquette & Marsit, 2014). De plus, des études démontrent que le système sérotoninergique placentaire est différent selon le sexe du fœtus (plus de méthylation dans les placentas de fœtus femelle que mâle) (Bale, 2016; Paquette *et al.*, 2013). Non seulement le système sérotoninergique placentaire est un domaine d'intérêt en tant que tel, mais il est aussi connu que la sérotonine interagit avec le système du cortisol. En effet, le cortisol contrôle la synthèse, le transport, la recapture et l'expression des récepteurs neuronaux de la sérotonine (Mina & Reynolds, 2014; Wyrwoll & Holmes, 2012). De plus, la dépression durant la grossesse augmente l'expression du SERT alors que la dépression est associée à une réduction de l'enzyme de dégradation de la sérotonine, MAO-A (Blakeley *et al.*, 2013; Ponder *et al.*, 2011). Bien que ces études démontrent un lien entre l'état de la mère durant la grossesse et l'expression de gènes impliqués dans le système sérotoninergique placentaire, aucune étude n'a démontré une association entre la programmation à long terme et le comportement de l'enfant (figure 1.11).

1.4. Problématique, hypothèse et objectifs

Les études sur le stress prénatal maternel ont majoritairement été réalisées avec des cohortes de femmes enceintes présentant des troubles d'anxiété, de dépression ou encore mesurant les événements de vie stressants. Le stress durant la grossesse demeure difficile à étudier, particulièrement chez l'humain pour des raisons éthiques ; il est impossible de faire subir intentionnellement un événement stressant aux femmes enceintes pour étudier les effets sur la grossesse, le placenta et le fœtus. Pour contourner cette limitation, il est possible de prendre avantage de catastrophes naturelles comme événement stressant. Notre équipe (Suzanne King, Institut Universitaire en santé mentale Douglas) a donc utilisé la crise du verglas de 1998 au Québec, pour étudier l'impact du stress maternel prénatal (PNMS) sur le fœtus. Cette étude originale a démontré que les stress maternels objectif et subjectif *in utero* sont corrélés négativement au développement des habilités cognitives, linguistiques et de jeu chez les enfants. Ces observations ont été rapportées à l'âge de 2 ans, 5 ans et demi et 8 ans et demi et étaient différentes selon le sexe de l'enfant et/ou le trimestre de grossesse à laquelle le fœtus a été exposé au PNMS (Cao *et al.*, 2014; Laplante *et al.*, 2004; Laplante *et al.*, 2008). En 2008, King et collaborateurs ont utilisé l'inondation en Iowa comme événement stressant pour inclure des données manquantes dans le projet Verglas, dont entre autres les données psychosociales avant la catastrophe naturelle (Yong Ping *et al.*, 2015b). Cependant, pour les études sur l'effet du verglas et de l'inondation en Iowa, le matériel biologique à la naissance n'a pas pu être recueilli. Malheureusement, par nature, les catastrophes naturelles sont imprévisibles et il est donc difficile d'étudier leurs conséquences de façon prospective. Notre équipe a su tirer avantage de l'inondation de la rivière Brisbane (Queensland, Australie) de 2011 (étude QF2011). Cette catastrophe naturelle a coûté la vie à 44 personnes en plus d'affecter celle de plus de 200 000 personnes et a coûté plus de 2 milliards de dollars de dommage. S'associant à l'étude M@NGO (*Midwives @ New Group practice Options* (Tracy *et al.*, 2011)) déjà en cours en 2011, il a été possible d'établir une cohorte de femmes enceintes rapidement, d'obtenir les résultats de questionnaires de détresse subjective et de stress objectif après l'inondation ainsi que du matériel biologique à l'accouchement (placenta, cordon et sang de cordon ombilical). L'étude QF2011 est unique et est la première à permettre l'étude des effets d'un stress maternel dû à une catastrophe naturelle (stress objectifs et subjectifs) durant la grossesse sur le placenta, le développement et la programmation fœtale (King *et al.*, 2015b). Le but du présent projet doctoral est de déterminer dans la cohorte QF2011 si, et par quels mécanismes biologiques, le stress objectif ou subjectif,

causé par l'inondation de Brisbane, subit par la mère au cours de la grossesse affecte certaines fonctions placentaires et le développement de l'enfant.

Hypothèses de recherche :

- (1) Le PNMS objectif ou subjectif dû à une catastrophe naturelle durant la grossesse est négativement corrélé à l'expression et à l'activité de la 11 β -HSD2 entraînant une augmentation du taux de cortisol placentaire menant à : (i) une diminution de l'expression des hormones placentaires régulées par le cortisol ; (ii) une altération de l'expression des transporteurs du glucose (GLUTs) placentaires ; et (iii) une altération du système sérotoninergique placentaire.
- (2) Les effets du PNMS sont plus marqués dans les placentas de fœtus mâle que femelle et dépendent du moment auquel la mère est exposée au stress durant la grossesse (semaine de grossesse).

Pour vérifier ces hypothèses, **les objectifs spécifiques** sont :

- (1) Mettre au point une méthode de sélection des gènes de référence pour la technique de RT-qPCR permettant de composer avec les différences de sexe du fœtus.

Déterminer l'effet du PNMS objectif et subjectif causé par l'inondation de Brisbane en 2011 sur :

- (2) Les taux d'ARNm codant les gènes impliqués dans le système des glucocorticoïdes placentaires (*HSD11B1*, *HSD11B2*, *NR3C1- α* , *NR3C1- β* , *CRH*) ainsi que l'expression protéique et l'activité de la 11 β -HSD2.
- (3) Les taux d'ARNm du système de transport du glucose (*SLC2A1*, *SLC2A3* et *SLC2A4*) ainsi que sur l'expression protéique de GLUT1.
- (4) Les taux d'ARNm codant les gènes impliqués dans le système sérotoninergique placentaire (*TPH2*, *SLC6A4*, *MAOA*, *HTR2A* et *HTR2B*).
- (5) Les taux d'ARNm des hormones peptidiques placentaires (*CSH1*, *GH2*, *CGB*) et de l'aromatase (*CYP19A1*).
- (6) Enfin, nous analyserons si les effets du PNMS observés au niveau placentaire (objectifs 2 à 5) sont différents selon le moment de la grossesse auquel la mère a été exposée à l'événement stressant.

Les analyses statistiques utilisées seront les corrélations Pearson ainsi que les régressions linéaires multiples hiérarchiques. Un test de modulation (interaction) sera utilisé pour analyser l'effet du moment de stress durant la grossesse.

Rationnel : Le logiciel le plus populaire pour la sélection de gènes de référence, GeNorm, ne permet pas de prendre en considération une variable comme le sexe des échantillons, ce qui peut être un problème pour identifier de faibles variations d'expression de l'ARNm en travaillant avec les tissus ou des cultures primaires (objectif 1) La littérature démontre que la 11 β -HSD2 est une enzyme clé dans la réponse placentaire au stress (ou au cortisol) durant la grossesse (objectif 2). Certaines études ont démontré une altération de l'expression des transporteurs du glucose en cas de PNMS chez les animaux (ou de cortisol *in vitro*). Toutefois, à notre connaissance, aucune étude chez l'humain n'a mis en lien le PNMS et une altération des GLUTs placentaire, alors que ceux-ci pourraient être impliqués dans le retard de croissance à la naissance suite au PNMS (objectif 3). Il a été démontré récemment que le placenta produit la sérotonine nécessaire au développement du cerveau. Néanmoins, peu d'études ont mis en lien la signalisation ou la production de sérotonine placentaire aux altérations de développement cérébral chez les enfants suite à une exposition au PNMS (objectif 4). Pour ce qui est de la fonction endocrine placentaire, bien qu'il ait été démontré que celle-ci puisse être affectée par le cortisol (dans les modèles animaux), aucune étude de cohorte n'a démontré l'effet du PNMS sur la production hormonale placentaire chez l'humain. Le fait que ces hormones agissent sur le métabolisme maternel pour la mobilisation des nutriments nécessaires au développement du fœtus et du placenta démontre qu'elles pourraient être importantes en cas de programmation fœtale (objectif 5). Ainsi, l'étude QF2011 permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la programmation fœtale et permettra l'élaboration éventuelle de biomarqueurs de risques induits par un stress au cours de la grossesse. Étant donné que le PNMS induit des effets différents en fonction du sexe du fœtus et du stade de la grossesse, il est important de tenir de ces variables dans les analyses effectuées.

CHAPITRE 2: A simple method to assess group difference in RT-qPCR reference gene selection using GeNorm: The case of the placental sex

Joey St-Pierre^{1,2}, Jean-Charles Grégoire³, and Cathy Vaillancourt^{1,2*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier et centre de recherche Biomed, Laval, Canada et ²Centre de recherche interdisciplinaire sur le bien-être, la santé, la Société et l'environnement, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada ; ³INRS-Centre Énergie Matériaux Télécommunications, Montréal, QC, Canada

Contribution de l'étudiant :

L'étudiant a participé à l'élaboration de l'étude, réalisé toutes les expériences, les calculs et analysé les résultats. Il a également rédigé l'article, participé au choix du journal de publication.

L'article a été soumis à ***Scientific Reports*** le 26 juin 2017 et accepté pour publication le 5 décembre 2017.

Résumé en français :

La normalisation des résultats bruts de RT-qPCR avec de bons gènes de références est une étape primordiale pour obtenir des résultats fiables pour l'analyse de l'ARNm. GeNorm et NormFinder sont deux logiciels populaires qui permettent de choisir les gènes de références en sélectionnant les gènes qui ont la plus grande stabilité. Par contre, GeNorm ne tient pas compte d'une variable de groupe d'échantillon (comme le sexe du placenta) dans son calcul. Dans cet article, nous démontrons une étape de calcul simple permettant de tenir en compte un paramètre de groupe tel le sexe du placenta. Il s'agit de multiplier la valeur du résultat GeNorm M avec la différence de moyenne de résultats de Cq entre les deux groupes pour chaque gène. Pour vérifier la validité de ce calcul, nous avons testé 28 gènes de références sur 20 échantillons placentaires (10 de chaque sexe). *HPRT1* a été utilisé comme gène cible (valeur de Cq plus petite dans les placentas de fœtus garçons ($p = 0.017$)). Notre calcul a démontré que la combinaison de *RPL30* et *GAPDH* était la meilleure option pour caractériser de petites différences significatives de taux d'ARNm entre les deux sexes en comparaison aux résultats normalisés avec les gènes sélectionnés par les logiciels GeNorm et NormFinder. En effet, le niveau d'expression de *HPRT1* normalisé était significativement différent pour les placentas de fœtus filles en comparaison aux placentas de fœtus garçons ($p = 0.01$) alors que la différence n'était pas significative en utilisant les gènes de référence proposés par GeNorm et NormFinder. Ces résultats démontrent que la nouvelle méthode de calcul proposée est adéquate pour mesurer les petites variations d'expression de l'ARNm dans deux groupes distincts d'échantillons.



Copyright
Clearance
Center

RightsLink®

SPRINGER NATURE

Publication: Scientific Reports
Publisher: Springer Nature
Date: Dec 5, 2017
Copyright © 2017, Springer Nature

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

Are you the [author](#) of this Springer Nature article?

To order reprints of this content, please contact Springer Nature by e-mail at reprintswarehouse@springernature.com, and you will be contacted very shortly with a quote.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

A simple method to assess group difference in RT-qPCR reference gene selection using GeNorm: The case of the placental sex

Received: 26 June 2017
Accepted: 20 November 2017
Published online: 05 December 2017

Joey St-Pierre^{1,2}, Jean-Charles Grégoire³ & Cathy Vaillancourt^{1,2}

Normalization with proper reference genes is a crucial step in obtaining accurate mRNA expression levels in RT-qPCR experiments. GeNorm and NormFinder are two commonly used software packages that help in selecting the best reference genes, based on their expression stability. However, GeNorm does not take into account a group variable, such as sample sex, in its calculation. We demonstrate a simple calculation step to assess the variability of such parameters by multiplying the GeNorm M value with the difference of Cq values between groups. To test this, we used 28 reference gene candidates, to analyze 20 placental samples (10 of each sex), and by using *HPRT1* (lower Cq values in male placentas ($P=0.017$)), as a target gene. Our calculation demonstrates that the *RPL30*–*GAPDH* reference gene combination is the better option to assess small placental sex differences in mRNA level, versus the selection obtained from GeNorm or NormFinder. The *HPRT1* normalized mRNA expression level is different between placental sexes, using *RPL30* and *GAPDH* as reference genes ($P=0.01$), but not when using genes suggested by GeNorm or NormFinder. These results indicate that the proposed calculation is appropriate to assess small variations in mRNA expression between 2 groups.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is an efficient tool to assess mRNA level. However, the production of reliable results requires several steps to be followed, which has not always been the case in some publications using RT-qPCR results^{1,2}. An important step is the selection of stable mRNA reference genes, in order to achieve accurate normalization³.

Poor reference gene selection can lead to inaccurate results⁴. Reference genes are often described as house-keeping genes that are necessary for regular cell function. These genes are expected to have a stable mRNA expression level throughout all cell types and conditions tested⁵. However, this is rarely the case as diseases, treatments or experimental conditions affect the stability of commonly used reference genes⁶. This indicates the need to test for reference gene variability between treatments or sample conditions, for all experiments. Several software options are widely utilized to assess the variability of reference genes, including GeNorm and NormFinder for qPCR experiment^{3,4}. While NormFinder offers a method of reference genes selection that takes into account intra- and inter-group variability, such as sex, GeNorm does not differentiate between groups of samples or treatments^{4,7}.

Sample sex is an important parameter for biological and molecular biology research, with grant funding bodies and publishers requiring sample sex to be evaluated or clear reasons for its exclusion^{8–11}. Placental research is an area where fetal sex differences are of significant importance^{12–14}, including in regard to placental adaptation strategy^{12,15,16}. Unfortunately, placental/fetal sex is not always a universally adopted parameter⁸.

Reference gene selection is especially important when working with tissue samples or primary cell lines. This study demonstrates a new method of calculation for the selection of reference genes when assessing the difference between two groups, exemplified in this case by placental sex.

¹INRS-Centre Institut Armand-Frappier and BioMed Research Center, Laval, Canada. ²Center for Interdisciplinary Research on Well-Being, Health, Society and Environment, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada.

³INRS-Centre Énergie Matériaux Télécommunications, Montréal, QC, Canada. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.V. (email: cathy.vaillancourt@iaf.inrs.ca)

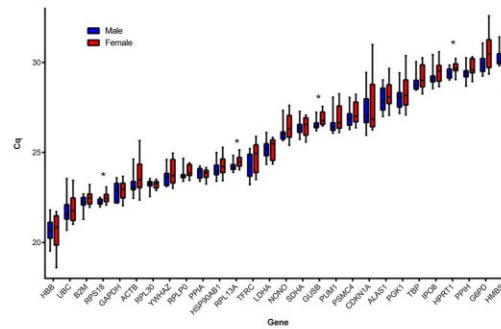


Figure 1. Distribution of the Cq values obtained for 28 candidate reference genes, from the reference genes H96 and H96 plus primePCR plates (Bio-Rad, see Table 1) for 10 placental samples for each fetal sex. Boxes represent the median Cq values with interquartile ranges representing minimum value to maximum value. Student's T tests were performed on Cq values between placental sexes. * $P \leq 0.05$. $n = 20$ placentas (10 males; 10 females).

Gene symbol	Name	RefSeq
ACTB	Beta Actin	NM_001101.3
ALAS1	Aminolevulinatase, delta-, synthase 1	NM_000688.5
B2M	Beta-2-microglobulin	NM_004048.2
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	NM_000389.4
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_000402.4
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_001256799.2
GUSB	Glucuronidase, beta	NM_000181.3
HBB	Hemoglobin, beta	NM_000518.4
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase	NM_001024382.1
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_000194.2
HSP90AB1	Heat shock protein 90 kDa alpha (cytosolic), class B member 1	NM_001271969.1
IPO8	Importin 8	NM_001190995.1
LDHA	Lactate dehydrogenase A	NM_001135239.1
NONO	Non-POU domain containing, octamer-binding	NM_001145408.1
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	NM_000291.3
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	NM_001300981.1
PPIH	Peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H)	NM_006347.3
PSMC4	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4	NM_006503.3
PUM1	Pumilio RNA-binding family member 1	NM_001020658.1
RPL13A	Ribosomal protein L13a	NM_001270491.1
RPL30	Ribosomal protein L30	NM_000989.3
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	NM_001002.3
RPS18	Ribosomal protein S18	NM_022551.2
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	NM_001294332.1
TBP	TATA box binding protein	NM_001172085.1
TFRC	Transferrin receptor (p90, CD71)	NM_001128148.1
UBC	Ubiquitin C	NM_021009.6
YWHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	NM_001135699.1

Table 1. List of candidate reference genes included in the reference gene H96 and H96 plus prime PCR plates with RefSeq number.

Results

Cq results. Figure 1 shows the distribution of Cq values for 28 reference genes in 20 placental tissues (10 for each sex) from PrimePCR Reference Gene H96 and Reference Gene H96 plus plates. Four reference genes showed significantly lower Cq, indicating higher mRNA levels, in male compared to female placentas (*RPS18*, $p = 0.018$; *RPL13A*, $p = 0.017$; *GUSB*, $p = 0.015$; *HPRT1*, $p = 0.017$). Results were similar using the absolute quantity of mRNA ($2^{-\Delta Cq}$) (data not shown).

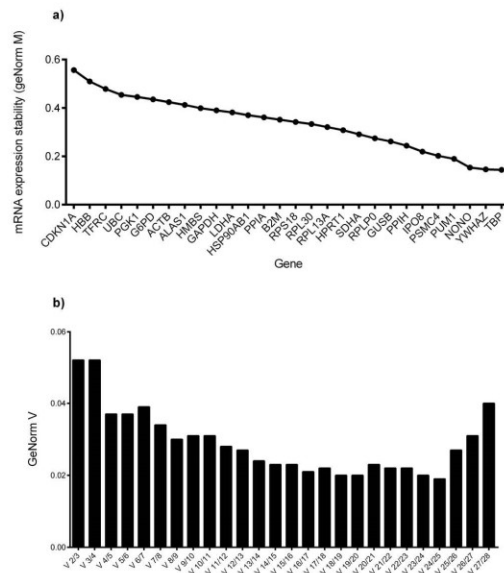


Figure 2. (a) GeNorm M results for all reference genes tested for all the placenta samples taken together. (b) GeNorm V value for all reference genes tested. These results represent the best reference genes selection (lower GeNorm M score) as well as the quantity of reference genes optimal to use found (GeNorm V score below 0.15) using the QbasePlus software.

GeNorm and NormFinder. Figure 2a shows the GeNorm M analysis for all 20 placental samples. Lower GeNorm M values represent the most stable reference genes. The GeNorm software package also computes variation of reference genes used for normalization (GeNorm V: $n/(n+1)$), indicating that 2 reference genes are suitable for RT-qPCR normalization in our experiment (2/3 genes GeNorm V < 0.15) (Fig. 2b). Thus, for all 20 samples, the best reference genes pair according to the GeNorm software is *TBP* and *YWHAZ*.

The samples were then split into two sets according to sex, which were entered separately in the GeNorm software package. Results demonstrate that for male placentas, *NONO* and *TBP* are the most stable reference genes (Fig. 3a), whilst for female placentas, *TBP* and *YWHAZ* are the most stable (Fig. 3b). Four genes have a highly different GeNorm rank between the sexes: *G6PD*, *ACTB*, *HMBS* and *PGK1*. The reference gene selection software NormFinder was also used to assess the best reference gene using intra- and inter-group (*i.e.* placental sex) variation. Results indicate *IPO8* and *TBP* to be the combination of reference genes to utilize for normalization (supplemental data Figure S1).

Novel calculation method. A novel calculation method was used to obtain the best reference genes possible for normalization in the two groups. This calculation requires the multiplication of the GeNorm M value by the difference of Cq between the groups (ΔCq^*M). The lowest number indicates the genes for which normalization provides the smallest bias for groups, while still accounting for pairwise variation (Fig. 4). Using this calculation on the 20 samples, the *RPL30* and *GAPDH* pair is the best combination of reference genes.

To validate this calculation, *HPRT1* was used as a target gene for normalized mRNA level ($2^{\Delta\Delta Cq}$), given that *HPRT1* mRNA level is significantly different between males and females. Figure 5 represents the normalized *HPRT1* mRNA level, using different reference genes chosen from the results of GeNorm (Fig. 2) and NormFinder (Fig. S1). *RPS18* was chosen as a reference gene to show normalizing with a reference gene that has a significant difference between two groups. As expected, normalizing with *RPS18* resulted in no significant difference in *HPRT1* mRNA level between sexes (Fig. 5). *IPO8* and *TBP* were selected as best reference genes by NormFinder (Fig. S1), while *TBP* and *YWHAZ* are the two best reference genes obtained with the GeNorm calculation for our samples (Fig. 2a). However, when normalizing with either *IPO8* and *TBP* or *TBP* and *YWHAZ*, there was no significant difference between males and females for placental *HPRT1* mRNA level (Fig. 5). When *RPL30* and the *RPL30*+*GAPDH* combination were used as reference genes, a significantly higher relative *HPRT1* mRNA level was obtained in male placentas ($p=0.009$ and $p=0.010$, respectively; Fig. 5). Results were similar for the other genes that have a significantly different absolute mRNA levels between placental sexes (*RPS18*, *GUSB* and *RPL13A* genes, data not shown). However, when normalizing every other gene with the *RPL30* and *GAPDH* combination, no statistically significant difference was evident between male and female placentas (data not shown). This indicates that the new calculation method proposed here for choosing the best reference genes, did not result in “false positive” group differences after normalization.

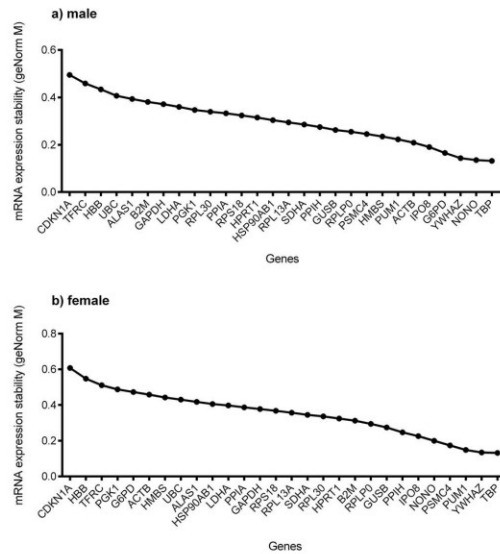


Figure 3. GeNorm results for (a) male placentas and (b) female placentas. Ten placentas from each sex were used to obtain results with PrimePCR Reference Gene H96 and Reference Gene H96 Plus plates (Bio-Rad). Cq values were transferred into the Qbase Plus software (Biogazelle) to obtain GeNorm M values.

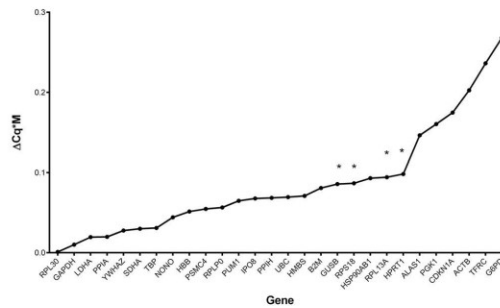


Figure 4. Results from multiplication of the GeNorm M value with the difference of average of Cq results between placental sexes (ΔCq). A smaller $\Delta Cq * M$ score represents the optimal value for gene expression results normalization for two groups (placental sex). *Genes showing significantly different Cq values between male and female placentas (Student's T test, $P \leq 0.05$; see Fig. 1).

Discussion

In this study, we demonstrate the importance of placental sex in reference gene selection and that proper reference genes selection is crucial to obtaining accurate results. The results here show that placental sex needs to be taken into consideration in the selection of reference genes for the normalization of placental mRNA expression levels. Significant Cq differences in placental mRNA levels were evident in some of the most commonly used reference genes: *HPRT1*, *GUSB*, *RPL13A* and *RPS18*. These genes had significantly lower Cq values for male, versus female, placentas, indicating that their utilization for gene normalization would produce biased results, both inappropriate non-significant and significant results^{1,2,4,17}.

Cvitic *et al.* found that most of the placental mRNA level of genes tested were higher in boy placentas than in girl placentas in microarray analysis, but this varied greatly between cell types¹⁸. This team used *HPRT1* as reference gene, but in their analysis, *HPRT1* did not vary between samples sexes. *HPRT1* is a gene that is present on the chromosome X. The *HPRT1* gene is inactivated in early embryology in female fetuses and has already been shown to have significantly different expression in regard to sample sex in other tissues^{19–21}. In our study, mRNA levels for *GUSB*, *RPL13A*, *RPS18* and *HPRT1* are significantly higher in boy placentas than in girl placentas (lower

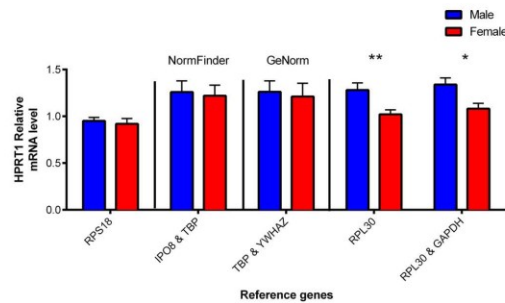


Figure 5. *HPRT1* mRNA expression levels normalized with different reference genes in human placenta. *RPS18* has significantly different Cq values between sexes. *IPO8* & *TBP* were selected using NormFinder software. *TBP* & *YWHAZ* were selected using GeNorm software. *RPL30* and *RPL30* & *GAPDH* were selected using the Δ Cq form the placental sex multiplied by GeNorm M value. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ n = 10 per placental sex.

Cq) and we did not observe any reference gene mRNA levels that were higher in girl (as opposed to boy) placentas. These could be explained by the fact that the RNA taken in our study was obtained from the trophoblastic layer of the placenta that has a generally higher overall gene expression in male placentas compared to female placentas^{14,18}.

It is noteworthy that *YWHAZ* was seen expressed significantly higher in male placentas compared to female placentas by Cleal *et al.*¹⁴ but not in our study. This could be explained by the fact that the authors tested 102 placentas compared to 20 placentas from our study, perhaps leading to a sampling bias resulting from less placental samples¹⁴. Another difference between their study compared to ours is that the sampling method might be different as the method used by Cleal *et al.* is not specified. However, the inconsistency between Cleal *et al.* results and ours highlights the importance to test and select reference genes for their difference in Cq values for every sample group in every experiment and not to rely only on previous literature.

Choosing a reference gene that does not vary between groups is essential for accurate RT-qPCR results, and this can be applied to placental sex as a subgroup⁷. In this study, we tested 28 different candidate reference genes for 20 human placental samples and rated them from best to worst using two of the most popular methods. Yet, when normalizing with the reference genes combinations found by commonly used software packages, there was no significant difference in *HPRT1* mRNA level between male and female placentas. This would suggest that NormFinder's reference gene selection does not include proper correction for the difference in the average gene expression, at least in our experiment.

When using reference genes selected by our new method of calculation, we observed a significant difference in the placental mRNA level of *HPRT1* between male and female placentas, that reflects the significant difference observed for the Cq values and for the absolute mRNA expression. The same is also observed for all genes which have significantly different Cq values between male and female populations. Moreover, using our calculation and in accordance with the Cq values obtained, we did not identify other significant differences in mRNA levels between sexes other than those that were significantly different for their Cq values and absolute mRNA level (*GUSB*, *RPL13A* and *RPS18*). This would mean that, when comparing for different groups (or in our case placental sexes), multiplying GeNorm M results by the Cq difference between groups will enable to find reference genes that will provide a more accurate normalization for group comparison, while not obtaining false-positive results.

However, this simple tool should be used with caution and does not replace a researcher's judgement, as is the case with any other method of selecting reference genes for RT-qPCR. Furthermore, the calculations we propose might not fit all situations encountered as they have only been tested human placentas and only for groups based on fetal sexes.

Conclusion

The main finding in this study is that even though the genes with the best GeNorm M values could be used to normalize RT-qPCR Cq values, this would not take into account group differences and might conceal slight differences between groups when normalizing results. While NormFinder does take into account a sample group such as placental sex, results using either GeNorm's or NormFinder's suggested genes did not provide the best reference gene to assess small mRNA level differences between samples. Here we have introduced a novel method of calculation for finding the best reference genes for normalization between groups. While this method is not perfect by any means, it is straightforward to use and can help pinpoint genes that have lower mRNA average variability between groups as well as the most stable in the pairwise variation method. The results presented in this study also highlights the importance of proper reference gene selection as well as the importance of not only relying blindly on software calculation results for such a critical part of the RT-qPCR technique. Thus, it is up to the researcher to verify and test differences between the mRNA levels of groups tested with raw RT-qPCR data.

Materials and Methods

Placental samples. Human term placentas (10 males/10 females; 38–41 gestation weeks) were obtained immediately after spontaneous vaginal deliveries from uncomplicated singleton pregnancies. Placentas were obtained with informed patient consent and approval of ethical committees at the CHUM-St-Luc Hospital (Montreal, QC) and INRS (Quebec, QC). Women having pathologies, smokers or under medication were excluded. All the experiments were performed according to ethical guidelines.

All samples were processed within 30 min of placental delivery. Placental tissue collection was realized using methods consistent with the recommendations²². Biopsies were taken, guided by a stereological grid, as described previously²². As the placenta is a heterogeneous tissue, it is necessary to reduce the sampling site-driven gene expression biases, which is achieved by multistage unbiased random sampling, thereby giving all sites equal possibility of selection. To maximize the representativeness of the extracted RNA, 5 tissue samples were collected from each placenta, using a stratified random sampling method, and then pooled for RNA extraction. The trophoblastic samples were then flash-frozen and kept at -80°C until analysis. All tissue samples were then pooled and ground into powder using a mortar and pestle, kept at very low temperature by dry ice and liquid nitrogen. Placental tissue powders, 15 to 20 mg, were weighed using a 1.5 ml tube cooled in liquid nitrogen for RNA isolation. Such steps ensured that the placental samples were not thawed prior to RNA extraction.

RNA isolation and cDNA synthesis. The RNA was isolated using the AllPrep DNA/RNA/Protein mini kit (Qiagen, Toronto, ON), after using Qiashtredder spin columns (Qiagen) to further disrupt placental tissue, according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were assessed using the ND-1000 Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA). RNA integrity was analyzed using the Experion automated electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA). Samples utilized had an RNA quality index (RQI) above 7.5. The cDNA was obtained using the iScript reverse transcription supermix for the RT-qPCR kit (Bio-Rad), following the manufacturer's instructions, for a total of 500 ng of RNA. The samples were then diluted 1/20 in RNase Free Water and stored at -20°C until further analysis.

qPCR. The reference genes analyzed originated from PrimePCR Reference genes H96 and Reference Genes Plus H96 (Bio-Rad). These plates come with 14 different reference gene primers, lyophilized in wells (28 genes; Table 1), as well as controls for positive and negative PCR reaction, reverse transcription control and two RNA integrity controls. The primer sequence is not available for the genes in PrimePCR assays, but the validation data is available online for each gene. The reagent used for qPCR reaction was SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The reaction was performed according to the manufacturer's instructions, on a CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad). Assays were performed in triplicate to control for technical errors.

Data analysis. To analyze the reference genes' mRNA expression stability, the qBase + software package (BioGazelle, Zwijnaarde, Belgium) was used to obtain GeNorm results. The qBase + software package calculates gene expression stability (GeNorm M), as well as the variation from using n reference gene or n + 1 reference genes to evaluate the lowest number of genes required for accurate normalization (GeNorm V). Statistical analyses were carried out using PRISM 5.0 (Graphpad software, La Jolla, CA). Variance was tested between sexes and normal sample distribution was also assessed, prior to using Student's t-test to evaluate the difference in mRNA level between male and female placentas.

References

- Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611–622, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797> (2009).
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. & Nguyen, M. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50, S1–S5, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005> (2010).
- Derveaux, S., Vandesompele, J. & Hellemans, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50, 227–230, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001> (2010).
- Lanoix, D. *et al.* Quantitative PCR Pitfalls: The Case of the Human Placenta. *Molecular Biotechnology*, 1–10, <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9539-2> (2012).
- Eisenberg, E. & Levanon, E. Y. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in genetics: TIG* 29, 569–574, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010> (2013).
- Kozera, B. & Rapacz, M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics* 54, 391–406, <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x> (2013).
- Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Orntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64, 5245–5250, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-0496> (2004).
- Ritz, S. A. *et al.* First steps for integrating sex and gender considerations into basic experimental biomedical research. *The FASEB Journal*, <https://doi.org/10.1096/fj.13-233395> (2013).
- Heidari, S., Babor, T. F., De Castro, P., Tort, S. & Curno, M. Sex and Gender Equity in Research: rationale for the SAGER guidelines and recommended use. *Research Integrity and Peer Review* 1, 2, <https://doi.org/10.1186/s41073-016-0007-6> (2016).
- Institute of Medicine Board on Population, H. & Public Health, P. In *Sex-Specific Reporting of Scientific Research: A Workshop Summary* (National Academies Press (US) National Academy of Sciences., 2012).
- Del Boca, F. K. Addressing sex and gender inequities in scientific research and publishing. *Addiction (Abingdon, England)* 111, 1323–1325, <https://doi.org/10.1111/add.13269> (2016).
- Clifton, V. L. Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival. *Placenta* 31, S33–S39, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.11.010> (2010).
- Adibi, J. *et al.* IFPA meeting 2016 workshop report II: Placental imaging, placenta and development of other organs, sexual dimorphism in placental function and trophoblast cell lines. *Placenta*, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.02.021> (2017).
- Cleal, J. K., Day, P. L., Hanson, M. A. & Lewis, R. M. Sex differences in the mRNA levels of housekeeping genes in human placenta. *Placenta* 31, 556–557, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.03.006> (2010).
- Osei-Kumah, A., Smith, R., Juristica, I., Caniggia, I. & Clifton, V. L. Sex-specific differences in placental global gene expression in pregnancies complicated by asthma. *Placenta* 32, 570–578, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.05.005> (2011).

CHAPITRE 3: Natural disaster-related prenatal maternal stress is associated with alterations in placental glucocorticoid system: The QF2011 Queensland Flood Study

Joey St-Pierre^{1,2}, David P. Laplante³, Guillaume Elgbeili³, Paul A. Dawson⁴, Sue Kildea^{4,5}, Suzanne King^{3,6*}, Cathy Vaillancourt^{1,2*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier et centre de recherche Biomed, Laval, Canada et ²Centre de recherche interdisciplinaire sur le bien-être, la santé, la Société et l'environnement, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada; ³Institut de santé mentale Douglas, Montréal, Canada; ⁴Mater Research Institute-University of Queensland, Brisbane, Australie; ⁵School of Nursing, Midwifery and Social Work, The University of Queensland, Brisbane, Australie; ⁶McGill University Montréal, Canada

Contribution de l'étudiant :

L'étudiant a participé à l'élaboration de l'étude, réalisé toutes les expériences liées au placenta et analysé les résultats. Il a également rédigé l'article et participé au choix du journal de publication.

L'article a été soumis à ***Psychoneuroendocrinology*** le 7 juillet 2017 et la version révisée (R1) le 7 décembre 2017.

Résumé de l'article en français :

Nous avons examiné l'effet d'une catastrophe naturelle (inondation) comme événement déclencheur du stress prénatal maternel (PNMS) sur les composantes placentaires du système des glucocorticoïdes et le transport du glucose. L'effet modérateur du moment de l'événement stressueur et du sexe du fœtus a aussi été évalué. Les échantillons placentaires proviennent de femmes participantes à l'étude *Queensland flood study 2011* (QF2011) qui étaient au premier ou deuxième trimestre de grossesse lors de l'inondation. Les questionnaires détaillés sur l'expérience vécue par les femmes ainsi que la détresse subjective ont été obtenus pour évaluer le degré de stress durant la grossesse. La régression linéaire hiérarchique a été utilisée pour déterminer l'effet spécifique du stress sur le système des glucocorticoïdes placentaires (expression de la protéine et activité de la 11 β -HSD2, ARNm de *HSD11B1*, *HSD11B2*, *NR3C1- α* , *NR3C1- β* et *CRH*), le transport du glucose (protéine de GLUT1, ARNm de *SLC2A1*, *SLC2A3* et *SLC2A4*). Le stress subjectif était associé à une diminution du taux d'ARNm de *NR3C1- β* pour les placentas de fœtus mâles seulement ($\beta = -0.491$, $p = 0.005$). L'âge gestationnel au moment de l'inondation était un modérateur significatif de l'effet du stress subjectif sur l'expression de l'ARNm de *NR3C1- α* ($p = 0.046$) et de *HSD11B1* ($p = 0.049$) pour les placentas de fœtus mâles. Lorsque l'événement stressueur était survenu plus tard durant la grossesse, un bas niveau de stress subjectif a été associé à une augmentation de l'ARNm de *HSD11B1* alors qu'un haut niveau de stress subjectif a été associé à une diminution de l'ARNm de *NR3C1- α* . Les résultats n'ont pas démontré d'effet du PNMS sur l'expression ou l'activité de la 11 β -HSD2 ni sur l'expression de l'ARNm de *HSD11B2*. Nos résultats démontrent une adaptation distincte face au PNMS pour le système des glucocorticoïdes selon le sexe du fœtus et le moment du stress durant la grossesse avec une réduction de l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux glucocorticoïdes chez les placentas de fœtus mâle. Le mécanisme exact par lequel le PNMS affecte le placenta et le rôle de celui-ci dans la programmation fœtale requiert plus d'études.

Natural disaster-related prenatal maternal stress is associated with alterations in placental glucocorticoid system: The QF2011 Queensland Flood Study

Joey St-Pierre^{1,2}, David P. Laplante³, Guillaume Elgbeili³, Paul A. Dawson⁴, Sue Kildea^{4,5}, Suzanne King^{3,6*}, Cathy Vaillancourt^{1,2*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier and BioMed Research Center, Laval, Canada and ²Center for Interdisciplinary Research on Well-Being, Health, Society and Environment, Université du Québec à Montréal, Montreal, Canada; ³Douglas Mental Health University Institute, Montreal, Canada; ⁴Mater Research Institute-University of Queensland, Brisbane, Australia; ⁵School of Nursing, Midwifery and Social Work, The University of Queensland, Brisbane, Australia; ⁶McGill University Montreal, Canada

Running title: Prenatal stress affects placental genes regulating fetal cortisol and glucose exposure

*** Corresponding authors**

Cathy Vaillancourt

INRS-Institut Armand Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

T: 1-450-687-5010 ext. 8812; cathy.vaillancourt@iaf.inrs.ca

and

Suzanne King

Douglas Mental Health University Institute, 6875 LaSalle Boulevard, Verdun, QC, Canada H4H 1Y1 T:

1-514-761-6131 ext. 2353; Suzanne.king@mcgill.ca

ABSTRACT

We investigated the effects of a natural disaster-related (a sudden flood) as a prenatal maternal stress (PNMS) on the placental glucocorticoid system and glucose transporters. Whether the gestational age at the time of the flood moderated these effects was also evaluated. Placental samples were collected from participants in the 2011 Queensland Flood Study (QF2011) who were pregnant in the first or second trimester at the onset of the flood. Detailed questionnaire results for objective hardship and composite subjective distress were obtained to assess stress levels. Subjective distress was significantly associated with a reduction in placental *NR3C1-β* mRNA levels for males only ($\beta = -0.491, p = 0.005$). In female placentas, objective hardship was marginally linked with lower *SLC2A1* mRNA levels while subjective distress was a marginally significant predictor of higher placental *SLC2A4* mRNA levels. Gestational age at the time of flood was a significant moderator of the effect of subjective distress on placental mRNA levels for *NR3C1-α* ($p = 0.046$) and *HSD11B1* ($p = 0.049$) in male placentas. If the flood occurred in mid pregnancy, lower subjective distress predicted higher *HSD11B1* while high subjective distress predicted low *NR3C1-α* placental mRNA level. While results did not show any PNMS effects on placental *HSD11B2* mRNA and protein levels, and activity, we showed a reduction in placental *NR3C1-β* mRNA level in male placentas. Our results show evidence of distinct placental glucocorticoid and glucose systems adaptations to PNMS as a function of fetal sex and gestational timing of exposure, with high subjective PNMS in mid-pregnancy associated with lower levels of expression glucocorticoid-promoting gene in males, leaving the fetus less protected against maternal stress. The exact mechanism by which natural disaster-related PNMS acts on the placenta and the impact on fetal programming requires further investigation.

Keywords: *Glucocorticoid receptors; glucose transporter; gestational age of exposure; sex, pregnancy.*

1. INTRODUCTION

There is growing evidence that prenatal maternal stress (PNMS) due to a natural disaster is linked to adverse fetal development and alterations in child outcomes (Dancause *et al.*, 2015; King *et al.*, 2005; Laplante *et al.*, 2004; Simcock *et al.*, 2017; Simcock *et al.*, 2016). Several studies have linked maternal depression, anxiety and stress in pregnancy with adverse fetal outcomes (Brunton & Russell, 2011; Buss *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 2011; O'Connor *et al.*, 2005; Ponder *et al.*, 2011). Studies also suggest that such programming effects are an evolutionary adaptation, preparing the child to unfavorable living conditions experienced by the mother (Glover & Hill, 2012).

The mechanisms underlying this phenomenon are still largely unknown but there is growing evidence linking the mother's hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and its end product, glucocorticoids (cortisol in humans), to fetal programming (Seckl & Holmes, 2007). In pregnancy, there is a modification in the maternal HPA axis as the placenta produces its own corticotropin releasing hormone (CRH) in response to cortisol, which modulates the maternal HPA axis in a positive feedback loop to increase blood cortisol levels (reviewed in (St-Pierre *et al.*, 2016c). To counterbalance the effect of higher circulating cortisol levels, the placenta expresses type 2, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzyme (11 β -HSD2, *HSD11B2* gene) that converts cortisol into inactive cortisone (Draper & Stewart, 2005). The placenta also expresses other proteins involved in the glucocorticoid system such as glucocorticoid receptors (GR, *NR3C1*) α and β as well as the cortisol-producing enzyme 11 β -HSD1 (*HSD11B1*), although at lower levels than 11 β -HSD2 (Saif *et al.*, 2015; Tomlinson *et al.*, 2004). After cortisol binding, the GR- α receptor can work as a transcription factor when dimerized, or can be linked to the nuclear bound inhibitory form GR- β (Oakley & Cidlowski, 2013). Studies of stress, anxiety and/or depression in pregnancy in humans, and studies of experimental stressors in rodents, have associated these maternal conditions with an altered placental glucocorticoid system and linked these to developmental programming in the offspring (Mairesse *et al.*, 2007a; Mina *et al.*, 2015; O'Donnell *et al.*, 2011a; Peña *et al.*, 2012; Räikkönen *et al.*, 2015; Seth *et al.*, 2015).

The placenta mediates the transfer of obligate nutrients, notably glucose, to meet fetal demands. Glucose is passed from maternal to fetal circulation via the placenta by glucose transporters (GLUTs). The main placental glucose transporter isoform is GLUT1 (*SLC2A1* gene; (Brown *et al.*, 2011); it is primarily expressed on the apical microvillus membrane of syncytiotrophoblast adjacent to maternal circulation, and to a lesser extent on the basolateral membrane adjacent to the fetal endothelial cells (Jansson *et al.*, 1993). It is also found in the syncytiotrophoblast precursor cells, the villous cytotrophoblasts (Baumann *et al.*, 2002). GLUT3

(*SLC2A3*) and GLUT4 (*SLC2A4*) are also expressed in the human placenta. GLUT3 is found in the trophoblast layer of term placenta but is predominantly expressed in the first trimester and it is thought to be an important component of the glucose transport system (Brown *et al.*, 2011). GLUT4 is primarily expressed in early gestation syncytiotrophoblast and is insulin-regulated, unlike GLUT1 (Ericsson *et al.*, 2005b). In rats, it has been shown that maternal restraint stress induces a reduction in placental GLUT1 and an increase in GLUT3 and GLUT4 protein levels at term (Mairesse *et al.*, 2007a). In humans, it has been shown that glucocorticoids down-regulate GLUT1 and GLUT3 in primary cultured villous trophoblastic cells *in vitro* (Hahn *et al.*, 1999).

Fetal sex is an important factor to account for in studies regarding PNMS and its effect on placental function, fetal development and programming. Studies have shown that the stress response in the placenta can differ depending on fetal sex (reviewed in (Clifton, 2010a). This different response in regards to PNMS can be attributed to different placental glucocorticoid receptor isoforms expressed (Saif *et al.*, 2015). Likewise, data suggests that the timing of the stress exposure during pregnancy may also affect fetal programming. For example, Project Ice Storm, a study of PNMS from a natural disaster, found that: (i) early gestational exposure predicts more severe autistic-like symptoms (Walder *et al.*, 2014) and lower IQ (Laplante *et al.*, 2004) in toddlers; and (ii) mid-gestational exposure predicts greater fluctuating asymmetry (King *et al.*, 2009), while late exposure predicts poorer motor abilities (Cao *et al.*, 2014).-Although these different aspects of PNMS (objective hardship and subjective distress) have been linked to different effects on a variety of child outcomes, to date, it is unknown how these different aspects of the natural disaster-related PNMS impact the glucocorticoid and glucose transporter systems in the human placenta, and how these relationships may be moderated by timing of exposure. In the current study, we took advantage of a natural disaster in Queensland, Australia, to study the effects of PNMS on placental functioning. On January 10, 2011 the Brisbane River overflowed its banks, and heavy rains flooded 70% of the state of Queensland. Nearly 15,000 homes were completely inundated, with another 18,000 partially flooded. There were 23 flood-related deaths, and the economic costs were more than AUS\$2-billion, making it one of the worst natural disasters in Queensland history.

The aim of this study was to determine the effect of *in utero* exposure to two aspects of natural disaster-related PNMS (i.e., objective hardship and subjective distress) on the placental glucocorticoid system and glucose transporters. We hypothesized that higher levels of PNMS would be associated with a decreased expression level of genes associated with reducing glucocorticoid effects (*HSD11B2*, *NR3C1-β*), and an increase in the expression level genes associated with promoting glucocorticoid effects (*HSD11B1*, *NR3C1-α*, *CRH*) in the placenta. We also hypothesized that higher

levels of PNMS would be associated with a reduction in placental *SLC2A1* levels and an increase in *SLC2A3* and *SLC2A4* levels. We suspected that the timing of the stress exposure in pregnancy would moderate any PNMS effect. To test our hypotheses, we used a cohort of women who were pregnant during the Queensland flood in January, 2011: The QF2011 Queensland Flood Study. Details on the cohort and methodology have already been described in detail elsewhere (King *et al.*, 2015a).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Participants

Participants were women who were pregnant during the flood on January 10, 2011. Recruitment began with ethics approval on April 1, 2011 and continued until mid-January 2012. As such, our sample includes women who were exposed to the flood at some point in the first 172 days (first 24 weeks, or 6.6 months) of pregnancy, and does not include women who gave birth between January 10 and April 1, 2011 and who were in their third trimester at the time of the flood. Further details on eligibility and recruitment are described in (King *et al.*, 2015a). The final sample size used for our analyses was 96 women who completed the stress questionnaires and from whom our team was able to collect placental samples (51 males and 45 females). The QF2011 study was approved by the Mater Hospital Human Research Ethics Committee on April 1, 2011 and The University of Queensland. Participants provided informed written consent.

2.2 Placental sampling

Placentas were obtained within 30 minutes of expulsion, and sampling occurred within one hour. Placentas from women who gave birth by elective cesarean section were excluded. Placentas were rinsed to remove excess blood and eight biopsies were taken from the trophoblast layer using a stereological grid as previously described (Mayhew, 2006). Samples were flash frozen immediately and kept at -80°C until further analysis. Pools of five placental samples were ground into powder using a mortar and pestle on dry ice, taking precautions to keep tissue samples frozen.

2.3 RNA isolation and cDNA synthesis

Frozen placental tissue samples (15 to 20 mg) were mixed with the appropriate amount of RLT buffer from the Allprep DNA/RNA/Protein mini kit (Qiagen, Toronto, ON) and placed in Qiashredder spin columns (Qiagen) to further disrupt the tissue before isolating RNA according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were assessed using a ND-1000 nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA), and RNA integrity was assessed using an Experion electrophoresis

system (Bio-Rad, Mississauga, ON). First strand cDNA was generated from 500 ng purified RNA using iScript reverse transcription supermix for RT-qPCR (Bio-Rad) for highly expressed genes (*CRH*, *HSD11B2*, *HSD11B1*, *NR3C1*, *NR3C1- α* and *SLC2A1*). For those genes expressed at lower levels (*NR3C1- β* , *SLC2A3* and *SLC2A4*) the iScript advanced cDNA synthesis kit was used with 2 μ g of purified RNA and an additional pre-amplification step using SsoAdvanced PreAmp Supermix (Bio-Rad). Primer sequences are presented in table S1

2.4 RT-qPCR

cDNA samples were diluted 1:32 for highly expressed genes, and 1:20 for genes expressed at lower levels. A 2-step PCR was performed using a CFX96 (Bio-Rad) with either SsoFast or SsoAdvanced PCR mastermix (Bio-Rad) for high and low mRNA expression, respectively. Assays were performed in triplicates with *HPRT1* and *TOP-1* as reference genes selected using Qbase plus software (BioGazelle, Zwijnaarde, Belgium) (Lanoix *et al.*, 2012b; Vandesompele *et al.*, 2002b). Reference genes were tested for their expression level according to the child's sex and showed no significant differences in levels between males and females (St-Pierre *et al.*, 2017).

2.5 Protein isolation and Western blot

Proteins for Western blot analysis were obtained using a radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer containing Halt protease and Halt phosphatase inhibitor cocktails (Thermo scientific, Waltham, MA) buffer with 15-20 mg of frozen placental tissue powder. Protein concentration was evaluated by bicinchoninic acid assay (BCA) assay following the manufacturer's instructions (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Proteins (40 μ g for 11 β -HSD2 and 20 μ g for GLUT1) were separated in 4-15% mini protean TGX gels (Bio-Rad) and transferred on Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. Five percent skimmed milk in 0.5% PBS-Tween was used as membrane blocking agent. The antibodies used were ab80317 for 11 β -HSD2 and ab652 for GLUT1 from Abcam (Cambridge, UK). Chemiluminescence was detected on a Chemidoc MP imaging system (Bio-Rad) with Clarity Western ECL blotting substrate (Bio-Rad). Protein expression level was evaluated by densitometry analysis of images and normalized to total protein coloration by MemCode reversible protein stain (Pierce). Results were obtained with the ImageLab 4.1 software.

2.6 11 β -HSD2 activity assay

11 β -HSD2 activity was estimated by radio-enzymatic conversion adapted from a recent study (St-Pierre *et al.*, 2016a). Briefly, proteins were isolated as described in section 2.5 for Western blot

analysis and incubated at 37°C for 30 minutes with ³H-Cortisol (Perkin-Elmer, Akron, OH) and unlabeled cortisol. Reaction was stopped by adding one volume of diethyl ether. Steroids were extracted by freezing the aqueous phase and removing the solvent phase. Solvent was evaporated and the steroids were suspended in dichloromethane. A small fraction of the suspension was placed on a thin layer chromatography plate (silica gel HLF 250µm, Analtech, Newark, Delaware). Steroids were separated using a solution of dichloromethane:methanol (95:5, v:v) and bands were identified under UV light with unlabeled cortisol and cortisone for reference. The identified bands were removed from the plates by scraping carefully and placed in scintillation vials for measurement in a Tri-Carb 2100TR (Perkin Elmer). Experiments were performed in duplicate and background values subtracted (cortisone conversion without placental proteins).

2.7 Maternal stress assessment

Maternal objective hardship was assessed using the Queensland Flood Objective Stress Scale (QFOSS) questionnaire at recruitment and 12-month post-flood. This questionnaire was designed to assess the distinctive experience of the 2011 Queensland flood based on previous disaster-related PNMS studies (Laplante *et al.*, 2007b; Yong Ping *et al.*, 2015a). The questionnaire items tapped into four categories of exposure: Threat, Loss, Scope and Change. Each of the four categories was scaled from 0 to 50 (from no impact to extreme impact) for a total possible score of 200, with higher scores indicating a higher level of objective hardship. Comprehensive details on the QFOSS questionnaire are available from previous publications (King *et al.*, 2015a; Simcock *et al.*, 2016).

To assess subjective distress, women completed three questionnaires at recruitment. The Impact of Event Scale-Revised (IES-R) (Weiss, 1997a) which assesses current PTSD-type symptoms as well as the Peritraumatic Distress Inventory (PDI-Q) (Brunet *et al.*, 2001) and the Peritraumatic Dissociation Experience Questionnaire (PDEQ) (Marmar, 1997) that are retrospective reports of distress and dissociation at the time of the flood. To reduce the number of analyses, the three subjective distress measures were combined according to a Principle Components Analysis into the COmposite Score for MOther's Subjective Stress (COSMOSS). Scores on COSMOSS are centered around a mean of 0 with negative scores indicating below average subjective stress and positive scores indicating above average distress. Further details have already been described (King *et al.*, 2015a; Simcock *et al.*, 2016).

The gestational age at the time of flood exposure (timing of exposure) was calculated as the number of days of pregnancy at the peak of the Queensland flood on January 10, 2011.

2.8 Covariates

The women's level of depression was assessed when they were first assigned their midwife (Mean = 14.6 weeks of gestation; range 6–36 weeks of gestation) using the Edinburgh Depression Scale (EDS) (Cox *et al.*, 1996a). Socioeconomic status was estimated using the Australian socioeconomic indexes for area (SEIFA) scores (Pink, 2011a) at recruitment into the study. Finally, the women's current anxiety levels were assessed at recruitment using the State-Trait Anxiety Inventory (STAI) (Spielberger, 2010).

2.9 Statistical analyses

We tested sex differences using Student's t-tests for data from questionnaires, maternal biological factors and child outcome measures. Pearson's product moment correlations were used to test for associations among mRNA levels of each gene, and also for associations between predictors and covariates and placental mRNA levels. The Shapiro-Wilk test indicated that all the mRNA levels and QFOSS questionnaire results were not normally distributed (Table S2). Thus, these data were log-transformed for them to be closer to a normal distribution.

In order to determine the importance of the effect of PNMS on placental mRNA, protein and activity levels over and beyond the effects of covariates (e.g. SEIFA score or maternal mood), hierarchical multiple regression was used for each outcome. In the first step, SEIFA score and mood outcomes were introduced into the model. For the second step, the timing of exposure to the flood in pregnancy was added. It was included in all of our analyses as timing of exposure to the flood during pregnancy was of particular interest and part of our initial hypothesis. Objective hardship (QFOSS) was added at the third step. Composite subjective distress (COSMOSS) was entered in the fourth step; thus allowing us to assess the effects of subjective distress while controlling for objective hardship levels. Finally, objective hardship × timing of exposure or subjective distress × timing of exposure interactions terms was entered separately into the model at the final step. Composite subjective distress was not included if the model tested the interaction between objective hardship and timing of exposure. When composite subjective stress had a significant effect on placental outcomes, the effects for its three components were tested separately in exploratory analyses. Finally, SEIFA score and mood outcomes were subsequently removed from the model if they did not contribute sufficiently to the model ($p \geq 0.10$) (backwards approach). Analyses were performed using SPSS v.21 (IBM) with the PROCESS v.2.11 macro (Hayes, 2013).

3. RESULTS

3.1 Descriptive statistics

Table 1 presents the descriptive statistics of the participants as a function of placental sex. Student's t-test showed that anxiety levels were higher for women carrying male compared to female fetuses ($t(94) = 2.123, p = 0.036$). There were no other statistically significant differences. We also compared these characteristics with the rest of the QF2011 cohort that was exposed to the flood during the first and second trimester of pregnancy (for whom the placentas were not collected) and the mothers reported significantly higher objective hardship for the participants that the placenta was not collected ($t(90) = 2.439, p = 0.017$) for women carrying a male fetus. Furthermore, there was a slightly shorter average gestation length for women for whom we did not collect the placenta ($t(92) = -1.985, p = 0.050$) carrying a female fetus. No other statistically significant differences were observed for the descriptive statistics between the participants for whom the placenta was available for analysis and those that was not. No significant differences in mRNA level of the genes, protein expression and activity analyzed were found between male and female placentas (Table S3).

3.2 Intercorrelations among placental glucocorticoid system and glucose transporter mRNA levels

Table 2 shows intercorrelations of mRNA levels for all of genes tested as a function of male and female placentas.

For male placentas: mRNA level of genes promoting glucocorticoid effects (*CRH*, *NR3C1- α* , and *HSD11B1*) were highly correlated with each other ($p = 0.014$ to $p < 0.001$) as well as the mRNA levels of the two glucocorticoid inhibiting genes (*HSD11B2* and *NR3C1- β*) ($p = 0.011$). For the glucose transporter genes, only *SLC2A3* and *SLC2A4* levels were correlated ($p < 0.001$). *SLC2A4* mRNA levels were also negatively associated with the mRNA levels of *NR3C1- β* ($p = 0.037$). *NR3C1* mRNA levels were positively correlated with the levels of both *NR3C1- α* ($p < 0.001$) and *NR3C1- β* ($p = 0.049$) as well as with *HSD11B1* ($p < 0.001$). Furthermore, the glucose transport *SLC2A1* mRNA levels were positively associated with the mRNA levels of *CRH* ($p = 0.034$) and *NR3C1- α* ($p = 0.042$) and negatively associated with the mRNA levels of *HSD11B2* ($p = 0.015$).

For female placentas: Similarly to the male, mRNA level of genes promoting glucocorticoid effects (*CRH*, *NR3C1- α* , and *HSD11B1*) were highly correlated ($p < 0.011$ to $p < 0.001$) as well as the mRNA levels of the two glucocorticoid inhibiting genes ($p = 0.014$). For the glucose transporter genes, only *SLC2A3* and *SLC2A4* levels were correlated ($p < 0.001$). *NR3C1* mRNA levels were positively correlated with the mRNA levels of glucocorticoid promoting genes *CRH* ($p = 0.004$), *NR3C1- α* (p

<0.001) and *HSD11B1* ($p = 0.015$), but were not associated with any of the glucocorticoid inhibiting genes. *NR3C1* mRNA levels were also positively correlated to the mRNA levels of *SLC2A1* ($p = 0.018$). Moreover, the mRNA levels of *SLC2A1* levels were positively associated with the mRNA levels of *CRH* ($p = 0.034$) and *NR3C1- α* ($p = 0.001$) and negatively associated with the mRNA levels of *HSD11B2* ($p < 0.001$).

3.3 Association between PNMS and placental mRNA level

Table 3 shows the correlations between predictors (stress measures and covariates) and placental mRNA levels.

For male placentas, only one marginally significant association was observed: Higher composite subjective distress levels were associated with lower *NR3C1- β* mRNA levels ($p = 0.068$).

For female placentas, higher objective hardship and composite subjective distress levels were associated with lower mRNA levels of the *SLC2A1* ($p = 0.042$ and $p = 0.092$, respectively). Timing of exposure to the flood, regardless of the level of PNMS severity, was associated with higher mRNA levels of the glucocorticoid promoting genes *NR3C1- α* ($p = 0.013$) and *HSD11B1* ($p = 0.022$). Higher parental SEIFA scores were associated with higher mRNA levels of *NR3C1- α* ($p = 0.013$) and *HSD11B1* ($p = 0.016$). Finally, higher recruitment maternal anxiety levels were marginally associated with lower mRNA levels of the *NR3C1- β* ($p = 0.079$). Significant correlations observed in Table 3 between placental biomarkers mRNA level and predictors (stress measures and covariates) are presented in Figure S1.

3.4 Hierarchical multiple linear regression of PNMS on placental mRNA level for male placentas

The results of the significant regression models are presented in Table 4 and Figure 1.

3.4.1 Glucocorticoid promoting genes (*CRH*, *NR3C1- α* , *HSD11B1*). After controlling for the non-significant effects of timing of exposure to the flood, objective hardship, and composite subjective distress, the composite subjective distress \times timing of exposure interaction was significantly associated with the mRNA levels of the *NR3C1- α* in male placentas accounting for 8.2% of the variance (Table 4A). The effect of composite subjective distress on male placental *NR3C1- α* mRNA levels was significant if the flood occurred after pregnancy Day 80 (marginal between Days 64 and 79) at which point the higher the composite subjective distress level the lower the mRNA level (Figure 1A). Interpreting the interaction in the alternate direction (Figure 1B), timing of exposure to the flood during pregnancy was a marginally significant predictor of *NR3C1- α* when the composite

subjective distress level was 0.78 standard deviation (SD) above the mean; the later in pregnancy flood occurred the lower the placental mRNA levels of this gene. In order to determine which aspect of the mothers' composite subjective distress was related to the mRNA levels of *NR3C1-α*, separate regression analyses were conducted by replacing maternal composite subjective distress with PTSD-like symptom, peritraumatic distress, and peritraumatic dissociation levels in separate analyses. After controlling for the non-significant effects of timing of exposure, objective hardship, and PTSD-like symptom levels, the PTSD-like symptoms × timing of exposure interaction was significantly associated with the mRNA levels of *NR3C1-α*, accounting for 14.2% of the variance in male placentas (Table S4A). The effect of PTSD-like symptoms on male placental mRNA was significant if the flood occurred after pregnancy Day 104 (marginal between Days 92 and 103) (Figure S2A) at which point the higher the level of PTSD-like symptoms the lower the mRNA level. Interpreting the interaction in the alternate direction (Figure S2B), timing of exposure was a significant predictor of *NR3C1-α* when maternal PTSD-like symptoms log-transformed levels were above 2.34: the later in pregnancy the flood occurred the lower the placental mRNA levels of this gene. The regression analyses conducted using peritraumatic distress and peritraumatic distress levels revealed that these two predictor variables and their interaction terms with timing of exposure were not significantly associated with the mRNA levels of *NR3C1-α* (Table S4A).

After controlling for the non-significant effects of timing of exposure, objective hardship and composite subjective distress, the composite subjective distress × timing of exposure interaction was significantly associated with the mRNA levels of *HSD11B1* and accounted for 8.0% of the variance in male placentas (Table 4B). The effect of composite subjective distress levels on mRNA levels in male placentas were significant when the flood occurred after pregnancy Day 130 (marginal between Days 82 and 129) (Figure 1C) with greater levels of composite subjective distress associated with lower placental mRNA levels. Interpreting the interaction in the alternate direction (Figure 1D), timing of exposure was found to have a marginally significant effect on placental mRNA level of *HSD11B1* when composite subjective distress was lower than -0.84, or nearly 1 SD below the mean, indicating that at low levels of composite subjective distress, there was a trend for placental mRNA levels to be lower the earlier in pregnancy the flood occurred. In order to determine which aspect of the mothers' composite subjective distress was related to the mRNA levels of *HSD11B1*, separate regression analyses were conducted by replacing levels of maternal composite subjective distress levels with PTSD-like symptom, peritraumatic distress, and peritraumatic dissociation levels in separate analyses. After controlling for the non-significant effects of timing of exposure, objective hardship, and PTSD-like symptoms, the PTSD-like symptoms × timing of exposure interaction was significantly

associated with the mRNA levels of *HSD11B1* and accounted for 14.4% of the variance in male placentas (Table S4A). The effect of IES-R on *HSD11B1* mRNA levels in male placentas was significant when the flood occurred after pregnancy Day 102 (marginal between Days 91 and 101) (Figure S2C) with higher levels of PTSD-like symptoms being associated with lower *HSD11B1* placental mRNA level. Interpreting the interaction in the alternate direction (Figure S2D), timing of exposure was found to have a significant effect on placental mRNA level of *HSD11B* when PTSD-like symptom log-transformed levels were lower than 0.44: this effect indicates that at low levels of PTSD-like symptoms, placental mRNA levels of *HSD11B1* were lower the earlier in pregnancy the flood occurred. Timing also had a marginally significant effect on placental mRNA level of *HSD11B1* when PTSD-like symptoms log-transformed levels were higher than 2.44, such that *HSD11B1* mRNA levels were lower the later in pregnancy the flood occurred.

After controlling for the non-significant effects of timing of exposure, objective hardship and peritraumatic dissociation levels, the peritraumatic dissociation \times timing of exposure interaction tended to be associated with the placental mRNA levels of *HSD11B1* ($p = .053$), accounting for 7.5% of the variance in male placentas (Table S4 A). The effect of the level of peritraumatic dissociation on mRNA levels of *HSD11B1* in male placentas was significant when the flood occurred after pregnancy Day 88 (marginal between Days 76 and 87) with higher levels of peritraumatic experiences being associated with lower *HSD11B1* placental mRNA level (data not shown). Interpreting the interaction in the alternate direction, timing of exposure was found to have a marginally significant effect on placental mRNA levels when peritraumatic dissociation log-transformed levels were lower than 0.13: this effect indicates that at low levels of peritraumatic dissociation there was a trend for placental mRNA levels to be lower the earlier in pregnancy the flood occurred (data not shown). The regression analyses conducted using levels of peritraumatic distress revealed that this predictor variable and its interaction term with timing of exposure to the flood were not significantly related to the placental mRNA levels *HSD11B1* (Table S4A).

3.4.2. Glucocorticoid inhibiting genes (*HSD11B2* and *NR3C1- β*).

After controlling for timing of exposure, objective hardship, and composite subjective distress did not significantly account for any of the variance of mRNA levels of the *HSD11B2* (Table S5). After controlling for the non-significant effects of timing of exposure and objective hardship, composite subjective distress levels were significantly related to the mRNA levels of *NR3C1- β* , accounting for 15.1% of the variance in male placentas. Increased levels of maternal composite subjective distress were related to lower mRNA levels of this gene (Table 4C). In order to determine which aspect of the mothers' subjective distress was related to the mRNA levels of *NR3C1- β* , separate

regression analyses were conducted by replacing composite subjective distress levels with PTSD-like symptoms, peritraumatic distress and peritraumatic dissociation levels. After controlling for the non-significant effects of timing of exposure and objective hardship, PTSD-like symptoms levels were significantly related to the mRNA levels of *NR3C1-β*, accounting for 8.3% of additional variance in male placentas. Increased levels of maternal PTSD-like symptoms were related to lower mRNA levels of this gene (Table S4B). Likewise, after controlling for the non-significant effects of timing of exposure and objective hardship, both peritraumatic distress ($p = .070$) and peritraumatic dissociation ($p = .063$) levels tended to be associated with lower mRNA levels *NR3C1-β*, accounting for 6.6% and 6.9% of the variance in male placentas, respectively (Table S4B).

3.4.3 Glucose transporter genes (*SLC2A1, SLC2A3, SLC2A4*). Timing of exposure, objective hardship, and composite subjective distress did not significantly account for any of the variance of mRNA levels of any of the glucose transporter genes in male placentas (Table S5).

3.5 Hierarchical multiple linear regression of PNMS on placental mRNA level for female placentas

3.5.1 Glucocorticoid promoting genes (*CRH, NR3C1-α, HSD11B1*). Timing of exposure, objective hardship, and composite subjective distress did not significantly account for any of the variance of mRNA levels of any of the three glucocorticoid promoting genes (*CRH, NR3C1-α, HSD11B1*) in female placentas (Table S5). However, there was a marginally significant timing x subjective distress interaction for CRH mRNA level with a significant reduction in CRH with higher composite subjective distress if the flood occurred later in pregnancy (Table S6).

3.5.2 Glucocorticoid inhibiting genes (*HSD11B2 and NR3C1-β*). After controlling for timing of exposure, objective hardship, and composite subjective distress did not significantly account for any of the variance of mRNA levels of the *HSD11B2* nor *NR3C1-β* in female placentas (Table S5).

3.5.3 Glucose transporter genes (*SLC2A1, SLC2A3, SLC2A4*). After controlling for the non-significant effects of timing of exposure, there was a trend for higher objective hardship levels to be associated with lower *SLC2A1* gene mRNA levels in female placentas ($p = .053$), explaining 8.5% of the variance (Table S5). After controlling for the non-significant effects of timing of exposure and objective hardship, there was a trend ($p = .057$) for higher composite subjective distress levels to be associated with higher *SLC2A4* gene mRNA levels in female placentas, explaining 8.5% of the variance (Table S5).

4. DISCUSSION

This study is the first to assess the effect of natural disaster-related PNMS on the placental glucocorticoid system and glucose transporters. We hypothesized that greater PNMS would be associated with a decrease in placental gene expression levels associated with reducing glucocorticoid effects, and an increase in the expression levels of the genes associated with promoting glucocorticoid effects. We also hypothesized a reduction in the placental level of GLUT1 and an increased level of GLUT4 with increased PNMS exposure. By studying the placentas from women exposed to a major flood with sudden onset in either their first or second trimester of pregnancy, we could study the relative effects of two distinct elements of PNMS: the objective severity of the pregnant women's exposure and the severity of their subjective stress response. Suspecting that the timing of the stress in pregnancy might moderate PNMS effects, we tested relevant interactions.

4.1. Placental glucocorticoid system

We found that the objective hardship (QFOSS) from a natural disaster did not predict placental mRNA level of genes implicated in the glucocorticoid system. However, in accord with our hypothesis, we found that, after controlling for objective hardship, exposure to high composite subjective distress (COSMOSS) levels were significantly related to a reduction in *NR3C1-β* mRNA levels in male placentas. GR-β is a cortisol inhibiting protein as it binds to GR-α in the nucleus and inhibits its transcription factor function (Oakley & Cidlowski, 2013). Placental GR-β has been neglected in anxiety, depression and PNMS studies. Our results suggest that the reduction in *NR3C1-β* mRNA level would be associated with a lower GR-β protein level leading to a higher sensitivity to glucocorticoids for male placentas.

The timing of exposure to the Queensland floods during pregnancy was a significant moderator on the effect of composite subjective distress, controlling for objective stress, on placental levels of two glucocorticoid-promoting genes in male placentas: *HSD11B1* and *NR3C1-α*. We found that for early exposure, there was no significant effect of composite subjective distress, but for women exposed to the flood during mid-pregnancy (beyond 3.6 months or beyond 5.3 months, respectively) there was a significant reduction in placental *NR3C1-α* and *HSD11B1* mRNA associated with high maternal composite subjective distress levels. We also observed that the timing of exposure effect was especially strong for PTSD-like symptoms from 104 days of gestation onwards, compared to peritraumatic distress or dissociation levels at the time of the flood. Thus, placental

functioning in months 3-5 of pregnancy appear to be particularly susceptible to heightened levels of maternal subjective distress.

While *NR3C1-α* expression is highly studied in the placenta, to our knowledge, this is the first study demonstrating an association between natural disaster-related PNMS and an alteration in placental *NR3C1-β* mRNA levels, as well as an effect of timing of exposure as a moderator of PNMS on placental *NR3C1-α* and *HSD11B1*. Furthermore, we observed a marginally significant interaction between composite subjective distress and timing of exposure for *CRH* mRNA level for females only, with a significant reduction in *CRH* mRNA with higher composite subjective distress if the flood occurred later in pregnancy (data not shown). These results suggest that different types of PNMS influence placental glucocorticoid sensitivity differently depending on the timing of the stressor *in utero*, with early- (months 1-2) or mid- (months 3-5) pregnancy stress associated respectively with no effect, or with a decrease in sensitivity to glucocorticoids in the term placentas. This moderating effect of timing of exposure on placental function could explain why prior research has found that timing of exposure to PNMS has different programming effects on child neurodevelopment (Cao *et al.*, 2014; Simcock *et al.*, 2016).

The human *NR3C1* gene can produce GR- α , GR- β , GR- γ , GR-A and GR-P isoforms through alternative splicing or translation initiation (Oakley & Cidlowski, 2013). Moreover, there are eight isoforms originating from the *NR3C1-α* mRNA (Mina *et al.*, 2015; Saif *et al.*, 2014a). The difference in isoform expression was thought to mediate in part the sexually dimorphic placental response to PNMS (Clifton, 2010a; Saif *et al.*, 2014a; St-Pierre *et al.*, 2016c). This difference is seen in our results as placental *NR3C1-β* mRNA levels of female placentas were not significantly reduced by composite subjective distress levels, unlike the reduced *NR3C1-β* mRNA levels observed in male placentas. However, it is also possible that other GR isoforms would be implicated in placental glucocorticoid sensitivity or resistance. Further studies are needed to assess the effect on different expression level of GR in the placenta and possibly associate the change in GR isoform level to fetal programming.

Interestingly, natural disaster-related PNMS did not affect placental 11 β -HSD2 expression or activity for either male or female placentas, which is not concordant with the current literature. O'Donnell *et al.* observed a reduction in *HSD11B2* mRNA level and 11 β -HSD2 activity with higher maternal anxiety one day before elective cesarean section (O'Donnell *et al.*, 2011a). Another study also found a negative (but weak) correlation of *HSD11B2* with both anxiety and depression in the third trimester (Seth *et al.*, 2015). Similar results on the activity and mRNA level were also observed for restraint stress on rats in late gestation (Mairesse *et al.*, 2007a). Another study found lower *HSD11B2* mRNA levels in placentas of male infants were associated with higher maternal life

satisfaction at pregnancy week 17, but observed higher *HSD11B2* mRNA levels for placentas from female infants with a higher maternal life satisfaction in mothers at 36 weeks of pregnancy (Mina *et al.*, 2015). In the same study, depression at pregnancy week 36 was also linked to lower placental *HSD11B2* mRNA levels. These studies have in common the fact that maternal stress was assessed in late gestation, near the time of delivery, unlike our study where late-gestation placentas were unavailable. While these results conflict with those obtained in the present study, stress from a natural disaster has a sudden in onset, while in other studies, anxiety, depression and life satisfaction is usually a prolonged state and/or even a stable trait in people. As such, our 'stress' method used in the present study more closely resembles that used in experimental animal studies (randomly assigned prenatal stress) than it does of human studies of maternal psychological functioning. Further studies are needed to confirm our observations on the effect of natural disaster-related PNMS on placental 11 β -HSD2 expression and activity.

Altogether, our data suggests another mechanism by which PNMS increases placental glucocorticoid sensitivity, while not compromising cortisol transfer to the fetus, for example, changing 11 β -HSD-1, -2 expression, and demonstrates the importance of considering other components of the placental glucocorticoid system in further studies.

4.2. Placental glucose transporters

In accord with our hypothesis, higher levels of composite subjective distress were marginally associated with higher *SLC2A4* mRNA levels for female placentas, while higher objective hardship was correlated with lower placental *SLC2A1* mRNA levels also for female placentas (with no effect of GLUT1 protein level). This suggests that PNMS could modify the *SLC2A1*: *SLC2A4* ratio, and thus the glucose transfer from the mother to the female fetus, suggesting a potentially different adaptation strategy for glucose transport in the placenta according to fetal sex.

These results suggest that when stressed in pregnancy, the glucose transport across the placenta seems to promote insulin-sensitive GLUT4 instead of the omnipresent GLUT1 in female placentas. GLUT1 is highly expressed in the human third trimester placentas while GLUT4 is expressed at a higher level in early gestation (Baumann *et al.*, 2002; Ericsson *et al.*, 2005b), suggesting that GLUT1 is the major glucose transporter to meet the fetal glucose needs in late gestation. Our data are in accordance with the literature showing that glucocorticoids reduce the placental *SLC2A1* mRNA level in primary trophoblast cell *in vitro* and *in vivo* in rat models (Hahn *et al.*, 1999). PNMS also has been shown to reduce placental GLUT1 protein level in rats and was associated with lower plasma glucose level in the fetus (Mairesse *et al.*, 2007a). The latter study also showed an increase in

placental GLUT4 protein level at term when dams were stressed which complements our findings that composite subjective distress levels were positively associated with placental *SLC2A4* mRNA levels. However, the same study also reported a slightly higher level of GLUT3 in the placentas of stressed rats while no alteration of *SLC2A3* was observed in our study. Further investigations are necessary to determine if these effects of PNMS on glucose transporters are linked with child metabolic programming.

4.3. Strengths

The use of a natural disaster as a stressor has clear advantages for studying the psychobiological mechanisms of fetal programming in humans. The objective severity of exposure to many natural disasters is quasi-randomly distributed in the population, typically has a sudden onset that affects pregnant women at various times in gestation, and occurs independently from the pregnant women's mental health or personality traits (King *et al.*, 2005). The use of multiple maternal stress assessments (objective hardship, PTSD-like symptoms, peritraumatic distress and dissociative experiences) is also a strength of this study. Furthermore, because we analyzed the effect of objective hardship independently from the mother's subjective distress, we were able to untangle their effects on placental mRNA levels of target genes.

4.4. Limitations

Limitations include the relatively small number of placental samples, and the lack of placentas from women not exposed to the flood, as well as the missing placentas of women exposed to the flood in the third trimester who gave birth before ethics approval for the study was obtained. This is a common challenge for this kind of study where we are dealing with a sudden and unpredictable natural disaster. We did not account for multiple testing in our analysis of data and thus the risk of type I errors has not been accounted for. While we do use a scale to measure PNMS from little to extremely stressed, we did not use a non-exposed similar cohort for biomarkers comparison. Finally, we were not able to control for maternal factors such as, drug use, alcohol consumption, smoking, diet or exercise that might influence placental biomarkers prior to or following PNMS exposure.

5. CONCLUSION

Although results did not show any effects of PNMS on placental 11 β -HSD2 mRNA, protein and activity, we showed a reduction in placental *NR3C1- β* mRNA in male placentas. Thus, our data shows evidence of distinct placental glucocorticoid and glucose systems adaptations to PNMS as a function of fetal sex and timing of exposure during pregnancy, with high composite subjective distress levels in mid-pregnancy associated with lower levels of expression of GC-inhibiting genes in male placentas, suggesting that in the QF2011 cohort males were sensitive to glucocorticoids ~~and~~ while female fetuses induced strategies to that promoted normal growth. Another major finding was that pregnancy months 3-6 appear to be a period of susceptibility to the effects of natural disaster-related PNMS on the placenta relative to earlier months; we can make no conclusions about third trimester exposure. While the results presented here confirm that natural disaster-related PNMS affects the placental glucocorticoid and glucose systems, the exact mechanism by which natural disaster-related PNMS acts on the placenta and impacts fetal growth and programming requires further investigation. A thorough understanding of how natural disaster-related PNMS influences the placental glucocorticoid system and glucose transport will provide a better appreciation of the role of the placenta in the fetal adaptive response to *in utero* exposure to stress. Since the placenta is easily accessible at birth, our study has high translational potential and may be useful in predicting the effect of natural disaster-related PNMS exposure on programming.

DISCLOSURE STATEMENT and CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest and have nothing to disclose.

CONTRIBUTORS

C. Vaillancourt, S. King, S. Kildea, P. Dawson, and D.P. Laplante participated in study conception and design as well as revising critically the manuscript. J. St-Pierre and P. Dawson were involved in the collection, preparation and storage of the placentas. J. St-Pierre drafted the manuscript and did the placental experimental work and the data acquisition, and did the statistical analysis under supervision of G. Elgbeili. J St-Pierre and C. Vaillancourt contributed to the analysis and interpretation of data. All authors have approved the final version of the article.

ROLE OF THE FUNDING SOURCE

Funding sources had no involvement in this article outside of financial support.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR; MOP-115067) to S. King, S. Kildea and colleagues and the Mater Research Institute and the Mater Health Service. J. St-Pierre was supported by the *Fond de recherche du Québec en santé (FRSQ)*. We are grateful to Vicki Clifton for critical comments on the manuscript. The authors wish to thank all the families who have participated in the QF2011 study, Matthew Cook, Laura Shoo and Jack Callum for their help with placental collection, as well as Donna Amaraddio, Belinda Lequertier, and Katrina Moss for data collection.

REFERENCES

- Baumann, M.U., Deborde, S., Illsley, N.P., 2002. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* 19, 13-22.
- Brown, K., Heller, D.S., Zamudio, S., Illsley, N.P., 2011. Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation. *Placenta* 32, 1041-1049.
- Brunet, A., Weiss, D.S., Metzler, T.J., Best, S.R., Neylan, T.C., Rogers, C., Fagan, J., Marmar, C.R., 2001. The Peritraumatic Distress Inventory: a proposed measure of PTSD criterion A2. *The American journal of psychiatry* 158, 1480-1485.
- Brunton, P.J., Russell, J.A., 2011. Neuroendocrine control of maternal stress responses and fetal programming by stress in pregnancy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35, 1178-1191.
- Buss, C., Davis, E.P., Muftuler, L.T., Head, K., Sandman, C.A., 2010. High pregnancy anxiety during mid-gestation is associated with decreased gray matter density in 6-9-year-old children. *Psychoneuroendocrinology* 35, 141-153.
- Cao, X., Laplante, D.P., Brunet, A., Ciampi, A., King, S., 2014. Prenatal maternal stress affects motor function in 5 1/2-year-old children: Project Ice Storm. *Developmental Psychobiology* 56, 117-125.
- Clifton, V.L., 2010. Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta* 31 Suppl, S33-39.
- Cox, J.L., Chapman, G., Murray, D., Jones, P., 1996. Validation of the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) in non-postnatal women. *J Affect Disord* 39, 185-189.
- Dancause, K.N., Laplante, D.P., Hart, K.J., O'Hara, M.W., Elgbeili, G., Brunet, A., King, S., 2015. Prenatal stress due to a natural disaster predicts adiposity in childhood: The Iowa flood study. *J. Obes.* 2015.

- Davis, E.P., Glynn, L.M., Waffarn, F., Sandman, C.A., 2011. Prenatal maternal stress programs infant stress regulation. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* 52, 119-129.
- Draper, N., Stewart, P.M., 2005. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *Journal of Endocrinology* 186, 251-271.
- Ericsson, A., Hamark, B., Powell, T.L., Jansson, T., 2005. Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Human Reproduction* 20, 521-530.
- Glover, V., Hill, J., 2012. Sex differences in the programming effects of prenatal stress on psychopathology and stress responses: An evolutionary perspective. *Physiology and Behavior* 106, 736-740.
- Hahn, T., Barth, S., Graf, R., Engelmann, M., Beslagic, D., Reul, J.M.H.M., Holsboer, F., Dohr, G., Desoye, G., 1999. Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84, 1445-1452.
- Hayes, A., 2013. *Introduction to Mediation, Moderation, and Conditional Process Analysis*. The Guilford Press, New York.
- Jansson, T., Wennergren, M., Illsley, N.P., 1993. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77, 1554-1562.
- King, S., Kildea, S., Austin, M.-P., Brunet, A., Cobham, V.E., Dawson, P.A., Harris, M., Hurrion, E.M., Laplante, D.P., McDermott, B.M., McIntyre, H.D., O'Hara, M.W., Schmitz, N., Stapleton, H., Tracy, S.K., Vaillancourt, C., Dancause, K.N., Kruske, S., Reilly, N., Shoo, L., Simcock, G., Turcotte-Tremblay, A.-M., Yong Ping, E., 2015. QF2011: a protocol to study the effects of the Queensland flood on pregnant women, their pregnancies, and their children's early development. *BMC Pregnancy & Childbirth* 15, 109.
- King, S., Laplante, D., Joober, R., 2005. Understanding putative risk factors for schizophrenia: retrospective and prospective studies. *J Psychiatry Neurosci* 30, 342-348.
- King, S., Mancini-Marie, A., Brunet, A., Walker, E., Meaney, M.J., Laplante, D.P., 2009. Prenatal maternal stress from a natural disaster predicts dermatoglyphic asymmetry in humans. *Development and Psychopathology* 21, 343-353.
- Lanoix, D., Lacasse, A.A., St-Pierre, J., Taylor, S.C., Ethier-Chiasson, M., Lafond, J., Vaillancourt, C., 2012. Quantitative PCR Pitfalls: The Case of the Human Placenta. *Molecular Biotechnology*, 1-10.

- Laplante, D.P., Barr, R.G., Brunet, A., Du Fort, G.G., Meaney, M.L., Saucier, J.F., Zelazo, P.R., King, S., 2004. Stress during pregnancy affects general intellectual and language functioning in human toddlers. *Pediatric Research* 56, 400-410.
- Laplante, D.P., Zelazo, P.R., Brunet, A., King, S., 2007. Functional play at 2 years of age: Effects of prenatal maternal stress. *Infancy* 12, 69-93.
- Mairesse, J., Lesage, J., Breton, C., Br√©ant, B., Hahn, T., Darnaud√©ry, M., Dickson, S.L., Seckl, J., Blondeau, B., Vieau, D., Maccari, S., Viltart, O., 2007. Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 292.
- Marmar, C.R., Weiss, D.S., Metzler, T.J. , 1997. The peritraumatic dissociative experiences questionnaire Assessing Psychological Trauma and PTSD pp. pp. 412-428.
- Mayhew, T.M., 2006. Stereology and the placenta: where's the point? -- a review. *Placenta* 27 Suppl A, S17-25.
- Mina, T.H., Raikokonen, K., Riley, S.C., Norman, J.E., Reynolds, R.M., 2015. Maternal distress associates with placental genes regulating fetal glucocorticoid exposure and IGF2: Role of obesity and sex. *Psychoneuroendocrinology* 59, 112-122.
- O'Connor, T.G., Ben-Shlomo, Y., Heron, J., Golding, J., Adams, D., Glover, V., 2005. Prenatal anxiety predicts individual differences in cortisol in pre-adolescent children. *Biological Psychiatry* 58, 211-217.
- O'Donnell, K.J., Bugge Jensen, A., Freeman, L., Khalife, N., O'Connor, T.G., Glover, V., 2011. Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11β-HSD2. *Psychoneuroendocrinology*.
- Oakley, R.H., Cidlowski, J.A., 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 132, 1033-1044.
- Peña, C.J., Monk, C., Champagne, F.A., 2012. Epigenetic effects of Prenatal stress on 11β-Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 in the Placenta and fetal brain. *PLoS ONE* 7.
- Pink, B., 2011. Socio-Economic Indexes for Areas (SEIFA) - Technical Paper, Secondary Socio-Economic Indexes for Areas (SEIFA)- Technical Paper.
- Ponder, K.L., Salisbury, A., McGonnigal, B., Laliberte, A., Lester, B., Padbury, J.F., 2011. Maternal depression and anxiety are associated with altered gene expression in the human placenta without modification by antidepressant use: Implications for fetal programming. *Developmental Psychobiology* 53, 711-723.

- Räikkönen, K., Pesonen, A.K., O'Reilly, J.R., Tuovinen, S., Lahti, M., Kajantie, E., Villa, P., Laivuori, H., Hämäläinen, E., Seckl, J.R., Reynolds, R.M., 2015. Maternal depressive symptoms during pregnancy, placental expression of genes regulating glucocorticoid and serotonin function and infant regulatory behaviors. *Psychological Medicine* 45, 3217-3226.
- Saif, Z., Hodyl, N.A., Hobbs, E., Tuck, A.R., Butler, M.S., Osei-Kumah, A., Clifton, V.L., 2014. The human placenta expresses multiple glucocorticoid receptor isoforms that are altered by fetal sex, growth restriction and maternal asthma. *Placenta* 35, 260-268.
- Saif, Z., Hodyl, N.A., Stark, M.J., Fuller, P.J., Cole, T., Lu, N., Clifton, V.L., 2015. Expression of eight glucocorticoid receptor isoforms in the human preterm placenta vary with fetal sex and birthweight. *Placenta* 36, 723-730.
- Seckl, J.R., Holmes, M.C., 2007. Mechanisms of disease: Glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism* 3, 479-488.
- Seth, S., Lewis, A.J., Saffery, R., Lappas, M., Galbally, M., 2015. Maternal Prenatal Mental Health and Placental 11beta-HSD2 Gene Expression: Initial Findings from the Mercy Pregnancy and Emotional Wellbeing Study. *International journal of molecular sciences* 16, 27482-27496.
- Simcock, G., Kildea, S., Elgbeili, G., Laplante, D.P., Cobham, V., King, S., 2017. Prenatal maternal stress shapes children's theory of mind: the QF2011 Queensland Flood Study. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 1-10.
- Simcock, G., Kildea, S., Elgbeili, G., Laplante, D.P., Stapleton, H., Cobham, V., King, S., 2016. Age-related changes in the effects of stress in pregnancy on infant motor development by maternal report: The Queensland Flood Study. *Developmental psychobiology* 58, 640-659.
- Spielberger, C.D., 2010. State-Trait Anxiety Inventory, *The Corsini Encyclopedia of Psychology*. John Wiley & Sons, Inc.
- St-Pierre, J., Fraser, M., Vaillancourt, C., 2016a. Inhibition of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by lead. *Reproductive Toxicology* 65, 133-138.
- St-Pierre, J., Grégoire, J.-C., Vaillancourt, C., 2017. A simple method to assess group difference in RT-qPCR reference gene selection using GeNorm: The case of the placental sex. *Scientific Reports* 7, 16923.
- St-Pierre, J., Laurent, L., King, S., Vaillancourt, C., 2016b. Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta* 48 Suppl 1, S66-S71.

- Tomlinson, J.W., Walker, E.A., Bujalska, I.J., Draper, N., Lavery, G.G., Cooper, M.S., Hewison, M., Stewart, P.M., 2004. 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: A tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocrine Reviews* 25, 831-866.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3.
- Walder, D.J., Laplante, D.P., Sousa-Pires, A., Veru, F., Brunet, A., King, S., 2014. Prenatal maternal stress predicts autism traits in 61/2 year-old children: Project Ice Storm. *Psychiatry Res.* 219, 353-360.
- Weiss, D.S., Marmar, C.R., 1997. The impact of event scale-revised *Assessing Psychological Trauma and PTSD* pp. pp. 399-411.
- Yong Ping, E., Laplante, D.P., Elgbeili, G., Hillerer, K.M., Brunet, A., O'Hara, M.W., King, S., 2015. Prenatal maternal stress predicts stress reactivity at 2(1/2) years of age: the Iowa Flood Study. *Psychoneuroendocrinology* 56, 62-78.

FIGURE LEGENDS

Fig.1: Significant moderation of the effect of subjective distress (COSMOSS) on placental (A-B) glucocorticoid receptor α (*NR3C1- α*), and (C-D) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (*HSD11B1*) mRNA levels by timing of exposure in gestation. Vertical solid (or dashed) lines represent the significance threshold of the region of significance showing significant (or marginal) subjective stress effects at later timing of exposure in A) and C); and significant (or marginal) timing effects at B) higher COSMOSS and D) lower COSMOSS. “Early” pregnancy is represented at 2 weeks of pregnancy and earlier, and “mid” is represented at 20 weeks of pregnancy and later. “Low” subjective stress is represented by 0.89 SD below the mean and “high” subjective stress is represented by 1.27 SD above mean. In panels A and C, the darker the shade of grey of a data point, the higher the composite subjective stress level of the participant. In panels B and D, the darker the shade of grey of a data point, the later the timing of exposure in gestation for the participant. Slope significance legend: * $p < 0.05$; $\sim p < 0.1$. See also table 4.

Table 1: Characteristics of the cohort

	Male Mean (n, SD)	Female Mean (n, SD)	Sig.
Predictor variables			
QFOSS	16.45 (51, 15.51)	18.20 (45, 14.72)	0.574
COSMOSS	-0.08 (51, 1.02)	-0.25 (45, 0.59)	0.324
IES-R	6.30 (51, 10.86)	4.25 (45, 7.07)	0.282
PDI	11.50 (51, 9.03)	9.72 (45, 6.38)	0.273
PDEQ	4.85 (51, 7.18)	4.41 (45, 4.10)	0.722
Covariates			
STAI	38.26 (51, 8.45)	34.40 (45, 9.37)	0.036*
EDS	5.07 (44, 3.55)	4.87 (39, 4.41)	0.823
SEIFA	1043.43 (51, 67.95)	1057.47 (45, 50.65)	0.259
Days of pregnancy at the flood	78.34 (51, 46.58)	86.79 (45, 50.25)	0.395
Pregnancy characteristics			
Gestation length (weeks)	39.37 (51, 1.25)	39.53 (45, 1.12)	0.510
Birth weight (Kg)	3.62 (51, 0.43)	3.58 (45, 0.38)	0.635
Birth weight for gestational age	0.26 (51, 0.78)	0.40 (45, 0.67)	0.335
Placental weight (kg)	0.65 (50, 0.12)	0.65 (43, 0.13)	0.889
Placental index	0.18 (50, 0.03)	0.18 (43, 0.03)	0.973
Mothers' characteristics			
Previous pregnancies	0.67 (51, 0.88)	0.84 (43, 1.07)	0.400
BMI	24.57 (51, 4.46)	24.50 (44, 5.77)	0.943
Age at birth	30.84 (51, 5.11)	31.15 (45, 5.69)	0.779

Student's t-test, * $p < 0.05$. QFOSS: Queensland Flood Objective Stress Scale; COSMOSS: COmposite Score of the MOther's Subjective Stress; IES-R: Impact of Event Scale - Revised; PDI: Peritraumatic Distress Inventory; PDEQ: Peritraumatic Dissociative Experiences Questionnaire; STAI: State-Trait Anxiety Inventory; EDS: Edinburgh Depression Scale; SEIFA: Socio-Economic Indexes for Areas; BMI: Body mass index; Placental index: placental weight divided by birth weight;

Table 2: Pearson's product moment correlations between placental mRNA level of genes tested separated by fetal sex.

		<u>GC promoting</u>			<u>GC inhibiting</u>			<u>Glucose transporters</u>		
		<i>CRH</i>	<i>NR3C1-α</i>	<i>HSD11B1</i>	<i>HSD11B2</i>	<i>NR3C1-β</i>	<i>NR3C1</i>	<i>SLC2A1</i>	<i>SLC2A3</i>	<i>SLC2A4</i>
<i>CRH</i>	Male									
	Female									
<i>NR3C1-α</i>	Male	.590**								
	Female	.490**								
<i>HSD11B1</i>	Male	.341*	.816**							
	Female	.375*	.645**							
<i>HSD11B2</i>	Male	.145	.102	.175						
	Female	.241	.089	.361*						
<i>NR3C1-β</i>	Male	.129	.187	.175	.353*					
	Female	-.057	.147	.311*	.363*					
<i>NR3C1</i>	Male	<u>.261</u>	.729**	.645**	.165	.277*				
	Female	.423**	.547**	.361*	.099	.019				
<i>SLC2A1</i>	Male	.298*	.286*	.014	-.338*	-.203	.179			
	Female	.317*	.390**	.033	-.307*	-.146	.351*			
<i>SLC2A3</i>	Male	<u>-.233</u>	.045	.089	-.090	-.067	-.087	-.215		
	Female	<u>-.242</u>	.072	-.008	-.066	.066	-.191	-.055		
<i>SLC2A4</i>	Male	<u>-.248</u>	-.040	-.046	-.187	-.293*	-.180	-.097	.503**	
	Female	<u>-.138</u>	.005	-.063	-.082	-.241	-.102	.019	.500**	

CRH: Corticotropin-releasing hormone; *NR3C1*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1; *NR3C1-α*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-α; *NR3C1-β*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-β; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 1; *HSD11B2*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 2; *SLC2A1*: Solute Carrier Family 2 type 1; *SLC2A3*: Solute Carrier Family 2 type 3; *SLC2A4*: Solute Carrier Family 2 type 4. Underline: $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 3: Pearson’s product moment correlations (r) between predictors and placental mRNA level of genes implicated in glucocorticoid (GC) promoting and inhibiting signal, and glucose transport in placentas for males (n=51) and females (n=45).

		GC promoting			GC inhibiting			Glucose transporters		
		<i>CRH</i>	<i>NR3C1-α</i>	<i>HSD11B1</i>	<i>HSD11B2</i>	<i>NR3C1-β</i>	<i>NR3C1</i>	<i>SLC2A1</i>	<i>SLC2A3</i>	<i>SLC2A4</i>
QFOSS	Male	-.027	-.036	-.027	.074	.004	-.176	-.076	.097	-.061
	Female	.010	-.066	.071	.087	-.137	-.131	-.304*	.056	.008
COSMOSS	Male	-.166	-.124	-.098	.018	-.257	-.167	-.007	.117	.159
	Female	-.113	-.026	.076	.112	-.235	-.131	-.254	.053	.231
Timing	Male	.184	.028	.116	-.187	-.167	-.138	.034	.053	-.035
	Female	.121	.366*	.341*	-.036	.172	.145	.134	-.224	-.087
SEIFA	Male	.151	.060	-.075	-.037	.003	-.122	.005	.089	.066
	Female	.224	.366*	.357*	.144	-.028	.086	.066	-.007	.023
STAI	Male	.055	-.068	-.169	.051	-.039	-.110	-.168	.011	.110
	Female	-.144	-.077	.172	.137	-.264	-.153	-.223	.021	.170
EDS	Male	-.100	-.196	-.212	-.095	-.223	-.207	.058	.202	.226
	Female	-.193	-.116	-.067	.086	.244	-.079	-.197	-.019	.024

QFOSS: Queensland Flood Objective stress score; COSMOSS: Composite score of the mother’s subjective stress; STAI: State-trait anxiety inventory; EDS: Edinburgh depression scale; SEIFA: Socio-Economic Indexes for Areas. *CRH*: Corticotropin-releasing hormone; *NR3C1*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1; *NR3C1-α*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-α; *NR3C1-β*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-β *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 1; *HSD11B2*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 2; *SLC2A1*: Solute Carrier Family 2 type 1; *SLC2A3*: Solute Carrier Family 2 type 3; *SLC2A4*: Solute Carrier Family 2 type 4. Underline: $p < 0.10$; *: $p < 0.05$.

Table 4: Significant hierarchical multiple linear regression results of prenatal stress effects and timing of exposure to flood on placental mRNA level of genes tested for male placentas.

<i>Predictor variables</i>	<i>B</i>	<i>Std.Error</i>	<i>β</i>	<i>R</i>	<i>R²</i>	<i>ΔR²</i>	<i>F</i>	<i>ΔF</i>
A) NR3C1-α Males								
Step 1				.028	.001	.001	.039	.039
Step 2	Timing	.028	.143	.028	.040	.002	.039	.039
Step 3	Timing	.018	.152	.018				
	QFOSS	-.030	.152	-.030	.132	.017	.277	.755
Step 4	Timing	-.028	.162	-.028				
	QFOSS	.041	.173	.041	.316	.100	1.274	4.208*
	COSMOSS	-.159	.183	-.159				
	Timing	-.083	.159	-.083				
	QFOSS	.083	.169	.083				
	COSMOSS	-.449	.226	<u>-.449</u>				
	COSMOSS X Timing	-.385	.188	<u>-.382*</u>				
B) HSD11B1 Males								
Step 1				.116	.014	.014	.674	.674
Step 2	Timing	.116	.142	.116	.117	.014	.333	.005
Step 3	Timing	.120	.151	.120				
	QFOSS	.011	.151	.011	.134	.018	.286	.203
Step 4	Timing	.096	.162	.096				
	QFOSS	.048	.173	.048	.313	.098	1.248	4.078*
	COSMOSS	-.082	.183	-.082				
	Timing	.042	.159	.042				
	QFOSS	.089	.169	.089				
	COSMOSS	-.368	.227	-.368				
	COSMOSS X Timing	-.379	.188	<u>-.376*</u>				
C) NR3C1-β Males								
Step 1				.167	.028	.028	1.398	1.398
Step 2	Timing	-.001	.001	-.167	.174	.030	.751	.129
Step 3	Timing	-.001	.001	-.184				
	QFOSS	-.025	.068	-.054	.426	.182	3.476*	8.685**
	Timing	-.002	.001	<u>-.327*</u>				
	QFOSS	.077	.072	.168				
	COSMOSS	-.169	.058	<u>-.491**</u>				

NR3C1-α: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member-α; *NR3C1-β*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member-β; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta Dehydrogenase type 1; QFOSS: Queensland flood objective stress score; COSMOSS: Combined stress measure of the mother's subjective stress. Underline: $p < 0.10$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (See also table S4, S5, S6 and Figure 1).

FIGURE 1

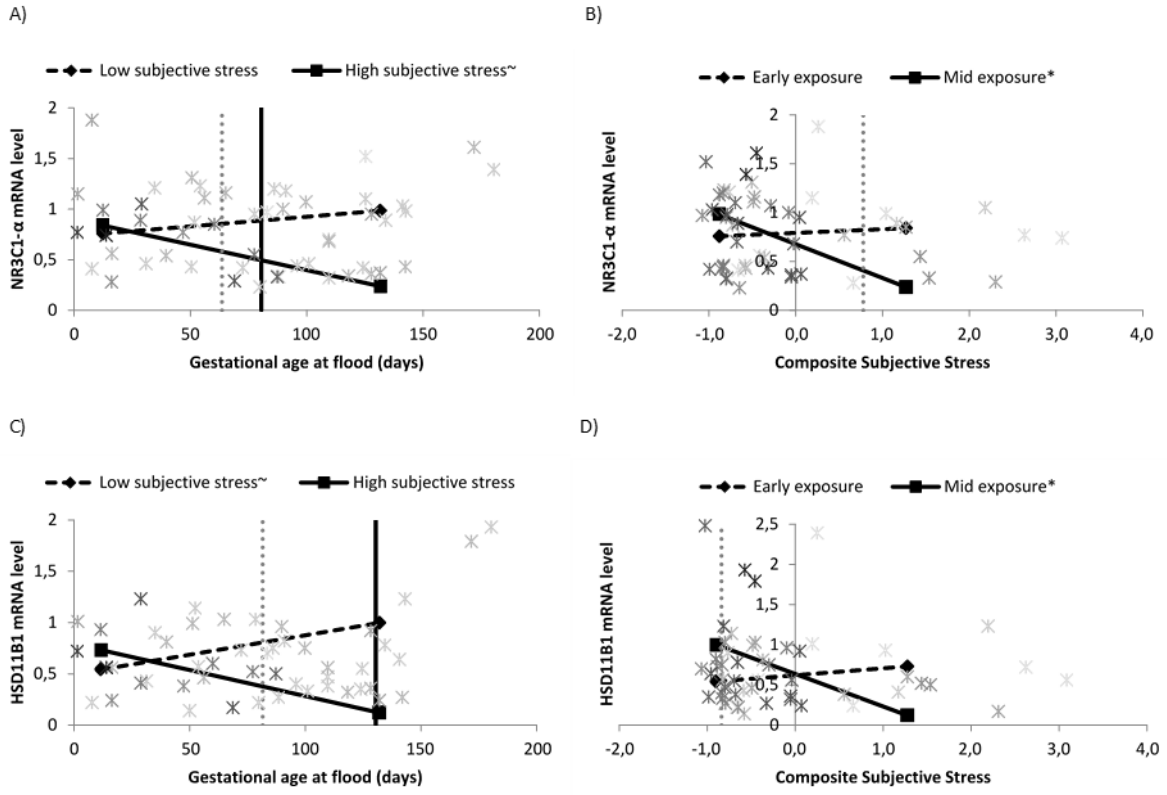


Table S1: Primer sequences of genes analyzed by RT-qPCR

Gene	Accession number	primer sequence sense	Primer sequence antisense
<i>CRH</i>	NM_000756.3	TCTGTACCATAGCGTGCTC	GTTGCTGCTGCACGTGAATA
<i>HPRT1</i>	NM_000194.2	GACCAGTCAACAGGGACATAA	AAGCTTGCGACCTTGACC
<i>HSD11B1</i>	NM_005525.3	AGCAAGTTTGCTTTGGATG	AGAGCTCCCCCTTTGATGAT
<i>HSD11B2</i>	NM_000196.3	TTGTTTCTCGGCACCAGT	GCCCTAATTCTTGAGCCAGT
<i>NR3C1</i>	NC_000005.10	CAAGTGATTGCAGCAGTGAAATG	TTTATGTTTTGCATCTTACCTGGTATTG
<i>NR3C1-α</i>	NM_001204258.1	CTTGGATTCTATGCATGAAGTGGTT	TTGGAAGCAATAGTTAAGGAGATTTTC
<i>NR3C1-β</i>	NM_001020825.1	ACTCTTGGATTCTATGCATGAAAATG	TGTGTGAGATGTGCTTTCTGGTTT
<i>SLC2A1</i>	NM_006516.2	GGCCAAGAGTGTGCTAAAGAA	ACAGCGTTGATGCCAGACAG
<i>SLC2A3</i>	NM_006931.2	GCTGGGCATCGTTGTTGGA	GCACTTTGTAGGATAGCAGGAAG
<i>SLC2A4</i>	NM_001042.2	ATCCTTGGACGATTCCTCATTGG	CAGGTGAGTGGGAGCAATCT
<i>TOP-1</i>	NM_003286.3	GGCGAGTGAATCTAAGG	CTTAAAGGGTACAGCGAATG

CRH: Corticotropin-releasing hormone; *HPRT1*: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase type 1; *HSD11B2*: Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase type 2; *NR3C1- α* : Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1- α ; *NR3C1- β* : Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1- β ; *SLC2A1*: Solute Carrier Family 2 member 1; *SLC2A3*: Solute Carrier Family 2 member 3; *SLC2A4*: Solute Carrier Family 2 member 4; *TOP-1*: Topoisomerase 1. *HPRT1* and *TOP-1* were used as reference genes.

Table S2: Descriptive statistics for placental biomarkers for A) male placentas and B) female placentas.

A) Males							
mRNA level	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Shapiro-Wilk Statistic	Sig.
<i>CRH</i>	51	0.004	4.892	0.936	1.090	.745	.000
<i>NR3C1-α</i>	51	0.254	5.576	1.431	1.067	.862	.000
<i>HSD11B1</i>	51	0.145	10.885	1.469	2.114	.542	.000
<i>HSD11B2</i>	51	0.023	4.606	1.094	0.893	.888	.000
<i>NR3C1-β</i>	51	0.158	4.950	1.139	1.019	.663	.000
<i>NR3C1</i>	51	0.095	6.519	1.097	1.086	.700	.000
<i>SLC2A1</i>	51	0.098	2.532	0.988	0.711	.919	.002
<i>SLC2A3</i>	51	0.169	2.538	1.120	0.508	.955	.050
<i>SLC2A4</i>	51	0.133	2.700	0.891	0.559	.913	.001
11β-HSD2 protein	50	0.002	172.848	17.888	35.757	3.171	0.337
GLUT1 protein	50	0.327	2.264	1.098	0.417	.977	.437
11β-HSD2 activity	51	0.000	339.216	101.514	76.642	.898	.000

B) Females							
mRNA level	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation	Shapiro-Wilk Statistic	Sig.
<i>CRH</i>	45	0.002	7.433	1.391	1.514	.798	.000
<i>NR3C1-α</i>	45	0.269	3.771	1.327	0.818	.901	.001
<i>HSD11B1</i>	45	0.132	4.339	1.380	1.174	.865	.000
<i>HSD11B2</i>	45	0.024	4.028	1.110	1.046	.865	.000
<i>NR3C1-β</i>	45	0.283	4.950	0.942	0.800	.656	.000
<i>NR3C1</i>	45	0.170	6.519	1.109	1.209	.614	.000
<i>SLC2A1</i>	45	0.075	2.789	0.851	0.673	.872	.000
<i>SLC2A3</i>	45	0.367	2.635	1.017	0.487	.915	.003
<i>SLC2A4</i>	45	0.134	2.519	1.037	0.601	.939	.020
11β-HSD2 protein	44	0.302	332.419	25.302	67.134	.394	.000
GLUT1 protein	44	0.447	2.154	1.182	0.452	.938	.019
11β-HSD2 activity	45	14.882	254.080	111.967	71.120	.931	.011

CRH: Corticotropin-releasing hormone; *NR3C1-α*, *-β*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1- α , $-\beta$; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 1; *11β-HSD2* and *HSD11B2*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 2; *GLUT1*: glucose transporter type 1; *SLC2A1*: Solute Carrier Family 2 type 1; *SLC2A3*: Solute Carrier Family 2 type 3; *SLC2A4*: Solute Carrier Family 2 type 4

Table S3: Comparison of mRNA level, protein expression and 11 β -HSD2 activity between male and female placentas.

mRNA	Sex	Mean	Std. Deviation	Sig.
CRH	Male	.549	.444	<u>.086</u>
	Female	.721	.529	
NR3C1-α	Male	.808	.396	.815
	Female	.790	.329	
HSD11B1	Male	.728	.514	.761
	Female	.758	.464	
HSD11B2	Male	.660	.394	.824
	Female	.641	.454	
NR3C1-β	Male	.687	.353	.255
	Female	.610	.302	
SLC2A1	Male	.626	.350	.337
	Female	.559	.330	
SLC2A3	Male	.725	.234	.300
	Female	.676	.226	
SLC2A4	Male	.598	.276	.208
	Female	.671	.286	
Protein				
11β-HSD2	Male	1.885	1.381	.844
	Female	1.941	1.384	
GLUT1	Male	.722	.201	.360
	Female	.760	.203	
Activity				
11β-HSD2	Male	4.267	1.057	.258
	Female	4.484	.771	

CRH: Corticotropin-releasing hormone; *NR3C1*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1; *NR3C1- α* : Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1- α ; *NR3C1- β* : Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1- β ; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 1; 11 β -HSD2 and *HSD11B2*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 2; GLUT1: glucose transporter type 1; *SLC2A1*: Solute Carrier Family 2 type 1; *SLC2A3*: Solute Carrier Family 2 type 3; *SLC2A4*: Solute Carrier Family 2 type 4. Independent samples T-Tests. Underline: $p < 0.10$.

Table S4: A) Interaction effect (R^2 change) of the timing of the stressful event on the effect of stress on *NR3C1* - α and *HSD11B1* for male placentas. B) Standardized coefficients from hierarchical multiple linear regression of subjective stress measures on placental *NR3C1*- β and *NR3C1* - α for male placentas only following significant COSMOSS effect.

(A)

Predictor	<i>NR3C1</i> - α males	<i>HSD11B1</i> males
IES-R x timing	.142**	.144**
PDI x timing	.018	.045
PDEQ x timing	.038	.075

(B)

Predictor	<i>NR3C1</i> - β males
IES-R	-.363*
PDI	-.305
PDEQ	-.303

IES-R: Impact of event scale – revised; PDI: Peritraumatic distress inventory; PDEQ: peritraumatic dissociative experiences questionnaire; *NR3C1*- β , - α : Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1- β , - α ; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta Dehydrogenase type 1; *SLC2A4*: Solute Carrier Family 2 member 4. Underline $p < 0.10$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Table S5: Standardized coefficients (adjusted for covariates) from hierarchical multiple linear regression of stress measures effect on placental glucocorticoid system and glucose transporters.

mRNA	Male		Female	
	QFOSS ^a	COSMOSS ^b	QFOSS ^a	COSMOSS ^b
<i>CRH</i>	.035	-.159	.022	-.202
<i>NR3C1-α</i>	-.030	-.159	-.134 ^c	-.037 ^c
<i>HSD11B1</i>	.011	-.082	-.101 ^{c,d}	-.107 ^{c,d}
<i>HSD11B2</i>	.017	-.111	.085	.097
<i>NR3C1-β</i>	-.054	-.491**	-.125 ^e	-.286 ^e
<i>NR3C1</i>	-.244	-.205	-.118	-.099
<i>SLC2A1</i>	-.072	.058	<u>-.293</u>	-.126
<i>SLC2A3</i>	.127	.142	.033	.058
<i>SLC2A4</i>	-.081	.281	-.001	<u>.366</u>
Protein				
11β-HSD2	-.113	-.179	.064 ^c	-.040 ^c
GLUT1	.071	.068	.003 ^e	-.305 ^e
Activity				
11β-HSD2	-.140	.168	-.053 ^e	.194 ^e

^a Adjusted for timing; ^b Adjusted for timing, and objective hardship; ^c Also adjusted for SES; ^d Also adjusted for maternal anxiety; ^e Also adjusted for maternal depression.

QFOSS: Queensland flood objective stress score; COSMOSS: Composite score of the mother's subjective stress; *CRH*: Corticotropin-releasing hormone; *NR3C1*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1; *NR3C1-α*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-α; *NR3C1-β*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-β; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 1; 11β-HSD2 and *HSD11B2*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 2; GLUT1: glucose transporter type 1; *SLC2A1*: Solute Carrier Family 2 type 1; *SLC2A3*: Solute Carrier Family 2 type 3; *SLC2A4*: Solute Carrier Family 2 type 4. Underline: $p < 0.10$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

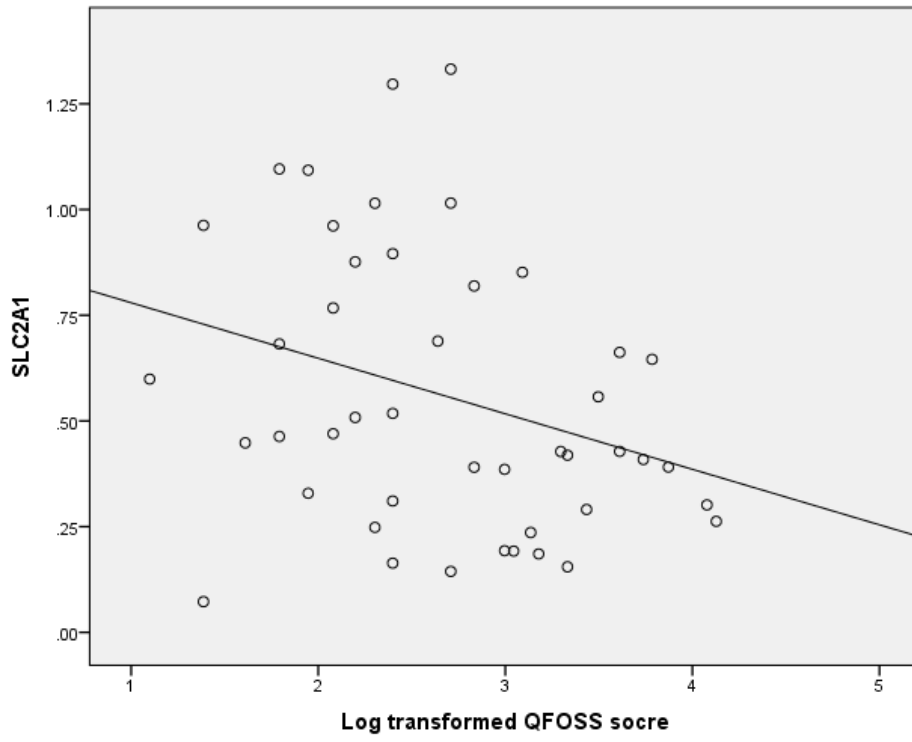
Table S6: Interaction effect (R² change) of the timing of the stressful event on the effect of stress on placental glucocorticoid system and glucose transporters separated by fetal sex.

Gene	Interaction timing			
	Males		Females	
	QFOSS ^a	COSMOSS ^b	QFOSS ^a	COSMOSS ^b
<i>CRH</i>	.027	.000	.023	.070
<i>NR3C1-α</i>	.007	.082*	.012 ^c	.002 ^c
<i>HSD11B1</i>	.007	.080*	.008 ^{c,d}	.000 ^{c,d}
<i>HSD11B2</i>	.000	.028	.018	.025
<i>NR3C1-β</i>	.001	.000	.021 ^e	.009 ^e
<i>NR3C1</i>	.007	.016	.063	.032
<i>SLC2A1</i>	.006	.006	.030	.033
<i>SLC2A3</i>	.014	.018	.021	.010
<i>SLC2A4</i>	.011	.012	.001	.053
Protein				
11β-HSD2	.035	.005	.000 ^c	.000 ^c
GLUT1	.015	.001	.001 ^e	.048 ^e
Activity				
11β-HSD2	.023	.005	.025 ^e	.031 ^e

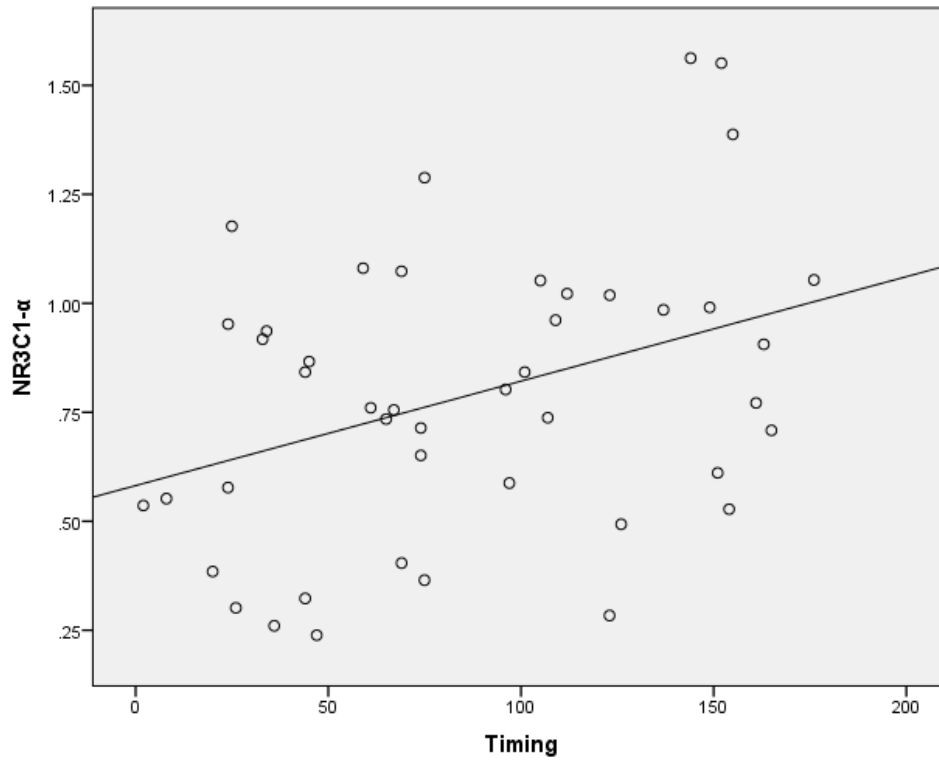
^a Adjusted for Timing; ^b Adjusted for Timing and QFOSS; ^c Also adjusted for SES; ^d Also adjusted for maternal anxiety; ^e Also adjusted for maternal depression.

QFOSS: Queensland flood objective stress score; COSMOSS: Composite score of the mother's subjective stress; *CRH*: Corticotropin-releasing hormone; *NR3C1-α, -β*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-α, -β; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 1; 11β-HSD2 and *HSD11B2*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 2; GLUT1: glucose transporter type 1; *SLC2A1*: Solute Carrier Family 2 type 1; *SLC2A3*: Solute Carrier Family 2 type 3; *SLC2A4*: Solute Carrier Family 2 type 4. Underline $p < 0.10$; * $p < 0.05$.

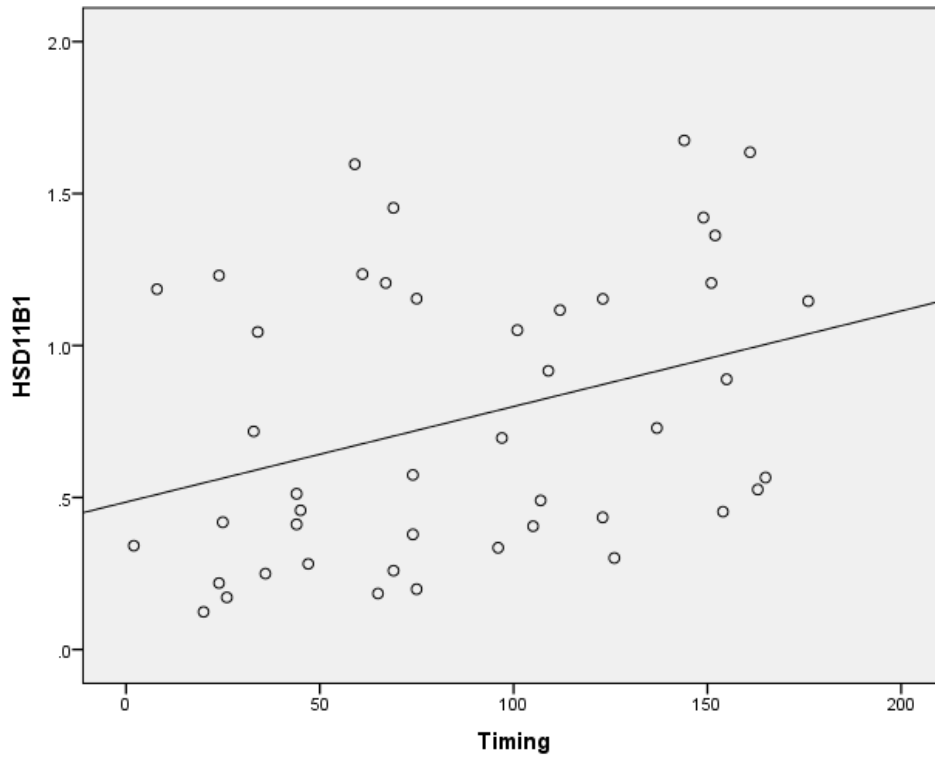
A)



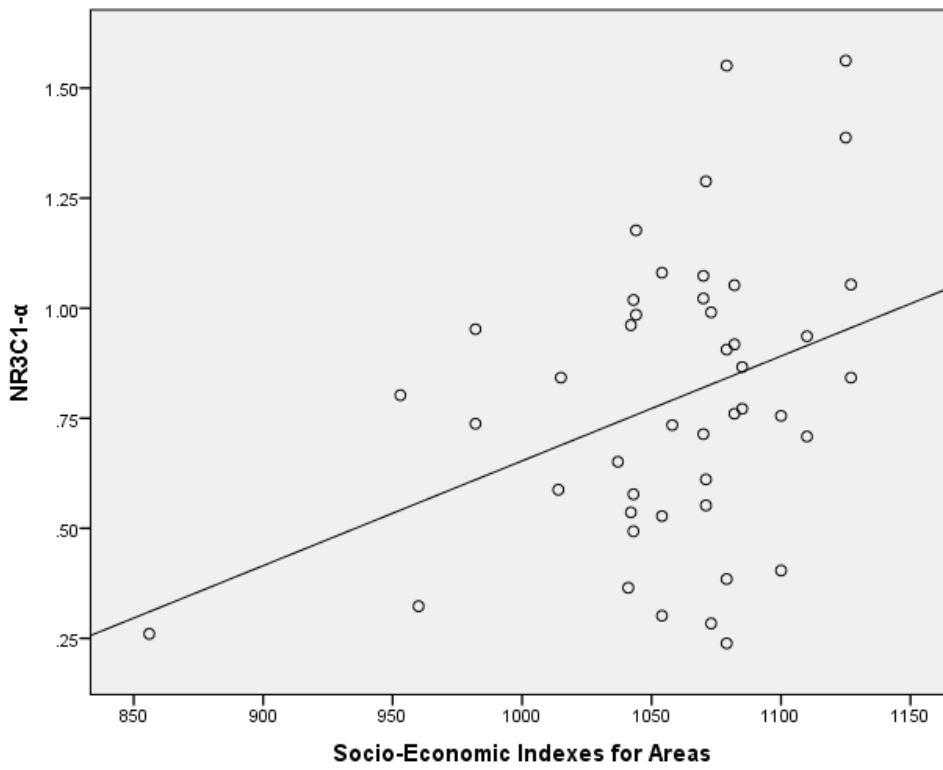
B)



C)



D)



E)

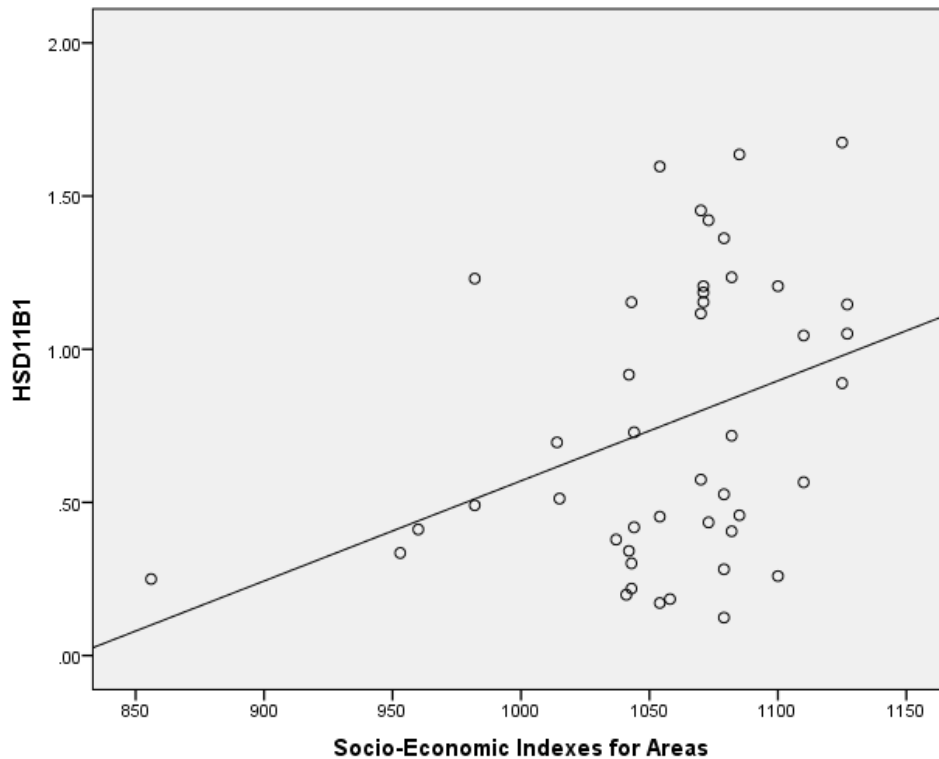


Figure S1: A) Significant negative correlation between log transformed objective stress score (QFOSS) and placental *SLC2A1* mRNA level for female placentas ($r = -0.304$, sig. = 0.042, $n = 45$). **B)** Significant correlation between the timing of the flood during pregnancy (days of pregnancy before the flood) and placental *NR3C1- α* mRNA level for female placentas only ($r = 0.366$, sig. = 0.013, $n = 45$). **C)** Significant correlation between the timing of the flood during pregnancy (days of pregnancy before the flood) and placental *HSD11B1* mRNA level for female placentas only ($r = 0.341$, sig. = 0.022, $n = 45$). **D)** Significant correlation between Socio-economic index for areas (SEIFA) and *NR3C1- α* mRNA level for female placentas only ($r = 0.357$, sig. = 0.016, $n = 45$). **E)** Significant correlation between Socio-economic index for areas (SEIFA) and *HSD11B1* mRNA level for female placentas only ($r = 0.357$, sig. = 0.016, $n = 45$).

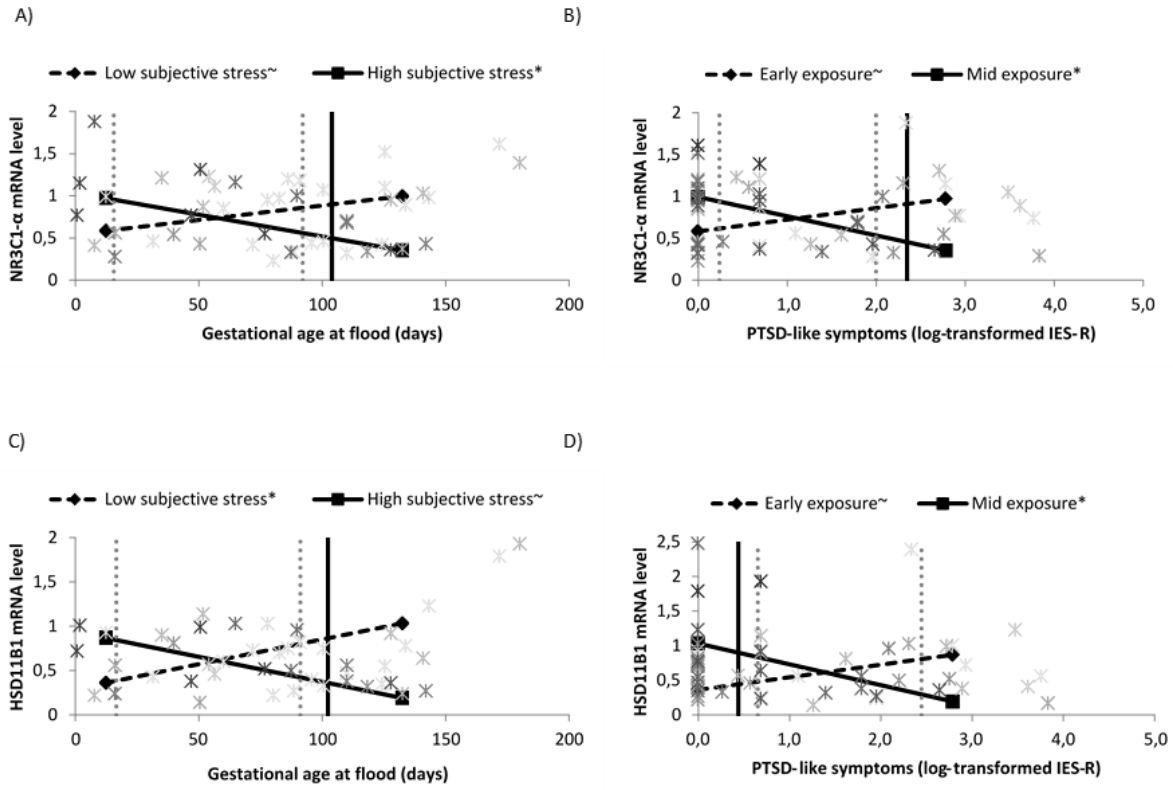


Figure S2: Significant moderation of the effect of PTSD-like symptoms (IES-R) on placental (A-B) glucocorticoid receptor α (*NR3C1- α*), and (C-D) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (*HSD11B1*) mRNA levels by timing of exposure in gestation. Vertical solid (or dashed) lines represent

HIGHLIGHTS

1. Prenatal stress from a natural disaster does not affect placental 11 β -HSD2
2. Natural disaster related prenatal stress decreases placental *NR3C1- β* mRNA in male placentas
3. Timing moderates the effect of prenatal maternal stress on placental *HSD11B1* and *NR3C1- α* mRNA for males only
4. The placenta is more susceptible to prenatal maternal stress between 3rd to 5th months of pregnancy

RESPONSES TO REVIEWERS

The reviewers did a stellar job of evaluating our study and identifying the area needing improvement, for which we are very grateful. We also thank the reviewers for a favorable first impression of our study, which they noted it to be an excellent study, that addresses an important gap. Strengths included: (1) clearly written manuscript; appropriate methods and (2) the authors acknowledge the small sample size which is the major weakness of the manuscript but the sample size is comparable to other studies in the field; (3) a very interesting and well-performed study; and (4) use of multiple maternal stress assessments. We also appreciated the constructive suggestions that we received from the reviewers and have modified the manuscript accordingly, as outlined below.

Reviewer 1

- *My major concern however, relates to the statistical analysis, an explanation of why each step was performed is severely lacking and the presentation of data is no adequate. It appears that a biostatistician was not involved with the study or the preparation of this manuscript, but it is clearly needed given the data which is being examined and hypotheses tested.*

Response: A biostatistician (G.E.) is co-author and involved with the study and the manuscript writing. Also, as suggested by the reviewers we have re-written the results section to make the story easier to follow and more logical. Therefore, we re-arranged the order of the tables and figures, which now follows the grouping of placental biomarkers tested instead of the statistical analysis performed. Furthermore, in order to simplify the interpretation and reduce the amount of results that were not in accord with our original hypothesis, we removed the results for “all sample” i.e. where both male and female placentas were assessed together. While this is a significant re-write of the original draft, the discussion and conclusion of the study remain the same. We believe that changing the results section was beneficial in order to make this a more straightforward and stronger paper.

- *The number of tests undertaken is considerable. Correlation coefficients are rather weak and p-values not particularly low. The authors need to really understand and discuss the major likelihood of false positives (type 1 errors). This should certainly be discussed in detail in the limitations. While I do not necessarily advocate for strict Bonferroni correction (given non-independence of tests), the authors need to be very careful about the findings. For example, in Table 3 alone there are 171 tests (9 x 19)*

and this is only a sub-fraction of all tests undertaken. 171 means even at a 5% significance level, 8 findings would come up as significant even if there was no association at all (by chance alone).

Response: We agreed with the review, the numbers of tests is considerable and this has been addressed in the limitations of the study (see lines 554-555). However, it is important to note that the number of tests have decreased with the removal of the 'all sample' from the analyses.

- *A number of outcome variables are shown in Table 1, but there is no discussion of these or explanation for why they have been included*

Response: Thank you to the reviewer, the outcome variables for child neurodevelopment have been removed. The mother and pregnancy characteristics were included in Table 1 for general population feature and comparisons with other studies.

- *It is not clear to me why EPDS and STAI feature in many of the tables (and as adjustment factors) and this has not been explained. From the methods it appears these measures were ONLY collected at 6 mths postpartum. Thus, I cannot think what the question being tested would be, given that both "exposure" and "outcomes" being examined occur before this. How can a measure occurring after the outcome (measured in placenta at birth) possibly influence the association? Adjustment in the tables for this later variables does not make sense to me.*

Response: We thank the reviewer for this comment. We have now replaced EDPS with Edinburgh Depression Scale (EDS). As written in the Methods the EDS scores were obtained at the time of the first visit to the hospital for pregnant women (20th-22nd week of pregnancy) as the EDS test is routinely administered to pregnant women at the Mater Mothers' hospital. For the STAI questionnaire, it was administered at the time of recruitment (at the same time as QFOSS, IES-R, PDI and PDEQ), Methods section has been clarified. As we wrote in the introduction of our manuscript the details of the cohort and methodology have already been described in detail (King et al, 2015)

- *Why did the authors use hierarchical multiple regression and it appears this hasn't been done using standard format ie normally variables known to influence the outcome are included, and then new variables to be tested (stress) added to see whether it significantly improves prediction. Table 4 and 5 have done this using initial models with variables that aren't associated with the outcome. Why include*

these in the models? The authors state themselves that they weren't associated. No explanation is given.

Response: Because of the relatively small sample size (particularly since we a priori divided the sample by placental sex) only covariates that were statistically significant with the outcome variable(s) were left in the final model so to retain sufficient power. Timing of exposure to the flooding was included in all analyses as this variable was an integral part of our hypotheses. We did, however, enter PNMS variables at the end to ensure that potential covariates were already in the model when PNMS was added. This has now been addressed in section 2.9.

- *Table 1 must include descriptive statistics for biological measures, so we know what the distribution of values is. Is it indeed normal or requires a log transformation?*

Response: Table 1 presents the mother and pregnancy characteristics for general population features and comparisons with other studies. As requested by the reviewer we also include the descriptive statistics of placental biomarkers (biological measures) in Table S2. However, it is noteworthy that mRNA level, protein and activity measures are relative and therefore not comparable studies to studies.

- *Significant findings from Table 3 MUST be displayed as a figure (ie with all data points visible), so the correlations can be seen. These are often driven by outliers, so it is very important for readers to see whether or not this is the case.*

Response: Figures of relevant significant correlations are presented in Figure S1. While some of them seem to have outliers, when these are winsorized, correlations obtained are still significant.

- *Figure 1 MUST include the actual data points, especially given the relatively small sample. It is not sufficient to just show the mean values.*

Response: As requested by the reviewer, we have modified the graphics to include data points, such that the darker shades indicate higher levels in the moderators. However, it is important to note that the lines depicted on Figure 1 use the mRNA values predicted from the regression model and not sample means.

- *A description of the full cohort size should be given in the methods, and a comparison between the full cohort and this sub-population should be made (indicates generalizability of findings)*

Response: A description of the full cohort has already been published (King *et al.*, 2015a). That being said, the cohort described in our manuscript is for participants for which we obtained placenta samples (n =

96; i.e. we tested all available placentas). As we mentioned in Methods section, since collection of placentas only began after ethics approval was obtained we were unable to collect placentas from women who were in their 3rd trimester during the flooding. As such, we compare the sample used in the present study with women who were in their 1st and 2nd trimester of pregnancy during the flood but for whom placentas sample were not collected. We did note few differences between these participants: lower objective hardship for pregnancies with male fetuses and longer gestation for pregnancies with female fetuses. As requested we added this information in section 3.1.

- *In limitations, the lack of a control group could also be mentioned. All women in the study were exposed to a natural disaster, so all have had some level of exposure compared to non-exposed women. I agree it is not possible to have a "control" group here which would be representative, but at least worth noting this.*

Response: You are correct in indicating at no 'non-exposed' group exists. Unfortunately, this is an inherent problem with disaster-related PNMS research both logistically (who would be the best control) and financially (inclusion of a non-exposed control doubles the cost of the project). As such, we have taken a dose-response approach to our analyses. This limitation of the study is mentioned in the discussion (4.4. limitations).

- *The paragraph on lines 296-305 on page 13-14, is written twice*

Response: Thanks to the reviewer, this has been corrected.

- *Table 4, don't you mean SLC2A1, not A2? Why was this done on all participants not just females where significant association observed. Again, this hasn't been explained*

Response: Table 4 represents the detailed results of significant hierarchical multiple regressions all the biomarkers tested were represented in Table S4/S5. Thus, Table 4 (as written in the legend) were the significant results from Table S4/S5. However, as written earlier, we chose to keep only the analyses separated by sample sex as to reflect our initial hypothesis.

Reviewer 2

- *My only minor comment is to consider changing the phrase 'timing' to 'gestation of exposure' or something similar*

Response: Thanks you for the comment. A definition of the gestational age at the time of flood exposure (timing of exposure) was added in section 2.7.

Reviewer 3

- *The manuscript by St Pierre et al describes the effect of natural disaster-related prenatal maternal stress on placental glucocorticoid system (and not signaling pathway as written in the article title).*

Response: Thanks you to the reviewer, we agreed with the remark “signaling pathway” has been change by “system” in the manuscript.

- *Of minor significance, some genes or mRNA are in italic, and others not and there are some problems of typography (Fig1 legend, tables 4 and 5).*

Response: This has been corrected.

- *In Fig1, we do not know how many patients are in "early pregnancy" / "mid pregnancy" and in these groups, how many with low or high subjective stress.*

Response: The gestational age (timing) at exposure and stress variables were not grouped or categorized. As such, we cannot provide a number of participants. To graph the lines, in panels A and C, for example, the regression model is used to determine the predicted mRNA levels with respect to gestational age at flood when the subjective stress level is set at the sample’s 10th or the 90th percentile. PROCESS (Hayes, 2013) is used to determine the percentiles, slope coordinates and significance levels.

- *I would suggest to analyse the different GR isoforms in these precious samples since it was described that there are different GR isoform profiles in male and female placentae that could confer sex-specific cellular sensitivity to glucocorticoids. Clifton et al., 2017 J endocrinol 234 (2). 89-100/ Placenta 54, 24-29.*

Response: Thank you for this suggestion. We have already planned to analyse the different GR isoforms and this will be the next phase of our research. However, we feel that they are presently beyond the scope of this study.

Reviewer 4

- *There is not a non-exposed group in the study design; instead, the authors consider variation in stress exposure from somewhat objective measures or subjective ratings. That may not necessarily be a problem, but it does raise some uncertainty about how to interpret the findings, and it does mean that the authors need to provide a clearer picture of the range and impact of the stress (e.g., did low exposure women function as essentially the comparison/non-distressed group, or was it that they were very exposed to clinically significant stress but perhaps not as traumatic as those at the higher end of the objective stress scale?).*

Response: You are correct in indicating that no 'non-exposed' group exists. Unfortunately, this is an inherent problem with disaster-related PNMS research both logistically (who would be the best control) and financially (inclusion of a non-exposed control doubles the cost of the project). As such, we have taken a dose-response approach to our analyses. This limitation of the study is mentioned in the discussion (4.4. limitations).

- *A mechanism for how PNMS induces alteration in placenta gene expression was not included in the analyses or design.*

Response: This study is the first step towards understanding the molecular consequences of disaster-related PNMS on placental function. The aim of this study was not to specifically determine the mechanisms, but to determine whether any potential molecular systems were affected by PNMS that could in turn affect child development later in life. Our results suggest that the placental glucocorticoid system (*NR3C1-a* and *11HSD11B1*), which warrants future studies to determine the mechanism involved in this alteration.

- *Too few details are provided about the sample and sampling approach to make inferences about generalizability. For example, how many women were initially recruited and what was the percentage participating in the placental analyses? How were the women sampled from all of those*

who experienced the flood, and what was the success rate of recruitment among those approached? Did the flood disproportionately affect a certain socio-demographic area of Queensland? Also, it is not quite clear when the assessments occurred in pregnancy; were women assessed at a standard time in pregnancy or did the assessment time vary according to their gestational age at the time of recruitment (and I don't believe the authors actually indicate when recruitment occurred)? In general, it is not very clear what measures were administered when.

Response: We agree with the reviewer that the timing of the assessments was not very clear. We have addressed this issue in the revised manuscript.

All participants for whom we obtained placenta samples are included in the present study. A description of the full cohort details has already been published (King *et al.*, 2015a). Recruitment into the study was multifaceted. Eligible women (were pregnant at the time of the flood) who were already enrolled in the M@NGO study were contacted and asked if they would participate in our flood study. Women were contacted at prenatal clinics. Recruitment was also conducted through regular and social media. Women were recruited into the study at varying times during the pregnancy. Thus, the timing of the assessment of the women's flood experiences varied.

A total of 230 participants were recruited into the study. Of these 186 were in their 1st or 2nd trimester of pregnancy at the time of the flood (the same period of exposure of the participants in the present study). All participants who were still pregnant at the time of recruitment were asked if the placenta samples could be obtained. However, some participants gave birth outside of the Mater Hospital where the placentas were obtained. As such, we were able to collect placentas from 54.2% of the 1st or 2nd trimester exposed women recruited into the study.

Based on the Australian 2011 census data and published reports of affected areas by postcode the flood did not affect one SERFA (SES) status group more than another. The average SEIFA score for our total sample (and the sample used in the present study) was 1050 which is very comparable to the average SEIFA score (1054) of all areas affected by the flooding. Thus, based on the available data it does not appear that the flood disproportionately affected a certain SES group.

- *Why were placentae delivered by cesarean section excluded? Some have argued that cesarean section deliveries may be better than normal vaginal deliveries for assessing glucocorticoid-mediated mechanisms because of the obvious alteration in these pathways associated with parturition. What evidence do the authors have that findings from cesarean and non-cesarean deliveries are not comparable?*

Response: We excluded only the elective cesarian section (i.e. delivery without labor). Given the fundamental difference that labour induce in expression of CRH, hCG, prostaglandins, estrogens, etc., we choose to exclude the 10 participants who gave birth by elective cesarian. Moreover, As mentioned in the manuscript the data published by Glover group are from C-section only and thus could explain the HSD11B2 differences observed between her and our studies.

- *Too many important confounds and covariates are not mentioned in analyses of placenta gene expression data (tables 4 and 5), including birth weight, gestational age, prematurity, maternal smoking and drug use in pregnancy, maternal medication exposure (were particularly distressed women given medication?), maternal age, race/ethnicity, parity, and many other factors. It is not really possible to evaluate the findings without this information.*

Response: Table 1 presents the mother and pregnancy characteristics for comparisons with other studies. We did not include birth weight and gestational age in our model as they are consequences of PNMS and not predictors of placental gene expression. As for maternal age and parity, their main effect on placental biomarkers were tested and did not have any significant effect. To maintain statistical power, these were excluded from further analyses. As for race/ethnicity, only very few women were not Caucasian (n=2, 1 male and 1 female) so this variable was not included in the analyses. Likewise, too few participants reported smoking during pregnancies (n=4 male placentas, 3 female placentas) to warrant its inclusion into the analyses. The drugs and medicaments data was incomplete for most of the participants so it was also not included in the analyses. These issues have been addressed in the limitations section.

- *It is potentially very valuable that there were timing effects, but the authors provide very few details on the timing distribution and how it may be confounded with factors associated with placenta gene expression data. Is timing measured in months or by trimester, for example?*

Response: The timing was measured as the number of days of pregnancy before January 10th (the peak of the flood) as mentioned in Methods. The number of days of pregnancy before the flood for our cohort was distributed equally.

- *The correlations in table 3 are interesting, but if corrections are made for multiple testing are there any reliable associations that remain? In general, the presentation of the results is made less clear by the number of non-significant associations that are interpreted; too much attention is given to*

interpreting non-significant effects (e.g., section 3.4 seems mostly about interpreting non-significant effects). This concern adds to the general uncertainty implied elsewhere about the reliability of the findings.

Response: The result section was completely rewritten to provide a better explanation of the results. In Table S6 and figure S2 includes the interactions that were marginally significant as a source of hypothesis for further studies and to help understand the underlying mechanism of how PNMS affects the placenta. We chose to explain these particular results because interactions presented are not explainable in tables only (which way are the interactions, stress later during pregnancy with lower or higher gene expression for example). Furthermore, we did not discuss non-significant results in the discussion (except for results contrary to our main hypothesis). Also, we added in the limitation section that we did not account for multiple testing.

- *Some of the effects sizes seems remarkably (almost implausibly) large. Some checks are needed to confirm that these effects (perhaps especially from the interactions) are not driven by outliers, given the small sample sizes – particularly when broken down by sex or timing.*

Response: Reviewer 1 had a similar concern, and suggested we add the actual datapoints to figure 1 to help determine if the effects shown are driven by outliers, which we did. The darker shades indicate higher levels in the moderators.

- The glucose transport system is a reasonable focus, but there would be many other targets that would be just as reasonable. Can the authors note all of the gene expression targets that were considered?

Response: All the gene expression targets analysed are presented in the manuscript and they have been chosen to test our hypothesis. For the glucose transport system, GLUT-1, GLUT-3 and GLUT-4 were analysed since these glucose transporter have been shown to be influenced by PNMS in rats placentas in (Mairesse *et al.*, 2007b).

REFERENCES

- King, S., et al 2015. QF2011: a protocol to study the effects of the Queensland flood on pregnant women, their pregnancies, and their children's early development. BMC Pregnancy & Childbirth 15, 109.

- Mairesse, J., et al. 2007. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 292, p.1526-1533.

CHAPITRE 4: Natural disaster-related prenatal maternal stress affects placental gene related to serotonin and estrogen system: The QF2011 Queensland Flood Study

Joey St-Pierre^{1,2}, David P. Laplante³, Guillaume Elbeili³, Paul A. Dawson⁴, Sue Kildea⁴, Suzanne King^{3,6*}, Cathy Vaillancourt^{1,2*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier et centre de recherche Biomed, Laval, Canada et ²Centre de recherche interdisciplinaire sur le bien-être, la santé, la Société et l'environnement, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada; ³Institut de santé mentale Douglas, Montréal, Canada; ⁴Mater Research Institute-University of Queensland, Brisbane, Australie; ⁵School of Nursing, Midwifery and Social Work, The University of Queensland, Brisbane, Australie; ⁶McGill University Montréal, Canada

Contribution de l'étudiant :

L'étudiant a participé à l'élaboration de l'étude, réalisé toutes les expériences liées au placenta et analysé les résultats. Il a également rédigé l'article, participé au choix du journal de publication.

En préparation pour soumission à *J of Neuroendocrinology* .

Résumé en français :

Le stress prénatal maternel (PNMS) est associé à des problèmes de développement chez les enfants, mais les mécanismes impliqués sont encore méconnus. La sérotonine d'origine placentaire est nécessaire au bon développement du cerveau fœtal. De plus, l'effet du PNMS sur les fonctions endocrines placentaires ainsi que leur effet sur la restriction de croissance est encore méconnu. Dans cette étude, nous avons analysé si le PNMS relié à un désastre naturel (inondation) était associé à des altérations du système sérotonine placentaire et des fonctions endocrines du placenta. De plus, nous avons vérifié si le moment de l'événement déclencheur du stress durant la grossesse pouvait modérer l'expression de l'ARNm des biomarqueurs placentaires. Les placentas analysés dans cette étude proviennent de participantes à l'étude *Queensland flood study 2011 (QF2011)* qui étaient enceintes durant l'inondation et qui ont complétés un questionnaire exhaustif mesurant le stress objectif et le stress subjectif lié à l'inondation. La régression linéaire hiérarchique a été utilisée pour tester l'effet du PNMS sur le taux d'ARNm des gènes impliqués dans la réponse à la sérotonine (*HTR2A*, *HTR2B*, *TPH2*), au transport et à la métabolisation de la sérotonine (*SLC6A4*, *MAOA*) ainsi que sur l'expression de l'ARNm des hormones peptidiques (*CGB*, *CSH1*, *GH2*) et de l'enzyme de production de l'estrogène, l'aromatase (*CYP19A1*). Le stress objectif a été lié à une réduction de l'expression de l'ARNm de *HTR2A* chez les placentas de fœtus femelle ($\beta = -0.374$, $p = 0.038$) alors que le stress subjectif a été associé à une diminution de l'expression de l'ARNm de *HTR2A* chez les placentas de fœtus mâles ($\beta = -0.368$, $p = 0.029$). Le nombre de jour de grossesse avant l'inondation était un modérateur significatif de l'effet du stress objectif sur l'expression de l'ARNm de *MAOA* ($p = 0.024$) chez les placentas de fœtus mâle ainsi que sur l'expression de l'ARNm de *CYP19A1* ($p = 0.025$). Ces résultats démontrent une adaptation du système sérotonine placentaire et de la production hormonale par rapport au PNMS : réduction de la *MAOA* si le PNMS s'est produit en début de grossesse et réduction de *CYP19A1* si le PNMS s'est produit au second trimestre de la grossesse. Les résultats démontrent aussi que pour un PNMS élevé, le placenta n'ajuste pas l'expression de *MAOA* et *CYP19A1* en comparaison à un faible PNMS. Le mécanisme par lequel le PNMS influence le système sérotonine placentaire ainsi que le système endocrinien placentaire et les conséquences sur le développement du fœtus requiert plus d'études.

Natural disaster-related prenatal maternal stress affects placental genes related to serotonin and aromatase: The QF2011 Queensland Flood Study

Joey St-Pierre^{1,2}, David P. Laplante³, Guillaume Elgbeili³, Paul A. Dawson⁴, Sue Kildea^{4,5}, Suzanne King^{3,6*}, Cathy Vaillancourt^{1,2*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier and BioMed Research Center, Laval, Canada and ²Center for Interdisciplinary Research on Well-Being, Health, Society and Environment, Université du Québec à Montréal, Montreal, Canada; ³Douglas Mental Health University Institute, Montreal, Canada; ⁴Mater Research Institute, The University of Queensland (UQ), Brisbane, Australia; ⁵School of Nursing, Midwifery and Social Work, UQ, Brisbane, Australia; ⁶McGill University Montreal, Canada

Running title: Maternal stress affects placental estrogen and serotonin systems

*** Corresponding authors**

Cathy Vaillancourt

INRS-Institut Armand Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

T: 1-450-687-5010 ext. 8812; cathy.vaillancourt@iaf.inrs.ca

and

Suzanne King

Douglas Mental Health University Institute, 6875 LaSalle Boulevard, Verdun, QC, Canada H4H

1Y1 T: 1-514-761-6131 ext. 2353; Suzanne.king@mcgill.ca

ABSTRACT

Prenatal maternal stress (PNMS) has been linked to adverse fetal development and child outcomes, but the underlying mechanism remains unclear. Placental serotonin and endocrine function are known to be crucial in fetal development. Here, we investigated if the stress from a natural disaster was associated with alterations in the placental serotonin system and endocrine function, and if the timing of the event moderated the effect of PNMS. Placental samples from women who were pregnant at the onset of the 2011 Queensland Flood Study (QF2011) were collected and women completed a detailed questionnaire on their flood exposure (objective hardship) and subjective distress. Multiple linear regression was used to assess the effect of PNMS on the mRNA expression of genes involved in placental serotonin system signalling (*HTR2A*, *HTR2B*, *TPH2*), serotonin transport and metabolism (*SLC6A4*, *MAOA*), placental hormone synthesis (*CGB*, *CSH1*, *GH2*) and estrogen production (*CYP19A1*). Objective hardship was associated with lower *HTR2A* mRNA level in female placentas ($\beta = -0.374$, $p = 0.038$) and subjective distress was associated with lower *HTR2A* mRNA level in male placentas ($\beta = -0.368$, $p = 0.029$), whereas there was no change in the level of mRNAs for gene related to placental endocrine function. The timing of the flood was a significant moderator of the effect of objective hardship on male placental *MAOA* ($p = 0.024$) and female placental *CYP19A1* ($p = 0.025$). These results show a reduction in *MAOA* and *CYP19A1* mRNA when objective stress occurred in early or mid gestation, respectively. Our results also suggest that for high PNMS, the placenta loses its ability to adjust *MAOA* and *CYP19A1* mRNA levels compared to low PNMS. The mechanism by which PNMS changes the expression of certain placental mRNAs and in turn fetal programming requires further investigation.

Keywords: CYP19, 5-HT_{2A} receptor, monoamine oxidase A, serotonin transporter, human placental lactogen, placental growth hormone, human gonadotrophin chorionic, Prenatal maternal stress

1 Introduction

Prenatal maternal stress (PNMS) has been associated with pregnancy complications and adverse fetal development and child outcomes; and risk of diseases later in life (reviewed in (Charil *et al.*, 2010)). This later phenomenon is called fetal programming or the developmental origin of health and disease (DOHaD). It was first reported by Barker *et al.* in 1989 (Barker *et al.*, 1989b) and since then has been the subject of extensive research. However, the underlying mechanism linking PNMS to adverse developmental outcomes remains unclear. PNMS during pregnancy is known to alter components of the placental glucocorticoid system (St-Pierre *et al.*, under review,(Ponder *et al.*, 2011)), which are thought to alter placental serotonin and endocrine function (reviewed in (St-Pierre *et al.*, 2016b)).

Serotonin is crucial for embryo/fetal development, including left/right axis modelling in vertebrates, neuronal development and cardiac morphogenesis and growth (reviewed in (St-Pierre *et al.*, 2016b)). It has been shown that the placenta expresses tryptophan hydroxylase (TPH) types 1 and 2, and produces serotonin *de novo* (Bonnin *et al.*, 2011; Laurent *et al.*). The placenta possesses other serotonin system components, such as the serotonin receptors 5HT_{2A} and 5HT_{2B} (*HTR2A* and *HTR2B* genes), the serotonin transporter (SERT, *SLC6A4* gene) and the serotonin metabolizing enzyme monoamine oxidase A (MAOA, *MAOA* gene) (Blakeley *et al.*, 2013; Bottalico *et al.*, 2004; St-Pierre *et al.*, 2016c; Viau *et al.*, 2009). Serotonin plays an important role in placental function. For example, serotonin induces the expression of the rate-limiting estrogen production enzyme aromatase (*CYP19A1* gene) in the placenta by the activation of the 5HT_{2A} receptor (Hudon Thibeault *et al.*, 2017; Klempan *et al.*, 2011; Malassine & Cronier, 2002). Placental estrogen is crucial for pregnancy well-being and fetal development (Groothuis *et al.*, 2007). However, if PNMS modulates estrogen production directly by altering CYP19 expression or indirectly via an action of serotonin system has never been study. Serotonin and glucocorticoid systems are known to interact in the central nervous system (CNS): serotonin regulates the expression of glucocorticoid receptors (GRs), while glucocorticoids regulate serotonin synthesis, transport and receptor expression in animal models (reviewed in (Wyrwoll & Holmes, 2012)). This cross talk between the glucocorticoid and serotonin systems highlights the physiological role of serotonin in the fetal programming of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and fetal brain. However, few studies have examined the effect of PNMS on the placental serotonin system in humans. One study by Rääkönen *et al.* found an association between placental *SLC6A4* mRNA level and more regulatory behaviour challenges in early life, highlighting the possible effect of placental serotonin system on fetal brain programming (Rääkönen *et al.*, 2015).

The human placenta produces protein hormones crucial for healthy pregnancy and well-being of the fetus: human chorionic gonadotropin (hCG, *CGB* gene), human placental lactogen (hPL, *CSH1* gene), the placental growth hormone (pGH, *GH2* gene) (Fowden & Forhead, 2015; Wang *et al.*, 2013). Previous studies showed that hCG induced the expression of *HSD11B2* mRNA level in primary trophoblasts (Shu *et al.*, 2014), and that cortisol induced hCG secretion in cultured syncytiotrophoblast (Wang *et al.*, 2012b). Furthermore, hPL expression is known to be reduced by synthetic glucocorticoids in sheep while *in vitro* assays demonstrated a reduction in pGH by cortisol in BeWo cells (a trophoblast model) (Braun *et al.*, 2007; Zeck *et al.*, 2008). These studies demonstrate an association between the glucocorticoid system and hormone production in the placenta. hPL and pGH are known to promote the mobilization of nutrients during pregnancy and a reduction in their production is associated with low birthweight (Lange & Anthonsen, 1980; Zeck *et al.*, 2008). Serotonin is also known to regulate growth hormone (GH), prolactin, corticotropin releasing hormone (CRH) and luteinizing hormone (LH), suggesting a potential link between serotonin and the placental endocrine functions (Balsa *et al.*, 1998; Rabii *et al.*, 1981; Valverde *et al.*, 2000). However, the effect of PNMS on these placental hormones and the role they play in placental adaptation to stress during pregnancy remains unknown.

The aim of this study was to determine the effect of *in utero* exposure to objective and subjective PNMS from a natural disaster on the placental serotonin system, aromatase, hPL, hCG and pGH. We also aimed determine the link between mRNA level from the placental glucocorticoid system: glucocorticoid producing enzyme 11 β -HSD1 (*HSD11B1* gene); glucocorticoid inactivating enzyme 11 β -HSD2 (*HSD11B2* gene); GR α and GR β (*NR3C1- α* and - β) and the serotonin system as these 2 systems have been shown to be related (St-Pierre *et al.*, 2016b). We propose that higher levels of PNMS would be associated with a decreased mRNA level of placental *TPH2*, *HTR2A* and *HTR2B*, and increased mRNA levels of *MAOA* and *SLC6A4*, which would lead to a decrease in *CSH1*, *GH2* and *CYP19A1* mRNA levels and an increase in *CGB* mRNA levels. We suspected that these proposed PNMS effects would be moderated by the timing of the stress in pregnancy (Mueller & Bale, 2008). To test our hypotheses, we took advantage of a natural disaster in Queensland, Australia. On January 10, 2011 the Brisbane River overflowed its banks, and heavy rains flooded 70% of the state of Queensland. Nearly 15,000 homes were completely inundated, with another 18,000 partially flooded. There were 23 flood-related deaths, and the economic costs were more than AUS\$2-billion, making it one of the worst natural disasters in Queensland history. we used the QF2011 Queensland Flood Pregnant Women Cohort Study. Details on the QF2011 Queensland Flood study cohort and methodology have been described previously (King *et al.*, 2015b).

2 Materials and Methods

2.1 Participants

Women who were pregnant during the flood on 10 January 2011 were recruited to be part of the *QF2011: the effects of the Queensland flood on pregnant women, their pregnancies, and their children's early development*. The QF2011 study was approved by the Mater Hospital Human Research Ethics Committee on 1 April 2011 and The University of Queensland. Participants provided informed written consent. Our sample includes women who were pregnant during the flood (ranging from 1 day of pregnancy before the peak of the flood on 10 January 2011 to 180 days of pregnancy before the peak of the flood). For this study, women who gave birth by elective C-section were excluded. The final sample size obtained for our analyses was 96 placentas (51 males and 45 females babies) from women who gave birth 3 to 9 months after 10 January 2011, at the study site in Brisbane, Australia and who completed the stress questionnaires.

2.2 Placenta sampling

Placentas were obtained after expulsion within 30 min. and were sampled within 1 h after being acquired to insure mRNA quality. Placentas were rinsed to remove excess blood and eight samples were taken from the trophoblast layer using a stereological grid to mitigate the effect of spatial distribution of the biomarkers analyzed (Burton *et al.*, 2014; Mayhew, 2006). Samples were rapidly flash frozen in dry-ice cooled ethanol and kept at -80°C until analysed. Placental samples from five different sampling sites were ground on dry ice using a mortar and pestle into powder, taking precautions that tissues samples were not thawed. Powdered samples were kept at -80°C until further analysis.

2.3 RNA isolation and cDNA synthesis

Ground frozen placental tissue samples (15 to 20 mg) were mixed with the appropriate amount of RLT buffer from the Allprep DNA/RNA/Protein mini kit (Qiagen, Toronto, ON) and placed in Qias shredder spin columns (Qiagen) according to the manufacturer's instructions to extract RNA. RNA concentration and purity were assessed using a ND-1000 nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA), and RNA integrity was evaluated with the Experion automated electrophoresis system (Bio-Rad, Mississauga, Canada). To generate first strand cDNA for highly expressed genes (*HSD11B1*, *HSD11B2*, *CRH*, *NR3C1- α* , *MAOA*, *SLC6A4*, *HTR2A*, *CYP19A1*, *CGB*, *CSH1* and *GH2*), 500 ng of total RNA was used for reverse transcriptase with the iScript reverse transcription supermix for RT-qPCR (Bio-Rad). For those genes expressed at low levels

(*TPH2*, *HTR2B* and *NR3C1-β*), 2 µg of RNA was used with the iScript advanced cDNA synthesis kit (Bio-Rad) followed by a pre-amplification step using Ssoadvanced preamp supermix (Bio-Rad). Primer sequences are listed in Table S1.

2.4 RT-qPCR

RT-qPCR reactions were performed using a CFX-96 (Bio-Rad) with either SsoFast PCR supermix (Bio-Rad) for highly expressed genes or SsoAdvanced PCR supermix (Bio-Rad) for genes with low expression levels. cDNA samples were diluted 1:32 for highly expressed genes, and 1:10 for genes expressed at lower levels. Assays were performed in triplicate at 60°C (except for *TPH2* at 58°C) with *HPRT1* and *TOP-1* as reference genes selected with the Qbase plus software (BioGazelle, Zwijnaarde, Belgium) (Lanoix *et al.*, 2012b; Vandesompele *et al.*, 2002a). Reference genes were also tested for their difference in expression level according to fetal sex and showed no statistically significant differences (St-Pierre *et al.*, 2017). Primer sequences used for RT-qPCR are presented in table S1.

2.5 Maternal stress assessment

The Queensland flood objective stress scale (QFOSS) was used to assess the objective hardship at recruitment (12-14 weeks of pregnancy) and 12-months post-flood to adjust for financial loss (King *et al.*, 2015b). Based on previous disaster related PNMS studies, QFOSS was designed to assess the distinctive experience of the 2011 Queensland flood (Laplante *et al.*, 2007b; Yong Ping *et al.*, 2015a). QFOSS assesses stress items into four categories of exposure: Threat, Loss, Scope and Change. Each of the categories was scaled from 0 (no impact) to 50 (extreme impact) for a possible total score of 200, with higher scores indicating a higher level of objective hardship. The detailed QFOSS questionnaire data is available from our previous publications (King *et al.*, 2015b; Simcock *et al.*, 2017; Simcock *et al.*, 2016).

The subjective distress was assessed using three different questionnaires: The Impact of Event Scale-Revised (IES-R) which assesses PTSD-like symptoms (Weiss, 1997b); the Peritraumatic Distress Inventory (PDI-Q) which assesses retrospectively peritraumatic distress (Brunet *et al.*, 2001); and the Peritraumatic Dissociation Experience Questionnaire (PDEQ) which assesses retrospectively peritraumatic dissociative experiences at the time of the flood (Marmar, 1997). To reduce the number of regression analyses, the three subjective distress measures were combined into the COmposite Score for MOther's Subjective Stress (COSMOSS). Scores on COSMOSS are centered around a mean of 0 with negative scores indicating below average

subjective stress and positive scores indicating above average distress. Further details of these assessments were previously described (King *et al.*, 2015b; Simcock *et al.*, 2016).

2.6 Covariates

The timing of the stressor event (flood) in pregnancy was used as a covariate. Timing was calculated as the number of days of pregnancy on the peak of the Queensland flood (10 January 2011), ranging from 1 to 180 days. Edinburgh depression scales (EDS) results were obtained as they are routinely administered at the hospital at the first visit (Cox *et al.*, 1996b). State-Trait Anxiety Inventory (STAI) measured at recruitment (Spielberger, 2010) and the Australian socioeconomic indexes for area (SEIFA, higher score reflects higher socioeconomic status) (Pink, 2011b) at recruitment were also used as covariates in regression analysis, but were only included if their effect was considered at least marginally significant in the final model ($p < 0.10$).

2.7 Statistical Analyses

Pearson's product moment correlations were used to evaluate for associations between predictors and covariates with placental mRNA level and to test for associations among the level of mRNA for each placental gene expression tested. To test for the normality of the distributions, we used the Shapiro-Wilk normality test. Analysis showed that all the mRNA level distributions and QFOSS score were highly skewed, thus data was log-transformed for to be closer to a normal distribution.

Hierarchical multiple linear regression was used to evaluate the effect of PNMS on placental mRNA level. At the first step, STAI, EPDS and/or SEIFA measures were added in the model. Step 2 introduced timing of the flood in pregnancy (days as continuous variable). For the third step, QFOSS was added, followed by COSMOSS for the fourth step to assess the effect of subjective distress corrected for objective hardship. Statistical interactions were also tested with timing of the flood event during pregnancy moderator on the effect of PNMS on placental mRNA level. Thus, timing interaction was introduced into the hierarchical multiple linear regression model after either QFOSS (step 3) or COSMOSS (step 4) as the final step. Timing interaction allowed us to specifically determine the difference in the effect of PNMS depending on the pregnancy days before the stressful event (flood timing) on placental mRNA level. STAI, EPDS and/or SEIFA measures were subsequently removed from the model if they did not contribute sufficiently to the model ($p \geq 0.10$) (backwards approach). Statistical analyses were performed using SPSS v.21 (IBM) with the PROCESS v.211 macro for the interactions (Hayes, 2013).

3 Results

3.1 Descriptive statistics of the cohort

Table 1 represents the descriptive characteristics of the subset of participants in the QF2011 for which we have obtained the placenta at birth (n= 96 placentas; 51 males and 45 females) of women who completed the stress questionnaires. We tested for any significant difference in these factors and we observed a significantly higher STAI score for women carrying a male fetus ($t(94) = 2.123, p = 0.036$). No other significant difference was found between results for women carrying a male compared to female fetuses.

3.2 Intercorrelations among the mRNA level of placental genes

The intercorrelations among placental mRNA levels tested are represented in Table 2. *SLC6A4* mRNA levels were highly positively correlated with *MAOA* ($p = 0.019$ to $p < 0.001$; Table 2) and with the mRNA level of the placental hormone *CGB*, *CSH1* and *GH2* ($p = 0.006$ to $p < 0.001$; Table 2). The *HTR2A* and *HTR2B* serotonin receptor mRNA levels were highly correlated with each other and with *TPH2* ($p = 0.017$ to $p < 0.001$) except for male placentas where *TPH2* and *HTR2B* are not correlated ($p = 0.07$; Table 2). Placental hormones were also correlated with each other and with *CYP19A1* ($p < 0.001$; Table 2). Serotonin promoting genes *TPH2* and *HTR2A* mRNA level were negatively correlated with placental hormones and *CYP19A1* ($p = 0.040$ to 0.004) with the exception of *CGB* for male placentas and a marginally significant negative correlation between *CSH1* and *TPH2* ($p = 0.067$, Table 2). These results show that placental hormones are negatively correlated with the expression of serotonin promoting genes *TPH2* and *HTR2A* except for *CGB* in male placentas.

Table 3 represents correlations between mRNA level of genes involved in placental glucocorticoids system with placental hormones and serotonin system. *SLC6A4* mRNA levels were positively correlated with mRNA level of glucocorticoid promoting genes (*CRH*, *NR3C1- α* and *HSD11B1*; $p = 0.021$ to $p < 0.001$; Table 3). *HTR2A* and *HTR2B* mRNA levels were positively correlated with placental *NR3C1- β* ($p = 0.018$ to $p < 0.001$; Table 3). Placental hormones and *CYP19A1* mRNA levels were also correlated with the level of placental *CRH* mRNA ($p = 0.043$ to $p < 0.001$; Table 3). However, no significant correlations were observed between the mRNA level of placental hormones and genes involved in the inhibition of the effect of glucocorticoid in the placenta (*HSD11B2* and *NR3C1- β* ; Table 3) for both male and female fetuses. The correlations between placental glucocorticoid system mRNA levels have previously been described (St-Pierre *et al.* Under revision *Psychoneuroendocrinology* 2018).

3.3 Hierarchical multiple linear regression of PNMS on placental mRNA level

Correlations between predictors (stress measures and covariates) and placental mRNA levels are presented in Table 4. There were no significant correlations between stress measures and mRNA level of genes tested for both male and female placentas. However, a marginally significant positive correlation between subjective distress (COSMOSS) and *MAOA* mRNA levels for male placentas ($p = 0.063$; Table 4) was observed. Moreover, the number of days of pregnancy before the flood (timing) was significantly associated with lower placental *MAOA* ($p = 0.018$; Table 4) and *TPH2* ($p = 0.021$; Table 4) for male placentas. The number of days of pregnancy before the flood was significantly correlated with a higher placental *CSH1* ($p = 0.029$; Table 4) and *CYP19A1* ($p = 0.010$; Table 4) mRNA level for female placentas only. Anxiety (STAI; $p = 0.042$; Table 4) and depression (EDS; $p = 0.048$; Table 4) scores were significantly associated with a higher placental *TPH2* mRNA levels for female placentas only. Higher depression was significantly correlated with high *HTR2A* mRNA levels ($p = 0.016$; Table 4) for female placentas. Furthermore, a higher anxiety score was significantly correlated with lower *CGB* mRNA levels for female placentas ($p = 0.023$; Table 4). As for socioeconomic situation (SEIFA), a higher score was correlated with a lower placental *TPH2* mRNA levels for female placentas only ($p = 0.012$; Table 4). Our data suggests no direct effect of the severity of PNMS on placental mRNA level of genes tested, however the number of days of pregnancy before the flood was significantly associated with a lower level of placental serotonin system mRNA (*MAOA* and *TPH2*) for male placentas and higher placental hormonal functions (*CSH1* and *CYP19A1*) in female placentas.

For the adjusted analysis, significant results are presented in Table 5. Controlling for timing and objective hardship (QFOSS) (none of which were significant), higher subjective distress was significantly associated with a lower *HTR2A* mRNA levels for male placentas, explaining 8.8% of the variance ($p = 0.038$; Table 5). When separating the different stress measures included in COSMOSS, we observe that there was no single significant subjective distress measure associated with a lower *HTR2A* mRNA levels for male placentas, but the combined score of subjective distress was a significant predictor of placental *HTR2A* mRNA level (Table S2). However, for female placentas, controlling for timing, depression and anxiety (marginally significant for anxiety, significant for depression, non-significant for timing), a higher objective hardship was significantly associated with a lower *HTR2A* mRNA levels, explaining 11.1% of the variance ($p = 0.029$; table 5). For male placentas, women's objective hardship was a marginally significant predictor of *CGB* mRNA levels, explaining 7.5% of the variance ($p = 0.052$; table S3). No other placental mRNA levels were significantly associated with stress measures in corrected

analysis (Table S3). These results show different alteration of placental *HTR2A* mRNA level for objective hardship and subjective distress depending on the fetal sex: (objective hardship predicts lower *HTR2A* for female placentas; subjective distress predicts lower *HTR2A* for male placentas).

3.4 Flood timing moderation

Timing interactions were introduced after objective hardship or subjective distress scores in the hierarchical linear regressions to assess timing effect of PNMS on placental mRNA levels. The timing of the exposure to the flood during pregnancy was a significant moderator of the effect of PNMS on placental *MAOA* for male placentas, explaining an additional 9.2% of the variance ($p = 0.024$; Table 6). For placentas of mothers exposed to the flood between day 0 and 31 of pregnancy, there was a significant reduction in *MAOA* mRNA level for a higher objective hardship for male placentas (Figure 1a). There was a significant difference in placental *MAOA* mRNA levels between early PNMS exposure and mid PNMS exposure if the log transformed QFOSS score was below 2.8 (Figure 1a). When using stress as the moderating variable, there was a significant difference in *MAOA* mRNA levels between high and low objective hardship score if stress occurred before 31 days of pregnancy (Figure 1b).

The effect of objective hardship on placental *CYP19A1* mRNA levels was also significantly moderated by the timing of exposure to the flood during pregnancy, explaining an additional 9.6% of the variance for female placentas ($p = 0.025$; Table 6). For placentas of mothers exposed to the flood later than 98 days of pregnancy, there was a significant reduction in *CYP19A1* mRNA level for a higher objective hardship for female placentas (Figure 1c). *CYP19A1* mRNA level was significantly different between early and mid exposure to objective hardship if the log transformed QFOSS score was below 3.1 (Figure 1c). When using stress as the moderating variable, there was a significant difference between placental *CYP19A1* mRNA levels if stress occurred after the 98 days of pregnancy with lower objective stress predicting higher *CYP19A1* mRNA level (Figure 1d). Thus, the timing of the stressor event is a significant moderator of objective hardship on placental *MAOA* mRNA level male placentas and *CYP19A1* mRNA level in female placentas.

Furthermore, timing was also a marginally significant moderator of the effect of subjective distress on placental *CYP19A1* and *GH2* mRNA levels for female placentas, explaining 7.4% and 7.2% of the variance, respectively ($p = 0.053$ and $p = 0.075$; table S4). Interpreting these interactions, lower subjective distress score was marginally associated with lower mRNA level if the flood occurred early in pregnancy compared to mid pregnancy for both *CYP19A1* and *GH2*. Interpreting these interactions, the other way, low subjective distress score was marginally associated with higher placental mRNA level of *CYP19A1* and *GH2* if the flood occurred later in

pregnancy (data not shown). The effect of objective hardship was also marginally moderated by timing for *CSH1* mRNA levels in female placentas, explaining 7.2% of the variance ($p=0.063$; table S5). Interpreting this interaction, lower QFOSS score was marginally associated with a lower *CSH1* mRNA level if the flood occurred in early pregnancy compared to mid pregnancy or the other way, low QFOSS score was marginally associated with higher *CSH1* mRNA level if the flood occurred in mid pregnancy (data not shown).

4 Discussion

This study aimed to determine if PNMS from a natural disaster can affect the mRNA level of placental genes related to serotonin system and endocrine function. We hypothesized that higher maternal objective hardship or subjective distress would be associated with a decreased mRNA level of placental genes involved in serotonin production *TPH2*, and signaling *HTR2A* and *HTR2B* and an increased mRNA level of placental genes related with serotonin clearance enzyme *MAOA*, and serotonin transport *SLC6A4*. We also proposed that PNMS will alter the placental endocrine function increasing *CGB* mRNA level and decreasing *CSH1*, *GH2*, and *CYP19A1* mRNA levels. As the effect of timing of the stressor event during pregnancy was suspected to have significant moderation effect, relevant interactions were tested. The main finding of our study is that subjective distress and objective hardship significantly predicts a reduction in placental *HTR2A* mRNA level of male and female placentas, respectively. We also found that the timing of exposure to the flood during pregnancy is a significant moderator of the effect of objective distress on placental *MAOA* in male and *CYP19A1* in female.

4.1 PNMS effect on placental serotonin system

Depending of fetal sex, objective hardships and subjective distress affect placental *HTR2A* mRNA levels differently with objective hardship predicting lower *HTR2A* mRNA level for females and subjective distress lower *HTR2A* mRNA level for males. The *HTR2A* gene encodes the serotonin receptor 5-HT_{2A} which is involved in placental cell differentiation and stimulation of CYP19 mRNA expression and activity (Hudon Thibeault *et al.*, 2017; Klempan *et al.*, 2011; Paquette *et al.*, 2013; Sonier *et al.*, 2005). Future study are needed to determine if PNMS affect placental function throughout an alteration of the 5-HT_{2A} receptor.

Perceived distress does not always correlate to objective hardship as shown in the ice storm project (Laplante *et al.*, 2004). The difference between perceived distress and experienced hardship is one of the advantages of using a natural disaster to study the effect of PNMS. Separating different stress measures has enabled us to identify placental biomarkers that may be

more sensitive to different types of stress. Moreover, the link between PNMS questionnaires and stress biomarkers such as cortisol level remain unclear (Baibazarova *et al.*, 2013; Wadhwa *et al.*, 1996). Objective stress in animal models has been associated with increased maternal and fetal cortisol and corticosterone level (the main glucocorticoid response of stress in rodents) (Gong *et al.*, 2015). However, in humans, this association is less clear as other factors such as personality and obesity can mitigate the cortisol response (Bose *et al.*, 2009; Oswald *et al.*, 2006). Harville *et al.* found a significant negative correlation between negative life events and salivary cortisol level during pregnancy and blood CRH level (Harville *et al.*, 2009). These studies highlight the possibility that different types of stress (assessed by questionnaires) might be associated with different biological responses in a subject, which may explain the dimorphism in the response to different stresses for the placental *HTR2A* we observed in our cohort (i.e. a different sensitivity to PNMS measures depending on fetal sex). It is also more accepted that the human placenta responds differently to PNMS depending on the fetal sex (reviewed in (Clifton, 2010b)). This is thought to be mediated, in part, by the different isoforms of the glucocorticoid receptor (GR) (Saif *et al.*, 2014b; Saif *et al.*, 2015). In this sense, we previously demonstrated that subjective distress also predicts lower *NR3C1-β* mRNA level in male placentas (*St-Pierre et al., Psychoneuroendocrinology under revision*), and in the present study we showed that *HTR2A* and *NR3C1-β* placental mRNA levels were positively correlated. This suggests that there may be a crosstalk between the serotonin and glucocorticoid signaling systems and that those systems might adapt differently depending on fetal sexes. However, such crosstalk or association remains to be clarified with further studies.

The placental serotonin system is crucial in the regulation of fetal development and programming [4, 5, 52, 53]. Contrary to our hypothesis, we did not observe any direct effect of PNMS on the placental mRNA levels of *MAOA*, *SLC6A4*, *TPH2* or *HTR2B*. However, we found that the anxiety and depression were significantly associated with a higher placental *TPH2* and *HTR2A* mRNA levels for female placentas. PNMS, prenatal anxiety and prenatal depression have been linked in another study, these results could suggest an indirect effect of PNMS on these placental serotonin-related genes (Rallis *et al.*, 2014). Furthermore, timing of the PNMS was a significant moderator of the effect of objective hardship on *MAOA* mRNA level for male placentas. Specifically, high objective distress in early pregnancy was associated with a lower placental *MAOA* mRNA level. For low objective distress, we observed a higher *MAOA* mRNA level if the PNMS occurred early during pregnancy (< 30 days) compared to a high objective hardship. This means that if the PNMS occurred early in pregnancy, there would be less placental *MAOA* mRNA at term, leading to a lower rate of degradation of serotonin. Less serotonin degradation in the

placenta exposed to PNMS during early pregnancy suggest a higher serotonin level in placenta (Bonnin *et al.*, 2011). As placental MAOA activity is crucial to maintain low maternal serotonin level to prevent vasoconstriction of the uterine artery, a decrease on MAOA mRNA expression in first trimester exposed mother might increase the risk of obstetric complication such as preterm birth and intra-uterine growth restriction. Further studies are needed to evaluate the effect of a lower placental MAOA level of pregnancy and child outcome.

4.2 Effect of PNMS on the placental endocrine system

Previous studies suggested that hCG, hPL and pGH may be involved in the cortisol system or influenced by cortisol during pregnancy (Braun *et al.*, 2007; Lange & Anthonsen, 1980; Zeck *et al.*, 2008). In our study, we did not find any direct link between PNMS and placental genes of hormones tested, except for a marginally significant reduction in *CGB* gene expression by objective hardship for male placentas. This was contrary to our hypothesis, but this reduction was not observed in the correlations analysis.

Interestingly we found a negative correlation between placental mRNA levels of genes of hormones and the expression of serotonin promoting genes. Placental *HTR2A* and *TPH2* were negatively correlated with the mRNA levels of *CGB*, *CSH1* and *GH2*. This suggests that an increase in serotonin production and signaling would reduce the level of placental growth hormones. On the other hand, placental *SL6A4* and *MAOA* mRNA, genes involved in to serotonin uptake and metabolism respectively, are positively correlated with placental *CGB*, *CSH1*, *GH2* as well as *CYP19A1* mRNA levels. This suggests that serotonin clearance (or serotonin re-uptake) and the resulting reduction in serotonin signaling would increase the production of placental hormones. Further studies are needed to corroborate the role of PNMS and serotonin signaling on placental endocrine functions.

The timing of exposure to the flood during pregnancy was a significant moderator of the mRNA level of *CYP19A1* in female placentas, with a significant reduction of *CYP19A1* if the flood occurred in mid-pregnancy. In other words, *CYP19A1* mRNA level was reduced with objective hardship if PNMS occurred closer to mid pregnancy. Furthermore, these data also suggest that for lower objective hardship, there was a significant difference in placental *CYP19A1* mRNA level. This indicates that even at relatively low objective hardship, there would be a significant change in placental estrogen production and that this modification would be dependant on the timing of the stressor event in pregnancy. As estrogen production is known to increase throughout pregnancy, the reduction in *CYP19A1* observed when PNMS exposure occurs in mid-gestation may potentially lead to a reduction in estrogen production for female placentas but not for male

placentas (Kumar & Magon, 2012). Still, this significant difference in placental *CYP19A1* mRNA level for low objective hardship in female placentas was not expected. A possible explanation is that early exposition to the event of PNMS during pregnancy (even for a low level of PNMS) inhibits the ability of the placenta to adjust its *CYP19A1* mRNA level later in pregnancy. Furthermore, *CYP19A1* seems to be only affected by high PNMS in mid pregnancy, shedding the light on specific vulnerability windows of the *CYP19A1* gene expression to PNMS during pregnancy. The *CYP19A1* gene is regulated by several promoters in the placenta (PII, I.2, I.3, I.4, I.8 and 1.2a) (Hogg *et al.*, 2013). Of those promoters, I.4 and I.8 are known to contain glucocorticoid receptor response elements (GRE). Thus, it is possible to speculate that the difference in timing sensitivity to PNMS observed in our study is a consequence of a shift in promoter activity (Hogg *et al.*, 2013). *CYP19A1* should be further investigated for its role in placental adaptation to PNMS and the possible role of an altered placental estrogen production on pregnancy and child outcome. Furthermore, placental *GH2* and *CYP19A1* are marginally moderated by subjective distress while *CSH1* is marginally moderated by timing for objective hardship for female placentas. The fact that the hormones are moderated by the timing of the flood only in female placentas is further evidence of placental adaptation to PNMS in female fetuses that is not present in male placentas (Clifton, 2010b; Gabory *et al.*, 2009). Further studies are needed to establish the exact role of placental hormones in the placental adaptation to PNMS and to their role in fetal programming.

4.3 Strengths

The use of a natural disaster as a stressor event to study the effect of PNMS on placental gene expression and fetal programming in humans has a lot of advantages compared to other methods (*e.g. in vitro*, life event assessments, anxiety, animal model). The natural disasters occurs randomly in a population of pregnant women at different stages of gestation and this happens independently from their prior mental health and personality traits (King *et al.*, 2005). The QF2011 study is the only study that assesses the effect of PNMS from a natural disaster on placental biomarkers. Another strength of the study is the use of several stress assessments, where we are able to pinpoint what is the PNMS measure linked to alterations in placental biomarkers as it has been demonstrated that objective hardship and subjective distress are linked to different fetal programming effects (Simcock *et al.*, 2017; Simcock *et al.*, 2016). Furthermore, to our knowledge, this is the first study to assess placental mRNA levels of genes related to the endocrine functions and the placental serotonin system following PNMS.

4.4 Limitations

The main limitation of this study is the relatively small sample of placentas that were available for analysis and associated with measures of stress from questionnaires. Furthermore, we were not able to obtain placentas from women who were exposed to the flood late in pregnancy. These women gave birth before the ethical approval was obtained as this study was planned right after the onset of the flood. Furthermore, we were not able to collect sufficient numbers for biological stress measures (salivary cortisol of the newborn). For the statistical analysis, it is noteworthy that we did not use any correction method for multiple testing. We also decided to highlight marginally significant results: these results need to be confirmed in other studies. It is also important to mention that we tested for genes that we hypothesized would be influenced by PNMS, however there are several other genes in the placental serotonin system or placental hormones.

4.5 Conclusion

This study shows distinct placental adaptations to PNMS depending on the fetal sex in regards to the serotonin signaling response and endocrine function. Another finding is that the placenta seems to lose the ability to adjust the mRNA level of *MAOA* for males and *CYP19A1* for females in case of high PNMS. While our results demonstrate that PNMS can affect mRNA levels of genes involved in serotonin signaling and hormonal production, the mechanism by which this will in turn affect the fetal programming power of the placenta remains to be studied. The placenta is easily accessible at birth and has the potential to be used to assess early biomarkers of adverse fetal programming effect appearing later in life.

DISCLOSURE STATEMENT and CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest and have nothing to disclose.

CONTRIBUTORS

C. Vaillancourt, S. King, S. Kildea, P. Dawson, and D.P. Laplante participated in study conception and design as well as revising critically the manuscript. J. St-Pierre and P. Dawson were involved in the collection, preparation and storage of the placentas with S. Kildea as site supervisor. J. St-Pierre drafted the manuscript and did the placental experimental work and the data acquisition, and did the statistical analysis under supervision of G. Elgbeili. J St-Pierre and C. Vaillancourt contributed to the analysis and interpretation of data. All authors have approved the final version of the article.

ROLE OF THE FUNDING SOURCE

Funding sources had no involvement in this article outside of financial support.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR; MOP-115067) to S. King, S. Kildea and colleagues and the Mater Research Institute and the Mater Health Service. J. St-Pierre was supported by the *Fond de recherche du Québec en santé (FRSQ)*. We are grateful to Vicki Clifton for critical comments on the manuscript. The authors wish to thank all the families who have participated in the QF2011 study, Matthew Cook, Laura Shoo and Jack Callum for their help with placental collection.

5 References

1. Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews*. 2010;65(1):56-79.
2. Barker DJP, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989;2(8663):577-80.
3. Ponder KL, Salisbury A, McGonnigal B, Laliberte A, Lester B, Padbury JF. Maternal depression and anxiety are associated with altered gene expression in the human placenta without modification by antidepressant use: Implications for fetal programming. *Developmental psychobiology*. 2011;53(7):711-23.
4. St-Pierre J, Laurent L, King S, Vaillancourt C. Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta*. 2016;48, Supplement 1:S66-S71.
5. Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih JC, et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature*. 2011;472(7343):347-50.
6. Laurent L, Deroy K, St-Pierre J, Côté F, Sanderson JT, Vaillancourt C. Human placenta expresses both peripheral and neuronal isoform of tryptophan hydroxylase. *Biochimie*.
7. St-Pierre J, Laurent L, King S, Vaillancourt C. Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta*. 2016;48 Suppl 1:S66-S71.
8. Viau M, Lafond J, Vaillancourt C. Expression of placental serotonin transporter and 5-HT 2A receptor in normal and gestational diabetes mellitus pregnancies. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(2):207-15.

9. Blakeley PM, Capron LE, Jensen AB, O'Donnell KJ, Glover V. Maternal prenatal symptoms of depression and down regulation of placental monoamine oxidase A expression. *Journal of Psychosomatic Research*. 2013;75(4):341-5.
10. Bottalico B, Larsson I, Brodzki J, Hernandez-Andrade E, Casslen B, Marsal K, et al. Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta*. 2004;25(6):518-29.
11. Klempan T, Hudon-Thibeault AA, Oufkir T, Vaillancourt C, Sanderson JT. Stimulation of serotonergic 5-HT_{2A} receptor signaling increases placental aromatase (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human choriocarcinoma cells. *Placenta*. 2011;32(9):651-6.
12. Malassine A, Cronier L. Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine*. 2002;19(1):3-11.
13. Hudon Thibeault AA, Laurent L, Vo Duy S, Sauve S, Caron P, Guillemette C, et al. Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the fetoplacental unit. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017;442:32-9.
14. Groothuis PG, Dassen HHNM, Romano A, Punyadeera C. Estrogen and the endometrium: Lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Human Reproduction Update*. 2007;13(4):405-17.
15. Wyrwoll CS, Holmes MC. Prenatal excess glucocorticoid exposure and adult affective disorders: A role for serotonergic and catecholamine pathways. *Neuroendocrinology*. 2012;95(1):47-55.
16. Rääkkönen K, Pesonen AK, O'Reilly JR, Tuovinen S, Lahti M, Kajantie E, et al. Maternal depressive symptoms during pregnancy, placental expression of genes regulating glucocorticoid and serotonin function and infant regulatory behaviors. *Psychological Medicine*. 2015;45(15):3217-26.
17. Wang WS, Liu C, Li WJ, Zhu P, Li JN, Sun K. Involvement of CRH and hCG in the induction of aromatase by cortisol in human placental syncytiotrophoblasts. *Placenta*. 2013.
18. Fowden AL, Forhead AJ. Glucocorticoids as regulatory signals during intrauterine development. *Experimental Physiology*. 2015;100(12):1477-87.
19. Shu Q, Li W, Li J, Wang W, Liu C, Sun K. Cross-Talk between cAMP and MAPK Pathways in HSD11B2 Induction by hCG in placental trophoblasts. *PLoS ONE*. 2014;9(9).

20. Wang W, Li J, Ge Y, Li W, Shu Q, Guan H, et al. Cortisol induces aromatase expression in human placental syncytiotrophoblasts through the cAMP/Sp1 pathway. *Endocrinology*. 2012;153(4):2012-22.
21. Zeck W, Widberg C, Maylin E, Desoye G, Lang U, McIntyre D, et al. Regulation of placental growth hormone secretion in a human trophoblast model - The effects of hormones and adipokines. *Pediatric Research*. 2008;63(4):353-7.
22. Braun T, Li S, Moss TJM, Newnham JP, Challis JRG, Gluckman PD, et al. Maternal betamethasone administration reduces binucleate cell number and placental lactogen in sheep. *Journal of Endocrinology*. 2007;194(2):337-47.
23. Lange AP, Anthonsen H. Serum levels of human placental lactogen during and after prenatal dexamethasone therapy. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 1980;59(2):111-4.
24. Balsa JA, Sanchez-Franco F, Pazos F, Lara JI, Lorenzo MJ, Maldonado G, et al. Direct action of serotonin on prolactin, growth hormone, corticotropin and luteinizing hormone release in cocultures of anterior and posterior pituitary lobes: autocrine and/or paracrine action of vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology*. 1998;68(5):326-33.
25. Rabii J, Buonomo F, Scanes CG. Role of serotonin in the regulation of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl. *J Endocrinol*. 1981;90(3):355-8.
26. Valverde I, Penalva A, Dieguez C. Influence of different serotonin receptor subtypes on growth hormone secretion. *Neuroendocrinology*. 2000;71(2):145-53.
27. Mueller BR, Bale TL. Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci*. 2008;28(36):9055-65.
28. King S, Kildea S, Austin MP, Brunet A, Cobham VE, Dawson PA, et al. QF2011: A protocol to study the effects of the Queensland flood on pregnant women, their pregnancies, and their children's early development. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2015;15(1).
29. Mayhew TM. Stereology and the placenta: where's the point? -- a review. *Placenta*. 2006;27 Suppl A:S17-25.
30. Burton GJ, Sebire NJ, Myatt L, Tannetta D, Wang YL, Sadovsky Y, et al. Optimising sample collection for placental research. *Placenta*. 2014;35(1):9-22.
31. Lanoix D, Lacasse AA, St-Pierre J, Taylor SC, Ethier-Chiasson M, Lafond J, et al. Quantitative PCR Pitfalls: The Case of the Human Placenta. *Molecular Biotechnology*. 2012:1-10.

32. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002;3(7):0034.1-1134.11.
33. St-Pierre J, Grégoire J-C, Vaillancourt C. A simple method to assess group difference in RT-qPCR reference gene selection using GeNorm: The case of the placental sex. *Scientific Reports*. 2017;7(1):16923.
34. Laplante DP, Zelazo PR, Brunet A, King S. Functional play at 2 years of age: Effects of prenatal maternal stress. *Infancy*. 2007;12(1):69-93.
35. Yong Ping E, Laplante DP, Elgbeili G, Hillerer KM, Brunet A, O'Hara MW, et al. Prenatal maternal stress predicts stress reactivity at 2(1/2) years of age: the Iowa Flood Study. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;56:62-78.
36. Simcock G, Kildea S, Elgbeili G, Laplante DP, Cobham V, King S. Prenatal maternal stress shapes children's theory of mind: the QF2011 Queensland Flood Study. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2017:1-10.
37. Simcock G, Kildea S, Elgbeili G, Laplante DP, Stapleton H, Cobham V, et al. Age-related changes in the effects of stress in pregnancy on infant motor development by maternal report: The Queensland Flood Study. *Developmental psychobiology*. 2016;58:640-59.
38. Weiss DS, Marmar, C.R. The impact of event scale-revised *Assessing Psychological Trauma and PTSD 1997*. p. 399-411.
39. Brunet A, Weiss DS, Metzler TJ, Best SR, Neylan TC, Rogers C, et al. The Peritraumatic Distress Inventory: a proposed measure of PTSD criterion A2. *Am J Psychiatry*. 2001;158(9):1480-5.
40. Marmar CR, Weiss, D.S., Metzler, T.J. . The peritraumatic dissociative experiences questionnaire *Assessing Psychological Trauma and PTSD 1997*. p. pp. 412-28.
41. Cox JL, Chapman G, Murray D, Jones P. Validation of the Edinburgh postnatal depression scale (EPDS) in non-postnatal women. *J Affect Disord*. 1996;39.
42. Spielberger CD. State-Trait Anxiety Inventory. *The Corsini Encyclopedia of Psychology*: John Wiley & Sons, Inc.; 2010.
43. Pink B. Socio-Economic Indexes for Areas (SEIFA) - Technical Paper. Secondary Socio-Economic Indexes for Areas (SEIFA)- Technical Paper: Australian Bureau of statistics; 2011.
44. Hayes A. *Introduction to Mediation, Moderation, and Conditional Process Analysis*. New York: The Guilford Press; 2013.

45. Sonier B, Lavigne C, Arseneault M, Ouellette R, Vaillancourt C. Expression of the 5-HT_{2A} serotonergic receptor in human placenta and choriocarcinoma cells: mitogenic implications of serotonin. *Placenta*. 2005;26(6):484-90.
46. Paquette AG, Lesseur C, Armstrong DA, Koestler DC, Appleton AA, Lester BM, et al. Placental HTR_{2A} methylation is associated with infant neurobehavioral outcomes. *Epigenetics*. 2013;8(8):796-801.
47. Laplante DP, Barr RG, Brunet A, Du Fort GG, Meaney ML, Saucier JF, et al. Stress during pregnancy affects general intellectual and language functioning in human toddlers. *Pediatric Research*. 2004;56(3):400-10.
48. Baibazarova E, van de Beek C, Cohen-Kettenis PT, Buitelaar J, Shelton KH, van Goozen SHM. Influence of prenatal maternal stress, maternal plasma cortisol and cortisol in the amniotic fluid on birth outcomes and child temperament at 3 months. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(6):907-15.
49. Wadhwa PD, Dunkel-Schetter C, Chicz-DeMet A, Porto M, Sandman CA. Prenatal psychosocial factors and the neuroendocrine axis in human pregnancy. *Psychosom Med*. 1996;58(5):432-46.
50. Gong S, Miao Y-L, Jiao G-Z, Sun M-J, Li H, Lin J, et al. Dynamics and Correlation of Serum Cortisol and Corticosterone under Different Physiological or Stressful Conditions in Mice. *PLoS ONE*. 2015;10(2):e0117503.
51. Bose M, Oliván B, Laferrère B. Stress and obesity: the role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in metabolic disease. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2009;16(5):340-6.
52. Oswald LM, Zandi P, Nestadt G, Potash JB, Kalaydjian AE, Wand GS. Relationship between cortisol responses to stress and personality. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(7):1583-91.
53. Harville EW, Savitz DA, Dole N, Herring AH, Thorp JM. Stress questionnaires and stress biomarkers during pregnancy. *J Womens Health (Larchmt)*. 2009;18(9):1425-33.
54. Clifton VL. Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival. *Placenta*. 2010;31(SUPPL.):S33-S9.
55. Saif Z, Hodyl NA, Hobbs E, Tuck AR, Butler MS, Osei-Kumah A, et al. The human placenta expresses multiple glucocorticoid receptor isoforms that are altered by fetal sex, growth restriction and maternal asthma. *Placenta*. 2014.

56. Saif Z, Hodyl NA, Stark MJ, Fuller PJ, Cole T, Lu N, et al. Expression of eight glucocorticoid receptor isoforms in the human preterm placenta vary with fetal sex and birthweight. *Placenta*. 2015;36(7):723-30.
57. Rallis S, Skouteris H, McCabe M, Milgrom J. A prospective examination of depression, anxiety and stress throughout pregnancy. *Women Birth*. 2014;27(4):e36-42.
58. Kumar P, Magon N. Hormones in pregnancy. *Nigerian Medical Journal : Journal of the Nigeria Medical Association*. 2012;53(4):179-83.
59. Hogg K, Blair JD, McFadden DE, von Dadelszen P, Robinson WP. Early onset pre-eclampsia is associated with altered DNA methylation of cortisol-signalling and steroidogenic genes in the placenta. *PLoS One*. 2013;8(5):e62969.
60. Gabory A, Attig L, Junien C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;304(1-2):8-18.
61. King S, Laplante D, Joober R. Understanding putative risk factors for schizophrenia: retrospective and prospective studies. *J Psychiatry Neurosci*. 2005;30(5):342-8.

Highlights

1. Objective hardship predicts a lower placental *HTR2A* mRNA level for male placentas
2. Subjective distress predicts a lower placental *HTR2A* mRNA level for female placentas
3. Lower objective hardship during 1st trimester predicts a higher *MAOA* mRNA level for male placentas
4. Lower objective hardship during second trimester predicts a higher *CYP19A1* mRNA level for female placentas

FIGURE

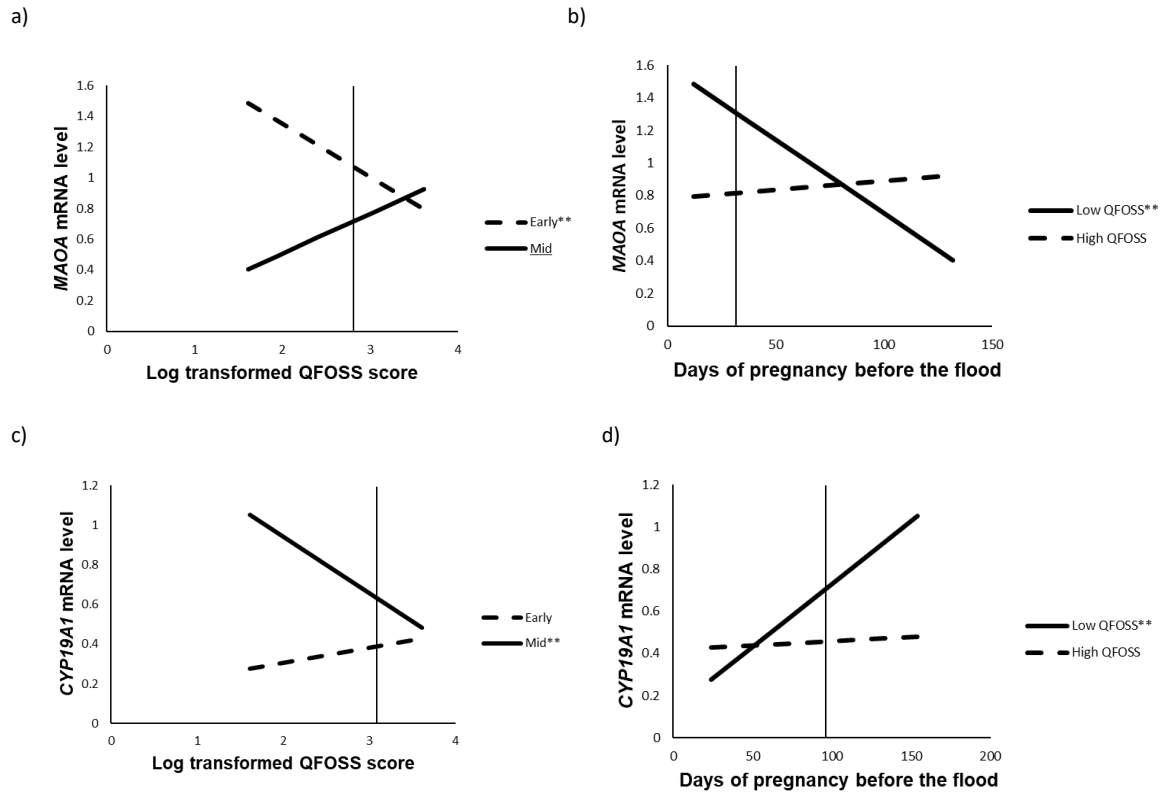


Fig.1: Significant moderation by timing of exposure during pregnancy of the effect of objective hardship (QFOSS) on placental mRNA levels of (A-B) monoamine oxidase A (MAOA) for male placentas, and (C-D) aromatase (CYP19A1) for female placentas. Vertical lines represent the significance threshold of the region of significance showing significant objective hardship effects at earlier timing of exposure in A) and mid in C); and significant timing effects at B) and D) lower QFOSS. “Early” pregnancy is represented at 2 weeks of pregnancy and earlier, and “mid” is represented at 20 weeks of pregnancy and later. Slope significance legend: **: $p < 0.01$; Underline: $p < 0.1$. See also table 6.

Table 1: Cohort characteristics

	Male Mean (n, SD)	Female Mean (n, SD)	Sig.
Predictor variables			
QFOSS	16.45 (51, 15.51)	18.20 (45, 14.72)	0.574
COSMOSS	-0.08 (51, 1.02)	-0.25 (45, 0.59)	0.324
IES-R	6.30 (51, 10.86)	4.25 (45, 7.07)	0.282
PDI	11.50 (51, 9.03)	9.72 (45, 6.38)	0.273
PDEQ	4.85 (51, 7.18)	4.41 (45, 4.10)	0.722
Covariates			
STAI	38.26 (51, 8.45)	34.40 (45, 9.37)	0.036*
EDS	5.07 (44, 3.55)	4.87 (39, 4.41)	0.823
SEIFA	1043.43 (51, 67.95)	1057.47 (45, 50.65)	0.259
Days of pregnancy at the flood	78.34 (51, 46.58)	86.79 (45, 50.25)	0.395
Pregnancy characteristics			
Gestation length (weeks)	39.37 (51, 1.25)	39.53 (45, 1.12)	0.510
Birth weight (Kg)	3.62 (51, 0.43)	3.58 (45, 0.38)	0.635
Birth weight for gestational age	0.26 (51, 0.78)	0.40 (45, 0.67)	0.335
Placental weight (kg)	0.65 (50, 0.12)	0.65 (43, 0.13)	0.889
Placental index	0.18 (50, 0.03)	0.18 (43, 0.03)	0.973
Mothers' characteristics			
Previous pregnancies	0.67 (51, 0.88)	0.84 (43, 1.07)	0.400
BMI	24.57 (51, 4.46)	24.50 (44, 5.77)	0.943
Age at birth	30.84 (51, 5.11)	31.15 (45, 5.69)	0.779

QFOSS: Queensland Flood Objective Stress Scale; COSMOSS: COmposite Score of the MOther's Subjective Stress; IES-R: Impact of Event Scale - Revised; PDI: Peritraumatic Distress Inventory; PDEQ: Peritraumatic Dissociative Experiences Questionnaire; STAI: State-Trait Anxiety Inventory; EPDS: Edinburgh Postpartum Depression Scale; SEIFA: Socio-Economic Indexes for Areas; BMI: Body mass index; Placental index: placental weight divided by birth weight. Student's T test was used to assess a statistical difference in the level of the descriptive statistics. * $p < 0.05$.

Table 2: Pearson's product moment correlation (r) between placental mRNA level of genes analyzed separated by fetal sex.

		Serotonin system					Hormones				
		<i>MAOA</i>	<i>SLC6A4</i>	<i>TPH2</i>	<i>HTR2A</i>	<i>HTR2B</i>	<i>CGB</i>	<i>CSH1</i>	<i>GH2</i>	<i>CYP19A1</i>	
<i>MAOA</i>	Males										
	Females										
<i>SLC6A4</i>	Males	.326*									
	Females	.603**									
<i>TPH2</i>	Males	-.125	-.197								
	Females	-.158	-.320*								
<i>HTR2A</i>	Males	-.149	-.036	.719**							
	Females	-.179	-.286	.805**							
<i>HTR2B</i>	Males	.027	-.112	.255	.480**						
	Females	-.072	-.235	.355*	.446**						
<i>CGB</i>	Males	.516**	.445**	-.104	-.216	-.145					
	Females	.469**	.627**	-.327*	-.320*	-.226					
<i>CSH1</i>	Males	.474**	.551**	-.259	-.303*	-.193	.717**				
	Females	.714**	.776**	-.328*	-.343*	-.186	.644**				
<i>GH2</i>	Males	.502**	.378**	-.312*	-.326*	-.110	.649**	.828**			
	Females	.570**	.538**	-.421**	-.408**	-.105	.610**	.779**			
<i>CYP19A1</i>	Males	.471**	.655**	-.368**	-.377**	-.225	.636**	.824**	.725**		
	Females	.619**	.811**	-.307*	-.311*	-.169	.541**	.875**	.574**		

MAOA: Monoamine oxidase A; *SLC6A4*: Solute Carrier Family 6 member 4 (serotonin transporter); *TPH2*: tryptophan hydroxylase type 2; *HTR2A*: 5-hydroxytryptamine receptor 2A; *HTR2B*: 5-hydroxytryptamine receptor 2B; *CGB*: Chorionic Gonadotropin Beta subunit; *CSH1*: Chorionic Somatomammotropin Hormone 1; *GH2*: Growth Hormone 2; *CYP19A1*: Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1. Underline: $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 3: Pearson’s product moment correlation (r) between placental mRNA level of genes of the cortisol system with placental serotonin system and hormones separated by fetal sex.

		Serotonin system					Hormones			
		<i>MAOA</i>	<i>SLC6A4</i>	<i>TPH2</i>	<i>HTR2A</i>	<i>HTR2B</i>	<i>CGB</i>	<i>CSH1</i>	<i>GH2</i>	<i>CYP19A1</i>
<i>CRH</i>	Males	.080	.663**	<u>-.263</u>	-.015	.042	.334*	.421**	.286*	.545**
	Females	<u>.293</u>	.546**	-.207	-.220	-.245	.303*	.537**	.327*	.550**
<i>NR3C1-α</i>	Males	.165	.659**	-.112	.031	.147	.199	<u>.252</u>	<u>.245</u>	.486**
	Females	.216	.573**	-.298*	-.066	.183	.136	.477**	.344*	.552**
<i>HSD11B1</i>	Males	.052	.501**	.116	<u>.238</u>	.308*	.001	.006	.017	.142
	Females	<u>.275</u>	.342*	-.121	.172	<u>.266</u>	.081	.375*	.217	.318*
<i>HSD11B2</i>	Males	.221	.158	.153	<u>.266</u>	.135	-.194	-.031	-.190	.023
	Females	.093	.054	.298*	<u>.293</u>	<u>.258</u>	-.073	.022	-.223	.037
<i>NR3C1-β</i>	Males	.030	.031	.343*	.408**	.337*	-.065	-.135	-.182	-.046
	Females	-.208	-.106	<u>.268</u>	.534**	.350*	-.108	-.147	-.143	-.155

CRH: Corticotropin-releasing hormone; *NR3C1-α*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-α; *NR3C1-β* : Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-β; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 1; *HSD11B2*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 2; *MAOA*: Monoamine oxidase A; *SLC6A4*: Solute Carrier Family 6 member 4; *TPH2*: Tryptophan hydroxylase type 2; *HTR2A*: 5-hydroxytryptamine receptor 2A; *HTR2B*: 5-hydroxytryptamine receptor 2B; *CGB*: Chorionic Gonadotropin Beta subunit; *CSH1*: Chorionic Somatomammotropin Hormone 1; *GH2*: Growth Hormone 2; *CYP19A1*: Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1. Underline: $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 4: Pearson’s product moment correlations (r) between predictors and placental mRNA level of genes in serotonin system and hormones as well as confounders used for hierarchical multiple regression.

		<i>MAOA</i>	<i>SLC6A4</i>	<i>TPH2</i>	<i>HTR2A</i>	<i>HTR2B</i>	<i>CGB</i>	<i>CSH1</i>	<i>GH2</i>	<i>CYP19A1</i>
QFOSS	Males	.046	-.082	-.023	-.040	.022	-.217	-.149	-.109	-.138
	Females	-.093	-.139	-.052	-.158	.060	.078	-.176	-.152	-.213
COSMOSS	Males	<u>.263</u>	.061	-.065	-.232	-.167	.084	.029	.108	.004
	Females	-.197	-.202	-.089	-.108	.042	-.078	-.158	-.155	-.166
Timing	Males	-.331*	-.015	-.323*	-.070	.123	-.135	.002	-.070	-.083
	Females	-.070	<u>.257</u>	-.227	.016	-.050	.170	.325*	.213	.381**
STAI	Males	.129	-.079	.130	.102	.034	.059	-.214	-.142	-.030
	Females	-.089	-.216	.305*	.226	.185	-.338*	<u>.262</u>	<u>-.293</u>	-.178
EDS	Males	.203	-.159	-.177	-.206	-.005	.058	-.071	.031	.016
	Females	-.049	-.186	.318*	.382*	.197	-.200	-.183	-.253	-.282
SEIFA	Males	-.061	-.107	-.112	-.149	.085	.058	-.066	-.153	.015
	Females	.176	<u>.254</u>	-.373*	-.186	-.108	-.200	-.266	.203	.172

QFOSS: Queensland flood objective stress score; COSMOSS: Composite score of the mother’s subjective stress; STAI: stay-trait anxiety inventory; EDS: Edinburg depression scale; SEIFA: Socio-Economic Indexes for Areas. *MAOA*: Monoamine oxidase A; *SLC6A4*: Solute Carrier Family 6 Member 4; *TPH2*: Tryptophan hydroxylase type 2; *HTR2A*: 5-hydroxytryptamine receptor 2A; *HTR2B*: 5-hydroxytryptamine receptor 2B; *CGB*: Chorionic Gonadotropin Beta Subunit; *CSH1*: Chorionic Somatomammotropin Hormone 1; *GH2*: Growth Hormone 2; *CYP19A1*: Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1. Underline: $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 5: Significant hierarchical multiple linear regression of stress measures effect on placental mRNA level of *HTR2A* for male or female placentas.

<i>Predictor variables</i>	B	Std. Error	β	R	R ²	ΔR^2	F	ΔF
<i>HTR2A males</i>								
Step 1				.070	.005	.005	.239	.239
Timing	-.001	.001	-.070					
Step 2				.095	.009	.004	.220	.205
Timing	-.001	.001	-.091					
QFOSS	-.037	.082	-.069					
Step 3				.311	.097	.088*	1.678	4.562*
Timing	-.002	.001	-.201					
QFOSS	.054	.090	.100					
COSMOSS	-.153	.072	-.373*					
<i>HTR2A females</i>								
Step 1				.401	.160	.160	3.439*	3.439*
STAI	.006	.007	.128					
EDS	.031	.015	.338*					
Step 2				.401	.160	.000	2.229	.001
STAI	.006	.007	.128					
EDS	.031	.015	.338*					
Timing	.000	.001	.004					
Step 3				.521	.271	.111*	3.163*	5.168*
STAI	.012	.007	<u>.279</u>					
EDS	.030	.014	.322*					
Timing	.000	.001	-.042					
QFOSS	-.190	.083	-.368*					

HTR2A: 5-hydroxytryptamine receptor 2A; QFOSS: Queensland flood objective stress score; COSMOSS: composite score of mother's subjective stress; STAI: State-trait anxiety inventory; EDS: Edinburgh depression scale. Underline: $p < 0.10$, * $p < 0.05$. (See also table S2, S3).

Table 6: Significant hierarchical multiple linear regression of stress measures and timing interaction on placental mRNA level of *MAOA* for males and *CYP19A1* for females.

Predictor variables	B	Std. Error	β	R	R ²	ΔR^2	F	ΔF
<i>MAOA</i> males								
Step 1				.331	.109	.109*	6.019*	6.019*
Timing	-.331	.135	-.331*					
Step 2				.337	.113	.004	<u>3.065</u>	.209
Timing	-.352	.143	-.352*					
QFOSS	-.065	.143	-.065					
Step 3				.454	.206	.092*	4.057*	5.470*
Timing	-.411	.139	-.411**					
QFOSS	-.018	.139	-.018					
QFOSS x Timing	.377	.161	.316**					
<i>CYP19A1</i> females								
Step 1				.381	.145	.145*	7.318*	7.318*
Timing	.381	.141	.381**					
Step 2				.419	.176	.030	4.478*	1.545
Timing	.363	.141	.363*					
QFOSS	-.175	.141	-.175					
Step 3				.521	.271	.096*	5.091**	5.382*
Timing	.446	.139	.446**					
QFOSS	-.223	.136	-.223					
QFOSS x Timing	-.315	.136	-.325*					

QFOSS: Queensland flood objective stress score; *MAOA*: Monoamine oxidase A; *CYP19A1*: Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1. Underline: $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (See also figure 1 and table S4).

Table S1: Primer sequences

Gene	Accession number	primer sequence sense	Primer sequence antisense
<i>CGB</i>	NM_033377.1	GCTACTGCCCCACCATGACC	ATGGACTCGAAGCGCACATC
<i>CRH</i>	NM_000756.3	TCTGTACCATAGCGCTGCTC	GTTGCTGCTGCACGTGAATA
<i>CSH1</i>	NM_001317.5	GCATGACTCCCAGACCTCCTT	TGCGGAGCAGCTCTAGATTGG
<i>CYP19A1</i>	NM_000103.3	TGTCTCTTTGTTCTTCATGC	TCACCAATAACAGTCTGGAT
<i>GH2</i>	NM_022558.3	AGAACCCCCAGACCTCCCT	TGCGGAGCAGCTCTAGGTTAG
<i>HPRT1</i>	NM_000194.2	GACCAGTCAACAGGGGACATAA	AAGCTTGCGACCTTGACC
<i>HSD11B1</i>	NM_005525.3	AGCAAGTTTGCTTTGGATG	AGAGCTCCCCCTTTGATGAT
<i>HSD11B2</i>	NM_000196.3	TTGTTTCTCGGCACCAGT	GCCCTAATTCTTGAGCCAGT
<i>HTR2A</i>	NM_000621.4	GCTGATATGCTGCTGGGTTTC	GGTAAATCCAGACTGCACAAAGC
<i>HTR2B</i>	NM_000867.4	TGGCTGATTTGCTGTTGG	GGCACAGAGATGCATGATGGA
<i>MAOA</i>	NM_000240.3	GGAGGTGGCATTTCAGGACT	TGGGTTGGTCCCACATAAGC
<i>NR3C1</i>	NC_000005.10	CAAGTGATTGCAGCAGTGAAATG	TTTATGTTTTGCATCTTACCTGGTATTG
<i>NR3C1-α</i>	NM_001204258.1	CTTGATTCTATGCATGAAGTGGTT	TTGGAAGCAATAGTTAAGGAGATTTTC
<i>NR3C1-β</i>	NM_001020825.1	ACTCTTGGATTCTATGCATGAAAATG	TGTGTGAGATGTGCTTTCTGGTTT
<i>SLC6A4</i>	NM_001045.5	CCGCCACAACACTACGACTT	CTGTTGGTGTCTGTTGGGTAAT
<i>TOP-1</i>	NM_003286.3	GGCGAGTGAATCTAAGG	CTTAAAGGGTACAGCGAATG
<i>TPH2</i>	NM_173353.3	CACGCCCTTCCTCTCAA	CCTCTCCGTGCCCAGTATTT

CGB: Chorionic Gonadotropin Beta subunit; *CRH*: Corticotropin-releasing hormone; *CSH1*: Chorionic Somatomammotropin Hormone 1; *CYP19A1*: Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1; *GH2*: Growth Hormone 2; *HPRT1*: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 1; *HSD11B2*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 2; *HTR2A*: 5-hydroxytryptamine receptor 2A; *HTR2B*: 5-hydroxytryptamine receptor 2B; *MAOA*: Monoamine oxidase A; *NR3C1- α* : Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1- α ; *NR3C1- β* : Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1- β ; *SLC6A4*: Solute Carrier Family 6 member 4; *TOP-1*: Topoisomerase 1; *TPH2*: Tryptophan hydroxylase type 2. *HPRT1* and *TOP-1* were used as reference genes.

Table S2: Standardized coefficients from hierarchical multiple linear regression of subjective stress measures on placental *HTR2A* for male placentas only, following significant COSMOSS effect.

Predictor	<i>HTR2A</i> males
IES-R	-0.211
PDI	-0.212
PDEQ	-0.235

COSMOSS: Composite score of the mother's subjective stress; IES-R: Impact of event scale – revised; PDI: Peritraumatic distress inventory; PDEQ: peritraumatic dissociative experiences questionnaire; *HTR2A*: 5-Hydroxytryptamine receptor 2A.

Table S3: Hierarchical multiple linear regression of stress measures effect on placental mRNA level of genes tested for either male, or female placentas.

Gene	Males		Females	
	QFOSS ^a	COSMOSS ^b	QFOSS ^a	COSMOSS ^b
<i>MAOA</i>	-.065	.232	-.196 ^c	-.226 ^c
<i>SLC6A4</i>	-.096	.149	-.113	-.217
<i>TPH2</i>	-.140	-.237	-.187 ^d	-.180 ^d
<i>HTR2A</i>	-.069	-.374*	-.368*^{c,e}	-.124 ^{c,e}
<i>HTR2B</i>	.068	-.225	.055	.015
<i>CGB</i>	<u>-.289</u>	.228	.225 ^d	-.104 ^d
<i>CSH1</i>	-.165	.155	-.144	-.119
<i>GH2</i>	-.146	.218	-.132	-.124
<i>CYP19A1</i>	-.183	.067	-.175	-.103

Adjusted for ^aTiming; ^bTiming and QFOSS; ^csocioeconomic status; ^danxiety; ^edepression.

MAOA: Monoamine oxidase A; *SLC6A4*: Solute Carrier Family 6 member 4; *TPH2*: Tryptophan hydroxylase type 2; *HTR2A*: 5-hydroxytryptamine receptor 2A; *HTR2B*: 5-hydroxytryptamine receptor 2B; *CGB*: Chorionic Gonadotropin Beta subunit; *CSH1*: Chorionic Somatomammotropin Hormone 1; *GH2*: Placental growth hormone 2; QFOSS: Queensland flood objective stress score; COSMOSS: composite score of mother's subjective stress. Underline: $p < 0.10$, * $p < 0.05$. (See also table S2)

Table S4: Interaction effect (R² change) of the timing of the stressful event on the effect of stress on placental serotonin system and hormones mRNA level separated by fetal sex.

Gene	Timing interaction			
	Males		Females	
	QFOSS ^a	COSMOSS ^b	QFOSS ^a	COSMOSS ^b
<i>MAOA</i>	.092*	.040	.027 ^c	.014 ^c
<i>SLC6A4</i>	.002	.033	.035	.012
<i>TPH2</i>	.008	.009	.020 ^d	.018 ^d
<i>HTR2A</i>	.006	.006	.009 ^{c,e}	.011 ^{c,e}
<i>HTR2B</i>	.012	.001	.039	.037
<i>CGB</i>	.004	.013	.043 ^d	.012 ^d
<i>CSH1</i>	.022	.009	.072	.057
<i>GH2</i>	.025	.011	.036	.072
<i>CYP19A1</i>	.041	.001	.096*	.074

Adjusted for: ^aTiming; ^bTiming and QFOSS; ^csocioeconomic status; ^danxiety; ^edepression.

MAOA: Monoamine oxidase A; *SLC6A4*: Solute Carrier Family 6 member 4; *TPH2*: Tryptophan hydroxylase type 2; *HTR2A*: 5-hydroxytryptamine receptor 2A; *HTR2B*: 5-hydroxytryptamine receptor 2B; *CGB*: Chorionic Gonadotropin Beta subunit; *CSH1*: Chorionic Somatomammotropin Hormone 1; *GH2*: Growth Hormone 2; *CYP19A1*: Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1. Underline: $p < 0.10$, * $p < 0.05$.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet de recherche démontre que le stress objectif et subjectif durant la grossesse pourrait affecter l'expression des gènes placentaires impliqués dans le système de réponse au cortisol et à la sérotonine, le transport du glucose ainsi que dans les fonctions endocrines (tableau 5.1).

Tableau 5.1 : Résumé des résultats significatifs obtenus pour l'effet du PNMS sur les biomarqueurs placentaires

Système	Biomarqueurs placentaires	Mesure du stress	
		Stress objectif (QFOSS)	Stress subjectif (COSMOSS)
Glucocorticoïdes	<i>CRH</i>	-	-
	<i>NR3C1-α</i>	-	♂↓M
	<i>HSD11B1</i>	-	♂↓M
	<i>HSD11B2</i>	-	-
	11β-HSD2- protéine	-	-
	11β-HSD2- activité	-	-
	<i>NR3C1-β</i>	-	♂↓
	<i>NR3C1</i>	-	-
Transport du glucose	<i>SLC2A1</i>	-	-
	GLUT1- protéine	-	-
	<i>SLC2A3</i>	-	-
	<i>SLC2A4</i>	-	-
Sérotonine	<i>MAOA</i>	♂↓D	-
	<i>SLC6A4</i>	-	-
	<i>TPH2</i>	-	-
	<i>HTR2A</i>	♀↓	♂↓
	<i>HTR2B</i>	-	-
Hormones	<i>CGB</i>	-	-
	<i>CSH1</i>	-	-
	<i>GH2</i>	-	-
	<i>CYP19A1</i>	♀↓M	-

♂ : placentas males; ♀ : placentas femelles M: stress survenu en mi-grossesse; D: stress survenu en début de grossesse *CRH*: Corticotropin-releasing hormone; *NR3C1*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1; *NR3C1-α*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-α; *NR3C1-β*: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1-β; *HSD11B1*: Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 1; *HSD11B2*: 11β-HSD2 - Hydroxysteroid 11-Beta dehydrogenase type 2; *SLC2A1*: Solute Carrier Family 2 type 1; *SLC2A3*: Solute Carrier Family 2 type 3; *SLC2A4*: Solute Carrier Family 2 type 4; *MAOA*: Monoamine oxidase A; *SLC6A4*: Solute Carrier Family 6 Member 4 (serotonin transporter); *TPH2*: Tryptophan hydroxylase type 2; *HTR2A*: 5-hydroxytryptamine receptor 2A; *HTR2B*: 5-hydroxytryptamine receptor 2B; *CGB*: Chorionic Gonadotropin Beta Subunit; *CSH1*: Chorionic Somatomammotropin Hormone 1; *GH2*: Growth Hormone 2; *CYP19A1*: Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1 (aromatase).

La technique de RT-qPCR utilisée principalement dans cette étude est une méthode très fiable, acceptée dans la littérature, pour identifier des différences d'expression de l'ARNm des gènes (Taylor *et al.*, 2010). Par contre, il s'agit d'une technique complexe qui requiert plusieurs étapes de contrôle pour obtenir des résultats précis et reproductibles (Lanoix *et al.*, 2012b). Certaines étapes comme la vérification de la qualité et de l'intégrité de l'ARNm ou encore le choix des gènes de références sont parfois négligées et entraînent des résultats erronés qui peuvent induire les chercheurs en erreur ou les diriger sur de fausses pistes pour des projets subséquents (Lanoix *et al.*, 2012b; Taylor *et al.*, 2010). L'utilisation de gènes de référence est la méthode de choix pour obtenir un niveau de quantification relatif et pour corriger les erreurs techniques qui peuvent survenir durant l'isolation de l'ARNm, la réaction de transcriptase inverse ou les dilutions (Vandesompele *et al.*, 2002a). Un gène de référence est un gène dont l'expression est stable dans tous les traitements ou les échantillons (Taylor *et al.*, 2010). Une variable importante du présent projet est le sexe du fœtus. Il s'avère donc primordial de choisir des gènes de référence qui ne varient pas selon le sexe du fœtus. Malheureusement, le logiciel le plus populaire (GeNorm) pour la sélection des gènes de référence ne permet pas d'inclure deux groupes d'échantillons dans la méthode de calcul (Vandesompele *et al.*, 2002a). En observant que certains gènes de référence populaires avaient un taux d'ARNm absolu qui était significativement différent entre les placentas de garçons et de filles, nous en avons conclu que le logiciel GeNorm n'est pas suffisant pour choisir de façon adéquate la bonne combinaison de gènes de référence. Le deuxième logiciel le plus populaire (NormFinder) permet la sélection de gènes de référence en tenant compte d'un groupe d'échantillons, mais en utilisant les gènes recommandés par celui-ci, les résultats ne démontraient pas de différences significatives entre les sexes pour le taux d'ARNm des gènes placentaires qui pourtant avaient un taux absolu d'expression significativement différent. Nous avons donc développé une nouvelle méthode d'analyse pour le choix du gène de référence en utilisant le logiciel GeNorm, mais en calculant la différence d'expression absolue entre les moyennes ayant la plus petite différence possible entre les groupes. Cette méthode de calcul permet de discerner certaines différences subtiles de l'expression de l'ARNm qui pourraient échapper aux chercheurs en utilisant des gènes de références choisis par GeNorm (chapitre 1).

Contrairement à l'hypothèse de départ, le stress engendré par l'inondation de Brisbane en 2011 n'a pas modifié significativement l'expression de l'ARNm et des protéines ni l'activité de la 11 β -HSD2. Bien que la littérature fait état d'une réduction significative de l'expression de l'ARNm du gène *HSD11B2* et de l'activité de la 11 β -HSD2 dans le placenta en situation de stress prénatal (modèle animal) (Mairesse *et al.*, 2007b), d'anxiété ou de dépression (O'Donnell *et al.*, 2011b;

Seth *et al.*, 2015) (femmes enceintes), aucun effet n'a été observée dans la cohorte QF2011. La majorité des études des effets du stress durant la grossesse sur la 11 β -HSD2 placentaire chez les humains sont basées sur l'anxiété ou la dépression qui sont généralement des états de stress psychologique sur un long terme (*i.e.* chronique) et ne sont donc pas ponctuels (*i.e.* aigue) comme le stress engendré par une catastrophe naturelle. D'autres études démontrent une réduction de l'activité de la 11 β -HSD2 suite à l'injection de glucocorticoïdes de synthèse en fin de grossesse (Garbrecht *et al.*, 2006b; Stark *et al.*, 2009). Dans notre étude, tout comme le PNMS, la dépression et l'anxiété durant la grossesse ne sont pas corrélés à l'expression, ni à l'activité de la 11 β -HSD2. Cette différence avec la littérature pourrait s'expliquer par le fait que le stress engendré par la catastrophe naturelle n'est pas suffisant (*e.g.* durée, intensité) pour engendrer une modification significative de la 11 β -HSD2, ou encore que nous n'avons assez de placentas de femmes exposées à l'évènement stressant en fin de grossesse (3^e trimestre). En effet, une limite de la présente étude est l'absence de placentas de femmes exposées à l'inondation durant le dernier trimestre de grossesse. Ainsi, si un stress engendré par une catastrophe naturelle en fin de grossesse affecte la 11 β -HSD2 placentaire, demeure à étudier. Malgré que nous n'observons aucun effet du PNMS sur la 11 β -HSD2 dans notre cohorte, des analyses préliminaires démontrent une association directe entre le taux d'ARNm de *HSD11B2* et l'indice de masse corporelle (IMC) des enfants à 16 et 30 mois ainsi qu'à 4 ans (Annexe 2 – Table A1). Une altération de l'expression placentaire de la 11 β -HSD2 pourrait indirectement, via la régulation des transporteurs ou hormones placentaires, programmer la croissance de l'enfant (adaptation). Dans ce sens, nous avons observé une corrélation négative entre les taux d'ARNm de *HSD11B2* et de *SLC2A1* dans le placenta. Cependant, il n'a pas été possible d'associer cette corrélation avec le PNMS. Enfin, des résultats préliminaires indiquent une augmentation de la méthylation du promoteur de *HSD11B2* dans les placentas de fœtus mâles associé au stress objectif. Cet effet épigénétique de l'inondation pourrait en partie expliquer les effets de programmation de l'IMC que nous avons observé (Annexe 2, Table A2). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux cerner les mécanismes impliqués.

Un des résultats importants de cette étude est la différence de réponse au stress entre les placentas de fœtus filles et garçons (Tableau 5.1). Entre autres, l'augmentation de *SLC2A4* placentaire associée au stress subjectif couplée à la corrélation négative entre *SLC2A1* et le stress subjectif dans les placentas femelles montre que le PNMS peut altérer le transport du glucose et que les fœtus filles sont plus affectés. Ces données suggèrent que les placentas de fœtus filles peuvent ajuster leur apport en glucose en situation de PNMS. Cette plus grande

plasticité des placentas de fœtus filles face au PNMS permettrait d'ajuster leur croissance pour réduire les effets de la programmation fœtale (revu dans (Clifton, 2010b)). Dans ce sens, une diminution de la 11 β -HSD2 placentaire a été observée chez les placentas de fœtus filles de mère asthmatique (sans traitement aux glucocorticoïdes), mais pas chez les placentas de fœtus garçons (Murphy *et al.*, 2003). Une augmentation de l'activité de la 11 β -HSD2 placentaire chez les placentas femelles suite à une injection de bétaméthasone chez les humains a également été décrite (Stark *et al.*, 2009). Ces résultats montrent clairement une régulation différente de la réponse placentaire de la 11 β -HSD2 dépendante du sexe du fœtus. La présente étude est la première à démontrer un dimorphisme sexuel du transport du glucose dans l'adaptation placentaire face au PNMS. Ce dimorphisme sexuel de la réponse placentaire au stress pourrait être régulé, en partie, par l'expression des isoformes du GR. En effet, des études ont montré que l'expression des isoformes du GR diffère selon le sexe du fœtus, avec davantage de GR- β dans les placentas de fœtus mâles (Saif *et al.*, 2014b; Saif *et al.*, 2015), ce qui conférerait une résistance au cortisol pour les fœtus mâles. Nous n'observons aucune différence d'expression de l'ARNm du gène *NR3C1- β* selon le sexe du fœtus. Cette différence entre nos résultats et l'étude de Saif et collaborateurs pourrait être due au fait qu'ils ont étudié l'expression protéique de GR- β alors que nous avons étudié seulement l'ARNm. En effet, l'expression de l'ARNm ne correspond généralement qu'à 30 % à 60 % de l'expression protéique (Vogel & Marcotte, 2012). Bien que le GR- β compte pour une petite fraction des GRs totaux dans le placenta et qu'il est difficile à détecter dans le tissu placentaire, nous avons démontré une association entre la détresse maternelle suite à l'inondation et une diminution de l'expression de l'ARNm de *NR3C1- β* surtout dans les placentas de fœtus mâle. Les résultats démontrent alors que les placentas de fœtus mâles seraient alors plus susceptibles à modifier de l'expression de GR- β (ARNm ou protéines) que les placentas de fœtus femelles. Il s'agit de la première étude démontrant un effet du stress maternel durant la grossesse sur GR- β placentaire. Ces résultats ont été obtenus grâce à l'utilisation de nouvelles technologies, la pré-amplification, permettant d'évaluer l'expression de l'ARNm de gènes très peu exprimés par RT-qPCR. La réduction de l'expression de l'ARNm de GR- β suggère que les placentas de fœtus mâles pourraient être plus sensibles aux effets des glucocorticoïdes en situation de stress survenant au début ou à mi- grossesse. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'effet du PNMS sur l'ARNm de *NR3C1- β* observé dans notre cohorte est similaire au niveau protéique. Il serait également intéressant de déterminer l'effet du PNMS sur l'expression protéique des différentes isoformes placentaires du GR et d'analyser si l'expression de ceux-ci sont prédicteurs des effets du PNMS sur la programmation fœtale (Clifton *et al.*, 2017).

La présente étude montre également que le moment de l'exposition maternelle au stress durant la grossesse (*timing*) est un modérateur de l'expression de l'ARNm placentaire des gènes *HSD11B1*, *NR3C1- α* , *MAOA* et *CYP19A1*. De plus, à l'exception de *CYP19A1*, ces résultats ont été observés seulement chez les placentas de fœtus mâles. Ces données suggèrent que les placentas de fœtus mâle sont plus susceptibles d'être affectés différemment par le stress selon le moment de la grossesse auquel la mère est exposée. En d'autres termes, le moment du stress affecte différemment la réponse placentaire, et ce davantage chez les mâles que chez les femelles. Cet effet est observé surtout dans les cas de réduction de l'ARNm des gènes impliqués dans la promotion de l'effet du cortisol (*HSD11B1* et *NR3C1- α*) dont le niveau d'expression est réduit si l'évènement stressant est survenu à mi-grossesse comparé au début de grossesse. Pour *MAOA*, le PNMS réduit l'expression de son ARNm si la mère est exposée en début de grossesse pour les placentas de fœtus mâles uniquement, suggérant que la sérotonine est moins métabolisée dans ces placentas, exposant le placenta et le fœtus à des taux plus élevés de sérotonine. Plus de sérotonine pourrait potentiellement affecter directement le développement du fœtus et indirectement, via l'augmentation de la pression sanguine maternelle, altérer la santé de la mère et du bébé (Steer *et al.*, 2004). Comme démontré par notre équipe, la sérotonine est essentielle pour le développement du placenta (production d'estrogènes, index placentaire) ainsi que pour le développement cardiaque fœtal (Hudon Thibeault *et al.*, 2017; Klempan *et al.*, 2011; Laurent *et al.*, 2016; Oufkir *et al.*, 2010; Oufkir & Vaillancourt, 2011). De plus, les travaux de Bonnin et collaborateur ont démontré que la production de sérotonine placentaire était nécessaire au bon développement cérébral, du moins dans le modèle murin (Bonnin & Levitt, 2011). Bien que nous n'ayons pas observé de liens entre l'expression des gènes impliqués dans le système sérotoninergique et le poids de l'enfant à la naissance ou l'index placentaire (données non présentées), une diminution de l'expression de l'ARNm codant le récepteur 5-HT_{2A} comme ce qui a été observé pourrait compromettre la fonction endocrine placentaire et donc mettre en péril le bon développement fœtal. Des résultats préliminaires ont montré que le stress objectif est associé à une hypométhylation du promoteur de *HTR2A* chez les placentas de fœtus femelles (Annexe 2, Table 2A). Ces données devront être confirmées et il serait intéressant de déterminer s'il y a une association avec la programmation des enfants.

Nous avons observé une augmentation de l'expression de l'ARNm du gène *CYP19A1* dans les placentas des mères présentant un faible stress objectif et exposées à l'inondation au second trimestre de la grossesse (98 à 180 jours de grossesse avant l'inondation). Ce résultat démontre que le moment auquel la mère est exposée à l'évènement stressant durant la grossesse affecte

différemment *CYP19A1* placentaire qui est crucial pour la production d'estrogènes. L'expression de *CYP19A1*, ainsi que le taux d'estrogènes, sont connues pour augmenter tout au long de la grossesse (Kumar & Magon, 2012). Ainsi, l'expression placentaire de *CYP19A1* est plus faible au début de la grossesse qu'au second trimestre ce qui pourrait expliquer qu'il soit moins affecté par un PNMS au début de la grossesse. En revanche, chez les mères exposées à l'inondation au second trimestre, nous avons observé qu'un stress objectif élevé est associé à une diminution de l'expression de *CYP19A1* par rapport à celle présentant un faible stress objectif. Ces effets du stress objectif sur *CYP19A1* sont observés uniquement dans les placentas de fœtus femelles. Ces résultats suggèrent que le stress objectif (faible ou élevé) modifie l'expression du gène *CYP19A1* empêchant son augmentation en fin de grossesse. Le gène *CYP19A1* est régulé par plusieurs promoteurs au niveau placentaire soit les PII, I.3, I.2, I.4, I.8 and 1.2a (Hogg *et al.*, 2013). Les promoteurs 1.4 et 1.8 contiennent des éléments de réponse aux récepteurs des glucocorticoïdes. Il est donc possible que ces promoteurs soient la cible de méthylation spécifique si le stress survient en mi-grossesse en comparaison au début de la grossesse. Finalement, nos résultats montrent que le PNMS affecte l'expression de *CYP19A1* et indiquent que le PNMS en début de grossesse (même faible) semble inhiber l'augmentation de son expression normale au cours de la grossesse. Si cette modification de l'expression de *CYP19A1* pouvait potentiellement être bénéfique ou néfaste à la grossesse ou au développement du fœtus reste à déterminer. Des résultats préliminaires, sur 48 placentas de la cohorte QF2011, n'ont montré aucun effet significatif du stress sur la méthylation de *NR3C1*, *MAOA*, *SLC2A4* et *CYP19A1*. Il sera donc important de confirmer ou infirmer ces résultats préliminaires sur la cohorte totale.

Il est important de mentionner que ce projet a été réalisé avec un échantillonnage placentaire aléatoire en utilisant une grille stéréologique. L'avantage de cette technique est d'éviter les biais de collection lors de l'échantillonnage (Burton *et al.*, 2014; Mayhew, 2006). En effet, le placenta humain est un organe hétérogène, certains échantillons, selon le site de prélèvement, peuvent contenir davantage de capillaire fœtaux, de syncytiotrophoblaste ou encore de tissus conjonctif (Évain-Brion, 2010). En prenant plusieurs échantillons à des sites différents et en les mélangeant, nous obtenons donc un portrait global de l'expression des biomarqueurs analysés. Par contre, une limitation de cette technique d'échantillonnage est qu'elle ne permet pas de distinguer dans quel type cellulaire l'expression de l'ARNm, protéique ou l'activité sont modifiées.

Cette étude n'a pas permis de démontrer un effet du PNMS causé par une catastrophe naturelle sur le développement et la programmation fœtale à court terme. Ces résultats pourraient

s'expliquer par le fait que nous avons les dyades enfants - échantillons placentaires pour seulement 46 à 57 enfants. Par contre, nos résultats préliminaires sur le développement à moyen et long terme de l'enfant démontrent que les hormones placentaires sont significativement médiatrices de l'effet du stress objectif sur les troubles du spectre autistique (*CSH1*, *GH2* et *CYP19A1*), l'anxiété préscolaire (*CSH1* et *CYP19A1*), le déficit d'attention (*CSH1* et *CYP19A1*), les troubles externalisés (*CSH1* et *CYP19A1*), les troubles internalisés (*CSH1*, *GH2* et *CYP19A1*), et les troubles d'anxiété à 4 ans (*CSH1*, *GH2* et *CYP19A1*) (Annexe 2, Figure A1). Ces résultats suggèrent que 1) les changements induits par le PNMS au niveau du placenta peuvent être liées à des altérations comportementales se développant plus tard au cours de la vie de l'enfant et 2) ces altérations sont liées à des hormones placentaires jouant un rôle dans l'adaptation de la physiologie de la mère à la grossesse et dans le développement du fœtus. Il est donc primordial de continuer à étudier les enfants issus de la cohorte QF2011 et d'élargir l'éventail de biomarqueurs placentaires en mesurant l'expression d'autres hormones placentaires impliqués dans le bon déroulement de la grossesse, tels que les gènes des enzymes impliqués dans la production de progestérone par exemple. En effet, des études ont montré que les taux maternels de progestérone sont diminués en situation de PNMS (Brunton & Russell, 2011; Joachim et al., 2003). Enfin, le stress durant la grossesse ne se résume pas seulement à une augmentation du cortisol sanguin et à l'action des GRs sur l'expression des gènes. En effet, la réponse au stress dite rapide n'a pas été examinée dans cette étude. Il serait intéressant de vérifier l'expression des catécholamines, étant donné que celles-ci ont été liées à des altérations du développement fœtal ainsi qu'au système sérotoninergique placentaire (Gu & Jones, 1986; Wyrwoll & Holmes, 2012).

CHAPITRE 6 : CONCLUSION GÉNÉRALE

Les résultats de cette étude permettent de mieux comprendre l'effet du PNMS sur certaines fonctions placentaires impliquées dans le développement du fœtus. Nous avons démontré que :

- 1) le PNMS peut affecter le système de régulation des glucocorticoïdes placentaires ainsi que l'expression ou l'activité de la 11 β -HSD2, en réduisant l'expression de l'ARNm de *NR3C1- β* ainsi que de *NR3C1- α* et de *HSD11B1* lorsque la mère est exposé à l'élément stresser en mi-grossesse ;
- 2) le PNMS peut influencer l'apport en glucose chez le fœtus en modifiant l'expression de différents transporteurs du glucose placentaire;
- 3) le PNMS est associé à une diminution de l'expression de l'ARNm du récepteur 5-HT2A; et
- 4) le moment auquel la mère est exposé au stress durant la grossesse module différemment l'expression de l'ARNm des gènes *CYP19A1*, *NR3C1- α* , *HSD11B1* et *MAOA* dans le placenta.

5) Enfin, dans ce projet doctoral une nouvelle méthode de sélection de gènes de référence permettant de tenir en compte de petites différences d'expressions entre deux groupes d'échantillons, comme le sexe du fœtus, a été développée. Des résultats préliminaires ont permis de montrer une association entre le niveau de l'ARNm de *HSD11B2* ainsi que l'indice de masse corporelle chez les enfants à 16 et 30 mois ainsi qu'à 4 ans et une médiation significative du PNMS par les fonctions endocrines placentaire sur le comportement de l'enfant à partir de 4 ans. Ces données préliminaires permettent de mieux cerner le rôle du placenta dans l'adaptation foétale au PNMS. L'étude QF2011 offre donc une opportunité unique d'étudier le PNMS et l'effet sur le placenta en lien avec la programmation foétale. Le placenta étant accessible facilement à la naissance, les études sur le stress durant la grossesse comme celles-ci pourraient permettre l'élaboration de biomarqueurs placentaires en lien avec le PNMS et la programmation foétale. Ces biomarqueurs pourraient alors permettre d'évaluer l'effet du stress durant la grossesse sur les nouveau-nés à risque de troubles du développement et ainsi permettre une approche préventive et thérapeutique précoce pour ces enfants. La poursuite de cette étude est nécessaire pour confirmer les résultats obtenus, étudier d'autres biomarqueurs potentiels (cytokines, transporteur des acides aminés, autres hormones) et déterminer l'effet du PNMS et des médiateurs placentaires sur la programmation de l'enfant à plus long terme.

RÉFÉRENCES

- Albrecht ED, Aberdeen GW & Pepe GJ (2000) The role of estrogen in the maintenance of primate pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 182(2):432-438.
- Alsat E, Malassiné A, Tarrade A, Merviel P & Vâvain-Brion D (1999) The human cytotrophoblast: An overview of recent data. *Le cytotrophoblaste humain, un casse-tete pour le biologiste* 15(11):1236-1243.
- Ambrus G & Rao CV (1994) Novel regulation of pregnant human myometrial smooth muscle cell gap junctions by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 135(6):2772-2779.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE & Evans RM (1987) Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science (New York, N.Y.)* 237(4812):268-275.
- Auda GR, Kirk SH, Billett MA & Billett EE (1998) Localization of monoamine oxidase mRNA in human placenta. *J Histochem Cytochem* 46(12):1393-1400.
- Aurelius G, Rådestad A, Nylander I & Zetterström R (1987) Psychosocial Factors and Pregnancy Outcome: Part Two of a Prospective Longitudinal Study of Children in a New Stockholm Suburb. *Scandinavian Journal of Social Medicine* 15(2):79-85.
- Austin MP, Leader LR & Reilly N (2005) Prenatal stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and fetal and infant neurobehaviour. *Early Human Development* 81(11):917-926.
- Avishai-Eliner S, Brunson KL, Sandman CA & Baram TZ (2002) Stressed-out, or in (utero)? *Trends in Neurosciences* 25(10):518-524.
- Azmitia EC (2001) Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull* 56(5):413-424.
- Baganz NL & Blakely RD (2013) A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chemical Neuroscience* 4(1):48-63.
- Baibazarova E, van de Beek C, Cohen-Kettenis PT, Buitelaar J, Shelton KH & van Goozen SHM (2013) Influence of prenatal maternal stress, maternal plasma cortisol and cortisol in the amniotic fluid on birth outcomes and child temperament at 3 months. *Psychoneuroendocrinology* 38(6):907-915.
- Bale TL (2011) Sex differences in prenatal epigenetic programming of stress pathways. *Stress* 14(4):348-356.
- Bale TL (2016) The placenta and neurodevelopment: sex differences in prenatal vulnerability. *Dialogues Clin Neurosci* 18(4):459-464.

- Balkovetz DF, Tiruppathi C, Leibach FH, Mahesh VB & Ganapathy V (1989) Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem* 264(4):2195-2198.
- Balsa JA, Sanchez-Franco F, Pazos F, Lara JI, Lorenzo MJ, Maldonado G & Cacicedo L (1998) Direct action of serotonin on prolactin, growth hormone, corticotropin and luteinizing hormone release in cocultures of anterior and posterior pituitary lobes: autocrine and/or paracrine action of vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology* 68(5):326-333.
- Bansal AS, Bora SA, Saso S, Smith JR, Johnson MR & Thum MY (2012) Mechanism of human chorionic gonadotrophin-mediated immunomodulation in pregnancy. *Expert Review of Clinical Immunology* 8(8):747-753.
- Baou M, Boumba VA, Petrikis P, Rallis G, Vougiouklakis T & Mavreas V (2016) A review of genetic alterations in the serotonin pathway and their correlation with psychotic diseases and response to atypical antipsychotics. *Schizophrenia Research* 170(1):18-29.
- Barbosa GA (2000) The association of life events to gestational age at delivery among low-income, urban, African American women. *Journal of Perinatology* 20(7):438-442.
- Barker DJP (2007) The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine* 261(5):412-417.
- Barker DJP, Godfrey KM, Gluckman PD, Harding JE, Owens JA & Robinson JS (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *The Lancet* 341(8850):938-941.
- Barker DJP & Osmond C (1986) INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. *The Lancet* 327(8489):1077-1081.
- Barker DJP, Osmond C, Winter PD, Margetts B & Simmonds SJ (1989a) WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. *The Lancet* 334(8663):577-580.
- Barker DJP, Winter PD, Osmond C, Margetts B & Simmonds SJ (1989b) Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2(8663):577-580.
- Baumann MU, Deborde S & Illsley NP (2002) Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* 19(1):13-22.
- Beaulieu JM, Zhang X, Rodriguiz RM, Sotnikova TD, Cools MJ, Wetsel WC, Gainetdinov RR & Caron MG (2008) Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(4):1333-1338.
- Beger C, Gerdes K, Lauten M, Tissing WJ, Fernandez-Munoz I, Schrappe M & Welte K (2003) Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human

- leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *British journal of haematology* 122(2):245-252.
- Beijers R, Jansen J, Riksen-Walraven M & De Weerth C (2010) Maternal prenatal anxiety and stress predict infant illnesses and health complaints. *Pediatrics* 126(2):e401-e409.
- Bell AW & Ehrhardt RA (2002) Regulation of placental nutrient transport and implications for fetal growth. *Nutrition Research Reviews* 15(2):211-230.
- Bellavance M-A & Rivest S (2014) The HPA – Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Frontiers in Immunology* 5(136).
- Bergman K, Sarkar P, O'Connor TG, Modi N & Glover V (2007) Maternal stress during pregnancy predicts cognitive ability and fearfulness in infancy. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 46(11):1454-1463.
- Berkowitz GS & Kasl SV (1983) The role of psychosocial factors in spontaneous preterm delivery. *Journal of Psychosomatic Research* 27(4):283-290.
- Berle JØ, Mykletun A, Daltveit AK, Rasmussen S, Holsten F & Dahl AA (2005) Neonatal outcomes in offspring of women with anxiety and depression during pregnancy: A linkage study from the Nord-Trøndelag Health Study (HUNT) and Medical Birth Registry of Norway. *Archives of Women's Mental Health* 8(3):181-189.
- Beversdorf DQ, Manning SE, Hillier A, Anderson SL, Nordgren RE, Walters SE, Nagaraja HN, Cooley WC, Gaelic SE & Bauman ML (2005) Timing of prenatal stressors and autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 35(4):471-478.
- Billett EE (2004) Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. *Neurotoxicology* 25(1-2):139-148.
- Birmes P, Brunet A, Benoit M, Defer S, Hatton L, Sztulman H & Schmitt L (2005) Validation of the Peritraumatic Dissociative Experiences Questionnaire self-report version in two samples of French-speaking individuals exposed to trauma. *European psychiatry : the journal of the Association of European Psychiatrists* 20(2):145-151.
- Birmes P, Brunet A, Carreras D, Ducasse JL, Charlet JP, Lauque D, Sztulman H & Schmitt L (2003) The predictive power of peritraumatic dissociation and acute stress symptoms for posttraumatic stress symptoms: a three-month prospective study. *Am J Psychiatry* 160(7):1337-1339.
- Blakeley PM, Capron LE, Jensen AB, O'Donnell KJ & Glover V (2013) Maternal prenatal symptoms of depression and down regulation of placental monoamine oxidase A expression. *Journal of Psychosomatic Research* 75(4):341-345.
- Boadle-Biber MC (1993) Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Biol* 60(1):1-15.

- Bolten MI, Wurmser H, Buske-Kirschbaum A, Papoušek M, Pirke KM & Hellhammer D (2011) Cortisol levels in pregnancy as a psychobiological predictor for birth weight. *Archives of Women's Mental Health* 14(1):33-41.
- Bonnin A, Goeden N, Chen K, Wilson ML, King J, Shih JC, Blakely RD, Deneris ES & Levitt P (2011) A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature* 472(7343):347-350.
- Bonnin A & Levitt P (2011) Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. *Neuroscience* 197:1-7.
- Bose M, Oliván B & Laferrère B (2009) Stress and obesity: the role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in metabolic disease. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 16(5):340-346.
- Bottalico B, Larsson I, Brodzki J, Hernandez-Andrade E, Casslen B, Marsal K & Hansson SR (2004) Norepinephrine Transporter (NET), Serotonin Transporter (SERT), Vesicular Monoamine Transporter (VMAT2) and Organic Cation Transporters (OCT1, 2 and EMT) in Human Placenta from Pre-eclamptic and Normotensive Pregnancies. *Placenta* 25(6):518-529.
- Braun T, Li S, Moss TJM, Newnham JP, Challis JRG, Gluckman PD & Sloboda DM (2007) Maternal betamethasone administration reduces binucleate cell number and placental lactogen in sheep. *Journal of Endocrinology* 194(2):337-347.
- Breckwoldt M & Keck C (2003) Human placental lactogen (hPL) - Structure, regulation, physiological significance. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 63(8):731-736.
- Bronson SL & Bale TL (2015) The Placenta as a Mediator of Stress Effects on Neurodevelopmental Reprogramming. *Neuropsychopharmacology* 10.1038/npp.2015.231.
- Brooke OG, Anderson HR, Bland JM, Peacock JL & Stewart CM (1989) Effects on birth weight of smoking, alcohol, caffeine, socioeconomic factors, and psychosocial stress. *British Medical Journal* 298(6676):795-801.
- Brown K, Heller DS, Zamudio S & Illsley NP (2011) Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation. *Placenta* 32(12):1041-1049.
- Brunet A, St-Hilaire A, Jehel L & King S (2003) Validation of a french version of the impact of event scale-revised. *Canadian Journal of Psychiatry* 48(1):56-61.
- Brunet A, Weiss DS, Metzler TJ, Best SR, Neylan TC, Rogers C, Fagan J & Marmar CR (2001) The Peritraumatic Distress Inventory: a proposed measure of PTSD criterion A2. *Am J Psychiatry* 158(9):1480-1485.

- Brunton PJ & Russell JA (2011) Neuroendocrine control of maternal stress responses and fetal programming by stress in pregnancy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35(5):1178-1191.
- Buitelaar JK, Huizink AC, Mulder EJ, Robles De Medina PG, Visser GHA, Finch, De K, Kessler & De W (2003) Prenatal stress and cognitive development and temperament in infants. *Neurobiology of Aging* 24(SUPPL. 1):S53-S60+S67-S68.
- Burton GJ, Sebire NJ, Myatt L, Tannetta D, Wang YL, Sadovsky Y, Staff AC & Redman CW (2014) Optimising sample collection for placental research. *Placenta* 35(1):9-22.
- Buss C, Davis EP, Muftuler LT, Head K & Sandman CA (2010) High pregnancy anxiety during mid-gestation is associated with decreased gray matter density in 6-9-year-old children. *Psychoneuroendocrinology* 35(1):141-153.
- Buss C, Davis EP, Shahbaba B, Pruessner JC, Head K & Sandman CA (2012) Maternal cortisol over the course of pregnancy and subsequent child amygdala and hippocampus volumes and affective problems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(20):E1312-E1319.
- Campbell EA, Linton EA & Wolfe CDA (1987) Plasma corticotropin-releasing hormone concentrations during pregnancy and parturition. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 64(5):1054-1059.
- Cao X, Laplante DP, Brunet A, Ciampi A & King S (2014) Prenatal maternal stress affects motor function in 51/2-year-old children: Project Ice Storm. *Developmental Psychobiology* 56(1):117-125.
- Causevic M & Mohaupt M (2007) 11[beta]-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in pregnancy and preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine* 28(2):220-226.
- Challis JRG & Connor K (2009) Glucocorticoids, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Mother, fetus, or both? *Endocrinology* 150(3):1073-1074.
- Chapman K, Holmes M & Seckl J (2013) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases intracellular gatekeepers of tissue glucocorticoid action. *Physiological Reviews* 93(3):1139-1206.
- Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C & King S (2010) Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews* 65(1):56-79.
- Clark J (1786) Observations on some causes of excess mortality of males above that of females. *Philos Trans R Soc Lond* (76):349-364.
- Class QA, Lichtenstein P, Langstrom N & D'Onofrio BM (2011) Timing of prenatal maternal exposure to severe life events and adverse pregnancy outcomes: a population study of 2.6 million pregnancies. *Psychosom Med* 73(3):234-241.

- Claustrat B, Brun J & Chazot G (2005) The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 9(1):11-24.
- Clifton VL (2010a) Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta* 31 Suppl:S33-39.
- Clifton VL (2010b) Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival. *Placenta* 31(SUPPL.):S33-S39.
- Clifton VL, Cuffe J, Moritz KM, Cole TJ, Fuller PJ, Lu NZ, Kumar S, Chong S & Saif Z (2017) Review: The role of multiple placental glucocorticoid receptor isoforms in adapting to the maternal environment and regulating fetal growth. *Placenta* 54:24-29.
- Clifton VL & Murphy VE (2004) Maternal asthma as a model for examining fetal sex-specific effects on maternal physiology and placental mechanisms that regulate human fetal growth. *Placenta* 25(SUPPL. A):S45-S52.
- Coleman JA, Green EM & Gouaux E (2016) X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature* 532(7599):334-339.
- Collins NL, Dunkel-Schetter C, Lobel M & Scrimshaw SCM (1993) Social Support in Pregnancy: Psychosocial Correlates of Birth Outcomes and Postpartum Depression. *Journal of Personality and Social Psychology* 65(6):1243-1258.
- Copper RL, Goldenberg RL, Das A, Elder N, Swain M, Norman G, Ramsey R, Cotroneo P, Collins BA, Johnson F, Jones P, Meier A, Roberts JM, Hauth JC, Northen A, Meis PJ, Mueller-Heubach E, Frye A & Mowad AH (1996) The preterm prediction study: Maternal stress is associated with spontaneous preterm birth at less than thirty-five weeks' gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 175(5):1286-1292.
- Corcoran JJ, Nicholson C, Sweeney M, Charnock JC, Robson SC, Westwood M & Taggart MJ (2014) Human uterine and placental arteries exhibit tissue-specific acute responses to 17 β -estradiol and estrogen-receptor-specific agonists. *Molecular Human Reproduction* 20(5):433-441.
- Costa MA (2016) The endocrine function of human placenta: An overview. *Reproductive BioMedicine Online* 32(1):14-43.
- Cote F, Fligny C, Bayard E, Launay JM, Gershon MD, Mallet J & Vodjdani G (2007) Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1):329-334.
- Cote F, Thevenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoche MA, Bayard E, Hanoun N, Saurini F, Lechat P, Dandolo L, Hamon M, Mallet J & Vodjdani G (2003) Disruption of the

- nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23):13525-13530.
- Cottrell EC & Seckl JR (2009) Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci* 3:19.
- Cox JL, Chapman G, Murray D & Jones P (1996a) Validation of the Edinburgh Postnatal Depression Scale (EPDS) in non-postnatal women. *J Affect Disord* 39(3):185-189.
- Cox JL, Chapman G, Murray D & Jones P (1996b) Validation of the Edinburgh postnatal depression scale (EPDS) in non-postnatal women. *J Affect Disord* 39.
- Cronier L, Bastide B, Herve JC, Deleze J & Malassine A (1994) Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 135(1):402-408.
- Crowther CA & Harding JE (2007) Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 10.1002/14651858.CD003935.pub2(3).
- Czyzyk A, Podfigurna A, Genazzani AR & Meczekalski B (2017) The role of progesterone therapy in early pregnancy: from physiological role to therapeutic utility. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 33(6):421-424.
- D'Anna-Hernandez KL, Hoffman MC, Zerbe GO, Coussons-Read M, Ross RG & Laudenslager ML (2012) Acculturation, maternal cortisol, and birth outcomes in women of Mexican descent. *Psychosomatic Medicine* 74(3):296-304.
- Da Costa D, Brender W & Larouche J (1998) A prospective study of the impact of psychosocial and lifestyle variables on pregnancy complications. *Journal of Psychosomatic Obstetrics and Gynaecology* 19(1):28-37.
- Da Costa D, Larouche J, Dritsa M & Brender W (2000) Psychosocial correlates of prepartum and postpartum depressed mood. *Journal of Affective Disorders* 59(1):31-40.
- Dancause KN, Laplante DP, Hart KJ, O'Hara MW, Elgbeili G, Brunet A & King S (2015) Prenatal stress due to a natural disaster predicts adiposity in childhood: The Iowa flood study. *J. Obes.* 2015.
- Dancause KN, Laplante DP, Oremus C, Fraser S, Brunet A & King S (2011) Disaster-related prenatal maternal stress influences birth outcomes: Project Ice Storm. *Early Human Development* 87(12):813-820.

- Davis EP, Glynn LM, Schetter CD, Hobel C, Chicz-Demet A & Sandman CA (2007) Prenatal exposure to maternal depression and cortisol influences infant temperament. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 46(6):737-746.
- Davis EP, Glynn LM, Waffarn F & Sandman CA (2011) Prenatal maternal stress programs infant stress regulation. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* 52(2):119-129.
- Davis EP & Sandman CA (2010) The timing of prenatal exposure to maternal cortisol and psychosocial stress is associated with human infant cognitive development. *Child Development* 81(1):131-148.
- Davis EP & Sandman CA (2012) Prenatal psychobiological predictors of anxiety risk in preadolescent children. *Psychoneuroendocrinology* 37(8):1224-1233.
- Dayan J, Creveuil C, Marks MN, Conroy S, Herlicoviez M, Dreyfus M & Tordjman S (2006) Prenatal depression, prenatal anxiety, and spontaneous preterm birth: A prospective cohort study among women with early and regular care. *Psychosomatic Medicine* 68(6):938-946.
- de Bruijn AT, van Bakel HJ, Wijnen H, Pop VJ & van Baar AL (2009a) Prenatal maternal emotional complaints are associated with cortisol responses in toddler and preschool aged girls. *Developmental psychobiology* 51(7):553-563.
- de Bruijn ATCE, van Bakel HJA & van Baar AL (2009b) Sex differences in the relation between prenatal maternal emotional complaints and child outcome. *Early Human Development* 85(5):319-324.
- De Weerth C, Van Hees Y & Buitelaar JK (2003) Prenatal maternal cortisol levels and infant behavior during the first 5 months. *Early Human Development* 74(2):139-151.
- Diego MA, Field T, Hernandez-Reif M, Schanberg S, Kuhn C & Gonzalez-Quintero VH (2009) Prenatal depression restricts fetal growth. *Early Human Development* 85(1):65-70.
- DiPietro JA (2002) Prenatal/perinatal stress and its impact on psychosocial child development. *Encyclopedia Early Child. Dev.* :1-5.
- Draper N & Stewart PM (2005) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *Journal of Endocrinology* 186(2):251-271.
- Driver PM, Rauz S, Walker EA, Hewison M, Kilby MD & Stewart PM (2003) Characterization of human trophoblast as a mineralocorticoid target tissue. *Mol Hum Reprod* 9(12):793-798.
- Eke AC, Saccone G & Berghella V (2016) Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) use during pregnancy and risk of preterm birth: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 123(12):1900-1907.

- Erdeljan P, Andrews MH, MacDonald JF & Matthews SG (2005) Glucocorticoids and serotonin alter glucocorticoid receptor mRNA levels in fetal guinea-pig hippocampal neurons, in vitro. *Reprod Fertil Dev* 17(7):743-749.
- Erickson K, Thorsen P, Chrousos G, Grigoriadis DE, Khongsaly O, McGregor J & Schulkin J (2001) Preterm birth: Associated neuroendocrine, medical, and behavioral risk factors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(6):2544-2552.
- Ericsson A, Hamark B, Jansson N, Johansson BR, Powell TL & Jansson T (2005a) Hormonal regulation of glucose and system A amino acid transport in first trimester placental villous fragments. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(3):R656-662.
- Ericsson A, Hamark B, Powell TL & Jansson T (2005b) Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Human Reproduction* 20(2):521-530.
- Ericsson A, Hamark B, Powell TL & Jansson T (2005c) Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Hum Reprod* 20(2):521-530.
- Eriksson JG, Kajantie E, Osmond C, Thornburg K & Barker DJP (2010) Boys live dangerously in the womb. *American Journal of Human Biology* 22(3):330-335.
- Erspamer V & Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169(4306):800-801.
- Escher G (2009) Hyperaldosteronism in pregnancy. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 3(2):123-132.
- Évain-Brion D, A. Malassiné (2010) *Le placenta humain*.
- Évain-Brion D & Malassiné A (2010) *Le placenta humain*. :198 p.
- Fanburg BL & Lee SL (1997) A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *Am J Physiol* 272(5 Pt 1):L795-806.
- Fenster L, Schaefer C, Mathur A, Hiatt RA, Pieper C, Hubbard AE, Von Behren J & Swan SH (1995) Psychologic stress in the workplace and spontaneous abortion. *American Journal of Epidemiology* 142(11):1176-1183.
- Field T, Hernandez-Reif M, Diego M, Figueiredo B, Schanberg S & Kuhn C (2006) Prenatal cortisol, prematurity and low birthweight. *Infant Behavior and Development* 29(2):268-275.
- Folkman S (2013) Stress: Appraisal and Coping. *Encyclopedia of Behavioral Medicine*, Gellman MD & Turner JR (Édit.) Springer New York, New York, NY10.1007/978-1-4419-1005-9_215. p 1913-1915.

- Fournier T, Guibourdenche J & Evain-Brion D (2015) Review: hCGs: different sources of production, different glycoforms and functions. *Placenta* 36 Suppl 1:S60-65.
- Fowden AL & Forhead AJ (2015) Glucocorticoids as regulatory signals during intrauterine development. *Experimental Physiology* 100(12):1477-1487.
- Gabory A, Attig L & Junien C (2009) Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Molecular and cellular endocrinology* 304(1-2):8-18.
- Gaddum JH & Hameed KA (1954) Drugs which antagonize 5-hydroxytryptamine. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 9(2):240-248.
- Gao L, Lv C, Xu C, Li Y, Cui X, Gu H & Ni X (2012) Differential regulation of glucose transporters mediated by CRH receptor type 1 and type 2 in human placental trophoblasts. *Endocrinology* 153(3):1464-1471.
- Garbrecht MR, Klein JM, Schmidt TJ & Snyder JM (2006a) Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung: Implications for lung development and the pulmonary surfactant system. *Biology of the Neonate* 89(2):109-119.
- Garbrecht MR, Schmidt TJ, Krozowski ZS & Snyder JM (2006b) 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and the regulation of surfactant protein A by dexamethasone metabolites. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 290(4):E653-660.
- Gennari-Moser C, Khankin EV, Schuller S, Escher G, Frey BM, Portmann CB, Baumann MU, Lehmann AD, Surbek D, Karumanchi SA, Frey FJ & Mohaupt MG (2011) Regulation of placental growth by aldosterone and cortisol. *Endocrinology* 152(1):263-271.
- Gerardin P, Wendland J, Bodeau N, Galin A, Bialobos S, Tordjman S, Mazet P, Darbois Y, Nizard J, Dommergues M & Cohen D (2011) Depression during pregnancy: Is the developmental impact earlier in boys? A prospective case-control study. *Journal of Clinical Psychiatry* 72(3):378-387.
- Gill RK, Pant N, Saksena S, Singla A, Nazir TM, Vohwinkel L, Turner JR, Goldstein J, Alrefai WA & Dudeja PK (2008) Function, expression, and characterization of the serotonin transporter in the native human intestine. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 294(1):G254-262.
- Gitau R, Cameron A, Fisk NM & Glover V (1998) Fetal exposure to maternal cortisol. *Lancet* 352(9129):707-708.
- Glover V (2011) Annual Research Review: Prenatal stress and the origins of psychopathology: an evolutionary perspective. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines* 52(4):356-367.

- Glover V & Hill J (2012) Sex differences in the programming effects of prenatal stress on psychopathology and stress responses: An evolutionary perspective. *Physiology and Behavior* 106(5):736-740.
- Glynn LM, Wadhwa PD, Dunkel-Schetter C, Chicz-DeMet A & Sandman CA (2001) When stress happens matters: Effects of earthquake timing on stress responsivity in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 184(4):637-642.
- Goedhart G, Vrijkotte TGM, Roseboom TJ, van der Wal MF, Cuijpers P & Bonse GJ (2010) Maternal cortisol and offspring birthweight: Results from a large prospective cohort study. *Psychoneuroendocrinology* 35(5):644-652.
- Gomez-Sanchez E & Gomez-Sanchez CE (2014) The Multifaceted Mineralocorticoid Receptor. *Comprehensive Physiology* 4(3):965-994.
- Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez MT, De Rodriguez AF, Romero DG, Warden MP, Plonczynski MW & Gomez-Sanchez CE (2009) Immunohistochemical demonstration of the mineralocorticoid receptor, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 and -2, and hexose-6-phosphate dehydrogenase in rat ovary. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 57(7):633-641.
- Gong S, Miao Y-L, Jiao G-Z, Sun M-J, Li H, Lin J, Luo M-J & Tan J-H (2015) Dynamics and Correlation of Serum Cortisol and Corticosterone under Different Physiological or Stressful Conditions in Mice. *PLoS ONE* 10(2):e0117503.
- Graignic-Philippe R, Dayan J, Chokron S, Jacquet AY & Tordjman S (2014) Effects of prenatal stress on fetal and child development: A critical literature review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 43:137-162.
- Grizenko N, Fortier ME, Zadorozny C, Thakur G, Schmitz N, Duval R & Joober R (2012) Maternal stress during pregnancy, ADHD symptomatology in children and genotype: Gene-environment interaction. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 21(1):9-15.
- Groothuis PG, Dassen HHNM, Romano A & Punyadeera C (2007) Estrogen and the endometrium: Lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Human Reproduction Update* 13(4):405-417.
- Gu X, Simons FE & Simons KJ (1999) Epinephrine absorption after different routes of administration in an animal model. *Biopharmaceutics & drug disposition* 20(8):401-405.
- Guibourdenche J, Fournier T, Malassin[√] A & Evain-Brion D (2009a) Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 47(5).

- Guibourdenche J, Fournier T, Malassiné A & Evain-Brion D (2009b) Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 47(5):S35-S40.
- Gur C, Diav-Citrin O, Shechtman S, Arnon J & Ornoy A (2004) Pregnancy outcome after first trimester exposure to corticosteroids: A prospective controlled study. *Reproductive Toxicology* 18(1):93-101.
- Gurtunca N & Sperling MA (2017) 144 - Growth Hormone, Prolactin, and Placental Lactogen in the Fetus and Newborn A2 - Polin, Richard A. *Fetal and Neonatal Physiology (Fifth Edition)*, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE & Fox WW (Édit.) Elsevier, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35214-7.00144-X>. p 1470-1476.e1471.
- Gutteling BM, De Weerth C & Buitelaar JK (2004) Maternal prenatal stress and 4-6 year old children's salivary cortisol concentrations pre- and post-vaccination. *Stress* 7(4):257-260.
- Gutteling BM, De Weerth C & Buitelaar JK (2005a) Prenatal stress and children's cortisol reaction to the first day of school. *Psychoneuroendocrinology* 30(6):541-549.
- Gutteling BM, De Weerth C & Buitelaar JK (2007) Prenatal stress and mixed-handedness. *Pediatric Research* 62(5):586-590.
- Gutteling BM, de Weerth C, Willemsen-Swinkels SH, Huizink AC, Mulder EJ, Visser GH & Buitelaar JK (2005b) The effects of prenatal stress on temperament and problem behavior of 27-month-old toddlers. *European child & adolescent psychiatry* 14(1):41-51.
- Gutteling BM, De Weerth C, Zandbelt N, Mulder EJH, Visser GHA & Buitelaar JK (2006) Does maternal prenatal stress adversely affect the child's learning and memory at age six? *Journal of Abnormal Child Psychology* 34(6):789-798.
- Haarman EG, Kaspers GJ, Pieters R, Rottier MM & Veerman AJ (2004) Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia* 18(3):530-537.
- Hadden C, Fahmi T, Cooper A, Savenka AV, Lupashin VV, Roberts DJ, Maroteaux L, Hauguel-de Mouzon S & Kilic F (2017) Serotonin transporter protects the placental cells against apoptosis in caspase 3-independent pathway. *J Cell Physiol* 10.1002/jcp.25812.
- Hahn T, Barth S, Graf R, Engelmann M, Beslagic D, Reul JM, Holsboer F, Dohr G & Desoye G (1999) Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84(4):1445-1452.
- Halford JC & Harrold JA (2012) 5-HT_{2C} receptor agonists and the control of appetite. *Handbook of experimental pharmacology* 10.1007/978-3-642-24716-3_16(209):349-356.

- Halmoy A, Johansson S, Winge I, McKinney JA, Knappskog PM & Haavik J (2010) Attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in offspring of mothers with impaired serotonin production. *Arch Gen Psychiatry* 67(10):1033-1043.
- Handwerker S & Freemark M (2000) The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13(4):343-356.
- Hansson SR, Bottalico B, Noskova V & Casslén B (2009) Monoamine transporters in human endometrium and decidua. *Human Reproduction Update* 15(2):249-260.
- Hansson SR, Mezey E & Hoffman BJ (1998) Ontogeny of vesicular monoamine transporter mRNAs VMAT1 and VMAT2 II. Expression in neural crest derivatives and their target sites in the rat. *Developmental Brain Research* 110(1):159-174.
- Harville EW, Savitz DA, Dole N, Herring AH & Thorp JM (2009) Stress questionnaires and stress biomarkers during pregnancy. *J Womens Health (Larchmt)* 18(9):1425-1433.
- Hay WW, Jr. (2006) Placental-fetal glucose exchange and fetal glucose metabolism. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 117:321-339; discussion 339-340.
- Hayes A (2013) *Introduction to Mediation, Moderation, and Conditional Process Analysis*. The Guilford Press, New York
- Hedegaard M, Brink Henriksen T, Sabroe S & Secher NJ (1993) Psychological distress in pregnancy and preterm delivery. *British Medical Journal* 307(6898):234-239.
- Hedegaard M, Henriksen TB, Secher NJ, Hatch MC & Sabroe S (1996) Do stressful life events affect duration of gestation and risk of preterm delivery? *Epidemiology* 7(4):339-345.
- Heiniger CD, Rochat MK, Frey FJ & Frey BM (2001) TNF- α enhances intracellular glucocorticoid availability. *FEBS Letters* 507(3):351-356.
- Hendricks TJ, Fyodorov DV, Wegman LJ, Lelutiu NB, Pehek EA, Yamamoto B, Silver J, Weeber EJ, Sweatt JD & Deneris ES (2003) Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron* 37(2):233-247.
- Hindmarsh PC & Charmandari E (2015) Variation in absorption and half-life of hydrocortisone influence plasma cortisol concentrations. *Clinical endocrinology* 82(4):557-561.
- Hodyl NA, Wyper H, Osei-Kumah A, Scott N, Murphy VE, Gibson P, Smith R & Clifton VL (2010) Sex-specific associations between cortisol and birth weight in pregnancies complicated by asthma are not due to differential glucocorticoid receptor expression. *Thorax* 65(8):677-683.

- Hogg K, Blair JD, McFadden DE, von Dadelszen P & Robinson WP (2013) Early onset pre-eclampsia is associated with altered DNA methylation of cortisol-signalling and steroidogenic genes in the placenta. *PLoS One* 8(5):e62969.
- Holmes MC, Abrahamsen CT, French KL, Paterson JM, Mullins JJ & Seckl JR (2006) The mother or the fetus? 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. *Journal of Neuroscience* 26(14):3840-3844.
- Holmes TH & Rahe RH (1967) The social readjustment rating scale. *Journal of Psychosomatic Research* 11(2):213-218.
- Horowitz M, Wilner N & Alvarez W (1979) Impact of Event Scale: a measure of subjective stress. *Psychosom Med* 41(3):209-218.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR & Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46(2):157-203.
- Hoyer D, Hannon JP & Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71(4):533-554.
- Huang WQ, Zhang CL, Di XY & Zhang RQ (1998) Studies on the localization of 5-hydroxytryptamine and its receptors in human placenta. *Placenta* 19(8):655-661.
- Hudon Thibeault AA, Laurent L, Vo Duy S, Sauve S, Caron P, Guillemette C, Sanderson JT & Vaillancourt C (2017) Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the feto-placental unit. *Molecular and cellular endocrinology* 442:32-39.
- Huh SY, Andrew R, Rich-Edwards JW, Kleinman KP, Seckl JR & Gillman MW (2008) Association between umbilical cord glucocorticoids and blood pressure at age 3 years. *BMC medicine* 6:25.
- Huizink AC, Robles De Medina PG, Mulder EJJ, Visser GHA & Buitelaar JK (2003) Stress during pregnancy is associated with developmental outcome in infancy. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* 44(6):810-818.
- Huttunen MO & Niskanen P (1978) Prenatal Loss of Father and Psychiatric Disorders. *Archives of General Psychiatry* 35(4):429-431.
- Illsley NP, Sellers MC & Wright RL (1998) Glycaemic regulation of glucose transporter expression and activity in the human placenta. *Placenta* 19(7):517-524.

- Irge E, Halici Z, Yilmaz M, Cadirci E & Karakus E (2016) Evaluation of 5-HT7 receptor expression in the placentae of normal and pre-eclamptic women. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)* 38(2):189-193.
- Jänig W (1989) Autonomic Nervous System. *Human Physiology*, Schmidt RF & Thews G (Édit.) Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg10.1007/978-3-642-73831-9_16. p 333-370.
- Jansson T & Powell TL (2007) Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)* 113(1):1-13.
- Jansson T, Wennergren M & Illsley NP (1993) Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77(6):1554-1562.
- Jansson T, Ylvén K, Wennergren M & Powell TL (2002) Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal plasma membranes in intrauterine growth restriction. *Placenta* 23(5):392-399.
- Jehel L, Brunet A, Paterniti S & Guelfi JD (2005) [Validation of the Peritraumatic Distress Inventory's French translation]. *Canadian journal of psychiatry. Revue canadienne de psychiatrie* 50(1):67-71.
- Johnson RF, Rennie N, Murphy V, Zakar T, Clifton V & Smith R (2008) Expression of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid transcripts in the human placenta at term. *J Clin Endocrinol Metab* 93(12):4887-4893.
- Jonnakuty C & Gragnoli C (2008) What do we know about serotonin? *J Cell Physiol* 217(2):301-306.
- Kadmiel M & Cidlowski JA (2013) Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in pharmacological sciences* 34(9):518-530.
- Kane N, Kelly R, Saunders PTK & Critchley HOD (2009) Proliferation of uterine natural killer cells is induced by human chorionic gonadotropin and mediated via the mannose receptor. *Endocrinology* 150(6):2882-2888.
- Khashan AS, Abel KM, McNamee R, Pedersen MG, Webb RT, Baker PN, Kenny LC & Mortensen PB (2008a) Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Archives of General Psychiatry* 65(2):146-152.
- Khashan AS, McNamee R, Abel KM, Mortensen PB, Kenny LC, Pedersen MG, Webb RT & Baker PN (2009) Rates of preterm birth following antenatal maternal exposure to severe life events: A population-based cohort study. *Human Reproduction* 24(2):429-437.

- Khashan AS, McNamee R, Abel KM, Pedersen MG, Webb RT, Kenny LC, Mortensen PB & Baker PN (2008b) Reduced infant birthweight consequent upon maternal exposure to severe life events. *Psychosomatic Medicine* 70(6):688-694.
- Khashan AS, McNamee R, Henriksen TB, Pedersen MG, Kenny LC, Abel KM & Mortensen PB (2011) Risk of affective disorders following prenatal exposure to severe life events: A Danish population-based cohort study. *Journal of Psychiatric Research* 45(7):879-885.
- Killingsworth C, Dunkel-Schetter C, Wadhwa PD & Sandman CA (1997) Personality, stress and pregnancy: Predicting adverse birth outcomes. *Ann Behav Med* 19.
- King S, Dancause K, Turcotte-Tremblay AM, Veru F & Laplante DP (2012) Using Natural Disasters to Study the Effects of Prenatal Maternal Stress on Child Health and Development. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* 96(4):273-288.
- King S, Kildea S, Austin M-P, Brunet A, Cobham VE, Dawson PA, Harris M, Hurrion EM, Laplante DP, McDermott BM, McIntyre HD, O'Hara MW, Schmitz N, Stapleton H, Tracy SK, Vaillancourt C, Dancause KN, Kruske S, Reilly N, Shoo L, Simcock G, Turcotte-Tremblay A-M & Yong Ping E (2015a) QF2011: a protocol to study the effects of the Queensland flood on pregnant women, their pregnancies, and their children's early development. *BMC Pregnancy & Childbirth* 15(1):109.
- King S, Kildea S, Austin MP, Brunet A, Cobham VE, Dawson PA, Harris M, Hurrion EM, Laplante DP, McDermott BM, McIntyre HD, O'Hara MW, Schmitz N, Stapleton H, Tracy SK, Vaillancourt C, Dancause KN, Kruske S, Reilly N, Shoo L, Simcock G, Turcotte-Tremblay AM & Yong Ping E (2015b) QF2011: A protocol to study the effects of the Queensland flood on pregnant women, their pregnancies, and their children's early development. *BMC Pregnancy and Childbirth* 15(1).
- King S, Laplante D & Joober R (2005) Understanding putative risk factors for schizophrenia: retrospective and prospective studies. *J Psychiatry Neurosci* 30(5):342-348.
- King S, Mancini-Marie A, Brunet A, Walker E, Meaney MJ & Laplante DP (2009) Prenatal maternal stress from a natural disaster predicts dermatoglyphic asymmetry in humans. *Development and Psychopathology* 21(2):343-353.
- Kinney DK, Miller AM, Crowley DJ, Huang E & Gerber E (2008) Autism prevalence following prenatal exposure to hurricanes and tropical storms in Louisiana. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 38(3):481-488.
- Kish SJ, Furukawa Y, Chang LJ, Tong J, Ginovart N, Wilson A, Houle S & Meyer JH (2005) Regional distribution of serotonin transporter protein in postmortem human brain: is the cerebellum a SERT-free brain region? *Nuclear medicine and biology* 32(2):123-128.

- Klempan T, Hudon-Thibeault AA, Oufkir T, Vaillancourt C & Sanderson JT (2011) Stimulation of serotonergic 5-HT_{2A} receptor signaling increases placental aromatase (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human choriocarcinoma cells. *Placenta* 32(9):651-656.
- Kletzky OA, Marrs RP, Howard WF, McCormick W & Mishell DR, Jr. (1980) Prolactin synthesis and release during pregnancy and puerperium. *Am J Obstet Gynecol* 136(4):545-550.
- Konstantakou P, Mastorakos G, Vrachnis N, Tomlinson JW & Valsamakis G (2017) Dysregulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: implications during pregnancy and beyond. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 30(3):284-293.
- Koren L, Whiteside D, Fahlman Å, Ruckstuhl K, Kutz S, Checkley S, Dumond M & Wynne-Edwards K (2012) Cortisol and corticosterone independence in cortisol-dominant wildlife. *General and Comparative Endocrinology* 177(1):113-119.
- Kossintseva I, Wong S, Johnstone E, Guilbert L, Olson DM & Mitchell BF (2006) Proinflammatory cytokines inhibit human placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity through Ca²⁺ and cAMP pathways. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 290(2):E282-E288.
- Kratschmar DV, Vuorinen A, Da Cunha T, Wolber G, Classen-Houben D, Doblhoff O, Schuster D & Odermatt A (2011) Characterization of activity and binding mode of glycyrrhetic acid derivatives inhibiting 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 125(1-2):129-142.
- Krozowski Z, Li KXZ, Koyama K, Smith RE, Obeyesekere VR, Stein-Oakley A, Sasano H, Coulter C, Cole T & Sheppard KE (1999) The type I and type II 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 69(1-6):391-401.
- Kumar P & Magon N (2012) Hormones in pregnancy. *Nigerian Medical Journal : Journal of the Nigeria Medical Association* 53(4):179-183.
- Lacroix MC, Guibourdenche J, Frenzo JL, Muller F & Evain-Brion D (2002) Human placental growth hormone--a review. *Placenta* 23 Suppl A:S87-94.
- Lafond J, Hamel A, Takser L, Vaillancourt C & Mergler D (2004) Low environmental contamination by lead in pregnant women: Effect on calcium transfer in human placental syncytiotrophoblasts. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 67(14):1069-1079.
- Lager S & Powell TL (2012) Regulation of nutrient transport across the placenta. *Journal of Pregnancy* 2012.

- Lan NC, Graham B, Bartter FC & Baxter JD (1982) Binding of steroids to mineralocorticoid receptors: implications for in vivo occupancy by glucocorticoids. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 54(2):332-342.
- Lange AP & Anthonsen H (1980) Serum levels of human placental lactogen during and after prenatal dexamethasone therapy. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 59(2):111-114.
- Lanoix D, Guérin P & Vaillancourt C (2012a) Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: New insights into the role of this hormone in pregnancy. *Journal of pineal research* 53(4):417-425.
- Lanoix D, Lacasse AA, St-Pierre J, Taylor SC, Ethier-Chiasson M, Lafond J & Vaillancourt C (2012b) Quantitative PCR Pitfalls: The Case of the Human Placenta. *Molecular Biotechnology* 10.1007/s12033-012-9539-2:1-10.
- Laplante DP, Barr RG, Brunet A, Du Fort GG, Meaney ML, Saucier JF, Zelazo PR & King S (2004) Stress during pregnancy affects general intellectual and language functioning in human toddlers. *Pediatric Research* 56(3):400-410.
- Laplante DP, Brunet A, Schmitz N, Ciampi A & King S (2008) Project ice storm: Prenatal maternal stress affects cognitive and linguistic functioning in 5 1/2-year-old children. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 47(9):1063-1072.
- Laplante DP, Zelazo PR, Brunet A & King S (2007a) Functional Play at 2 Years of Age: Effects of Prenatal Maternal Stress. *Infancy* 12(1):69-93.
- Laplante DP, Zelazo PR, Brunet A & King S (2007b) Functional play at 2 years of age: Effects of prenatal maternal stress. *Infancy* 12(1):69-93.
- Laurent L, Deroy K, St-Pierre J, Cote F, Sanderson JT & Vaillancourt C (2017) Human placenta expresses both peripheral and neuronal isoform of tryptophan hydroxylase. *Biochimie* 10.1016/j.biochi.2017.07.008.
- Laurent L, Deroy K, St-Pierre J, Côté F, Sanderson JT & Vaillancourt C (Human placenta expresses both peripheral and neuronal isoform of tryptophan hydroxylase. *Biochimie* <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.008>.
- Laurent L, Huang C, Ernest SR, Berard A, Vaillancourt C & Hales BF (2016) In utero exposure to venlafaxine, a serotonin–norepinephrine reuptake inhibitor, increases cardiac anomalies and alters placental and heart serotonin signaling in the rat. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* 106(12):1044-1055.

- Lazarus RS & Launier R (1978) Stress-Related Transactions between Person and Environment. *Perspectives in Interactional Psychology*, Pervin LA & Lewis M (Édit.) Springer US, Boston, MA 10.1007/978-1-4613-3997-7_12. p 287-327.
- Leckie CM, Welberg LAM & Seckl JR (1998) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase is a predominant reductase in intact rat leydig cells. *Journal of Endocrinology* 159(2):233-238.
- Lewinn KZ, Stroud LR, Molnar BE, Ware JH, Koenen KC & Buka SL (2009) Elevated maternal cortisol levels during pregnancy are associated with reduced childhood IQ. *International Journal of Epidemiology* 38(6):1700-1710.
- Magni G, Rizzardo R & Andreoli C (1986) Psychosocial Stress and Obstetrical Complications: The need for a comprehensive model. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 65(3):273-276.
- Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S & Viltart O (2007a) Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 292(6).
- Mairesse J, Lesage J, Breton C, Bréant B, Hahn T, Darnaudéry M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S & Viltart O (2007b) Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 292(6):p.1526-1533.
- Malassiné A (2001) Variabilité morphologique et fonctionnelle du placenta. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 29(7-8):489-496.
- Malassine A & Cronier L (2002) Hormones and human trophoblast differentiation: a review. *Endocrine* 19(1):3-11.
- Malassiné A, Tarrade A, Guibourdenche J, Rochette-Agly C & Avain-Brion D (2000) The placenta. *Le placenta* 16(3):329-335.
- Mandl M, Ghaffari-Tabrizi N, Haas J, Nöhammer G & Desoye G (2006) Differential glucocorticoid effects on proliferation and invasion of human trophoblast cell lines. *Reproduction* 132(1):159-167.
- Markham JA & Koenig JI (2011) Prenatal stress: Role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology* 214(1):89-106.
- Marmar CR, Weiss, D.S., Metzler, T.J. (1997) The peritraumatic dissociative experiences questionnaire *Assessing Psychological Trauma and PTSD* ppp. 412-428.

- Masson J, Emerit MB, Hamon M & Darmon M (2012) Serotonergic signaling: multiple effectors and pleiotropic effects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* 1(6):685-713.
- Mayhew TM (2006) Stereology and the placenta: where's the point? -- a review. *Placenta* 27 Suppl A:S17-25.
- McEwen BS (1999) Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22:105-122.
- McLean M, Bisits A, Davies J, Woods R, Lowry P & Smith R (1995) A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nature Medicine* 1(5):460-463.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Weaver S, Yau J, Chapman K & Seckl JR (2000) Postnatal Handling Increases the Expression of cAMP-Inducible Transcription Factors in the Rat Hippocampus: The Effects of Thyroid Hormones and Serotonin. *The Journal of Neuroscience* 20(10):3926-3935.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR & Plotsky PM (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: Implications for adrenocortical responses to stress. *Developmental Neuroscience* 18(1-2):49-72.
- Meek LR, Burda KM & Paster E (2000) Effects of prenatal stress on development in mice: Maturation and learning. *Physiology and Behavior* 71(5):543-549.
- Mercado N, Hakim A, Kobayashi Y, Meah S, Usmani OS, Chung KF, Barnes PJ & Ito K (2012) Restoration of corticosteroid sensitivity by p38 mitogen activated protein kinase inhibition in peripheral blood mononuclear cells from severe asthma. *PLoS One* 7(7):e41582.
- Mercer BM, Macpherson CA, Goldenberg RL, Goepfert AR, Haugel-De Mouzon S, Varner MW, Iams JD, Meis PJ, Moawad AH, Miodovnik M, Caritis SN, Van Dorsten JP, Sorokin Y, Thurnau GR & Spong CY (2006) Are women with recurrent spontaneous preterm births different from those without such history? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 194(4):1176-1184.
- Michael AE & Papageorgiou AT (2008) Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Human Reproduction Update* 14(5):497-517.
- Michael AE, Thurston LM & Rae MT (2003) Glucocorticoid metabolism and reproduction: A tale of two enzymes. *Reproduction* 126(4):425-441.
- Middelkoop CM, Dekker GA, Kraayenbrink AA & Popp-Snijders C (1993) Platelet-poor plasma serotonin in normal and preeclamptic pregnancy. *Clin Chem* 39(8):1675-1678.

- Millan MJ (2005) Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. *Therapie* 60(5):441-460.
- Mina TH, Raikkonen K, Riley SC, Norman JE & Reynolds RM (2015) Maternal distress associates with placental genes regulating fetal glucocorticoid exposure and IGF2: Role of obesity and sex. *Psychoneuroendocrinology* 59:112-122.
- Mina TH & Reynolds RM (2014) Mechanisms linking in utero stress to altered offspring behaviour. in *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (Springer Verlag), p 93-122.
- Mitchell JB, Rowe W, Boksa P & Meaney MJ (1990) Serotonin regulates type II corticosteroid receptor binding in hippocampal cell cultures. *J Neurosci* 10(6):1745-1752.
- Mueller BR & Bale TL (2008) Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci* 28(36):9055-9065.
- Mulder EJH, Robles De Medina PG, Huizink AC, Van Den Bergh BRH, Buitelaar JK & Visser GHA (2002) Prenatal maternal stress: Effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Human Development* 70(1-2):3-14.
- Murphy VE, Fittock RJ, Zarzycki PK, Delahunty MM, Smith R & Clifton VL (2007) Metabolism of synthetic steroids by the human placenta. *Placenta* 28(1):39-46.
- Murphy VE, Gibson PG, Giles WB, Zakar T, Smith R, Bisits AM, Kessell CG & Clifton VL (2003) Maternal Asthma Is Associated with Reduced Female Fetal Growth. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168(11):1317-1323.
- Murphy VE, Zakar T, Smith R, Giles WB, Gibson PG & Clifton VL (2002) Reduced 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity is associated with decreased birth weight centile in pregnancies complicated by asthma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87(4):1660-1668.
- Mutale T, Creed F, Maresh M & Hunt L (1991) Life events and low birthweight—analysis by infants preterm and small for gestational age. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 98(2):166-172.
- Muzzio D, Zygmunt M & Jensen F (2014) The role of pregnancy-associated hormones in the development and function of regulatory B cells. *Frontiers in Endocrinology* 5(APR).
- Nebigil CG, Choi D-S, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, Launay J-M & Maroteaux L (2000) Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(17):9508-9513.
- Nebigil CG, Etienne N, Schaerlinger B, Hickel P, Launay JM & Maroteaux L (2001) Developmentally regulated serotonin 5-HT_{2B} receptors. *Int J Dev Neurosci* 19(4):365-372.

- Neugebauer R, Kline J, Stein Z, Shrout P, Warburton D & Susser M (1996) Association of stressful life events with chromosomally normal spontaneous abortion. *American Journal of Epidemiology* 143(6):588-596.
- Newbern D & Freemark M (2011) Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 18(6):409-416.
- Newton RW & Hunt LP (1984) Psychosocial stress in pregnancy and its relation to low birth weight. *British Medical Journal* 288(6425):1191-1194.
- Newton RW, Webster PAC, Binu PS, Maskrey N & Phillips AB (1979) Psychosocial stress in pregnancy and its relation to the onset of premature labour. *British Medical Journal* 2(6187):411-413.
- Ni W & Watts SW (2006) 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33(7):575-583.
- Ni XT, Duan T, Yang Z, Guo CM, Li JN & Sun K (2009) Role of Human Chorionic Gonadotropin in Maintaining 11 β -hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression in Human Placental Syncytiotrophoblasts. *Placenta* 30(12):1023-1028.
- Nkansah-Amankra S, Luchok KJ, Hussey JR, Watkins K & Liu X (2010) Effects of maternal stress on low birth weight and preterm birth outcomes across neighborhoods of South Carolina, 2000-2003. *Maternal and Child Health Journal* 14(2):215-226.
- Norbeck JS & Tilden VP (1983) Life stress, social support, and emotional disequilibrium in complications of pregnancy: A prospective, multivariate study. *Journal of Health and Social Behavior* 24(1):30-46.
- Novakovic B, Gordon L, Robinson WP, Desoye G & Saffery R (2013) Glucose as a fetal nutrient: Dynamic regulation of several glucose transporter genes by DNA methylation in the human placenta across gestation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24(1):282-288.
- O'Connor TG, Ben-Shlomo Y, Heron J, Golding J, Adams D & Glover V (2005) Prenatal anxiety predicts individual differences in cortisol in pre-adolescent children. *Biological Psychiatry* 58(3):211-217.
- O'Connor TG, Heron J, Golding J, Beveridge M & Glover V (2002) Maternal antenatal anxiety and children's behavioural/emotional problems at 4 years. Report from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *British Journal of Psychiatry* 180(JUNE):502-508.
- O'Connor TG, Heron J, Golding J & Glover V (2003) Maternal antenatal anxiety and behavioural/emotional problems in children: A test of a programming hypothesis. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines* 44(7):1025-1036.

- O'Donnell K, O'Connor TG & Glover V (2009) Prenatal stress and neurodevelopment of the child: Focus on the HPA axis and role of the placenta. *Developmental Neuroscience* 31(4):285-292.
- O'Donnell KJ, Bugge Jensen A, Freeman L, Khalife N, O'Connor TG & Glover V (2011a) Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11 α -HSD2. *Psychoneuroendocrinology* 10.1016/j.psyneuen.2011.09.014.
- O'Donnell KJ, Bugge Jensen A, Freeman L, Khalife N, O'Connor TG & Glover V (2011b) Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11 β -HSD2. *Psychoneuroendocrinology* 10.1016/j.psyneuen.2011.09.014.
- Oakley RH & Cidlowski JA (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 132(5):1033-1044.
- Odermatt A, Gumy C, Atanasov AG & Dzyakanchuk AA (2006) Disruption of glucocorticoid action by environmental chemicals: Potential mechanisms and relevance. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102(1-5 SPEC. ISS.):222-231.
- Odermatt A & Nashev LG (2010) The glucocorticoid-activating enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 has broad substrate specificity: Physiological and toxicological considerations. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 119(1-2):1-13.
- Olson AL & Pessin JE (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr* 16:235-256.
- Omer H (1986) Possible psychophysiologic mechanisms in premature labor. *Psychosomatics* 27(8):580-584.
- Orsillo SM (2001) Measures for Acute Stress Disorder and Posttraumatic Stress Disorder. *Practitioner's Guide to Empirically Based Measures of Anxiety*, Antony MM, Orsillo SM & Roemer L (Édit.) Springer US, Boston, MA 10.1007/0-306-47628-2_20. p 255-307.
- Oswald LM, Zandi P, Nestadt G, Potash JB, Kalaydjian AE & Wand GS (2006) Relationship between cortisol responses to stress and personality. *Neuropsychopharmacology* 31(7):1583-1591.
- Oufkir T, Arseneault M, Sanderson JT & Vaillancourt C (2010) The 5-HT 2A serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK-ERK1/2 and JAK2-STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 31(5):439-447.
- Oufkir T & Vaillancourt C (2011) Phosphorylation of JAK2 by serotonin 5-HT (2A) receptor activates both STAT3 and ERK1/2 pathways and increases growth of JEG-3 human placental choriocarcinoma cell. *Placenta* 32(12):1033-1040.

- Pacak K & Palkovits M (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22(4):502-548.
- Pagel MD, Smilkstein G, Regen H & Montano D (1990) Psychosocial influences on new born outcomes: A controlled prospective study. *Social Science and Medicine* 30(5):597-604.
- Paquette AG, Lesseur C, Armstrong DA, Koestler DC, Appleton AA, Lester BM & Marsit CJ (2013) Placental HTR2A methylation is associated with infant neurobehavioral outcomes. *Epigenetics* 8(8):796-801.
- Paquette AG & Marsit CJ (2014) The developmental basis of epigenetic regulation of HTR2A and psychiatric outcomes. *Journal of Cellular Biochemistry* 115(12):2065-2072.
- Peña CJ, Monk C & Champagne FA (2012) Epigenetic effects of Prenatal stress on 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 in the Placenta and fetal brain. *PLoS ONE* 7(6).
- Pink B (2011a) Socio-Economic Indexes for Areas (SEIFA) - Technical Paper. in *Secondary Socio-Economic Indexes for Areas (SEIFA)- Technical Paper.*
- Pink B (2011b) Socio-Economic Indexes for Areas (SEIFA) - Technical Paper. in *Secondary Socio-Economic Indexes for Areas (SEIFA)- Technical Paper.* (Australian Bureau of statistics).
- Ponder KL, Salisbury A, McGonnigal B, Laliberte A, Lester B & Padbury JF (2011) Maternal depression and anxiety are associated with altered gene expression in the human placenta without modification by antidepressant use: Implications for fetal programming. *Developmental psychobiology* 53(7):711-723.
- Prasad HC, Steiner JA, Sutcliffe JS & Blakely RD (2009) Enhanced activity of human serotonin transporter variants associated with autism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1514):163-173.
- Prasad HC, Zhu CB, McCauley JL, Samuvel DJ, Ramamoorthy S, Shelton RC, Hewlett WA, Sutcliffe JS & Blakely RD (2005) Human serotonin transporter variants display altered sensitivity to protein kinase G and p38 mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(32):11545-11550.
- Pretorius E (2004) Corticosteroids, depression and the role of serotonin. *Rev Neurosci* 15(2):109-116.
- Rabii J, Buonomo F & Scanes CG (1981) Role of serotonin in the regulation of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl. *J Endocrinol* 90(3):355-358.
- Räikkönen K, Pesonen AK, O'Reilly JR, Tuovinen S, Lahti M, Kajantie E, Villa P, Laivuori H, Hämäläinen E, Seckl JR & Reynolds RM (2015) Maternal depressive symptoms during

- pregnancy, placental expression of genes regulating glucocorticoid and serotonin function and infant regulatory behaviors. *Psychological Medicine* 45(15):3217-3226.
- Rainey WE, Rehman KS & Carr BR (2004) Fetal and maternal adrenals in human pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 31(4):817-835.
- Rallis S, Skouteris H, McCabe M & Milgrom J (2014) A prospective examination of depression, anxiety and stress throughout pregnancy. *Women Birth* 27(4):e36-42.
- Rapport MM, Green AA & Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176(3):1243-1251.
- Raubenheimer PJ, Young EA, Andrew R & Seckl JR (2006) The role of corticosterone in human hypothalamic-pituitary-adrenal axis feedback. *Clinical endocrinology* 65(1):22-26.
- Reeb KG, Graham AV, Zyzanski SJ & Kitson GC (1987) Predicting low birthweight and complicated labor in urban black women: A biopsychosocial perspective. *Social Science and Medicine* 25(12):1321-1327.
- Richard Green A (2006) Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. *British Journal of Pharmacology* 147(Suppl 1):S145-S152.
- Richardson HN, Zorrilla EP, Mandyam CD & Rivier CL (2006) Exposure to repetitive versus varied stress during prenatal development generates two distinct anxiogenic and neuroendocrine profiles in adulthood. *Endocrinology* 147(5):2506-2517.
- Ringler GE, Kallen CB & Strauss JF, 3rd (1989) Regulation of human trophoblast function by glucocorticoids: dexamethasone promotes increased secretion of chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 124(4):1625-1631.
- Rini CK, Dunkel-Schetter C, Wadhwa PD & Sandman CA (1999) Psychological adaptation and birth outcomes: The role of personal resources, stress, and sociocultural context in pregnancy. *Health Psychology* 18(4):333-345.
- Rondó PHC, Ferreira RF, Nogueira F, Ribeiro MCN, Lobert H & Artes R (2003) Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation. *European Journal of Clinical Nutrition* 57(2):266-272.
- Rondó PHC, Lemos JO, Pereira JA & Souza JMP (2010) The relationship between cortisol concentrations in pregnancy and systemic vascular resistance in childhood. *Early Human Development* 86(2):127-131.
- Rondó PHC, Pereira JA, Lemos JO & Ferreira RF (2011) The impact of maternal cortisol concentrations on child arterial elasticity. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2(1):56-62.

- Rose'Meyer R (2013) A review of the serotonin transporter and prenatal cortisol in the development of autism spectrum disorders. *Molecular Autism* 4(1).
- Rossant J & Cross JC (2001) Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nature Reviews Genetics* 2(7):538-548.
- Roth M, Obaidat A & Hagenbuch B (2012) OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* 165(5):1260-1287.
- Rothberg AD & Lits B (1991) Psychosocial support for maternal stress during pregnancy: Effect on birth weight. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 165(2):403-407.
- Rothenberger SE, Resch F, Doszpod N & Moehler E (2011) Prenatal stress and infant affective reactivity at five months of age. *Early Human Development* 87(2):129-136.
- Roy-Matton N, Moutquin JM, Brown C, Carrier N & Bell L (2011) The Impact of Perceived Maternal Stress and Other Psychosocial Risk Factors on Pregnancy Complications. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 33(4):344-352.
- Ruiz RJ, Fullerton J, Brown CEL & Schoolfield J (2001) Relationships of Cortisol, Perceived Stress, Genitourinary Infections, and Fetal Fibronectin to Gestational Age at Birth. *Biological Research For Nursing* 3(1):39-48.
- Sable MR & Wilkinson DS (2000) Impact of perceived stress, major life events and pregnancy attitudes on low birth weight. *Family Planning Perspectives* 32(6):288-294.
- Sabolovic Rudman S, Mustapic M, Kosec V, Pivac N, Rudman F & Muck-Seler D (2015) Serotonin risk factors for the development of hypertension in pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 291(4):779-785.
- Saif Z, Hodyl NA, Hobbs E, Tuck AR, Butler MS, Osei-Kumah A & Clifton VL (2014a) The human placenta expresses multiple glucocorticoid receptor isoforms that are altered by fetal sex, growth restriction and maternal asthma. *Placenta* 35(4):260-268.
- Saif Z, Hodyl NA, Hobbs E, Tuck AR, Butler MS, Osei-Kumah A & Clifton VL (2014b) The human placenta expresses multiple glucocorticoid receptor isoforms that are altered by fetal sex, growth restriction and maternal asthma. *Placenta* 10.1016/j.placenta.2014.01.012.
- Saif Z, Hodyl NA, Stark MJ, Fuller PJ, Cole T, Lu N & Clifton VL (2015) Expression of eight glucocorticoid receptor isoforms in the human preterm placenta vary with fetal sex and birthweight. *Placenta* 36(7):723-730.

- Sandman CA, Davis EP, Buss C & Glynn LM (2012) Exposure to prenatal psychobiological stress exerts programming influences on the mother and her fetus. *Neuroendocrinology* 95(1):8-21.
- Sari Y & Zhou FC (2003) Serotonin and its transporter on proliferation of fetal heart cells. *International Journal of Developmental Neuroscience* 21(8):417-424.
- Sarkar S, Tsai SW, Nguyen TT, Plevyak M, Padbury JF & Rubin LP (2001) Inhibition of placental 11 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by catecholamines via α \pm -adrenergic signaling. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 281(6 50-6).
- Sata R, Ohtani H, Tsujimoto M, Murakami H, Koyabu N, Nakamura T, Uchiumi T, Kuwano M, Nagata H, Tsukimori K, Nakano H & Sawada Y (2005) Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J Pharmacol Exp Ther* 315(2):888-895.
- Schneider ML, Moore CF, Kraemer GW, Roberts AD & DeJesus OT (2002) The impact of prenatal stress, fetal alcohol exposure, or both on development: Perspectives from a primate model. *Psychoneuroendocrinology* 27(1-2):285-298.
- Schock H, Zeleniuch-Jacquotte A, Lundin E, Grankvist K, Lakso H-Å, Idahl A, Lehtinen M, Surcel H-M & Fortner RT (2016) Hormone concentrations throughout uncomplicated pregnancies: a longitudinal study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 16(1):146.
- Schumacher A, Heinze K, Witte J, Poloski E, Linzke N, Woidacki K & Zenclussen AC (2013) Human chorionic gonadotropin as a central regulator of pregnancy immune tolerance. *Journal of Immunology* 190(6):2650-2658.
- Scott NM, Hodyl NA, Murphy VE, Osei-Kumah A, Wyper H, Hodgson DM, Smith R & Clifton VL (2009) Placental cytokine expression covaries with maternal asthma severity and fetal sex. *J Immunol* 182(3):1411-1420.
- Seckl JR (1998) Physiologic programming of the fetus. *Clin. Perinatol.* 25(4):939-962.
- Seckl JR (2004a) 11 α -hydroxysteroid dehydrogenases: Changing glucocorticoid action. *Current Opinion in Pharmacology* 4(6):597-602.
- Seckl JR (2004b) Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *European Journal of Endocrinology, Supplement* 151(3).
- Seckl JR & Chapman KE (1997) The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action. *European Journal of Biochemistry* 249(2):361-364.

- Seckl JR & Holmes MC (2007) Mechanisms of disease: Glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism* 3(6):479-488.
- Sedlmayr P, Blaschitz A & Stocker R (2014) The Role of Placental Tryptophan Catabolism. *Frontiers in Immunology* 5:230.
- Seth S, Lewis AJ, Saffery R, Lappas M & Galbally M (2015) Maternal Prenatal Mental Health and Placental 11beta-HSD2 Gene Expression: Initial Findings from the Mercy Pregnancy and Emotional Wellbeing Study. *Int J Mol Sci* 16(11):27482-27496.
- Shajib MS & Khan WI (2015) The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiologica* 213(3):561-574.
- Shams M, Kilby MD, Somers DA, Howie AJ, Gupta A, Wood PJ, Afnan M & Stewart PM (1998) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Human Reproduction* 13(4):799-804.
- Shi QJ, Lei ZM, Rao CV & Lin J (1993) Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 132(3):1387-1395.
- Shozu M, Akasofu K, Harada T & Kubota Y (1991) A new cause of female pseudohermaphroditism: placental aromatase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 72(3):560-566.
- Shu Q, Li W, Li J, Wang W, Liu C & Sun K (2014) Cross-Talk between cAMP and MAPK Pathways in HSD11B2 Induction by hCG in placental trophoblasts. *PLoS ONE* 9(9).
- Sibley C, Glazier J & D'Souza S (1997) Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Exp Physiol* 82(2):389-402.
- Simcock G, Kildea S, Elgbeili G, Laplante DP, Cobham V & King S (2017) Prenatal maternal stress shapes children's theory of mind: the QF2011 Queensland Flood Study. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 10.1017/S2040174417000186:1-10.
- Simcock G, Kildea S, Elgbeili G, Laplante DP, Stapleton H, Cobham V & King S (2016) Age-related changes in the effects of stress in pregnancy on infant motor development by maternal report: The Queensland Flood Study. *Developmental psychobiology* 58:640-659.
- Sivasubramaniam SD, Finch CC, Billett MA, Baker PN & Billett EE (2002) Monoamine Oxidase Expression and Activity in Human Placentae from Pre-eclamptic and Normotensive Pregnancies. *Placenta* 23(2-3):163-171.

- Sonier B, Lavigne C, Arseneault M, Ouellette R & Vaillancourt C (2005) Expression of the 5-HT_{2A} serotonergic receptor in human placenta and choriocarcinoma cells: mitogenic implications of serotonin. *Placenta* 26(6):484-490.
- Spielberger CD (2010) State-Trait Anxiety Inventory. *The Corsini Encyclopedia of Psychology*, John Wiley & Sons, Inc., 10.1002/9780470479216.corpsy0943.
- St-Pierre J, Fraser M & Vaillancourt C (2016a) Inhibition of placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by lead. *Reproductive Toxicology* 65:133-138.
- St-Pierre J, Grégoire J-C & Vaillancourt C (2017) A simple method to assess group difference in RT-qPCR reference gene selection using GeNorm: The case of the placental sex. *Scientific Reports* 7(1):16923.
- St-Pierre J, Laurent L, King S & Vaillancourt C (2016b) Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta* 48, Supplement 1:S66-S71.
- St-Pierre J, Laurent L, King S & Vaillancourt C (2016c) Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development. *Placenta* 48 Suppl 1:S66-S71.
- Standley K, Soule B & Copans SA (1979) Dimensions of prenatal anxiety and their influence on pregnancy outcome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 135(1):22-26.
- Stark MJ, Wright IMR & Clifton VL (2009) Sex-specific alterations in placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 activity and early postnatal clinical course following antenatal betamethasone. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 297(2).
- Steer PJ, Little MP, Kold-Jensen T, Chapple J & Elliott P (2004) Maternal blood pressure in pregnancy, birth weight, and perinatal mortality in first births: prospective study. *BMJ : British Medical Journal* 329(7478):1312-1312.
- Stein A, Campbell EA, Day A, McPherson K & Cooper PJ (1987) Social adversity, low birth weight, and preterm delivery. *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 295(6593):291-293.
- Stiles J & Jernigan TL (2010) The basics of brain development. *Neuropsychology review* 20(4):327-348.
- Strauss JF, 3rd, Kido S, Sayegh R, Sakuragi N & Gafvels ME (1992) The cAMP signalling system and human trophoblast function. *Placenta* 13(5):389-403.
- Sun K, Yang K & Challis JRG (1998) Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by progesterone, estrogen, and the cyclic adenosine 5'-monophosphate pathway in cultured human placental and chorionic trophoblasts. *Biol Reprod* 58(6):1379-1384.

- Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, Li M & Chambon P (2011) Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 145(2):224-241.
- Tanahashi T, Mune T, Morita H, Tanahashi H, Isomura Y, Suwa T, Daido H, Gomez-Sanchez CE & Yasuda K (2002) Glycyrrhizic acid suppresses type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression in vivo. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80(4-5):441-447.
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M & Nguyen M (2010) A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50(4):S1-S5.
- Thibeault AA, Deroy K, Vaillancourt C & Sanderson JT (2014) A unique co-culture model for fundamental and applied studies of human fetoplacental steroidogenesis and interference by environmental chemicals. *Environmental health perspectives* 122(4):371-377.
- Tollenaar MS, Beijers R, Jansen J, Riksen-Walraven JMA & De Weerth C (2011) Maternal prenatal stress and cortisol reactivity to stressors in human infants. *Stress* 14(1):53-65.
- Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M & Stewart PM (2004) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: A tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocrine Reviews* 25(5):831-866.
- Torche F & Kleinhaus K (2012) Prenatal stress, gestational age and secondary sex ratio: The sex-specific effects of exposure to a natural disaster in early pregnancy. *Human Reproduction* 27(2):558-567.
- Tracy SK, Hartz D, Hall B, Allen J, Forti A, Lainchbury A, White J, Welsh A, Tracy M & Kildea S (2011) A randomised controlled trial of caseload midwifery care: M@NGO (Midwives @ New Group practice Options). *BMC Pregnancy and Childbirth* 11:82-82.
- Tremblay J, Hardy DB, Pereira IE & Yang K (1999) Retinoic acid stimulates the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Biol Reprod* 60(3):541-545.
- Tsatsaris V, Malassiné A, Fournier T, Handschuh K, Schaaps J-P, Foidart J-M & Evain-Biron D (2006) Placenta Humain. *Gynécologique/Obstétrique* 5(005):A-10.
- Tsigos C & Chrousos GP (1994) Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 23(3):451-466.
- Tsigos C & Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53(4):865-871.

- Tzschoppe A, Fahlbusch F, Seidel J, Dörr HG, Rascher W, Goecke TW, Beckmann MW, Schild RL, Struwe E & Dötsch J (2011) Dexamethasone stimulates the expression of leptin and 11 β -HSD2 in primary human placental trophoblastic cells. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology* 156(1):50-55.
- Vaillancourt C, Lanoix D, Le Bellego F, Daoud G & Lafond J (2009) Involvement of MAPK signalling in human villous trophoblast differentiation. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 9(8):962-973.
- Valverde I, Penalva A & Dieguez C (2000) Influence of different serotonin receptor subtypes on growth hormone secretion. *Neuroendocrinology* 71(2):145-153.
- Van Batenburg-Eddes T, De Groot L, Huizink AC, Steegers EAP, Hofman A, Jaddoe VVW, Verhulst FC & Tiemeier H (2009) Maternal symptoms of anxiety during pregnancy affect infant neuromotor development: The generation R study. *Developmental Neuropsychology* 34(4):476-493.
- Van Beek JP, Guan H, Julan L & Yang K (2004) Glucocorticoids stimulate the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cultured human placental trophoblast cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89(11):5614-5621.
- Van Den Bergh BRH & Marcoen A (2004) High antenatal maternal anxiety is related to ADHD symptoms, externalizing problems, and anxiety in 8- and 9-year-olds. *Child Development* 75(4):1085-1097.
- Van den Bergh BRH, Van Calster B, Pinna Puissant S & Van Huffel S (2008a) Self-reported symptoms of depressed mood, trait anxiety and aggressive behavior in post-pubertal adolescents: Associations with diurnal cortisol profiles. *Hormones and Behavior* 54(2):253-257.
- Van Den Bergh BRH, Van Calster B, Smits T, Van Huffel S & Lagae L (2008b) Antenatal maternal anxiety is related to HPA-axis dysregulation and self-reported depressive symptoms in adolescence: A prospective study on the fetal origins of depressed mood. *Neuropsychopharmacology* 33(3):536-545.
- Van Der Kolk BA (1998) Trauma and memory. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 52(S1):S52-S64.
- Van Os J & Selten JP (1998) Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands. *British Journal of Psychiatry* 172(APR.):324-326.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A & Speleman F (2002a) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric

- averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3(7):0034.0031-1134.0011.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A & Speleman F (2002b) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3(7).
- Vatten LJ & Skjærven R (2004) Offspring sex and pregnancy outcome by length of gestation. *Early Human Development* 76(1):47-54.
- Viau M, Lafond J & Vaillancourt C (2009) Expression of placental serotonin transporter and 5-HT 2A receptor in normal and gestational diabetes mellitus pregnancies. *Reprod Biomed Online* 19(2):207-215.
- Vogel C & Marcotte EM (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews. Genetics* 13(4):227-232.
- Vrana SL, Dworkin SI & Vrana KE (1993) Radioenzymatic assay for tryptophan hydroxylase: [3H]H₂O release assessed by charcoal adsorption. *J Neurosci Methods* 48(1-2):123-129.
- Wadhwa PD (2005) Psychoneuroendocrine processes in human pregnancy influence fetal development and health. *Psychoneuroendocrinology* 30(8):724-743.
- Wadhwa PD, Buss C, Entringer S & Swanson JM (2009) Developmental Origins of Health and Disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. *Seminars in reproductive medicine* 27(5):358-368.
- Wadhwa PD, Dunkel-Schetter C, Chicz-DeMet A, Porto M & Sandman CA (1996) Prenatal psychosocial factors and the neuroendocrine axis in human pregnancy. *Psychosom Med* 58(5):432-446.
- Wadhwa PD, Garite TJ, Porto M, Glynn L, Chicz-Demet A, Dunkel-Schetter C & Sandman CA (2004) Placental corticotropin-releasing hormone (CRH), spontaneous preterm birth, and fetal growth restriction: A prospective investigation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 191(4):1063-1069.
- Wadhwa PD, Porto M, Garite TJ, Chicz-DeMet A & Sandman CA (1998) Maternal corticotropin-releasing hormone levels in the early third trimester predict length of gestation in human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 179(4):1079-1085.
- Wadhwa PD, Sandman CA, Chicz-DeMet A & Porto M (1997) Placental CRH modulates maternal pituitary-adrenal function in human pregnancy. p 276-281.

- Wadhwa PD, Sandman CA & Garite TJ (2001) The neurobiology of stress in human pregnancy: Implications for prematurity and development of the fetal central nervous system. in *Progress in Brain Research*), p 131-142.
- Wadhwa PD, Sandman CA, Porto M, Dunkel-Schetter C & Garite TJ (1993) The association between prenatal stress and infant birth weight and gestational age at birth: A prospective investigation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 169(4):858-865.
- Walder DJ, Laplante DP, Sousa-Pires A, Veru F, Brunet A & King S (2014) Prenatal maternal stress predicts autism traits in 61/2 year-old children: Project Ice Storm. *Psychiatry Res.* 219(2):353-360.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H & Bader M (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science (New York, N. Y.)* 299(5603):76.
- Wang B, Parobchak N & Rosen T (2012a) RelB/NF-kappaB2 regulates corticotropin-releasing hormone in the human placenta. *Mol Endocrinol* 26(8):1356-1369.
- Wang W, Li J, Ge Y, Li W, Shu Q, Guan H, Yang K, Myatt L & Sun K (2012b) Cortisol induces aromatase expression in human placental syncytiotrophoblasts through the cAMP/Sp1 pathway. *Endocrinology* 153(4):2012-2022.
- Wang WS, Liu C, Li WJ, Zhu P, Li JN & Sun K (2013) Involvement of CRH and hCG in the induction of aromatase by cortisol in human placental syncytiotrophoblasts. *Placenta* 10.1016/j.placenta.2013.10.018.
- Weinberger DR (1995) From neuropathology to neurodevelopment. *The Lancet* 346(8974):552-557.
- Weinstock M (2001) Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog. Neurobiol.* 65(5):427-451.
- Weinstock M (2008) The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32(6):1073-1086.
- Weiss DS, Marmar, C.R. (1997a) The impact of event scale-revised *Assessing Psychological Trauma and PTSD* ppp. 399-411.
- Weiss DS, Marmar, C.R. (1997b) The impact of event scale-revised *Assessing Psychological Trauma and PTSD* p399-411.
- Welberg LAM, Thivikraman KV & Plotsky PM (2005) Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *Journal of Endocrinology* 186(3).

- Williamson Jr HA, LeFevre M & Hector Jr M (1989) Association between life stress and serious perinatal complications. *Journal of Family Practice* 29(5):489-496.
- Wood CE (2005) Estrogen/hypothalamus-pituitary-adrenal axis interactions in the fetus: The interplay between placenta and fetal brain. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 12(2):67-76.
- Wu HH, Choi S & Levitt P (2016) Differential patterning of genes involved in serotonin metabolism and transport in extra-embryonic tissues of the mouse. *Placenta* 42:74-83.
- Wurmser H, Rieger M, Domogalla C, Kahnt A, Buchwald J, Kowatsch M, Kuehnert N, Buske-Kirschbaum A, Papoušek M, Pirke KM & von Voss H (2006) Association between life stress during pregnancy and infant crying in the first six months postpartum: A prospective longitudinal study. *Early Human Development* 82(5):341-349.
- Wyrwoll CS & Holmes MC (2012) Prenatal excess glucocorticoid exposure and adult affective disorders: A role for serotonergic and catecholamine pathways. *Neuroendocrinology* 95(1):47-55.
- Wyrwoll CS, Seckl JR & Holmes MC (2009) Altered placental function of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 knockout mice. *Endocrinology* 150(3):1287-1293.
- Yashwanth R, Rama S, Anbalagan A & Rao AJ (2006) Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: A study using human placental and rat Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 246(1-2):114-120.
- Yong Ping E, Laplante DP, Elgbeili G, Hillerer KM, Brunet A, O'Hara MW & King S (2015a) Prenatal maternal stress predicts stress reactivity at 2(1/2) years of age: the Iowa Flood Study. *Psychoneuroendocrinology* 56:62-78.
- Yong Ping E, Laplante DP, Elgbeili G, Hillerer KM, Brunet A, O'Hara MW & King S (2015b) Prenatal maternal stress predicts stress reactivity at 2½ years of age: The Iowa Flood Study. *Psychoneuroendocrinology* 56(0):62-78.
- Youdim MB, Edmondson D & Tipton KF (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7(4):295-309.
- Yudt MR, Jewell CM, Bienstock RJ & Cidlowski JA (2003) Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Mol Cell Biol* 23(12):4319-4330.
- Zeck W, Widberg C, Maylin E, Desoye G, Lang U, McIntyre D, Prins J & Russell A (2008) Regulation of placental growth hormone secretion in a human trophoblast model - The effects of hormones and adipokines. *Pediatric Research* 63(4):353-357.

- Zhang H, Smith GN, Liu X & Holden JJ (2010) Association of MAOA, 5-HTT, and NET promoter polymorphisms with gene expression and protein activity in human placentas. *Physiol Genomics* 42(1):85-92.
- Zhu CB, Hewlett WA, Feoktistov I, Biaggioni I & Blakely RD (2004) Adenosine receptor, protein kinase G, and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent up-regulation of serotonin transporters involves both transporter trafficking and activation. *Mol Pharmacol* 65(6):1462-1474.
- Zhu P, Tao F, Hao J, Sun Y & Jiang X (2010) Prenatal stress life events: implications for preterm birth and infant birthweight. *Am J Obstet Gynecol* 3(1-34):e1-8.
- Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Münstedt K, Rao CV, Lang U & Preissner KT (2002) Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87(11):5290-5296.

ANNEXE I: EFFECTS OF PRENATAL MATERNAL STRESS ON SEROTONIN AND FETAL DEVELOPMENT

Joey St-Pierre^{1,2}, Laetitia Laurent^{1,2}, Suzanne King^{3,4}, Cathy Vaillancourt^{1,2}

¹INRS-Institut Armand-Frappier et centre de recherche Biomed, Laval, Canada et ²Centre de recherche interdisciplinaire sur le bien-être, la santé, la Société et l'environnement, Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada; ³Institut de santé mentale Douglas, Montréal, Canada; ⁴McGill University Montréal, Canada

Contribution de l'étudiant :

L'étudiant a participé à l'élaboration de l'article ainsi qu'à la rédaction de façon égale à Laetitia Laurent. De plus, il a aussi conçu les figures dont la figure 2 qui a été choisie en couverture de la revue.

Article publié dans : Placenta 48, Supplement 1, Trophoblast Research, Vol. 30 (2016) S66eS71



Title: Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development
Author: Joey St-Pierre, Laetitia Laurent, Suzanne King, Cathy Vaillancourt
Publication: Placenta
Publisher: Elsevier
Date: December 2016
© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

LOGIN
If you're a [copyright.com](#) user, you can login to RightsLink using your [copyright.com](#) credentials. Already a RightsLink user or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)



Contents lists available at ScienceDirect

Placenta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/placenta

Effects of prenatal maternal stress on serotonin and fetal development

Joey St-Pierre^{a,1}, Laetitia Laurent^{a,1}, Suzanne King^b, Cathy Vaillancourt^{a,*}^a INRS-Institut Armand-Frappier and BioMed Research Center, Laval, QC, Canada^b Douglas Mental Health University Institute and McGill University, Montreal, QC, Canada

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 October 2015
Received in revised form
23 November 2015
Accepted 25 November 2015

Keywords:
Placenta
Stress
Fetal programming
Brain development
Pregnancy
Human
Serotonin receptors
Serotonin transporter
Sex difference

ABSTRACT

Fetuses are exposed to many environmental perturbations that can influence their development. These factors can be easily identifiable such as drugs, chronic diseases or prenatal maternal stress. Recently, it has been demonstrated that the serotonin synthesized by the placenta was crucial for fetal brain development. Moreover, many studies show the involvement of serotonin system alteration in psychiatric disease during childhood and adulthood. This review summarizes existing studies showing that prenatal maternal stress, which induces alteration of serotonin systems (placenta and fetal brain) during a critical window of early development, could lead to alteration of fetal development and increase risks of psychiatric diseases later in life. This phenomenon, termed fetal programming, could be moderated by the sex of the fetus. This review highlights the need to better understand the modification of the maternal, placental and fetal serotonin systems induced by prenatal maternal stress in order to find early biomarkers of psychiatric disorders.

© 2015 Published by IFPA and Elsevier Ltd.

1. Introduction

Fetuses are exposed to many environmental factors that can influence their development especially during the very first weeks of gestation since most women do not yet know they are pregnant and so may not have modified their risk behaviors. These factors can be easily identifiable such as drugs (e.g. medication, alcohol), chronic diseases (e.g. depression) but it can also be more subjective like prenatal maternal stress (PNMS), which depends on the type, intensity and duration of stress, and the individual. Thereby, a deregulation of the early life environment can induce not only pregnancy disease (miscarriages, preeclampsia) or fetal development alteration (intrauterine growth restriction, congenital malformations) but also increase the unborn child's risk of a range of diseases including psychiatric disorders (autism, anxiety, and depression) in childhood or adulthood. This concept is termed developmental programming. One of the key components allowing adaptation of fetuses to these conditions is the placenta, and an increasing number studies show its involvement in fetal

programming. Recently, it has been demonstrated that the serotonin (or 5-hydroxytryptamine, 5-HT) synthesized by the placenta is essential for fetal brain development. In this review, we highlight the critical role of serotonin, especially placental serotonin, in fetal development. Then we focus on the effect of PNMS on the placental and fetal serotonin system and on fetal brain programming. Finally, we suggest that a deregulation of the tight interaction between placental glucocorticoids and serotonin systems during *in utero* development could explain the increasing risk to developing psychiatric disease later in life (Fig. 1).

2. Serotonin system

The identification of serotonin in the brain in the early 1950s [1,2] led to numerous studies showing its involvement in mental health and psychiatric diseases such as depression, attention deficit hyperactivity disorder, and schizophrenia [3]. The serotonin system is complex including at least 18 subtypes of receptors. Most of them belong to the GPCR (G protein-coupled receptor) family, except for one group, which are ionotropic receptor, the 5-HT₃. The serotonin transporter (SERT or 5HTT) allows the reuptake of serotonin in the intracellular domain and is the main target of antidepressant molecules such as selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). The tryptophan hydroxylase (TPH)-1, expressed preferentially in

* Corresponding author. INRS-Institut Armand Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada.

E-mail address: cathy.vaillancourt@iaf.inrs.ca (C. Vaillancourt).

¹ Both authors (JSP and LL) contributed equally to this review.

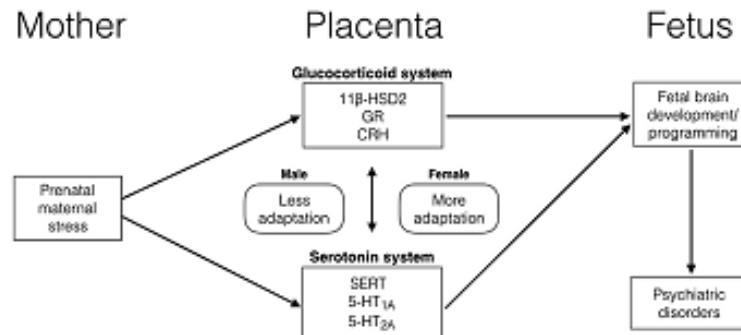


Fig. 1. Proposed mechanism of fetal programming of psychiatric disorders involving placental serotonin system. Cortisol and placental serotonin are essential for fetal brain development. Prenatal maternal stress alters glucocorticoid (11 β -HSD2, GR and CRH) and serotonin (SERT, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A}) systems as well as serotonin and glucocorticoid interaction in the placenta. These placental alterations lead to adverse neurodevelopment and programming leading to psychiatric disorders later in life. Placental adaptation in response to PNMS is sex-dependent, leading to an increased risk of adverse neurodevelopmental effect in male compared to female. 11 β -HSD2: Type 2 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase, GR: Glucocorticoid receptor, CRH: Corticotrophin releasing hormone, SERT: Serotonin transporter, 5-HT_{1A}: Serotonin 1A receptor, 5-HT_{2A}: Serotonin 2A receptor.

the periphery, and the TPH-2, expressed in the central nervous system (CNS), allow the synthesis of serotonin from L-tryptophan. The monoamine oxidases A and B (MAOA and MAOB) degrade the serotonin. This complexity may explain why serotonin is involved in a large variety of functions and, therefore, in many diseases.

Serotonin is expressed very early in embryo/fetal development [4]. In rodents, TPH-2 (E11.25), SERT (E12) and MAOA (E12) are expressed in the brain of the fetuses before the appearance of the first serotonergic neuron (reviewed in Ref. [1]). The pattern of serotonin system development *in utero* in humans appears to be relatively similar, with the appearance of SERT at 8 weeks of pregnancy, and the observation of clustered serotonin cell bodies in the raphe nuclei at 15 weeks of gestation [15]. These data suggest that an external source of serotonin allows the serotonin system to develop itself in the earliest stages of fetal development before the fetus is able to synthesize its own. For a long time it was believed that this source of serotonin came only from the mother, that is, that maternal serotonin crosses the placental barrier to reach the fetus. Recently, using a mouse model, it was shown that the placenta synthesizes *de novo* its own serotonin from the maternal L-tryptophan via the placental TPH-1 enzyme [6]. Mouse placenta produces serotonin as early as E10.5 and provides the main source of serotonin in the fetal forebrain in the earliest stages of development [6]. Even if the placenta of mouse and human are different from a structural point of view, our lab showed that the human placenta also expresses TPH and synthesizes serotonin *de novo* [6–8]. Moreover, the human placenta possesses many components of the serotonin system such as SERT [9,10], MAO [11,12] and 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors [9,13–15].

Serotonin is crucial for numerous stages of embryogenesis, such as left/right axis modeling in vertebrates, neuronal development and differentiation and cardiac morphogenesis and development [6,16–23]. This monoamine is also involved in placentation (e.g. vascular reshaping, decidualization, early gastrulation, blastocyst adhesion and implantation) [24–27]. Using animal models it has been shown that a partial or complete loss of serotonin appears to lead to developmental alterations and psychiatric disease in adulthood. Treatment with DL-P-chlorophenylalanine (PCPA), an inhibitor of serotonin synthesis, during the embryogenesis (E12–17) alters the maturation of pyramidal neurons in the somatosensory cortex of rats, suggesting that a hypo-serotonergic environment cause insufficient neuronal network development [28,29]. Sato *et al.* suggest that this reduction in serotonin levels in the developing brain can lead to an autistic phenotype [29]. The partial or

complete lack of cerebral serotonin in knock-out (KO) Pet-1 or KO TPH-2 mice results in an increase in anxiety-like behavior [30,31]. Surprisingly, the brain of the KO TPH-2 appears structurally normal. The authors propose that this effect is due to a sufficient supply of exogenous serotonin synthesized by the peripheral TPH-1 enzyme (i.e. placental and maternal serotonin), to the TPH-2 KO embryo's brain, during early prenatal development before the blood brain barrier closes [32]. Moreover, using TPH-1 KO mice, which have no serotonin in the periphery, Cote *et al.* showed that maternal serotonin is involved in the control of morphogenesis which is critical for normal mouse development [22]. On the other hand, it seems that an excess of serotonin signaling during a critical time period of development has more deleterious effects on brain development (e.g. neuronal formation in the somatosensory cortex) than serotonin deficiency [33]. Indeed, KO SERT mice have higher levels of serotonin in the brain and show depressive- and anxiety-like behavior. It seems that these effects can be reproduced by inhibiting SERT during embryogenesis (E8–18) with SSRI. These mouse models had abnormalities in heart and brain development as well as depressive- and anxiety-related behavior in adulthood [34], mimicking the KO phenotype. Interestingly, inhibiting SERT at later time points of development (3 month-old mice) has no observable effect on behavior [35]. It was also reported that embryos grown in the presence of either a high concentration of serotonin or SSRI, have a decreased proliferation of myocardium, cardiac mesenchyme, and endothelium, indicating that serotonin may regulate proliferation in the embryonic heart [21].

As Booij *et al.* mentioned, each component of the serotonin system undergoes major changes *in utero* and early life and possesses a unique development pattern, with some components stabilizing early in life (e.g. MAOA) and others not before adulthood (e.g. TPH-1) [1]. Thereby, a deregulation in serotonin homeostasis during precise critical windows of time could alter the fetal short-term development and also the lifelong health including cognitive and mental health outcomes [3]. This phenomenon is called developmental programming and was first described by Barker and colleagues [36].

The theory of developmental programming, referred to as Developmental Origins of Health and Disease (DOHAD), describes how, during early life, the interplay between maternal and environmental factors programs fetal growth and development and later health and disease risk [37]. The fetal environment is modulated by the placenta, which is a plastic organ that can quickly adapt to changes from the maternal environment (e.g. PNMS), for

example, through epigenetic mechanism [38]. Paquette et al. highlight that placental *HTR2A* (gene encoding 5-HT_{2A} receptor) methylation could influence placental growth and function, as well as placental serotonin signaling which, in turn, can affect infant brain development, inducing long-term neurobehavioral outcomes [3]. The same group showed that the regulation of placental *HTR2A* methylation is different depending on fetal sex [38]. Indeed, placental epigenetic machinery shows basal sex-differences [39]. The expression of DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (DNMT1), the enzyme responsible for basal DNA methylation, is significantly lower in male placentas compared to female placentas in mice in basal condition (e.g. no PNMS) [39]. Interestingly, PNMS induced an elevation of DNMT1 expression only in the placenta of female mice. The increase of the placental DNMT1 expression observed following PNMS in female (but not in male) allow the female mice to maintain the pattern of methylation (which is crucial for brain development) even after stress, while male mice cannot [39]. This data suggest that female mice are able to adapt for circumvent the effect of PNMS.

The gene encoding SERT, *SLC6A4*, is also subject to epigenetic regulation. One study reports that increased maternal depressive mood during the 2nd trimester of pregnancy is associated with reduced methylation of the maternal and neonatal *SLC6A4* promoter region. The results suggest that this decrease may result in increased SERT mRNA levels, which modify the serotonin levels and, in turn, contribute to increased vulnerability to affective disorders later in life [40,41]. Thus, all the parameters that can alter serotonin homeostasis early in life, such as PNMS, could lead to structural and functional changes in fetal development and in brain circuits that, in turn, may result in a predisposition to psychopathology in adulthood.

3. Prenatal maternal stress

The principal effectors of the stress response are commonly referred to as the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis

(Fig. 2). Following a stressful event, the hypothalamus produces corticotropin-releasing hormone (CRH) which stimulates the anterior pituitary gland to produce adrenocorticotropic hormone (ACTH). ACTH induces the adrenal glands to produce cortisol, a glucocorticoid often defined as the stress hormone [42]. Cortisol (or corticosterone in rodents) is the end product of the HPA axis. It is essential in the survival response to a stressor event by disabling non-essential functions such as digestion and the immune system [43]. Cortisol also inhibits CRH and ACTH production by the hypothalamus and pituitary gland, respectively, in a negative feedback manner, keeping cortisol levels down when they are not necessary for survival [44]. During pregnancy, the placenta produces CRH in response to cortisol, which in turn modulates the maternal HPA axis in a positive loop (Fig. 2) [45]. Thus, blood cortisol level is increased in a pregnant compared to non-pregnant woman and reaches peak concentration in the third trimester [46,47]. Maternal cortisol is inactivated by the type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD2) in the placenta [48], controlling the level of maternal cortisol that reaches the fetus. 11 β -HSD2 is primarily located in the syncytiotrophoblast layer of the placenta. While cortisol is mostly inactivated by placental 11 β -HSD2, about 20% of the cortisol from the mother's circulation crosses the placenta and reaches the fetus [49]. Cortisol is essential to fetal development such as for lung maturation and brain development [50,51]. On the other hand, high levels of maternal cortisol may be harmful for the fetus. Indeed, stress during pregnancy is not only known to increase the mother's blood cortisol, it is also linked to a reduction in the expression and activity of the placental 11 β -HSD2 [49,52,53], and is associated with fetal growth restriction [54,55], prematurity [56,57] and low birth-weight [58,59].

In animal models the effect of PNMS is relatively straightforward to study compared to research in humans, as it is not ethically acceptable to induce stress in a pregnant woman and observe the impact on her child's development. Indeed, animal models have the advantage that it is possible to control the magnitude, timing, and

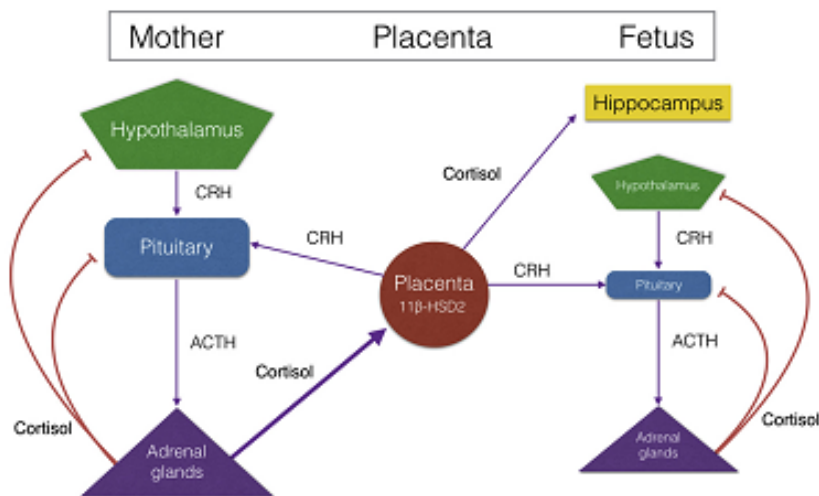


Fig. 2. Stress axis during pregnancy: Mother-placental-fetal communication. Following a stressful event, the hypothalamus produces CRH that induces ACTH production by the pituitary gland. ACTH in turn induces cortisol production by the adrenal glands. Cortisol by negative feedback inhibits the production of CRH and ACTH by the hypothalamus and pituitary gland, respectively. Maternal cortisol induces the production of CRH by the placenta increasing maternal cortisol level during pregnancy. Although cortisol is degraded into cortisone in the placenta by the 11 β -HSD2 enzyme, about 20% passes beyond the placenta to the fetus. A normal level of cortisol is important for the normal fetal brain development (e.g. HPA axis, hippocampus). CRH: Corticotropin releasing hormone, ACTH: Adrenocorticotropic hormone, 11 β -HSD2: Type 2 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase, HPA: Hypothalamus-pituitary-adrenal.

type of stressful event. In other words, it is possible to apply the same degree of stress to multiple animals and then measure biomarkers. For example, in animal models, PNMS can be induced in several ways such as by restraint, forced swimming or by treatment with dexamethasone, a synthetic glucocorticoid. On the other hand, it is not possible to assess how the animal feels about the stressful event, as is the case with humans. In humans, PNMS can be measured by questionnaires (subjective distress, depression or objective exposure) and/or by biological measures (analysis of blood, saliva or urinary cortisol). Biological cortisol measures and fetal programming in humans has been extensively reviewed by Zijlmans and colleagues [60]. Subjective distress can be evaluated following trauma exposure by questionnaires such as the Impact of Event Scale-Revised (IES-R) or the Peritraumatic Distress Inventory (PDI) [61–63]. For objective stress exposure, it can also be evaluated by questionnaires, but it is different from the subjective stress evaluation as it does not seek to determine the way the mothers were affected, but only to determine their degree of hardship in objective terms. One way to assess the effect of objective stress during pregnancy in humans is to take advantage of a natural disaster as a stressor event. One benefit of using a natural disaster as a stressor event is that the objective hardship is often randomly distributed in a population. It is also independent from the mother's temperament or influence, unlike experiences such as divorce or other interpersonal stressors [51,64]. Results from natural disaster studies give insight on the effect of PNMS on children's development. Such is the case for a study of women pregnant during Québec's 1998 ice storm where results established a link between disaster-related PNMS and alterations in cognitive, linguistic and motor functioning in children at 5½ years old, autism traits at 6½ years old as well as alterations in the children's immunological system in adolescence [65–68]. In a similar study using Iowa's 2008 flooding, PNMS has been linked to adiposity in childhood [69]. Another study using a natural disaster as a stressor event involves floods in Australia in 2011: the QF2011 Queensland Flood Study. Given that QF2011 includes samples of birth tissues (detailed in Ref. [70]). This study will link PNMS from a natural disaster with the children's development and the placental mechanisms involved.

PNMS is a known risk factor that may have negative effects on the developing fetus. PNMS may result in long-term alteration of the child's cognitive development, immune system and pose a higher risk of autism spectrum disorders (reviewed in Ref. [51]). This fetal programming is most likely transmitted to the fetus by the mother's cortisol blood level. Cortisol in the mother's blood is correlated with cortisol in the fetal circulation [75]. This change in cortisol concentration in the fetus is known to induce structural changes in hippocampus and to alter the functioning of the fetal HPA axis [52,76,77].

More and more studies show that fetal sex plays an important role in placental and fetal development adaptation to environmental factors such as PNMS (reviewed in Ref. [71]). In the case of PNMS, the placenta seems to adopt different survival strategies depending on fetal sex. Placentas from male fetuses seem to adapt their gene expression for increased growth at the expense of lower survival in case of severe adverse maternal environment (e.g. lack of food, stress) while females seem to reduce growth to promote survival. In other words, male placentas become insensitive while female placentas stay sensitive to glucocorticoid levels. These differences in sensitivity can be explained by glucocorticoid receptor (GR) subtypes expressed in the placenta which are dissimilar depending on fetal sex [72]. Indeed, glucocorticoid resistance observed in male placentas can be mediated by a higher level of inactive GR isoforms (GR-β, GR-A and GR-P) compared to female placenta. Moreover, female placenta expressed higher level of active GR-α isoform compared to male. These results suggest that placental

changes in response to PNMS can be sex-dependent, and highlight the role of placental/fetal sex on fetal brain programming [73,74].

4. PNMS effects on serotonin

Accumulating evidence shows a link between PNMS and an increase of behavioral disorders in offspring, including anxiety and depression [75,76]. In many of these disorders an impairment of serotonin systems was reported. Using animal models, it has been demonstrated that an application of different type of stress (e.g. restraint stress, auditory stress) during pregnancy induces alteration of the central serotonin systems of offspring even later in life. For example, PNMS in mice induced an increase of the turnover of serotonin (5HIAA/5-HT ratio) in the hippocampus [77] as well as a decrease of SERT levels in the offspring leading to a depressive-like phenotype [39]. Another study demonstrated that a high level of PNMS increased TPH expression and serotonin level in the dorsal raphe nuclei [78]. In rat offspring, PNMS has also been shown to increase the 5-HT_{1A} receptor in the hippocampus [79]. Moreover, even a chronic stress applied just before conception altered the serotonin system in offspring (e.g. decrease serotonin turnover, 5-HT_{1A} receptor and SERT) [80]. Interestingly, alterations observed in animal models exposed to PNMS, including molecular and behavioral anomalies, were restored following treatment with SSRI. In fact, treatment during early postnatal days (1–3 weeks) with the SSRI fluoxetine, which is known to increase extracellular serotonin levels, restored corticosterone levels, serotonin turnover, spine density in hippocampus, and spatial learning in mice exposed to PNMS [77]. The authors suggest that the increase of serotonin levels, induced by fluoxetine treatment, allow restoration of the negative feedback exerted by the glucocorticoid receptors on the HPA axis. Indeed, the glucocorticoid system and the serotonin system are closely related. For example, prenatal dexamethasone exposure in rats resulted in a reduction of serotonin turnover in the offspring's neocortex, hippocampus, hypothalamus and midbrain, but not in the striatum [81]. Additionally, dexamethasone treatment with pregnant rats induced cerebrocortical expression of serotonin receptors (5-HT_{1A} and 5-HT₂) as well as SERT level in the adult offspring [82]. Serotonin is also known to regulate glucocorticoid receptor mRNA and binding *in vitro* in rat, mice and guinea pig cerebral cells [83–85]. These results highlight the interaction between PNMS, serotonin and HPA axis and suggest that the serotonin system is implicated in the fetal programming of the offspring's HPA axis by PNMS [86].

Very few studies have highlighted the effect of PNMS on the placental serotonin system and its potential fetal programming effect. A recent study by Raikkonen *et al.* showed that higher placental level of mRNA implicated in serotonin and glucocorticoid placental system were associated with more regulatory behavioral challenges in the human infant at 16 days. Interestingly, while placental 11β-HSD2 and SERT mRNA levels were linked with more regulatory behavior challenges, only 11β-HSD2 mRNA level was linked to infant regulatory behavior challenges when maternal depression symptoms were included in the statistical model [87]. Because the placenta produces serotonin, and serotonin is known to be implicated in fetal programming as well as in autism spectrum disorders [88], research on the effect of PNMS on the placental serotonin system could be leading to early biomarkers of risk of autism spectrum disorder, or the placental serotonin system could be a potential therapeutic target to attenuate the adverse effect of PNMS on fetal and child outcome.

5. Conclusion

The serotonin system is crucial for fetal development, especially for brain development, and many studies show its involvement in

psychiatric disease during adulthood. In this review, we group information showing that maternal exposure to environmental factors, including PNMS, which induces alteration of serotonin systems during critical windows of early development, could lead to alterations of fetal development and increase risk of psychiatric diseases such as depression, anxiety, or autism later in life. By taking into account data obtained in human and animal models, it seems that fetal sex is also an important variable in the effect of PNMS on fetal programming. Thus, a better understanding of the effect of PNMS on the maternal, placental and fetal serotonin systems, according to fetal sex, could lead to finding early biomarkers of psychiatric pathologies, such as autism. Moreover, the placental serotonin system could be a potential therapeutic target to lessen the effects of fetal programming.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgment

Financially supported by the March of Dimes Foundation Social and Behavioral Sciences Research grant (#12-FY12-179) to CV, and a operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR: MOP-1150067) to SK and CV as well as by studentship awards to JSP from *Fonds de recherche en santé (FRQ)-Santé*. Both JSP and LL contributed equally to this review.

References

- [1] L. Booij, et al., Genetic and early environmental influences on the serotonin system: consequences for brain development and risk for psychopathology, *J. Psychiatry Neurosci.* 40 (1) (2015) 5–18.
- [2] A.H. Amin, T.B. Crawford, J.H. Gaddum, The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog, *J. Physiol.* 126 (3) (1954) 596–618.
- [3] A.G. Paquette, C.J. Marsit, The developmental basis of epigenetic regulation of HTR2A and psychiatric outcomes, *J. Cell Biochem.* 115 (12) (2014) 2065–2072.
- [4] L. Olson, A. Seiger, Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations, *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 137 (3) (1972) 301–316.
- [5] B.L. Jacobs, E.C. Azmitia, Structure and function of the brain serotonin system, *Physiol. Rev.* 72 (1) (1992) 165–229.
- [6] A. Bonnin, et al., A transient placental source of serotonin for the fetal fore-brain, *Nature* 472 (7343) (2011) 347–350.
- [7] K. Deroy, et al., Serotonin production by human and mouse trophoblast: involvement in placental development and function, *Placenta* 34 (9) (2013) A71.
- [8] K. Deroy, et al., Altered placental function in the tryptophan hydroxylase 1 knock-out mouse – from fetal development in utero to erythropoiesis in post-natal life, *Placenta* 35 (9) (2014) A8.
- [9] M. Viau, J. Lafond, C. Vaillancourt, Expression of placental serotonin transporter and 5-HT 2A receptor in normal and gestational diabetes mellitus pregnancies, *Reprod. Biomed. Online* 19 (2) (2009) 207–215.
- [10] B. Bottalico, et al., Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies, *Placenta* 25 (6) (2004) 518–529.
- [11] E.E. Billett, Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues, *Neurotoxicology* 25 (1–2) (2004) 139–148.
- [12] G.R. Auda, et al., Localization of monoamine oxidase mRNA in human placenta, *J. Histochem. Cytochem.* 46 (12) (1998) 1393–1400.
- [13] B. Sonier, et al., Expression of the 5-HT2A serotonergic receptor in human placenta and choriocarcinoma cells: mitogenic implications of serotonin, *Placenta* 26 (6) (2005) 484–490.
- [14] C. Vaillancourt, et al., Labelling of D2-dopaminergic and 5-HT2-serotonergic binding sites in human trophoblastic cells using [³H]-spiperone, *J. Recept. Res.* 14 (1) (1994) 11–22.
- [15] W.Q. Huang, et al., Studies on the localization of 5-hydroxytryptamine and its receptors in human placenta, *Placenta* 19 (8) (1998) 655–661.
- [16] M. Levin, G.A. Buznikov, J.M. Lauder, Of minds and embryos: left-right asymmetry and the serotonergic controls of pre-neural morphogenesis, *Dev. Neurosci.* 28 (3) (2006) 171–185.
- [17] E.S. Petrova, V.A. Orellin, Serotonin is involved in the regulation of histogenetic processes in rat embryonic neocortex, *Bull. Exp. Biol. Med.* 143 (3) (2007) 372–375.
- [18] M.J. Eaton, et al., Developmental regulation of early serotonergic neuronal differentiation: the role of brain-derived neurotrophic factor and membrane depolarization, *Dev. Biol.* 170 (1) (1995) 169–182.
- [19] G.A. Buznikov, The action of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis, *Pharmacol. Ther.* 25 (1) (1984) 23–59.
- [20] P.M. Whitaker-Azmitia, et al., Serotonin as a developmental signal, *Behav. Brain Res.* 73 (1–2) (1996) 19–29.
- [21] M.S. Yavarone, et al., Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo, *Teratology* 47 (6) (1993) 573–584.
- [22] F. Cote, et al., Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (1) (2007) 329–334.
- [23] F. Cote, et al., Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (23) (2003) 13525–13530.
- [24] J.A. Mitchell, R.E. Hammer, Serotonin-induced disruption of implantation in the rat: I. Serum progesterone, implantation site blood flow, and intrauterine pO₂, *Biol. Reprod.* 28 (4) (1983) 830–835.
- [25] J.A. Mitchell, R.E. Hammer, H. Goldman, Serotonin-induced disruption of implantation in the rat: II. Suppression of decidualization, *Biol. Reprod.* 29 (1) (1983) 151–156.
- [26] F. Maekawa, K. Yamanouchi, Effect of deprivation of serotonin by p-chlorophenylalanine on induction and maintenance of pseudopregnancy in female rats, *Brain Res. Bull.* 39 (5) (1996) 317–321.
- [27] T. Oufkir, C. Vaillancourt, Phosphorylation of JAK2 by serotonin 5-HT (2A) receptor activates both STAT3 and ERK1/2 pathways and increases growth of JEG-3 human placental choriocarcinoma cell, *Placenta* 32 (12) (2011) 1033–1040.
- [28] T. Vitalis, et al., Embryonic depletion of serotonin affects cortical development, *Eur. J. Neurosci.* 26 (2) (2007) 331–344.
- [29] K. Sato, Placenta-derived hypo-serotonin situations in the developing fore-brain cause autism, *Med. Hypotheses* 80 (4) (2013) 368–372.
- [30] T.J. Hendricks, et al., Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior, *Neuron* 37 (2) (2003) 233–247.
- [31] J.M. Beaulieu, et al., Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (4) (2008) 1333–1338.
- [32] L. Gurknecht, et al., Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification, *PLoS One* 7 (8) (2012) e43157.
- [33] N. Nordquist, L. Orelund, Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders—a review, *Ups. J. Med. Sci.* 115 (1) (2010) 2–10.
- [34] C.W. Noolander, et al., Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart cardiomyopathy and lifelong behavioral abnormalities, *PLoS One* 3 (7) (2008) e2782.
- [35] M.S. Ansorge, E. Morelli, J.A. Gingrich, Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice, *J. Neurosci.* 28 (1) (2008) 199–207.
- [36] D.J.P. Barker, et al., Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life, *Lancet* 341 (8850) (1993) 938–941.
- [37] D.J.P. Barker, The fetal and infant origins of disease, *Eur. J. Clin. Invest.* 25 (7) (1995) 457–463.
- [38] A.G. Paquette, et al., Placental HTR2A methylation is associated with infant neurobehavioral outcomes, *Epigenetics* 8 (8) (2013) 796–801.
- [39] B.R. Mueller, T.L. Bale, Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy, *J. Neurosci.* 28 (36) (2008) 9055–9065.
- [40] A.M. Devlin, et al., Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth, *PLoS One* 5 (8) (2010) e12201.
- [41] R. Philibert, et al., Serotonin transporter mRNA levels are associated with the methylation of an upstream CpG island, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 144B (1) (2007) 101–105.
- [42] E. Charmandari, C. Tsigos, G. Chrousos, Endocrinology of the Stress Response, 2005, pp. 259–284.
- [43] T.P. Braun, D.L. Marks, The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids, *Front. Physiol.* 6 (2015) FEB01.
- [44] C. Tsigos, G.P. Chrousos, Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress, *J. Psychosom. Res.* 53 (4) (2002) 865–871.
- [45] M. Thomson, The physiological roles of placental corticotropin releasing hormone in pregnancy and childbirth, *J. Physiol. Biochem.* 69 (3) (2013) 559–573.
- [46] I. Phocas, A. Sarandakou, D. Rizos, Maternal serum total cortisol levels in normal and pathologic pregnancies, *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 31 (1) (1990) 3–8.
- [47] R.D. Benfield, et al., Cortisol as a biomarker of stress in term human labor: physiological and methodological issues, *Biol. Res. Nurs.* 16 (1) (2014) 64–71.
- [48] N. Draper, P.M. Stewart, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action, *J. Endocrinol.* 186 (2) (2005) 251–271.
- [49] C. Jensen Pena, C. Monk, F.A. Champagne, Epigenetic effects of prenatal stress on 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain, *PLoS One* 7 (6) (2012) e39791.
- [50] P.L. Ballard, Hormonal influences during fetal lung development, *Ciba Found. Symp.* 78 (1980) 251–274.
- [51] A. Charil, et al., Prenatal stress and brain development, *Brain Res. Rev.* 65 (1) (2010) 56–79.

ANNEXE II : RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Tableau A1 : Corrélation Pearson entre le taux d'ARNm de *HSD11B2* placentaire et l'IMC des enfants à 16 mois, 30 mois et 4 ans séparés selon le sexe.

Corrélation Pearson			IMC 16 mois	IMC 30 mois	IMC 4 ans
<i>HSD11B2</i>	Tous	Corrélation	-.292*	-.270*	-.392*
		Sig.	0.044	0.04	0.01
		N	48	58	42
	Male	Corrélation	-0.312	-0.153	-.445*
		Sig.	0.107	0.41	0.043
		N	28	31	21
	Femelles	Corrélation	-0.31	-.416*	-0.316
		Sig.	0.183	0.031	0.163
		N	20	27	21

HSD11B2 : gène de la 11 β -Hydroxystéroïde Déshydrogénase Type 2 ; IMC : Indice de masse corporelle; Sig. : niveau de significativité, p-value; * : $p \leq 0.05$.

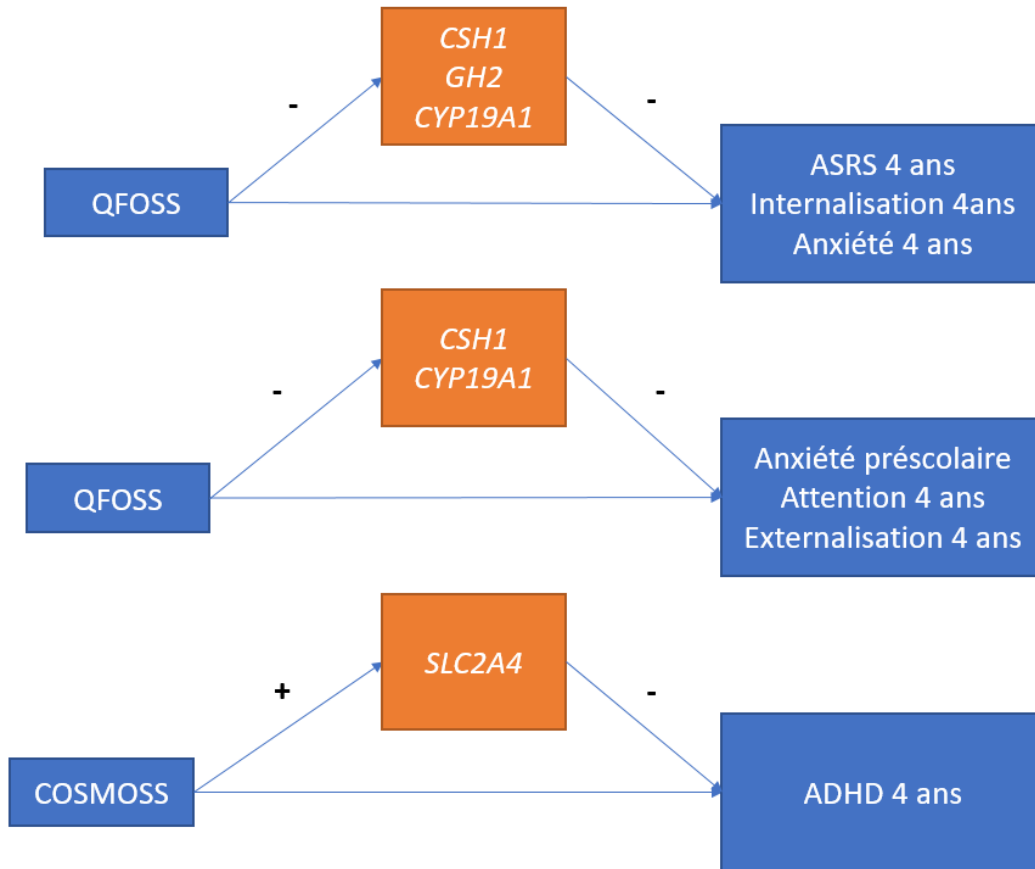


Figure A1 : Schéma des médiations significatives de l'expression placentaire de l'ARNm influençant l'effet du PNMS sur les troubles du comportement de l'enfant. Les médiations significatives décrivent l'effet du PNMS (objectif et subjectif) sur l'expression des gènes placentaires qui par la suite (médiation) est associée avec des altérations comportementales chez les enfants. Les analyses ont été réalisées avec la macro Process V2.11. QFOSS: *Queensland flood objective stress score*; COSMOSS: *Combined score of mother's subjective stress*; CSH1: Hormone chorionique somatotrope 1 (hormone placentaire lactogène (hPL)); GH2: Hormone de croissance placentaire (pGH); CYP19A1: Cytochrome p450 A1 (aromatase); SLC2A4: transporteur de soluté 2 membre 4 (GLUT4); ASRS : *Autism spectrum rating scale*; ADHD: *Attention deficit hyperactivity disorder*- trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité. Les troubles internalisés, externalisés, l'anxiété, l'attention, et l'ADHD ont été évaluées avec le questionnaire *child behavioral check list* (CBCL). L'anxiété préscolaire a été évalué en utilisant le *Spence preschool anxiety scale*.

Tableau A2 : Modèles de régression linéaires prédisant la méthylation de l'ADN des gènes placentaires séparés par sexe du fœtus.

	B	Std. Error	β	R	R²	p-value
A <i>HSD11B2</i> males				0.571	0.326	0.009
QFOSS	1.379	0.637	0.373			0.041
Timing exposure	0.029	0.01	0.528			0.005
<i>HSD11B2</i> females				0.510	0.260	0.104
QFOSS	0.277	1.047	0.067			0.795
Placental index	-1.263	0.75	-0.387			0.113
Maternal BMI	0.221	0.114	0.446			0.071
B <i>HTR2A</i> males				0.359	0.129	0.066
QFOSS	0.014	1.22	0.003			0.991
BWGA	-1.464	0.76	-0.359			0.066
<i>HTR2A</i> females				0.498	0.248	0.022
QFOSS	-3.919	1.564	-0.498			0.022
C <i>MAOA</i> males				0.381	0.145	0.050
QFOSS	-0.364	1.651	-0.042			0.827
BWGA	2.806	1.363	0.381			0.050
<i>MAOA</i> females				0.669	0.447	0.009
QFOSS	1.319	1.561	0.183			0.411
BWGA	-4.904	1.47	-0.682			0.004
Placental index	-3.004	1.152	-0.533			0.019

QFOSS: *Queensland flood objective stress score*; Placental index: ratio du poids du fœtus sur le poids placentaire; BMI : Indice de masse corporelle; BWGA : poids du fœtus pour l'âge gestationnel. *HSD11B2* : gène de la 11β-Hydroxystéroïde Déshydrogénase Type 2; *HTR2A* : gène du récepteurs de la sérotonine de type 2A; *MAOA* :Gène de la monoamine oxydase A.

Résultats non-publiés: Effect of prenatal maternal stress on placental methylation of glucocorticoid and serotonin systems: the QF2011 study.

Laurent L, St-Pierre J Penaherrera M, Kildea S, Robinson WP, Oberlander TF, King S and Vaillancourt