

# Thèse de Doctorat

Nhat-Thang TRAN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : BIOLOGIE SANTE NANTES ANGERS

Discipline : *Biologie, Médecine, et Santé*

Spécialité : *Physiologie et nutrition périnatale*

Unité de recherche : *PhAN UMR1280, INRA, Université de Nantes*

Soutenue le 26 Octobre 2016

Thèse N° :

## La citrulline, un nouvel agent en thérapeutique pour le retard de croissance intra-utérin (RCIU) ? Impact sur le placenta, la croissance fœtale et questions ouvertes sur la supplémentation néonatale dans un modèle animal de RCIU.

### JURY

Rapporteurs :	Olivier MOREL, Professeur, Nancy Franck PERROTIN, Professeur, Tours
Examineurs :	Valérie AMARGER, Docteur, Nantes Anne TARRADE, Docteur, Jouy-en-Josas
Président :	Henri-Jean PHILIPPE, Professeur, Paris
Directeur de Thèse :	Dominique DARMAUN, Professeur, Nantes
Co-directeur de Thèse :	Norbert WINER, Professeur, Nantes

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : rien ne fonctionne et personne ne sait pourquoi ! »*

Albert Einstein

# Remerciements

A Professeur Morel,

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond respect pour avoir accepté de juger ce travail, malgré des contraintes de temps. Je vous en remercie sincèrement.

A Professeur Perrotin,

Soyez assuré de ma reconnaissance pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Par votre grande connaissance sur un modèle d'expérimentation de même thématique, vous avez été, et serez encore, l'un des interlocuteurs importants pour ce travail.

A Docteur Tarrade,

Votre expertise des pathologies placentaires est indispensable à une critique de qualité de ce travail. Soyez assuré de mon respect et ma gratitude.

A Professeur Philippe,

Soyez assuré de ma reconnaissance pour m'avoir offert une précieuse opportunité de rentrer en France pour réaliser cette aventure scientifique. Je vous remercie également de me faire l'honneur de présider le jury de thèse.

Valérie,

Tu n'es pas simplement un membre du jury ma thèse. Tu m'as donné des prémisses essentielles pour que ce travail soit né, malgré en post-terme. Encore mille fois merci pour ton aide, pour chaque moment où tu me demandais « ça va ? » et après notre discussion, je retrouvais la raison pour laquelle j'ai commencé cette aventure.

Aurélié,

Tu mérites d'être co-auteur de ce travail. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite.

Patricia, Marie-Cécile, Khadija,

Je tiens à vous remercier pour l'accompagnement volontaire et efficace, pour votre disponibilité à tous les moments.

Guillaume, Blandine, Maeva, Isabelle, Anthony,

Sachez que j'ai tellement apprécié votre compétence et expérience, votre bonne humeur malgré des pannes de technique, des abattages et des manips sans arrêt. Je ne vous « emmerde » plus mais soyez prêts pour mon retour un jour, je vous jure.

Axel, Charlotte, Anne-Lyse, Marième, Bérange, Emilie, Vincent, Jacob,

Nous sommes tous jeunes et pleins d'énergie, pour toujours. Il y a eu déjà des survivants, et on va tous s'en sortir finalement. C'est nous à « réguler » notre destin, par toutes les voies de signalisation possibles. Soyez heureux comme si c'était nous au jeu de laser et rendez-vous la prochaine fois, pourquoi pas ?

Un grand merci à l'équipe de Myriam et ses techniciennes, pour votre adorable gentillesse et votre professionnalisme.

A Norbert et Dominique, sans qui cette thèse n'existerait pas. Votre gentillesse est exemplaire pour moi et les autres. Vos précieux conseils, votre connaissance du monde de la recherche et votre grande expérience sont indispensables pour nourrir mon amour professionnel. Assurez ma gratitude et mon grand respect.

A ma mère qui m'a offert la vie et l'amour éternel. Je t'en serai toujours reconnaissant. A toi Hieu qui me rend heureux et malheureux, mais il s'agit déjà d'un morceau de ma vie. J'espère que ce travail comme le reste vous rendra fiers de moi.

## Liste des abréviations

Ala	Alanine
Cit	Citrulline
DOHaD	<i>Developmental origins of health and disease</i>
DP	Dysfonction placentaire
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
(s)Flt	<i>(soluble) Fms-like tyrosine kinase</i>
GD	<i>Gestational day</i>
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
IGFR	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
JZ	<i>Junctional zone</i>
LP	<i>Low protein diet</i>
LZ	<i>Labyrinthe zone</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
NP	<i>Normal protein diet</i>
PAG	Petit pour l'âge gestationnel
PE	Pré-éclampsie
PND	<i>Postnatal day</i>
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RE	Réticulum endoplasmique
ROL	Radicaux oxygénés libres
SMet	Syndrome métabolique
SNAT	<i>Sodium-coupled neutral amino acid transporter</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
(s)VEGFR	<i>(soluble) Vascular endothelial growth factor receptor</i>

## TABLE DES MATIERES

<b>1. LA TRAJECTOIRE ALTÉRÉE D'UNE CROISSANCE FŒTALE.....</b>	<b>4</b>
1.1. Qu'est-ce qu'un retard de croissance intra-utérin ?.....	4
1.2. Diagnostic du RCIU .....	5
<b>2. PLACENTA ET CROISSANCE FŒTALE .....</b>	<b>7</b>
2.1. Facteurs déterminants de la fonction nutritionnelle du placenta .....	7
2.1.1. Facteurs de croissance, système insuline – insulin-like growth factors (IGF)....	7
2.1.2. Angiogénèse et vasculogénèse .....	10
2.1.3. Transporteurs placentaires.....	16
2.2. Quelle est la pertinence de l'utilisation d'un modèle d'expérimentation animale pour le RCIU humain ? .....	17
2.2.1. Intérêt de l'espèce animale utilisée : .....	17
2.2.2. Quelle est la pertinence d'un modèle animal expérimental pour l'étude du placenta dans le RCIU humain ? .....	20
2.3. Où en est-on dans la connaissance des adaptations placentaires au cours d'une grossesse avec retard de croissance du fœtus ? .....	23
2.3.1. Le stress localisé au placenta : Stress oxydant et stress du réticulum endoplasmique .....	23
2.3.2. Voie de l'angiogénèse en situation de grossesse pathologique d'origine placentaire :.....	26
2.3.3. Marqueurs biologiques d'origine placentaire .....	30
<b>3. CONSÉQUENCES DU RCIU .....</b>	<b>33</b>
3.1. Conséquences à court terme .....	33
3.2. Conséquences à long terme .....	33
3.2.1. L'introduction du concept de la programmation ou l'origine précoce des maladies chroniques cardio-métaboliques de l'adulte.....	35
3.2.2. Mécanismes de programmation mis en évidence à partir des modèles d'expérimentation.....	36
3.2.3. Syndrome métabolique, obésité et impact du fructose .....	38
<b>4. POURQUOI EXPLORER L'ARGININE ET LA CITRULLINE COMME NOUVELLE PISTE THÉRAPEUTIQUE POUR LE RCIU EN PÉRIODE PÉRINATALE ? .....</b>	<b>42</b>
4.1. Effets de la supplémentation en arginine au stade prénatal :.....	44
4.2. Pourquoi explorer la supplémentation en citrulline en période postnatale :.....	45
<b>5. OBJECTIF DE CE TRAVAIL SUR LA SUPPLÉMENTATION PÉRINATALE EN CITRULLINE.....</b>	<b>48</b>
5.1. Citrulline dans la croissance et fonction placentaire : .....	48
5.1.1. Effet de la citrulline sur la restriction maternelle en protéine :.....	48
5.1.2. Les objectifs de la 1 <sup>ère</sup> partie du travail de thèse étaient donc de : .....	48
5.2. Citrulline a-t-elle une place en période postnatale précoce ? .....	48
5.2.1. Impact du modèle de restriction maternelle en protéines sur la programmation fœtale .....	48
5.2.2. Impact de la citrulline en période néonatale : .....	49
5.2.3. Objectifs de la 2 <sup>e</sup> partie du travail de thèse : .....	49
5.3. Schéma simplifié du protocole d'expérimentation.....	50
<b>6. RÉSULTATS .....</b>	<b>51</b>

6.1. Phase prénatale : Article intitulé « <i>Maternal citrulline supplementation enhances placental function and fetal growth in a rat model of IUGR involvement of insulin-like growth factor 2 and angiogenic factors</i> » .....	51
6.1.1. Résumé .....	51
6.1.2. Article accepté dans le <i>Journal of Maternal-Fetal &amp; Neonatal Medicine</i> .....	52
6.2. Phase postnatale : Article en cours de développement sous le titre « <i>Does neonatal citrulline supplementation affect growth and metabolism in rats receiving a high fructose diet?</i> » .....	59
6.2.1. Résumé .....	59
6.2.2. Article en préparation pour soumission à <i>Journal of Developmental Origins of Health and Disease</i> : .....	60
<b>7. DISCUSSION - PERSPECTIVES.....</b>	<b>92</b>
7.1. L'effet de la supplémentation prénatale en citrulline se confirme de manière reproductible :.....	92
7.1.1. La croissance fœtale est améliorée :.....	92
7.1.2. Quel est le site principal de l'effet de la citrulline ?.....	92
7.1.3. Pour ce qui est de l'effet placentaire de la citrulline, quel est le primum movens, quelle est la séquence des événements ?.....	94
7.1.4. Comment envisager une translation en médecine humaine et ultérieurement un essai clinique de supplémentation anténatale en citrulline ?.....	96
7.2. La supplémentation postnatale en citrulline reste à justifier en termes d'efficacité :.....	98
7.2.1. La citrulline post-natale est-elle sans effet sur la croissance précoce ?.....	98
7.2.2. Le « régime enrichi en fructose » est-il un bon modèle d'induction du syndrome métabolique ?.....	99
7.2.3. Comment interpréter l'absence d'effet de la citrulline sur l'impact métabolique du fructose ? .....	100
<b>8. CONCLUSION.....</b>	<b>102</b>
<b>9. ANNEXE : TECHNIQUE EN COURS DE LA MISE AU POINT .....</b>	<b>103</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Recoupement entre PAG et RCIU .....	4
Figure 1.2 : Implications pour la santé publique de la prématurité et des PAG .....	5
Figure 2.1 : Différents composants du système Insuline-like growth factor .....	9
Figure 2.2 : Régulation de transcription par voie VHL/HIF/VEGF.....	11
Figure 2.3 : VEGF et son système de récepteurs.....	12
Figure 2.4 : Evolution de la concentration plasmatique du sVEGFR-1 au cours d'une grossesse normale. D'après Romero (2008). .....	13
Figure 2.5 : Image au microscope électronique d'une villosité terminale .....	14
Figure 2.6 : Concentration plasmatique du PlGF au cours d'une grossesse normale.....	15
Figure 2.7 : Analyse par RT-PCR de l'expression du PlGF.....	15
Figure 2.8 : Barrière materno-foetale chez l'humain .....	17
Figure 2.9 : Barrière foeto-maternelle trilaminaire chez le rat .....	19
Figure 2.10 : Schéma de la circulation intra-placentaire chez le rat.....	19
Figure 2.11 : Circulation placentaire de l'humain et de rat. ....	19
Figure 2.12 : Effets du régime de restriction en protéines .....	22
Figure 2.13 : Contribution du stress du RE et du stress oxydant placentaire à la pathophysiologie du RCIU isolé et du RCIU associé à la PE.....	24
Figure 2.14 : Détoxification principale des ROL .....	25
Figure 2.15 : Action inhibitrice du sFlt-1 sur la voie VEGF .....	27
Figure 2.16 : Répartition des anomalies placentaires en fonction de la concentration de PlGF maternel.....	28
Figure 2.17 : Corrélations du poids fœtal avec des facteurs intra-placentaires au cours de la gestation. ....	30
Figure 2.18 : Dépistage de la dysfonction placentaire par le dosage des facteurs d'angiogénèse .....	31
Figure 3.1 : Risque relatif de mortalité néonatale et post-néonatale associé à la prématurité et au faible poids de naissance.....	33
Figure 3.2 : Association entre le PN et le devenir à l'âge adulte.....	34
Figure 3.3 : Adaptations structurelles et métaboliques des tissus au cours de la programmation intra-utérine des maladies métaboliques.....	37
Figure 3.4 : Métabolisme du fructose au niveau hépatique.....	40
Figure 3.5 : Effets systémiques de la consommation chronique du fructose.....	41
Figure 4.1 : Structure moléculaire de l'arginine .....	42
Figure 4.2 : Structure moléculaire de la citrulline .....	43

## 1. La trajectoire altérée d'une croissance fœtale

### 1.1. Qu'est-ce qu'un retard de croissance intra-utérin ?

Le terme « retard de croissance intra-utérin » (RCIU) (ou plutôt « restriction » dans la littérature contemporaine) est utilisé pour désigner une contrainte de la croissance potentielle d'un fœtus, habituellement du fait d'un processus pathologique. Dans cette optique, le RCIU se différencie du terme « petit pour l'âge gestationnel » (PAG) qui désigne un fœtus ou un nouveau-né, avec un poids (respectivement estimé échographiquement ou mesuré à la naissance), inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile pour l'âge gestationnel, par rapport à une population de référence. Cela signifie que ce terme PAG ne tient pas compte de la vélocité de croissance pendant la grossesse.

Le poids faible à la naissance (*low birth weight* – LBW) est défini comme un poids inférieur à 2500 g sans tenir compte de l'âge gestationnel et donc indépendant du choix d'une courbe de référence.

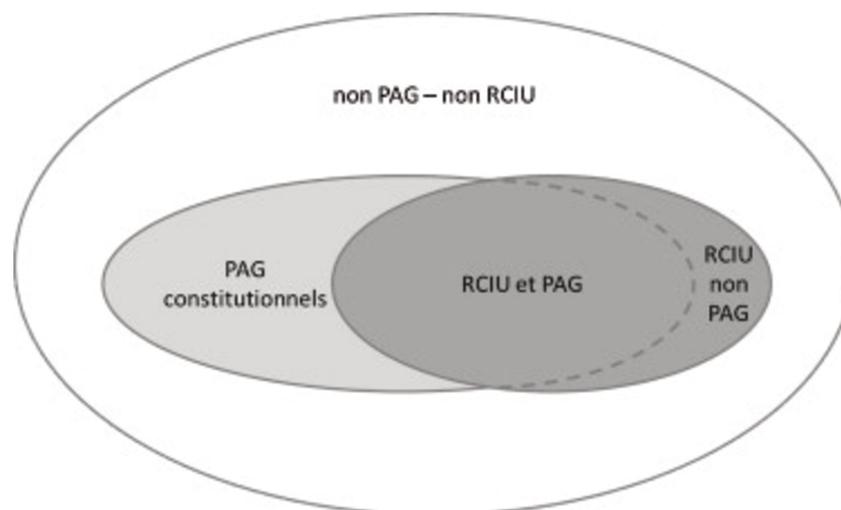


Figure 1.1 Recouvrement entre PAG et RCIU. D'après Ego (2013)

On estime que 30.000 à 80.000 enfants naissent chaque année avec un RCIU en France. Parmi des pays à ressources faibles et moyennes en 2010, l'estimation était de plus de 30 millions à l'échelle mondiale (Lee, 2013).

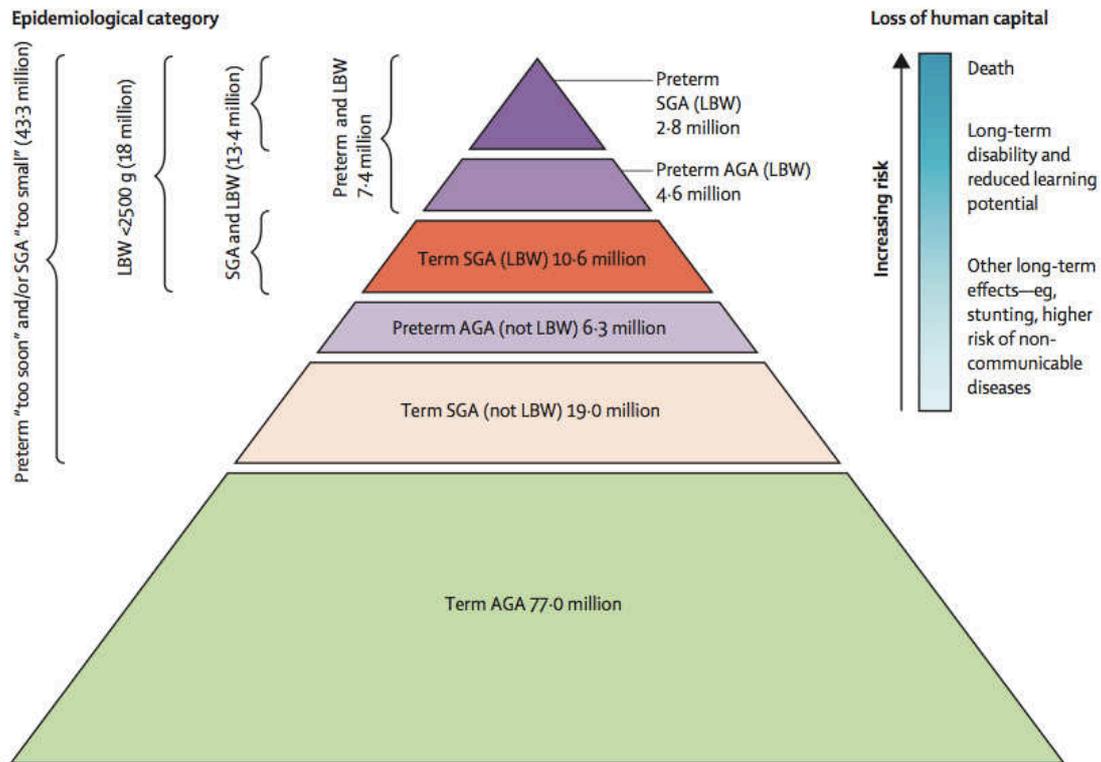


Figure 1.2 : Implications pour la santé publique de la prématurité et des PAG pour 120 millions de naissances dans des pays à ressources faibles et moyennes. D'après (Lee, 2013)

## 1.2. Diagnostic du RCIU

Le diagnostic du RCIU est posé à l'aide d'outils cliniques, mais d'une manière imparfaite, incertaine et rétrospective. L'approche habituelle consiste à identifier dans un premier temps un fœtus PAG. Cela présente des inconvénients puisque une proportion significative des fœtus PAG ont pourtant une vélocité de croissance fœtale appropriée à leur potentiel génétique et sont simplement constitutionnellement petits. A l'inverse, le poids d'un fœtus atteint de RCIU n'est pas nécessairement inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile. L'exemple peut être pris d'un fœtus dont la croissance suivrait initialement le 70<sup>ème</sup> percentile et serait ralentie graduellement pour finir entre 10<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> percentiles. Le diagnostic de RCIU exige en toute rigueur de mettre en évidence une cassure ou un arrêt de croissance, et/ou une altération du bien-être fœtal (anomalies du Doppler, oligoamnios). Le dépistage du RCIU en population générale est effectivement de faible performance, d'après le résultat d'une étude récente en France : le taux de détection anténatale n'atteint que 21,7% ou 33,0% parmi les PAG à la naissance selon que la référence est le 10<sup>ème</sup> ou le 3<sup>ème</sup> percentile, respectivement (Monier, 2015). Ce-

la s'accorde avec les constatations de Gardosi (2013) : un RCIU passé inaperçu expose à un risque plus élevé de mort *in utero*, et il faudrait mettre en place de meilleures stratégies pour améliorer ce dépistage. Cependant, cela pourrait induire à tort des interventions médicales avant terme et par conséquent une prématurité élevée. Une identification correcte permettrait chez ces individus fragiles un meilleur pronostic à court et à long terme.

## 2. Placenta et croissance fœtale

Par son rôle de coordonnateur nutritionnel entre la mère et le fœtus, le placenta a une place centrale dans la vie intra-utérine. La croissance fœtale est déterminée non seulement par l'apport en nutriments et en oxygène maternel, mais également par la capacité d'échange et l'activité endocrine du placenta. Etant un organe extrêmement actif pour les fonctions d'échange et de sécrétion endocrine, le placenta lui-même exige un apport important d'oxygène et de nutriments. Des mécanismes complexes assure l'équilibrage entre les besoins du placenta pour son propre métabolisme et son développement optimal (et sa survie en cas de grossesse pathologique) et les besoins liés au métabolisme et à la croissance du fœtus.

Des conditions anormales, telles que l'hypoxie, l'altitude, la malnutrition maternelle, certains agents toxiques et infectieux etc., peuvent altérer cet équilibre. La dysfonction placentaire (DP) est impliquée dans un spectre clinique de pathologies spécifiques en obstétrique, comprenant la prééclampsie (PE), le RCIU, la prématurité, et l'hématome rétro-placentaire (HRP) (Brosens, 2011), qui restent des causes majeures de la morbi-mortalité chez la mère et le fœtus dans le monde entier.

L'approche de la physiopathologie fœto-placentaire devrait nous apporter une meilleure connaissance mécanistique, et dégager éventuellement des pistes thérapeutiques pour l'amélioration et/ou la correction des altérations de croissance fœtale. Néanmoins, comme le modèle d'expérimentation utilisé au sein de notre laboratoire est basé sur une manipulation nutritionnelle, seuls les processus impliqués dans les relations entre nutrition maternelle et croissance fœtale seront abordés ci-dessous.

### 2.1. Facteurs déterminants de la fonction nutritionnelle du placenta

#### 2.1.1. Facteurs de croissance, système insuline – *insulin-like growth factors* (IGF)

L'insuline sécrétée par le pancréas maternel ne traverse pas le placenta mais favorise la croissance du fœtus en agissant chez la mère comme un signal

orientant spécifiquement les substrats énergétiques, en particulier le glucose, les acides aminés et les acides gras, vers le placenta. Au cours de la grossesse, des changements métaboliques majeurs s'opèrent : afin d'irriguer un nouvel organe, l'unité fœto-placentaire, la production de globules rouges s'accroît ; afin de préparer la phase de croissance fœtale rapide du 3<sup>ème</sup> trimestre, l'organisme maternel met en réserve, dès le 1<sup>er</sup> trimestre, des carburants sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux maternel ; au 3<sup>ème</sup> trimestre, afin de fournir au fœtus le glucose, son carburant quasi-exclusif, la production de glucose par le foie maternel s'accroît. L'insuline favorise physiologiquement l'entrée du glucose dans les cellules. Toutefois, lors du 3<sup>ème</sup> trimestre de la gestation, une résistance des tissus maternels à l'insuline se met en place, ce qui réduit l'utilisation du glucose par les tissus de l'organisme maternel, et « cana-lise » donc le glucose vers le placenta et le fœtus (Freemark, 2010). Au niveau de la membrane microvillositaire trophoblastique, l'insuline maternel régule l'expression des transporteurs placentaires du glucose, notamment des GLUT4, afin de raffiner une balance entre la consommation du glucose au placenta et le flux de ce substrat vers le fœtus : GLUT4 surexprimé au 1<sup>er</sup> trimestre et diminué au terme où le glucose sera indispensable pour une croissance fœtale exponentielle (Ericsson, 2005). En plus, l'action de l'insuline et l'IGF1 maternel sur le placenta joue un rôle de régulation en amont de la voie mTOR placen-taire, celle qui serait responsable ensuite des adaptations placentaires pour le fœtus en termes des nutriments et de l'oxygène (Jansson, 2012).

L'IGFI et l'IGFII sont d'importants facteurs intervenant dans la croissance placentaire. Brièvement, ce système consiste en : (1) deux ligands, IGFI et IGFII, (2) six protéines de liaison (*IGF-binding proteins*-IGFBP), codées de 1 à 6, qui se lient avec des IGF circulants et constituent ainsi une sorte de stockage sérique des IGF (grâce à une demi-vie significativement augmentée par rapport l'IGF libre), (3) des protéases d'IGFBP qui coupent des complexes IGFBP, (4) deux ré-cepteurs d'IGF (type 1 et 2) (Verhaeghe, 2008).

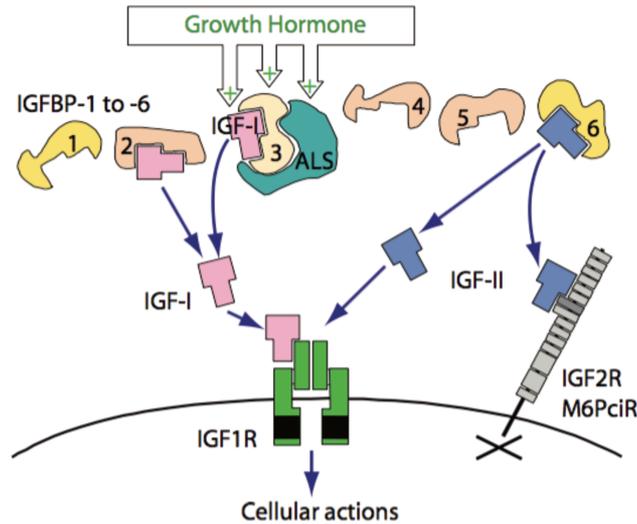


Figure 2.1 : Représentation schématique des différents composants du système Insuline-like growth factor. ALS : Acid-Labile-Subunit. D'après Netchine (2011)

Les IGF et leurs protéines de liaison sont produits au sein de l'unité placentaire qui régule son propre développement d'une manière autocrine et paracrine. Forbes (2008) a montré sur des explants de villosités placentaires humaines, que l'IGF1 et l'IGFII peuvent agir comme régulateurs exogènes sur la croissance placentaire et préserver les cytotrophoblastes de l'apoptose. Han (1996) a montré que les ARNm de l'IGF2 sont plus abondants que ceux de l'IGF1 tout au long de la gestation ; la même conclusion a été atteinte par Carter (2006) sur le placenta murin. Carter (2006) a montré l'expression placentaire des ARNm de l'IGF2 qui est forte et durable dans le mésoderme (qui donne ensuite la naissance des vaisseaux fœtaux), les cellules trophoblastiques de la zone labyrinthique et jonctionnelle (*cf.* Figure 2.11). A l'inverse, l'expression placentaire de l'IGF1 est très faible pendant toute la gestation. Effectivement, la croissance du placenta de rat n'est affectée que par la manipulation du gène d'*Igf2* (Fowden, 2003). L'IGF2 a une influence particulièrement importante sur la morphologie et la fonction placentaires, notamment dans le contexte d'une altération nutritionnelle expérimentale chez des rongeurs (Sferruzzi-Perri, 2011). Le rôle différentiel des transcrits placentaire et fœtal du gène *Igf2* a par ailleurs été bien décrit dans des modèles de souris chez lesquels le gène a été invalidé. Cela implique des mécanismes épigénétiques in-

tervenant dans l'adaptation de l'apport placentaire à la demande fœtale (Constancia, 2002).

Hills (2004) a étudié l'impact de l'axe IGF-IGFBP-1 sur la biologie des cytotrophoblastes villositaires humains (VCT), au lieu des explants extravillositaire (EVCT) ou des lignées immortalisées cancéreuses comme d'autres équipes l'avaient fait auparavant. Il a montré que les IGF régulent *seulement les VCT du 1<sup>er</sup> trimestre*, mais pas ceux du placenta à terme, notamment dans le cas de l'IGFII. Ensuite, en 2012, Hills a trouvé que l'IGFII, mais pas l'IGFI, est un régulateur important de la survie des VCT en gestation. Cet effet impliquerait le récepteur IGF2R (Harris, 2011), dont on a longtemps cru qu'il n'agissait pas dans la transduction du signal IGFII, mais seulement dans la dégradation de celui-ci. Si l'on envisage un traitement ciblé sur le placenta, particulièrement sur le système des IGF et leurs récepteurs placentaires, un tel traitement putatif devrait donc être *précoce*, dès des premiers signes éventuels de placentation sous-optimale ou de dysfonction placentaire.

L'expression d'IGFII est importante au niveau de la colonne trophoblastique intermédiaire des villosités crampons, ce qui suggère qu'il joue un rôle essentiel dans l'invasion des trophoblastes au cours de la placentation (Han, 1996). Cette régulation est liée à l'interaction de l'IGFII avec le système des IGFBP1-6 exprimées au niveau déciduale, parmi lesquelles l'IGFBP1 est la plus exprimée. Récemment, Madeleneau (2015) a montré par l'intermédiaire de l'analyse transcriptomique du placenta humain que l'IGFBP1 est fortement induit au cours du RCIU vasculaire.

### 2.1.2. Angiogénèse et vasculogénèse

Le placenta se développe de façon invasive avec une angiogénèse continue. Une vascularisation adéquate, couplée à un débit sanguin progressivement augmenté, est en effet essentielle pour l'efficacité de l'échange fœto-placentaire. LA mise en place de ce système est régulée par l'ensemble des facteurs angiogéniques. Les protéines de la famille VEGF (*vascular endothelial growth factors*) sont les plus étudiées.

Le VEGF A, généralement appelé VEGF, est la molécule la plus connue dans cette grande famille.

La sécrétion du VEGF est induite par plusieurs mécanismes parmi lesquels l'hypoxie reste l'élément stimulant majeur. Ce processus peut se faire par la stabilisation des ARN messager, mais surtout par la régulation transcriptionnelle en présence du HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor alpha*).

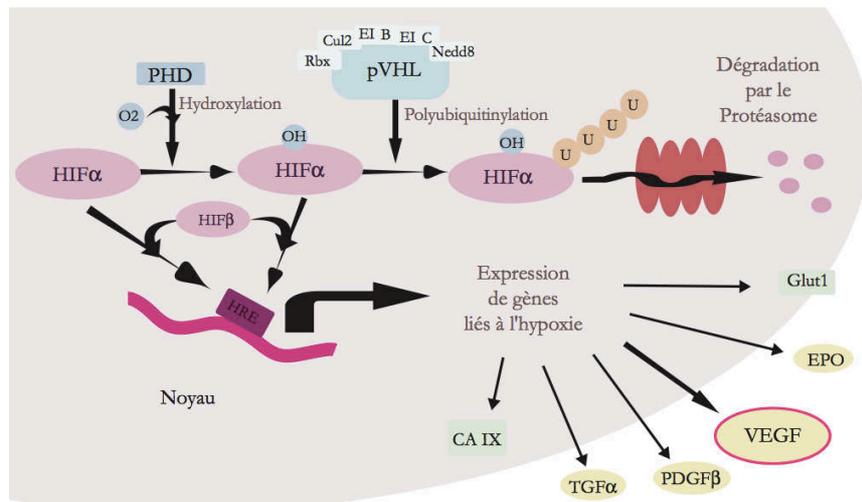


Figure 2.2 : Voie VHL/HIF/VEGF. En présence d'oxygène, la prolylhydroxylase (PHD) réalise l'hydroxylation de HIF. Une fois hydroxylé, HIF $\alpha$  peut être polyubiquitinylé par le complexe polyenzymatique formé autour de la pVHL (protéine du gène *von Hippel-Lindau tumor suppressor*), et être ensuite dégradé par le protéasome. En cas d'hypoxie ou d'inactivation de VHL, HIF $\alpha$  va se lier à HIF $\beta$ , être transloqué dans le noyau entraînant une surexpression de nombreux gènes liés à l'hypoxie en interagissant avec des domaines HRE (*hypoxia responsive elements*) que contiennent les promoteurs de ces gènes. Ces gènes-cibles comprennent notamment le VEGF, le PDGF $\beta$ , le TGF $\alpha$ , le CA IX, l'EPO et le Glut1. D'après Edéline (2010).

D'ailleurs, il a été montré que les facteurs de croissance (IGF1, IGF2) sont capables d'activer l'expression du VEGF par l'intermédiaire de HIF-1 $\alpha$  (Feldser, 1999). Notamment, il a été prouvé que l'IGF2 a un rôle important dans l'angiogénèse quand ce facteur était ajouté dans des cellules endothéliales de vaisseaux utérins humains en culture (Herr, 2003). Il semble que cet effet soit médié par son récepteur IGF2-R.

Dans le contexte de ce travail sur le RCIU, nous n'abordons pas le rôle évident des autres facteurs tels que des oncogènes, ou hormones (œstrogènes) dans la régulation du VEGF.

Les récepteurs pour les ligands de la famille VEGF sont VEGFR-1 (*FMS-like tyrosine kinase, Flt1*), VEGFR-2 (*kinase insert domain receptor, KDR*), et VEGFR-3 (*Flt4*).

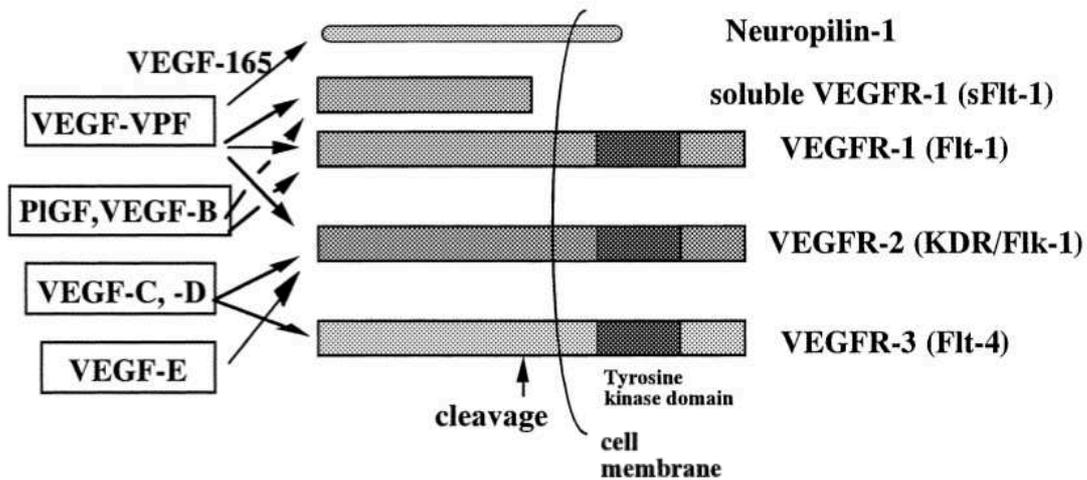


Figure 2.3 : VEGF et son système de récepteurs. D'après Shibuya (2001)

Pour exercer son rôle important dans la croissance des cellules endothéliales ainsi que la vasculo-angiogénèse au sein des villosités, le VEGF se lie aux deux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Il existe un autre membre de la même famille, le PlGF (*Placenta growth factor*) qui est également secrété au cours du développement placentaire, et qui se fixe exclusivement au VEGFR-1 pour l'activer.

Le récepteur VEGFR-1 a un rôle de modulateur positif dans le bourgeonnement de néo-vaisseaux et l'apparition de ramifications vasculaires (l'angiogénèse arborescente, celle qui est dominante au sein des villosités placentaires pendant la première moitié de la gestation) (Kaufmann, 2004). Ce processus est régulé par liaison du VEGF à son récepteur VEGFR-1. Il est important de noter que VEGFR-1 a une variante soluble (sVEGFR-1 ou sFlt-1), qui ne possède pas le domaine tyrosine kinase. Dans les conditions physiologiques, une stimulation *in vitro* de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (*human umbilical vein endothelial cells-HUVEC*) par le VEGF induit une augmentation significative de la transcription de l'ARNm de sFlt-1 (Ahmad, 2011). Ces auteurs ont proposé que l'expression de ce variant au niveau trophoblastique serait gouverné par le VEGF par un mécanisme autocrine de régulation afin de contrôler *per se* l'angiogénèse. Le dosage de ce récepteur circulant dans le sang maternel donne des résultats d'une grande hétérogénéité selon les kits d'immuno-dosage, ce qui explique que la valeur ne soit pas transposable d'un kit de

dosage à un autre. Cependant, la cinétique d'évolution de sFlt-1 est assez homogène dans les grossesses à l'issue normale (Romero, 2008). Le rôle de cette forme circulante dans un contexte pathologique sera abordé plus loin.

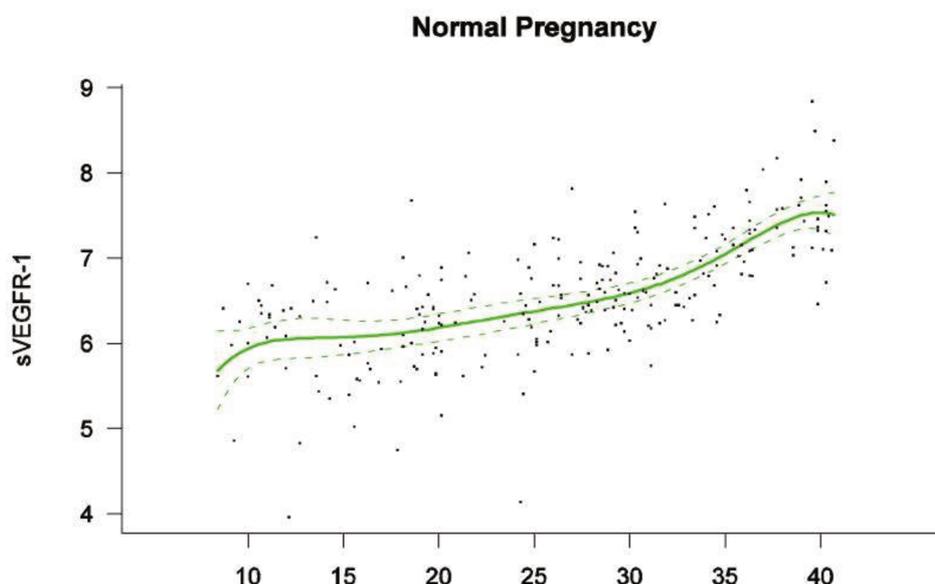


Figure 2.4 : Evolution de la concentration plasmatique du sVEGFR-1 (sFlt-1) (l'échelle verticale est en  $\log(1+sVEGFR-1)$ ) dosée chez la femme enceinte au cours d'une grossesse normale. L'échelle horizontale représente les semaines d'aménorrhée. D'après Romero (2008).

La pression partielle intra-placentaire en oxygène est faible lors des premiers stades de développement placentaire où les villosités se forment dans un environnement physiologiquement « hypoxique » (Jauniaux, 2003). Effectivement, ce stade d'hypoxie relative est indispensable à un développement optimal de l'unité fœto-placentaire dans laquelle les trophoblastes n'exprime pas encore de réserve suffisante en enzymes anti-oxydantes. Cette propriété physiologique a été confirmée récemment par l'étude de Cindrova-Davies (2015). Il a décrit qu'au cours du développement précoce de l'embryon humain, aucune trace de stress hypoxique n'est visible et la voie de signalisation de HIF dans les villosités choriales n'est pas activée. Par ailleurs, la stabilisation du HIF va conduire à une augmentation des ARNm du VEGF, avec en revanche, une diminution parallèle des ARNm du PlGF (Khaliq, 1999a).

Le PlGF est un polypeptide de la même famille que le VEGF. Il est reconnu comme un facteur d'angiogénèse puissant mais plus spécifique du placenta (Khaliq, 1999b), bien qu'il soit exprimé dans d'autres tissus comme la rétine, les tumeurs rénales... Dans le placenta humain, il se trouve exprimé dans les villosités tropho-

blastiques et l'endothélium vasculaire. Le PlGF se lie avec une affinité plus faible au récepteur VEGFR-1, en comparaison avec le VEGF, mais le PlGF est sécrété de façon croissante au cours de la grossesse sous l'effet de l'élévation de la pression partielle en oxygène (Ahmed, 2000). Osol (2008) a montré que ce facteur a une activité vasodilatatrice effective, en particulier sur les artères utérines. Cette activité est médiée seulement par l'intermédiaire du VEGFR-1 dont la production est augmentée significativement pendant la gestation. Au cours de la gestation, la sécrétion du VEGF diminue progressivement, parallèlement à un accroissement du PlGF. L'étude des explants placentaires humains nous montre que l'expression du PlGF est régulée par la pression partielle élevée en oxygène (Khaliq, 1999a), et elle augmente par conséquent progressivement au cours de la grossesse. Le relais entre le VEGF et PlGF au cours de la grossesse s'adapte probablement à l'évolution progressive de la pression partielle en oxygène, qui est elle-même le résultat de l'efficacité du remodelage des artères spiralées déciduales. En plus la synergie entre PlGF et VEGF (Autiero, 2003) ciblant le récepteur VEGFR-1 stimule l'angiogénèse non-arborescente (les capillaires villositaires s'allongent sans se ramifier), la formation des villosités tertiaires, réduisant ainsi la distance entre la circulation capillaire fœtale et le sang maternel intervillitaire, à côté d'un amincissement de la couche trophoblastique. Cette évolution joue un rôle important pour un échange maximal par diffusion, en particulier au troisième trimestre où la demande en énergie et en oxygène du fœtus devient maximale (Burton, 2009a).

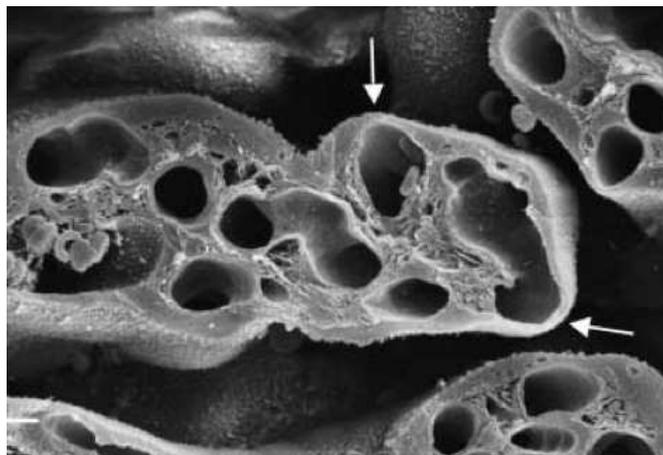


Figure 2.5 : Image au microscope électronique d'une villosité terminale. La vascularité est élevée et le capillaire s'approche de la membrane villoseuse (flèche). D'après Burton (2009a)

La cinétique des concentrations sanguines (sérique ou plasmatique) du PIGF chez la femme enceinte varie en fonction de la méthode de dosage utilisée, mais la concentration s'élève progressivement, puis diminue à la fin du 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse (Han, 2016; Levine, 2004; Romero, 2008).

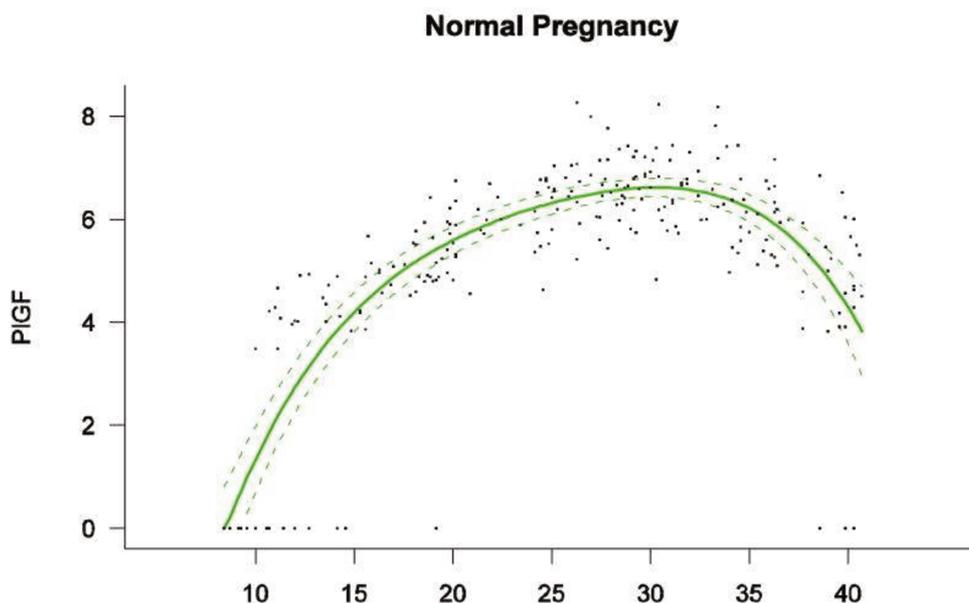


Figure 2.6 : Concentration plasmatique du PIGF (l'échelle verticale est en  $\log(1+PIGF)$ ) dosée chez la femme enceinte au cours d'une grossesse normale. L'échelle horizontale représente les semaines d'aménorrhée. D'après Romero (2008).

Choi (2005) a confirmé sur le placenta de rat le même profil d'expression (de l'ARNm) que chez l'humain, l'augmentation du PIGF étant concomitante avec la phase de croissance exponentielle du fœtus.

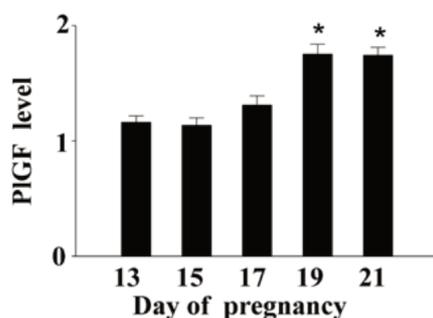


Figure 2.7 : Analyse par RT-PCR de l'expression du PIGF, la concentration des ARNm étant normalisée par rapport à celle de l'actine (unités arbitraires). (\*)  $p < 0,05$  (vs control). D'après Choi (2005).

L'intégrité de la membrane trophoblastique et du réseau capillaire placentaire, gouvernés par des facteurs de croissance et d'angiogénèse, détermine la surface d'échange ainsi que l'épaisseur de la barrière fœto-maternelle. Il s'agit donc de

composantes essentielles, avec les transporteurs membranaires, pour un transport placentaire optimal des nutriments.

### 2.1.3. Transporteurs placentaires

A côté de la diffusion (simple ou facilitée), le transfert des nutriments de la circulation maternelle vers le compartiment fœtal est assuré par un grand nombre de systèmes transporteurs (Lager, 2012). Il faut bien noter que la concentration des nutriments dans la circulation maternelle peut être altérée par la dénutrition/malnutrition, et détermine également le gradient de concentration des nutriments entre sang maternel et sang fœtal, et donc l'efficacité du transfert placentaire.

Les acides aminés jouent un rôle capital pour la croissance fœtale, non seulement comme « briques de construction » des protéines fœtales, mais aussi comme carburants (van den Akker, 2011). La concentration de la plupart des acides aminés est plus élevée dans le sang fœtal que dans le sang maternel, ce qui démontre l'existence d'un transport actif. Le placenta régule le transport des acides aminés, par l'intermédiaire d'un ensemble de transporteurs localisés au niveau des membranes trophoblastiques. La famille des transporteurs de Système A (*sodium-coupled neutral amino acid transporter*-SNAT1, SNAT2 et SNAT4) prend en charge le transport des acides aminés neutres qui sont cruciaux pour le développement et la croissance tant fœtale que placentaire (Jones, 2007). Chez le rat, il a été démontré qu'une diminution de l'expression des SNAT placentaires précède le ralentissement de la croissance fœtale dans le modèle de RCIU induit par restriction du régime maternel en protéines (Jansson, 2006), et l'auteur a proposé que cette réduction du transport serait donc plutôt la cause que la conséquence du RCIU. De plus, la même équipe a rapporté précédemment que l'activité de ce système est diminuée dans le placenta des RCIU humains (Jansson, 2002). Fait intéressant, l'IGF2 est impliqué dans la signalisation régulatrice de l'expression des gènes codant pour ces transporteurs. Il est démontré que ce processus fait partie de l'adaptation placentaire dans l'équilibre du flux des nutriments entre mère et fœtus (Constancia, 2005).

Pour assurer le transport des autres nutriments, il existe évidemment d'autres transporteurs, tels que des GLUT (*glucose transporter*) pour le glucose, ou des FATP (*fatty acid transport protein*) pour les acides gras (Lager and Powell, 2012).

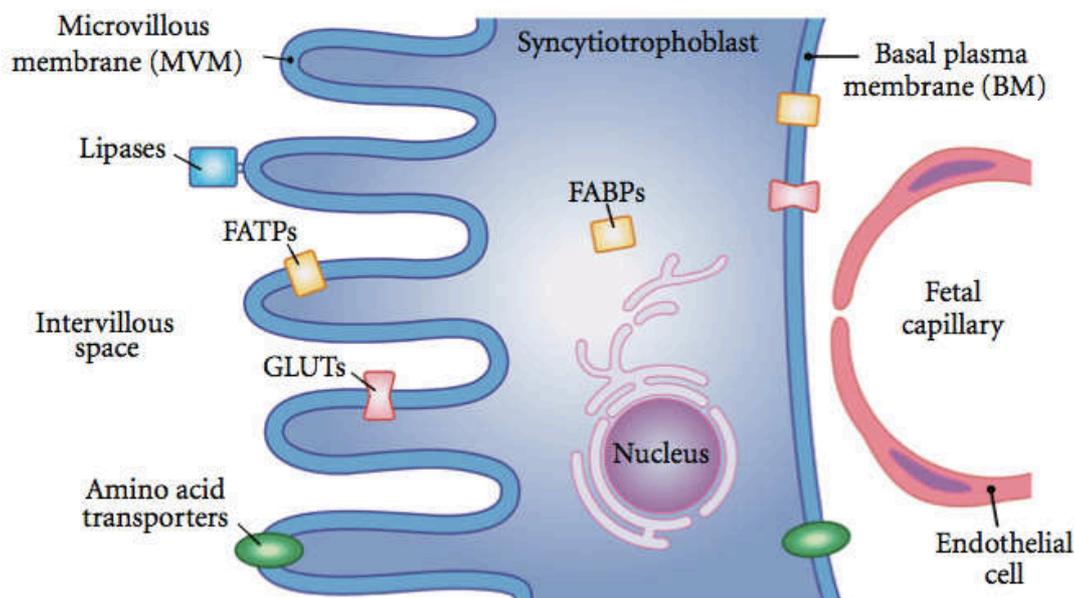


Figure 2.8 : Barrière materno-fœtale chez l'humain avec une couche syncytiotrophoblastique et une couche cytotrophoblastique. D'après Lager et Powell (2012).

## 2.2. Quelle est la pertinence de l'utilisation d'un modèle d'expérimentation animale pour le RCIU humain ?

### 2.2.1. Intérêt de l'espèce animale utilisée :

Bien que la durée de la gestation (21 jours), et le nombre de nouveau-nés par portée soient très différents entre le rat et l'espèce humaine, le choix du rat comme animal d'expérience est motivé, en partie, par les caractéristiques du placenta des rats qui, comme chez l'ensemble des rongeurs, est du type hémochorial, c'est-à-dire que le sang maternel est directement en contact avec la barrière fœto-placentaire dont les cellules ont une origine exclusivement fœtale. Cette caractéristique est partagée par le placenta humain.

Chez le rat, le placenta est divisé en plusieurs zones bien distinctes. On distingue:

- La décidue

Elle contient les leucocytes maternels. Les cellules endométriales sont alors transformées en cellules stromales déciduales. La décidue contient les artères spiralées qui acheminent au placenta le sang maternel.

- La zone de jonction : JZ

Elle est composée des cellules géantes trophoblastiques (*Trophoblast giant cells*-TGC), des cellules à glycogène (*Glycogen trophoblast cells*-GTC) et des spongiotrophoblastes. La zone jonctionnelle est impliquée dans les fonctions endocrines et invasives du placenta (TGC et GTC), et a aussi un rôle structurel (de soutien pour le labyrinthe) (Simmons, 2005). Le nombre de cellules spongiotrophoblastiques s'accroît surtout entre GD12,5 et GD16,5 chez la souris (GD14 à GD17,5 chez le rat) pour diminuer ensuite progressivement jusqu'au terme (Watson, 2005).

En fin de gestation, des cellules trophoblastiques à glycogène se différencient dans le spongiotrophoblaste pour migrer par la suite dans le mur utérin (Adamson, 2002). Le rôle de ces cellules reste à définir. Une des hypothèses serait la libération du glucose dans le sang maternel qui irrigue le labyrinthe à la fin de la gestation, permettant ainsi d'assurer les besoins fœtaux durant cette période de forte croissance (Coan, 2006).

- La zone labyrinthique (ou labyrinthe) : LZ

Le labyrinthe est la zone d'échange de nutriments et de gaz entre les capillaires fœtaux et le sinus sanguin maternel. La zone labyrinthique forme donc une barrière majeure dans le contrôle du transfert des nutriments. Trois couches de trophoblastes composent la zone labyrinthique, d'où la classification de placenta hémotrichorial :

- une couche à l'interface maternelle (ou cytotrophoblaste), cellulaire, avec la présence de microvillosités à la surface.
- deux couches de cellules (ou syncytiotrophoblaste) dont les fonctions principales sont la régulation du transfert de nutriments et les échanges au travers du placenta.

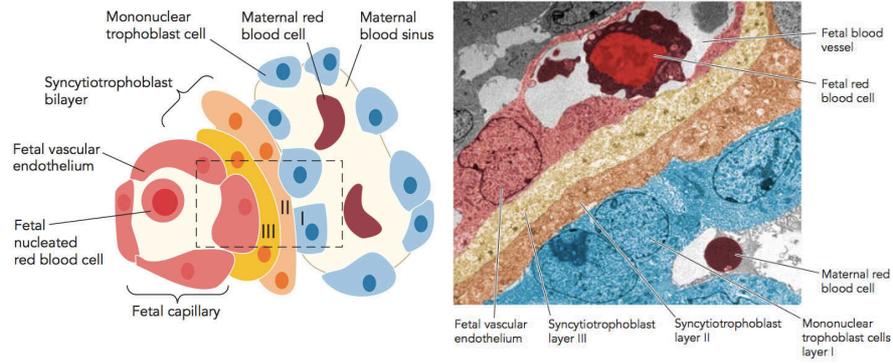


Figure 2.9 : Barrière fœto-maternelle trilaminaire : image schématique (à gauche) et cliché au microscope électronique (à droite). D'après Watson et Cross (2005).

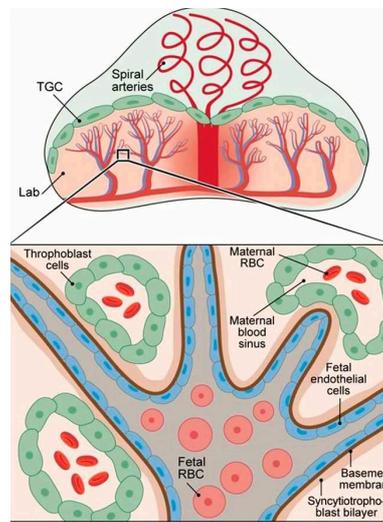


Figure 2.10 : Schéma de la circulation intra-placentaire chez le rat. Le compartiment fœtal est entouré par l'endothélium et la membrane trophoblastique fœtale. Les capillaires fœtaux baignent dans le sinus sanguin maternel bordé par les trophoblastes, et qui contient les hématies maternelles (RBC).

TGC : cellules géantes trophoblastiques, Lab : labyrinthe. D'après Solomon (2014).

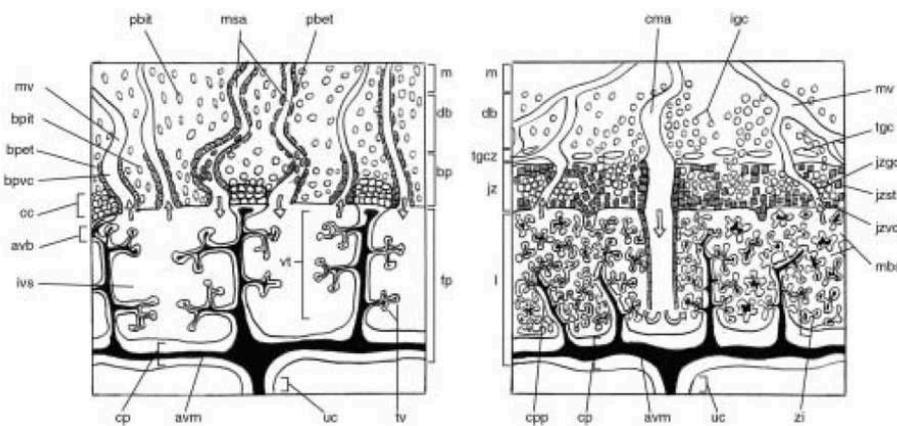


Figure 2.11 : Comparaison entre la circulation placentaire de l'humain à gauche (troisième trimestre) et de rat à droite (5 derniers jours de la gestation). D'après Georgiades (2002).

### 2.2.2. Quelle est la pertinence d'un modèle animal expérimental pour l'étude du placenta dans le RCIU humain ?

Pourquoi choisir un modèle nutritionnel de RCIU ? Une masse de données expérimentales de la littérature souligne l'importance de la nutrition maternelle au cours de la gestation pour la croissance fœtale, dès la période péri-conceptionnelle et jusqu'à la phase de croissance exponentielle du fœtus dans le 3<sup>ème</sup> tiers de la gestation. Malgré la réduction de la faim dans le monde, la prévalence de la dénutrition maternelle reste élevée dans de vastes territoires des pays en voie de développement et des pays émergents, et le RCIU d'origine nutritionnelle reste hélas fréquent. D'autre part on suspecte que la dénutrition/malnutrition pourrait avoir des conséquences dans la trajectoire développementale chez la descendance, plusieurs générations plus tard. Enfin, la plupart des pays émergents sont aux prises avec la transition nutritionnelle, au cours de laquelle des populations autrefois dénutries, sont exposées à un type d'alimentation sur-abondante de type occidental, ce qui accroît la prévalence de l'obésité. On a ainsi pu parler du « double fardeau » (dénutrition + obésité) qui aggrave encore la charge à long terme pour le système de santé de nombreux pays en développement.

Le modèle expérimental de restriction protéique maternelle est utilisé depuis longtemps pour générer une altération de la croissance fœtale (Levy, 1993) et, en conséquence, les mécanismes impliqués dans l'adaptation compensatrice du placenta sont étudiés depuis longtemps. L'impact de la dénutrition/malnutrition maternelle sur la croissance fœtale se fait par l'intermédiaire de son effet sur le placenta, au moins sur sa taille. Des modifications du développement placentaire touchant la vascularisation, la fonction endocrine, et le transport des nutriments sont progressivement mises en évidence.

La littérature indique également que le placenta est sensible à une restriction maternelle lors de la première moitié de la gestation, période de croissance rapide du placenta. L'étude de la famine Hollandaise de 1944-1945 a montré qu'une nutrition maternelle compromise durant le premier trimestre de la grossesse augmentait le poids du placenta à la naissance, sans pour autant modifier le poids de naissance de l'enfant (Lumey, 1998). Ce résultat sug-

gère que le placenta est capable, pendant cette période clé de son développement, de s'adapter à un environnement pauvre en nutriments afin d'assurer ultérieurement au mieux la croissance du fœtus. Chez des rates gestantes, la restriction en protéines du régime maternel produit des effets variables selon le niveau de restriction (Levy and Jackson, 1993). Par rapport au régime témoin contenant 18% de protéines, le poids du placenta n'était pas différent pour la restriction à 12%, mais était significativement augmenté avec le régime à 9% de protéines, et montrait une diminution significative dans le cas du régime à 6%. Avec une restriction très sévère (4%) et précoce (dès le 2<sup>ème</sup> jour de gestation, GD2) chez des rates gestantes, Jansson (2006) a caractérisé le profil de la croissance placentofœtale au fil de la gestation : le poids du fœtus et du placenta n'arrête de s'accroître qu'à la fin, au GD21. De plus, cette équipe a démontré que l'altération du transport placentaire des acides aminés précède l'arrêt de la croissance fœtale. Dans une étude plus récente, Strakovsky (2010) a trouvé que des rates Sprague-Dawley soumises à un régime à 9% de protéines donnaient naissance à des rats de poids identique aux rates sous le régime standard (18%), mais la voie de signalisation mTOR du placenta était pourtant activée chez les rates mises au régime à 9%. Cette stimulation est interprétée comme un signal destiné à favoriser chez le fœtus, une réponse adaptée à son environnement prévisible. Ainsi, l'effet sur le placenta était plus évident que l'effet sur la croissance pondérale du fœtus, d'autant plus que cet effet varie selon la souche de rats, et serait moins net chez les Sprague-Dawley que chez les Wistars. Pour être sûrs d'induire à la fois des modifications significatives du placenta et un RCIU sévère, reflétant le tableau clinique le plus difficile pour la prise en charge obstétricale, nous avons choisi un modèle de rate Sprague-Dawley gestante avec une restriction protéique précoce (dès GD2) et sévère en protéines (4%).

La seule mesure du poids absolu du placenta est en fait un mauvais indicateur de la fonction placentaire. D'autres analyses sont donc plus intéressantes et l'histo-morphologie placentaire montre une réduction significative de longueur des vaisseaux dans la zone labyrinthique (Rutland, 2007). Une augmentation de l'apoptose est trouvée dans des zones placentaires comme la

zone jonctionnelle et le labyrinthe dans le cadre d'une dénutrition calorique maternelle chez la rate (Belkacemi, 2009; Belkacemi, 2011). Cette incidence est comparable dans la dysfonction placentaire aboutissant à des RCIU humain (Levy, 2002). Il est très intéressant de noter que Gonzalez (2016) a réussi sur un modèle de souris sous restriction protéique à reproduire l'effet de préservation de la taille cérébrale observé chez les RCIU humains : le pôle céphalique est réduit mais plus ou moins préservé, associé à une restriction plus prononcée du reste du corps et coexistence avec des anomalies morphologiques et fonctionnelles du placenta.

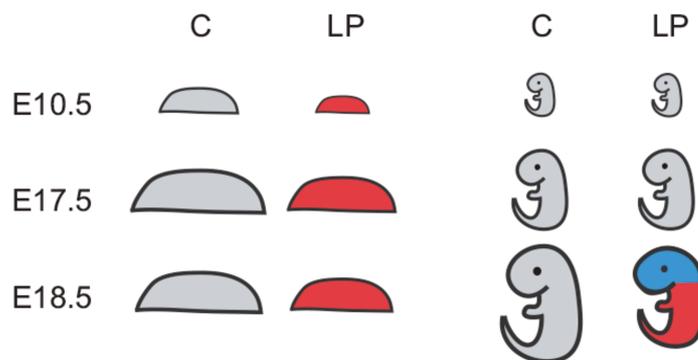


Figure 2.12 : Résumé schématique des effets du régime de restriction en protéines sur le placenta, le poids du fœtus, et la taille de la tête. Groupe C-contrôle ; Groupe LP-low protein ; couleur rouge : réduction significative de poids par rapport au contrôle, couleur bleue : taille du crâne et du cerveau diminuée considérablement vs. des animaux contrôles de même âge. D'après Gonzalez (2016).

Certaines altérations observées sur le placenta dans le modèle de RCIU obtenu chez le rat par manipulation du régime maternel, sont proches de celles observées dans le RCIU humain. Chez des rates gestantes subissant une réduction de 50% de leurs apports en calories Rosso (1980) a montré une réduction marquée du flux sanguin vers les ovaires et le placenta. La dénutrition maternelle a réduit également le débit sanguin placentaire chez la brebis gestante (Hawkins, 2000). Le défaut de vasodilatation des artères utérines observé chez la rate gestante en restriction protéique (Itoh, 2002) rappelle celui observé dans le RCIU d'origine vasculaire dans les pays développés. En outre, comme évoqué plus haut, une altération du transport placentaire des acides aminés précède le ralentissement de la croissance fœtale dans le RCIU induit par restriction protéique (Jansson, 2006), ce qui suggère que la réduction du

transport est la cause, plutôt que la conséquence du RCIU. Or des altérations du transport des acides aminés ont été établies dans le RCIU humain d'origine vasculaire (Paolini, 2001; Shibata, 2008). Par ailleurs, le tableau clinique des grossesses multiples avec une compétition entre jumeaux pour les nutriments pourrait être comparable au modèle animal de restriction maternelle (Bajoria, 2001).

Enfin, Rebelato (2013) a observé que son modèle de restriction précoce (GD1) en protéines (6%) altère la morphologie placentaire et la fonction mitochondriale chez la rate gestante. Cette dernière caractéristique, combinée avec l'apoptose élevée (Belkacemi, 2010), suggère que la restriction protéique induit un stress du placenta.

### 2.3. Où en est-on dans la connaissance des adaptations placentaires au cours d'une grossesse avec retard de croissance du fœtus ?

Nous pouvons classer globalement les adaptations placentaires en deux types principaux : morphologiques (des altérations de la vascularisation placentaire, de l'intégrité de la barrière trophoblastique) et fonctionnelles (des modifications de l'abondance et l'activité des transporteurs de nutriments ou de l'activité endocrinienne). Dans les deux types, des facteurs de transcription, ainsi que les facteurs régulateurs de la voie de signalisation sont impliqués. Deux processus sont particulièrement impliqués dans les placentas pathologiques humains : le stress placentaire et l'angiogénèse placentaire.

#### 2.3.1. Le stress localisé au placenta : Stress oxydant et stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un lieu essentiel de synthèse et de maturation des protéines de la membrane plasmique, des organites intracellulaires et des protéines sécrétées par la cellule. Le repliement de ces protéines pour la maturation requiert la participation de protéines résidentes du réticulum endoplasmique, les chaperons. En cas de défaut de conformation, la protéine est transportée vers le cytoplasme pour être dégradée par le protéasome ERAD (*endoplasmic reticulum-associated degradation*). Dans certaines conditions cellulaires, la quantité de protéines de conformation anormale dans le ré-

ticulum endoplasmique augmente si fortement que cela sature l'équipement cellulaire en chaperons et en protéines de dégradation ; les protéines incorrectes ont alors tendance à s'accumuler, plaçant les cellules dans une situation de « stress du réticulum endoplasmique ».

Le repliement des protéines est un processus oxydant qui génère des espèces réactives oxygénées ou radicaux oxygénés libres (ROL). Les ROL peuvent cibler les protéines chaperonnes et les canaux ioniques calciques du RE, ce qui conduit au relargage de calcium du RE vers le cytoplasme et induit des voies de signalisation de stress. Il en résulte un stress oxydant avec accumulation de ROL du fait d'un stress de RE prolongé.

Dans les placentas issus de grossesses associées à une pré-éclampsie (PE) et/ou un RCIU, il existe des preuves d'une altération de la synthèse protéique placentaire. Cela peut être secondaire à un stress du RE qui est observé dans des placentas d'un RCIU normotensif, ou associé à un stress oxydant dans des placentas compliqués de PE (Burton, 2009c). Le stress du RE est trouvé aussi au niveau de l'interface déciduale des grossesses compliquées par le RCIU, qu'il soit ou non accompagné de PE (Lian, 2011).

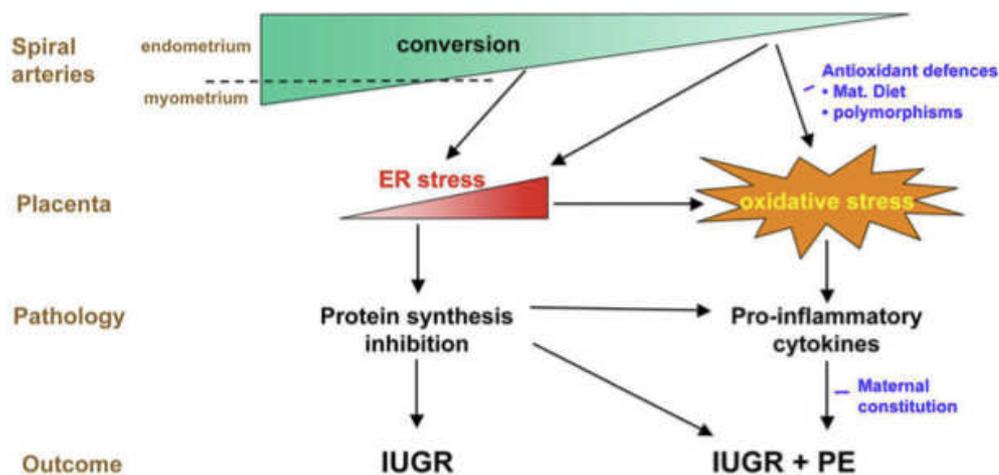


Figure 2.13 : Schéma illustrant la contribution potentielle du stress du RE et du stress oxydant placentaire à la pathophysiologie du RCIU isolé et du RCIU associé à la PE. L'auteur propose que la pathologie est principalement liée au stress du RE dans le RCIU isolé, avec des réponses homéostatiques, en particulier une inhibition de la synthèse protéique, qui serait responsable de la petite taille de placenta. Lorsque des anomalies vasculaires maternelles sont plus sévères, le stress oxydant placentaire pourrait être surajouté, provoquant la libération supplémentaire d'un ensemble de facteurs pro-inflammatoires qui conduisent aux manifestations périphériques de la PE. D'après Burton (2009c).

Effectivement, la littérature nous apporte de plus en plus de preuves d'une diminution de la concentration des antioxydants (non-enzymatiques et enzymatiques) dans le sang maternel et le placenta des RCIU (Cohen, 2015). Yung (2014; 2012) a montré que le stress du RE placentaire pourrait contribuer à la physiopathologie de la PE précoce et des RCIU liés à l'altitude, mais serait peu impliqué dans la PE d'apparition tardive dans laquelle une altération de croissance fœtale est plus rare. Dans une étude prospective, Hsieh (2012) a montré que la concentration plasmatique et urinaire de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), marqueur des lésions oxydatives de l'ADN, est élevée dès 24-28 SA dans les grossesses où se développe ensuite un RCIU et/ou PE.

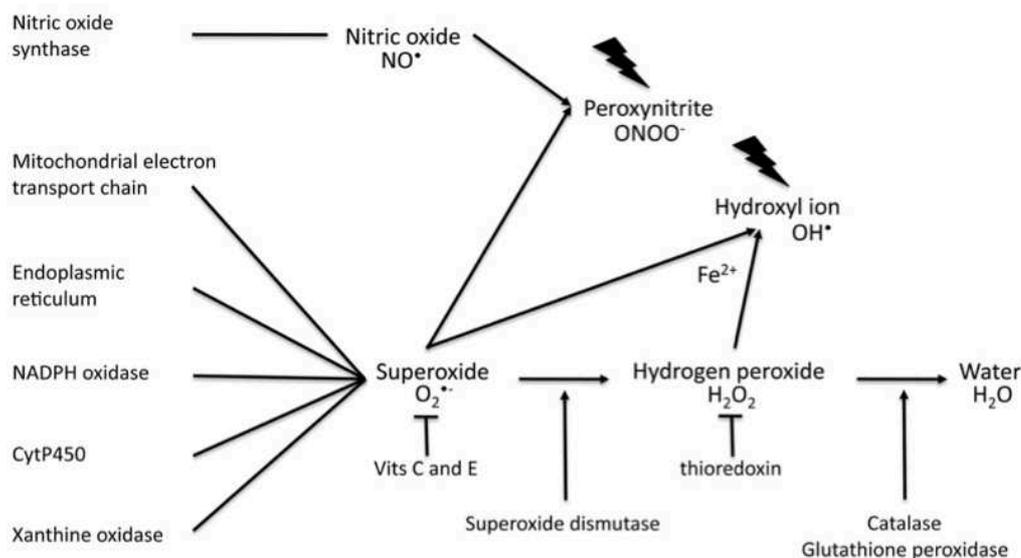


Figure 2.14 : Représentation diagrammatique de la détoxification principale des ROS. Un excès de production des superoxydes pourrait entraîner la formation élevée d'anion d'hydroxyl (qui est le plus dangereux des radicaux libres). Par ailleurs, le superoxyde réagirait avec le monoxyde d'azote pour former du peroxynitrite, qui a une forte activité pro-oxydante. Cette combinaison se produit parfois avec une vitesse dix fois plus rapide que l'association entre le superoxyde et la superoxyde-dismutase (SOD), l'une des principales enzymes anti-oxydantes. D'après Burton (2011).

Le stress du RE et le stress oxydant stimulent progressivement la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, de différents facteurs angiogéniques et de transporteurs placentaires, ce qui pourrait expliquer des modifications

morphologiques et fonctionnelles du placenta et par conséquent une altération de la croissance fœtale (Kawakami, 2014; Yung, 2014; Yung, 2008).

### 2.3.2. Voie de l'angiogénèse en situation de grossesse pathologique d'origine placentaire :

Sur des explants de placentas issus de grossesses avec PE ou RCIU, Ahmad (2004) a montré que l'axe VEGF/PlGF placentaire est dérégulé. La sécrétion du récepteur soluble sVEGFR-1 dosée dans le milieu de culture des explants de placentas PE et RCIU était élevée, en particulier dans le cas des PE, ce qui explique une réduction du ratio de concentrations des facteurs pro-angiogéniques par rapport aux facteurs anti-angiogéniques. En plus, le rapport VEGF/PlGF était augmenté dans le placenta en fin de grossesse en cas de PE ou RCIU.

Un grand nombre d'études a montré que, à l'inverse du VEGFR-2, le VEGFR-1 (et son ligand VEGF) est régulé et augmenté par l'hypoxie. Cet effet est médié par la liaison du HIF-1 $\alpha$  sur l'élément de réponse à l'hypoxie du promoteur du gène Flt-1 (Gerber, 1997). Helske (2001) a trouvé que seule l'expression du VEGFR-1, mais pas celle des autres récepteurs, était induite dans les syncytiotrophoblastes des placentas prélevés sur des patientes avec une PE sévère associée au RCIU, en comparaison avec des placentas normaux. Cette modification était associée à une diminution significative de la concentration sanguine du PlGF chez ces patientes. Barut (2010) a observé une expression placentaire accrue du VEGF et de eNOS qui pourrait être secondaire à une perfusion utéro-placentaire insuffisante. Ces données sont compatibles avec l'hypothèse d'un RCIU d'« hypoxie placentaire ». Le même profil est observé dans des grossesses pré-éclamptiques, comme l'a montré Rath (2014) : le HIF-1 $\alpha$  placentaire est exprimé significativement, alors qu'inversement une diminution du PlGF est observée. Le sVEGFR-1 (sFlt-1) est sécrété par la membrane syncytiotrophoblastique de façon accrue dans des conditions de stress (Nevo, 2006), parallèlement avec l'activation du VEGF (dans un environnement d'hypoxie) et le sFlt-1 est impliqué dans les manifestations cliniques de la PE chez la mère. Dans la circulation maternelle, la liaison d'affinité forte entre le

sFlt-1 circulant et le VEGF/PlGF maternel, réduirait la biodisponibilité du VEGF, donc l'effet du VEGF au niveau du réseau endothélial maternel, ce qui expliquerait le cortège de pathologies endothéliales systémiques de la PE. De plus, ce récepteur soluble est capable de former un hétéro-dimère avec Flt1 transmembranaire et donc de supprimer totalement la signalisation en aval (Charnock-Jones, 2015).

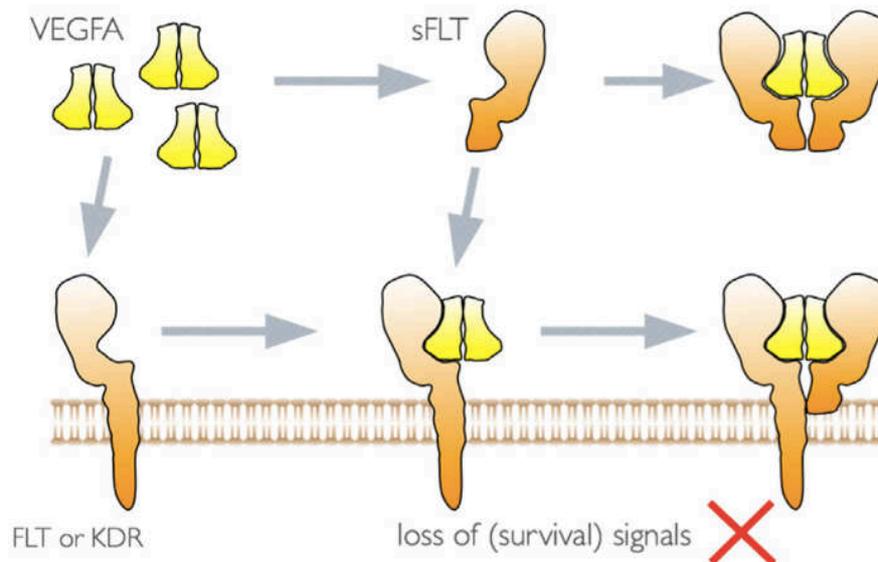
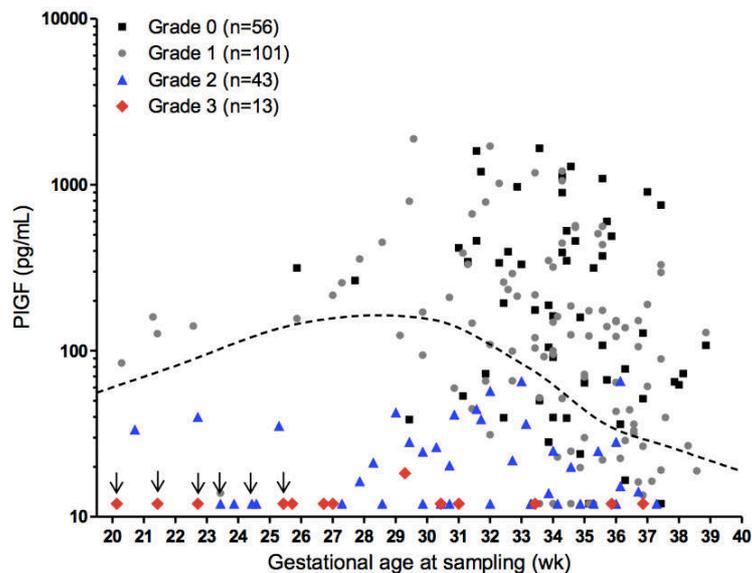


Figure 2.15 : Schéma de l'action inhibitrice du sFlt-1 sur la voie VEGF. D'après Charnock-Jones (2015)

Cependant, Rajakumar (2007) a observé que des placentas recueillis de femmes normotendues ayant accouché à terme ( $\geq 37$  SA) de nouveau-nés RCIU, ne montraient pas la même tendance, VEGFR-1 et sVEGFR-1 y étant exprimés de façon comparable aux placentas normaux. L'augmentation d'expression du HIF-1 $\alpha$  et de VEGFR-1 n'était retrouvée que dans le groupe des PE. Ces résultats sont concordants avec l'étude de Shibata (2005). Ces données suggèrent une capacité diminuée d'extraction de l'oxygène des villosités, l'hypothèse « hyperoxie placentaire » (Khaliq, 1999a; Kingdom, 2000). Il existe une forme plus tardive de RCIU, à l'apparition retardée (*late-onset*), où l'adaptation de l'angiogénèse intravilleuse se déroule normalement dans un premier temps (et par conséquent, il ne se produit ni une PE ni un RCIU précoce), mais où le placenta n'atteint ses limites fonctionnelles qu'à la fin de sa durée de vie. La PE avec manifestations retardées après 34 SA semble relever de ce mécanisme, selon l'étude de Sgambati (2004), où des placentas pré-

éclampsiques ont été prélevés par césarienne à 35-38 SA. Cet auteur n'a trouvé effectivement aucune élévation du niveau d'expression de l'ARNm de VEGF, parallèlement avec des données très hétérogènes d'expression en immunohistochimie placentaire entre les différents groupes (PE, PE avec HELLP (*hemolysis, elevated liver enzyme levels, and low platelet levels*) ou hypertension gestationnelle). Récemment, l'augmentation du sFlt-1 a aussi été suspectée d'être responsable de la faible disponibilité en PlGF, vu que l'affinité du sFlt-1 circulant pour le PlGF est forte. Effectivement, dans une cohorte de fœtus soupçonnés de PAG à l'échographie anténatale (sans coexistence d'une hypertension artérielle), le dosage du PlGF entre 20 et 41 SA paraît discriminant pour confirmer une perturbation pathologique de la croissance fœtale (combinée avec la recherche d'anomalies histo-pathologiques du placenta), et la distinguer d'une simple petite taille constitutionnelle (Benton, 2016).



- Grade 0 : pas de pathologie placentaire
- Grade 1 : pathologie avec lésions légères
- Grade 2 : pathologie avec lésions modérées
- Grade 3 : sévère pathologie du placenta

Figure 2.16 : Répartition des anomalies placentaires en fonction de la concentration de PlGF maternel. La courbe pointillée représente le 5<sup>ème</sup> percentile de la concentration du PlGF dans le plasma maternel. D'après Benton (2016).

Les résultats observés dans des modèles d'expérimentation animale pourraient aider à comprendre la mécanistique du RCIU puisque des manipula-

tions induites par l'expérimentateur sont directement en cause. L'ischémie du placenta secondaire à une ligature expérimentale des artères utérines chez la rate gestante (dès le milieu de la gestation) entraîne une augmentation de la pression artérielle, de la concentration plasmatique du sFlt-1, et inversement une diminution de la concentration plasmatique de PlGF et VEGF (Gilbert, 2007). Néanmoins, chez des rates gestantes nourries par un régime à 8% de protéines (contre 20% pour les régimes standards) la naissance des ratons RCIU s'accompagne d'une réduction de l'expression placentaire du VEGF sans modification d'expression des récepteurs (Liu, 2014). Précédemment, Itoh (2002) avait montré que des artères utérines prélevées sur des rates nourries par un régime hypo-protéique réagissaient moins bien au VEGF exogène dont l'action vasodilatatrice était moins significative. Le VEGF est connu comme un facteur vasodilatateur par son interaction avec le monoxyde d'azote (NO). Une réduction de la production de NO pourrait être une explication. Au total, la liaison du sFlt-1 au PlGF joue très vraisemblablement un rôle causal dans les manifestations de pathologie endothéliale (Bates, 2011).

Récemment, Pereira (2014) a montré que le stress du RE renforce l'activité du HIF-1 $\alpha$  par la transactivation du VEGF. Le VEGF est transcrit de façon plus intense quand les deux voies sont activées que lorsqu'un seul stress (stress du RE ou hypoxie) est présent. De même, le HIF-1 alpha est régulé, que la situation soit hypoxique ou normoxique, par des ROL (Movafagh, 2015), et l'élévation de l'expression de cette protéine est évidemment impliquée dans la régulation de la voie du VEGF. Mizuuchi (2016) a apporté des arguments en faveur du rôle pathologique du stress de RE en confirmant que la réponse des trophoblastes au stress conduit à une diminution de l'expression placentaire de PlGF. Burton (2016) a résumé l'évolution de la concentration de ces différents facteurs au cours de la croissance fœtale dans le schéma ci-dessous.

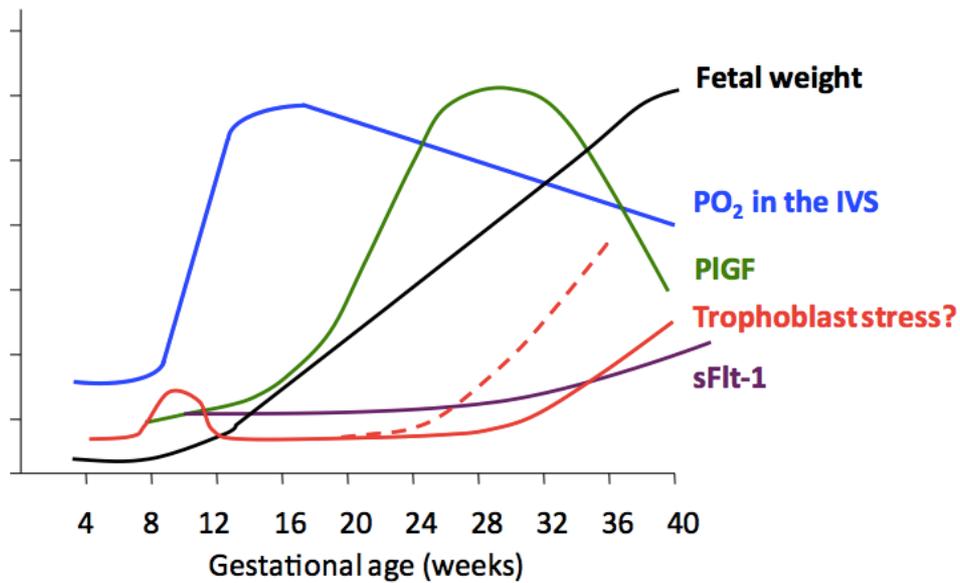


Figure 2.17 : Corrélation du poids fœtal avec des facteurs intra-placentaires au cours de la gestation. Schéma représentant les changements de la concentration d'oxygène dans la chambre intervillosaire (IVS), la croissance du poids fœtal, et la concentration maternelle du sFlt-1 et du PIGF au cours de la grossesse. Le stress oxydant est observé plus marqué à la fin du 1<sup>er</sup> trimestre (associé avec l'arrivée du sang de la circulation maternelle). La sécrétion placentaire du sFlt-1 est régulée positivement avec le niveau de stress, tandis que le PIGF est régulé négativement par le stress du RE. Ces changements en concentrations pourraient refléter un niveau de stress au sein des trophoblastes vers le terme induit par le déséquilibre progressif entre la demande fœtale en oxygène et l'apport maternel. La ligne pointillée illustre le cas de PE à l'apparition précoce, due à une perfusion anormale secondaire à un remodelage déficient des artères spiralées. D'après Burton (2016).

### 2.3.3. Marqueurs biologiques d'origine placentaire

Des raisons éthiques évidentes, ainsi que le caractère invasif de l'étude du placenta humain en son site naturel, rendent irréaliste l'exploration *fonctionnelle* du placenta *in situ*. L'imagerie avec ses évolutions incontournables (Duan, 2015) ne nous apporte des résultats qu'au stade relativement avancé d'une grossesse pathologique où les perturbations hémodynamiques deviennent évidentes et plus ou moins irréversibles donc inaccessibles à un traitement. Cela justifie la recherche de bio-marqueurs dans le sang maternel.

Une masse considérable de données de la littérature présentée précédemment suggère qu'une *dysfonction placentaire* contribue à un profil déséquilibré des facteurs régulateurs de l'angiogenèse dans le compartiment maternel. Nous présentons ci-dessous l'algorithme stratifié proposé par Herraiz (2015) basé sur le ratio sFlt-

1/PIGF dans le sang maternel dont la performance prédictive semble supérieure à celle du PIGF ou de sFlt-1 seul. Dès le milieu de la grossesse, une dysfonction placentaire peut être suspectée ou écartée avec une forte vraisemblance selon le ratio sFlt-1/PIGF :

- Un ratio sFlt-1/PIGF inférieur à 38 (Zeisler, 2016) permet d'écarter des complications éventuelles liées à une dysfonction placentaire. La grossesse est donc suivie avec les procédures habituelles

- Un ratio sFlt-1/PIGF > 85 (Stepan, 2015) indique le risque de manifestation clinique d'une complication sévère (par exemple PE) imminente, ce qui impose éventuellement une hospitalisation précoce afin de réduire efficacement la morbidité maternelle et fœtale.

- En cas de ratio sFlt-1/PIGF compris entre 38 et 85 : comme la valeur de prédiction positive pour une PE pourrait atteindre à 47,5%, ce groupe de grossesses devrait être suivi en soin obstétrical intensif.

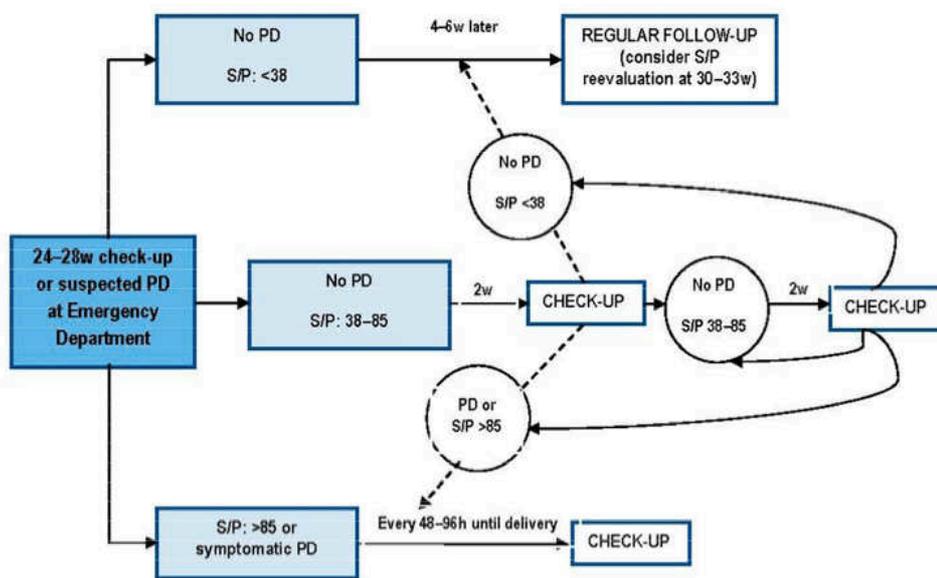


Figure 2.18 : Dépistage de la dysfonction placentaire par le dosage des facteurs d'angiogénèse. L'algorithme est basé sur le ratio sFlt-1/PIGF mesuré dans le sang maternel. D'après Herraiz (2015)

Une question se pose : quelle est l'attitude appropriée devant un dépistage « positif » ou l'appartenance à un groupe de grossesses à risque ? En effet, une meilleure identification des morbidités précoces liées à la mauvaise placentation pourrait permettre la mise en œuvre de thérapeutiques préventives avant qu'un tableau

clinique ne se manifeste, car le traitement sera beaucoup complexe et couteux à ce stade. Parfois, une terminaison de la grossesse est impérative du fait du risque de morbidité maternelle. Ces questions soulignent l'enjeu de la recherche de pistes innovantes qui aient une action corrective sur les perturbations biologiques d'une placentation pathologique. Parmi les axes potentiels, on pourrait imaginer la modulation de l'angiogénèse placentaire, le « nettoyage » des ROL, ou une stimulation des facteurs de croissance placentaire (Spencer, 2014).

### 3. Conséquences du RCIU

#### 3.1. Conséquences à court terme

Un RCIU est associé à un risque accru de mortalité et de morbidité périnatale, reliée à l'acidose ou asphyxie *intra-partum*, l'hypoglycémie néonatale, l'hypocalcémie, l'infection, et l'entérocolite ulcéro-nécrosante. Ce risque de morbi-mortalité néonatale est fonction de la sévérité de la restriction et indépendant de l'effet propre de la prématurité (Malin, 2014). En revanche, le risque de mortalité néonatale associé à un faible poids de naissance s'ajoute au risque lié à la prématurité elle-même (Katz, 2013).

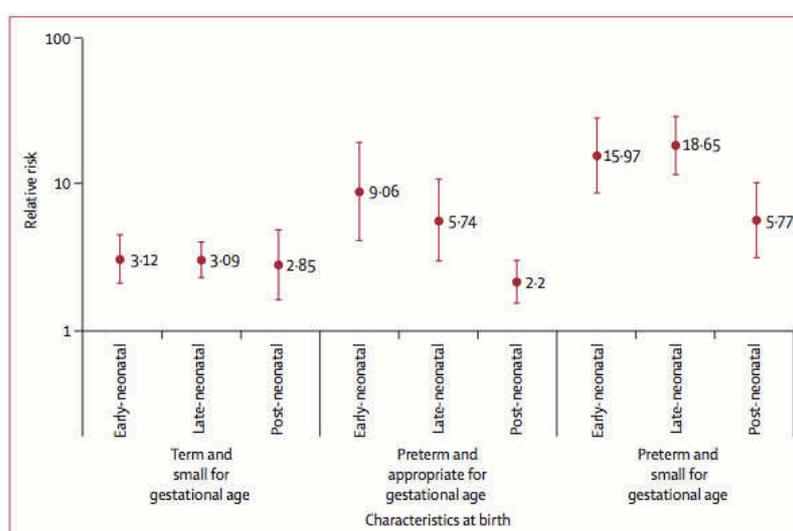


Figure 5: Relative risk of early-neonatal, late-neonatal, and post-neonatal infant mortality associated with preterm and size for gestational age

Figure 3.1 : Risque relatif de mortalité néonatale précoce, retardée et post-néonatale associé à la prématurité et au faible poids de naissance. D'après Katz (2013)

#### 3.2. Conséquences à long terme

Depuis les travaux de Barker dans les années 90, un poids faible à la naissance est reconnu comme un facteur de risque de pathologies chroniques à l'âge adulte telles que maladies cardiovasculaires et métaboliques (Wang, 2014), asthmatiques (Xu, 2014), ou des désordres dépressifs (Loret de Mola, 2014). Cela représente un défi pour la stratégie de santé publique dans les pays en voie de développement où se produit fortement la transition nutritionnelle (Popkin, 2012).

Néanmoins, une méta-analyse récente explorant l'association entre le PAG exclusivement à terme avec la morbidité à l'âge d'adulte a montré que cette rela-

tion n'est pas retrouvée dans toutes les études (Malin, 2015). Parmi les enfants nés au-delà de 37 semaines d'aménorrhée, l'association avec la morbidité à l'adulte (HTA, hypercholestérolémie, diabète de type 2, mortalité cardiovasculaire, anxiété, insuffisance rénale terminale) n'est retrouvée de façon constante selon la méta-analyse, ni pour le critère < 2500g ni pour le critère < 10<sup>ème</sup> percentile. Cela pourrait signifier que seuls les fœtus ayant souffert d'une « cassure » de la trajectoire de croissance *in utero* (c'est-à-dire les vrais RCIU, et pas tous les nouveau-nés PAG), d'autant plus si cette « cassure » se produit précocement à distance du terme, sont exposés au risque de pathologie à long terme. Ainsi, l'identification des vrais RCIU, même ceux qui sont diagnostiqués proches du terme, serait indispensable pour mettre en œuvre une meilleure prévention des pathologies chroniques à long terme.

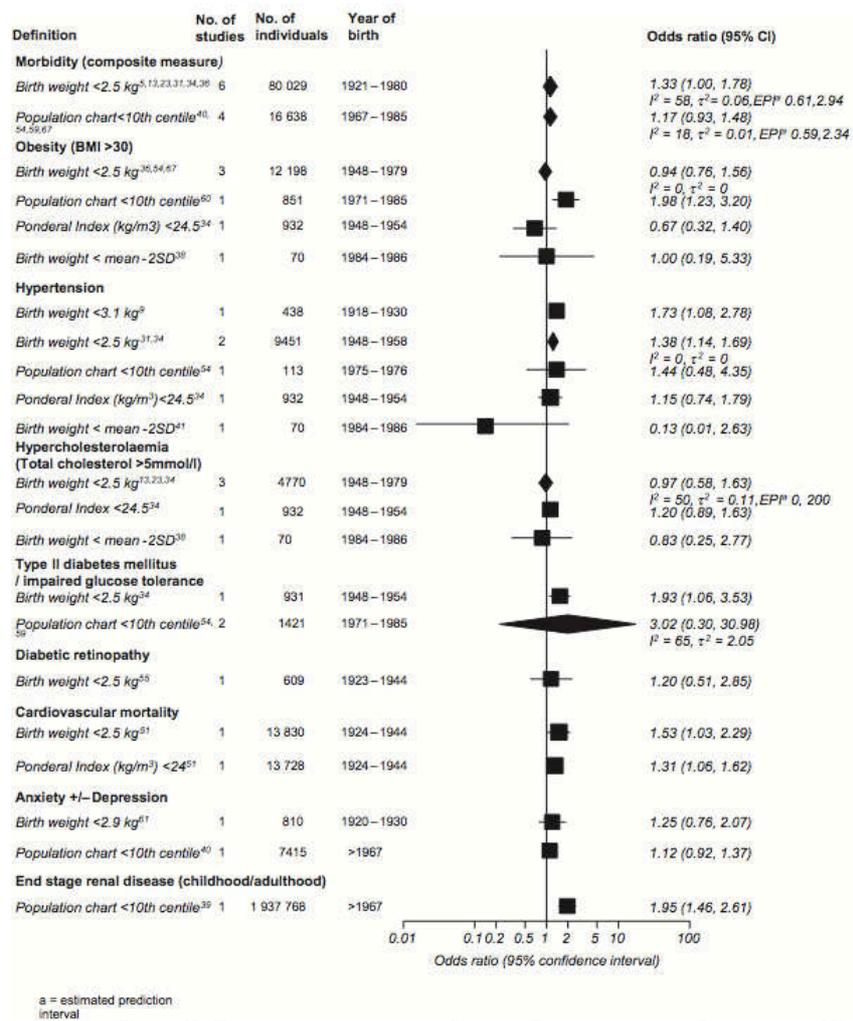


Figure 3.2 : Graphique en forêt de l'odd ratio de l'association entre le PN et le devenir à l'âge adulte.

D'après Malin (2015).

Par ailleurs la naissance prématurée est constamment associée avec des troubles de la tension artérielle à l'âge adulte selon des méta-analyses récentes (de Jong, 2012; Parkinson, 2013). Cela peut être expliqué par la réduction du nombre des néphrons chez les prématurés, telle réduction qui prédispose à une augmentation de la pression de filtration glomérulaire et, à long terme, à une dysfonction rénale (Bacchetta, 2009; Carmody, 2013). Dans cette optique, la décision obstétricale de faire naître à tort un fœtus RCIU avant terme prédisposerait cet individu à une autre morbidité à long terme.

### 3.2.1. L'introduction du concept de la programmation ou l'origine précoce des maladies chroniques cardio-métaboliques de l'adulte

Ces observations épidémiologiques rétrospectives renforcent le concept de « l'origine précoce de la santé et des maladies de l'adulte » (*developmental origins of health and disease-DOHaD*), ou encore de « programmation fœtale » (*fetal programming*) avec des débats sur le terme à utiliser. L'expression « empreinte nutritionnelle » nous semble préférable ; en effet le terme « programmation » paraît trop fort, il suggère que les pathologies à l'âge adulte seraient inévitables, alors qu'il y a simplement une forte augmentation du risque. Ce concept, proposé initialement par Hales et Barker (1993; 2001), défend l'hypothèse que pour s'adapter à une nutrition fœtale et/ou postnatale précocement appauvrie, le fœtus ou le nouveau-né adopterait un nombre de stratégies pour optimiser ses chances de survies *in utero* et postnatale avec une allocation préférentielle des nutriments en faveur de la croissance cérébrale aux dépens d'autres tissus tels que le muscle, les reins et le pancréas endocrine. Cette période d'adaptation périnatale, qui s'étend schématiquement sur les « 1000 premiers jours de la vie », de la conception au deuxième anniversaire de l'enfant, est une *fenêtre majeure de vulnérabilité*. Au cours de cette période de vulnérabilité, un stimulus transitoire a non seulement un effet à court terme mais peut laisser aussi une empreinte longtemps silencieuse, modulant, la vie durant, les fonctions et régulations physiologiques. En revanche, le même stimulus transitoire, en dehors de cette phase de vulnérabilité, n'a le plus souvent qu'un effet à court terme (Simeoni, 2016). De plus, il est supposé

que la programmation métabolique favoriserait la survie du nouveau né dans un environnement nutritionnel postnatal équivalent à celui auquel il a été exposé *in utero*. Ainsi, le phénotype économe (*thrifty phenotype*) programmé en période foétale serait adapté à un environnement postnatal de même nature. Des apports caloriques trop importants au cours de la vie post-natale favoriseraient alors le stockage d'énergie et participeraient à l'installation progressive de maladies chroniques telles que le diabète de type 2, l'obésité etc. chez un individu métaboliquement inadapté à un environnement nutritionnel pléthorique (Barker, 2006).

Il convient de noter que si le concept DOHaD n'est qu'un facteur de risque parmi d'autres, l'ampleur de son effet est au moins égal à celle des autres facteurs de risque connus des maladies chroniques de l'âge adulte (Simeoni, 2016). Dans les conditions périnatales pathologiques, un retard de croissance intra-utérin important couplé avec une prématurité extrême devrait accentuer l'effet de programmation.

### 3.2.2. Mécanismes de programmation mis en évidence à partir des modèles d'expérimentation

Bien que l'expérimentation animale ait reproduit le phénomène de « programmation foétale » et permis d'en mieux comprendre les mécanismes, il n'existe pas de modèle parfait, notamment en termes de trajectoire de croissance postnatale et programmation foétale.

L'insuffisance ou dysfonction placentaire représente la cause la plus fréquente du RCIU chez l'humain dans des sociétés occidentales (ACOG, 2013). Un modèle a été construit et proposé par (Wigglesworth, 1974), avec la ligation uni- ou bilatérale des artères utérines pour induire une perfusion placentaire anormale et conséquemment un RCIU. Chez les descendants nés de cette manipulation, on a retrouvé des perturbations développementales du pancréas, des reins et du foie, ainsi que des anomalies de la sécrétion et de la sensibilité à l'insuline, qui aboutissent à un diabète de type 2. En revanche, l'étude de l'hémodynamique placentaire humaine nous montre que l'anomalie de perfusion serait plutôt de type d'ischémie-reperfusion (Burton, 2009b), ce qui ex-

plique que la ligature permanente chez les animaux d'expérience ne reproduit pas tous les processus adaptatifs éventuels au niveau placentaire et fœtal.

Cela explique le rôle des manipulations nutritionnelles qui sont les modèles les plus utilisés (Warner, 2010). Des anomalies endocrines, métaboliques ont été documentées chez les descendants, et sont fonction de la sévérité de la restriction (calorique ou protéique) et du timing de l'induction. Une croissance postnatale anormale (croissance restreinte ou au contraire rattrapage de croissance, *catch up*) du fait de la manipulation des apports postnataux génère une empreinte permanente. Un ensemble des travaux de thèse réalisés au sein de notre unité, basés sur ce type de manipulation sera présenté plus loin. La programmation périnatale pourrait, *via* différents mécanismes moléculaires, avoir de nombreuses répercussions sur le métabolisme général qui seraient à l'origine d'une dérégulation de l'homéostasie énergétique et mener sur le long terme au développement de pathologies cardio-métaboliques.

Une revue complète des différents modèles utilisés chez le rongeur dans la programmation métabolique a été réalisée par Warner et Ozanne en 2010.

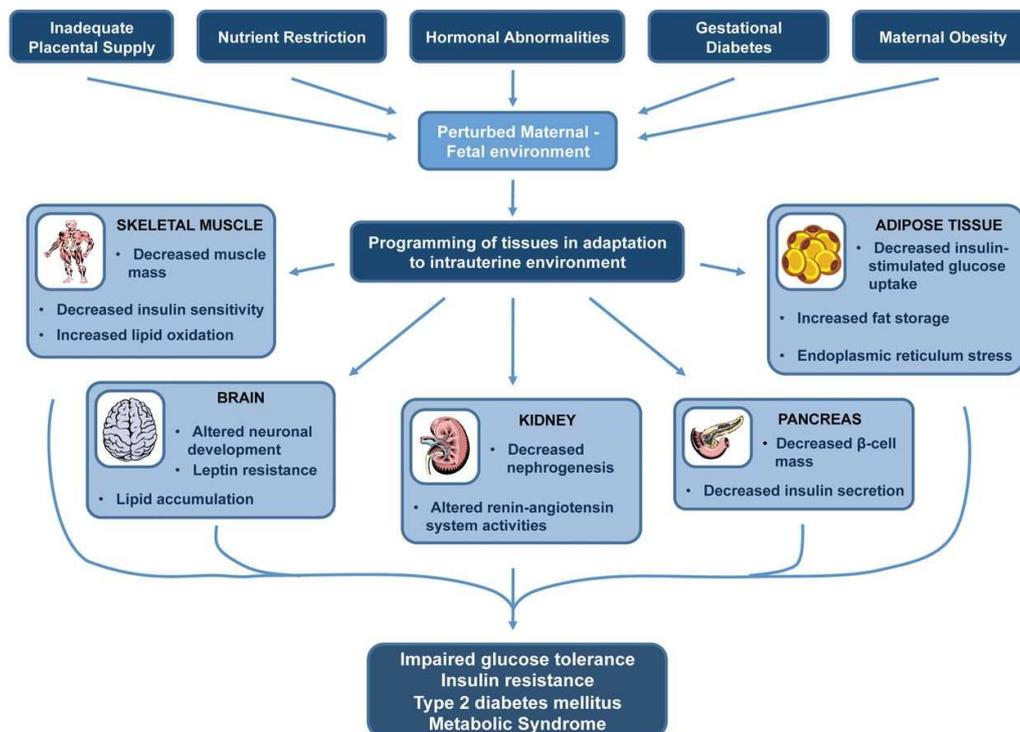


Figure 3.3 : Schéma des adaptations structurelles et métaboliques des tissus au cours de la programmation intra-utérine des maladies métaboliques. D'après Warner et Ozanne (2010)

### 3.2.3. Syndrome métabolique, obésité et impact du fructose

Le SMet est caractérisé l'association d'au moins 3 désordres métaboliques asymptomatiques présents chez un individu, parmi lesquels : [thèse de Martin Agnoux 2014]

- un excès de poids et notamment un embonpoint abdominal (tour de taille supérieur à 102 cm pour les hommes et à 88 cm pour les femmes),
- une hypertension,
- une hyperglycémie supérieure ou égale à 6,1 mmol/L à jeun,
- un taux d'insuline anormalement élevé,
- une hyperlipidémie avec des concentrations sanguines de triglycérides supérieurs à 1,6 ou 1,7 mmol/L
- une hypercholestérolémie avec des concentrations de cholestérol HDL (High density lipoprotein) inférieures à 1,04 mmol/L pour les hommes et 1,29 mmol/L pour les femmes.

Il est vraisemblable que, chez les individus nés RCIU, l'apparition du SMet à l'âge adulte, résulte de l'interaction entre une prédisposition acquise *in utero*, et un facteur d'environnement postnatal mis en œuvre immédiatement ou ultérieurement. Le SMet devrait effectivement être décrit comme la conséquence de deux « attaques » : 1) un processus développemental pathologique dans la fenêtre de vulnérabilité *in utero* qui laisse une « empreinte », puis 2) des attaques environnementales ultérieures qui seraient indispensables (Symonds, 2009).

Un récent travail de thèse mené au sein de notre unité (thèse de Martin Agnoux A, 2013) a exploré les effets métaboliques à long terme d'une restriction en protéines à 8% pendant la gestation et lactation, avec la présence à l'âge adulte d'un régime déséquilibre sucré-gras (*Western diet*). Ce travail a confirmé que l'impact de la programmation foetale dans ce modèle pourrait être responsable d'un index HOMA- $\beta$  (*homeostatis model assessment*), celui qui reflète la fonction des cellules beta pancréatiques, significativement réduit à un âge avancé (227 jours de vie), indépendant du régime d'induction, avec une tendance diminutive dès l'âge adulte jeune (63 jours de vie). En revanche, une sensibilité élevée à l'insuline a été notée chez l'adulte jeune (63 jours de

vie) comme une optimisation maximale toutes les allocations qu'ils recevaient après une vie précaire intra-utérine (Martin Agnoux, 2014)

Dans un autre travail de l'équipe, des ratons nés RCIU à la suite d'une restriction du régime maternel à 8% de protéines, ont reçu du 5<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jour de vie, une alimentation artificielle par gastrostomie : l'apport d'un lait artificiel enrichi en protéines a entraîné, à partir de l'âge de la puberté, l'apparition de plusieurs éléments du « syndrome métabolique » (SMet) : augmentation du poids, de la masse grasse, de la taille des adipocytes, élévation des triglycérides circulants, avec une glycémie normale mais une augmentation du rapport insuline/glucose par rapport aux rats ayant reçu un lait à teneur normale en protéines (Delamaire, 2012).

A côté de l'apport riche en protéines et matières gras, l'épidémie de l'obésité dans le monde entier semble être concomitante avec la généralisation des boissons sucrées industrialisées (« *soft drinks* »). La consommation du sirop de maïs riche en fructose (HFCS) s'est accrue d'une manière impressionnante au cours des 4 dernières décennies (plus 1000% entre des années 1970 et 1990) aux Etats-Unis (Bray, 2004). Malgré une forte hétérogénéité affaiblissant la puissance statistique, une méta-analyse récente de Kelishadi (Kelishadi, 2014) révèle l'association significative d'une consommation de fructose élevée avec une élévation de la glycémie à jeun. Il est notable que la consommation du fructose d'origine naturelle (fruits, légumes) n'est pas comparable en termes de métabolisme hépatique avec celle du fructose d'origine industrielle (boissons sucrées).

Le fructose est phosphorylé au niveau du foie par la fructokinase en fructose-1-phosphate pour une conversion ultérieure en glyceraldehyde-3-phosphate. Il est utilisé ensuite pour la synthèse du glycérol ou des acides gras au cours de la néo-lipogénèse.

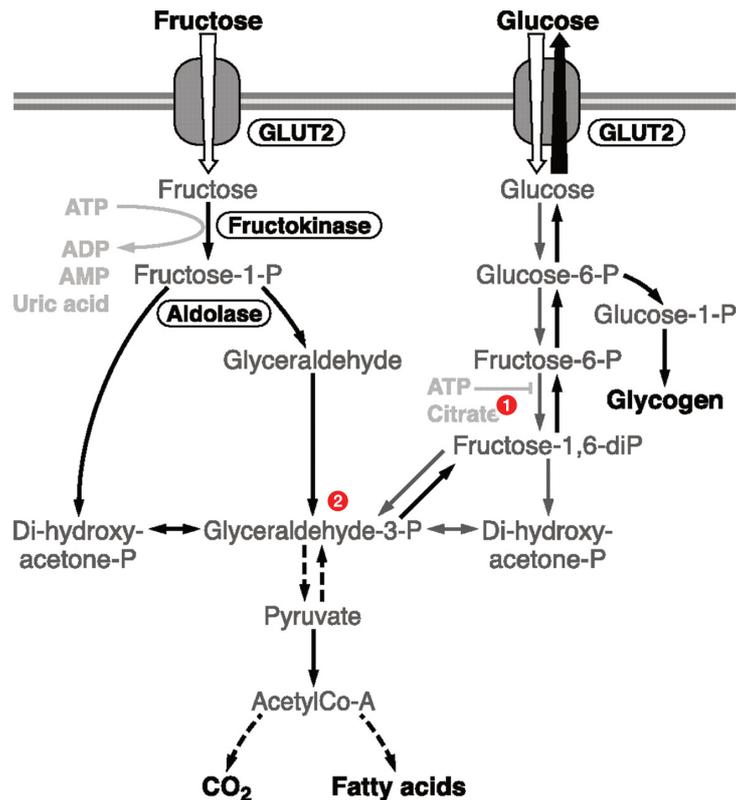


Figure 3.4 : Métabolisme du fructose au niveau hépatique. D'après Tappy (2010)

En comparant le métabolisme hépatique du fructose et du glucose, quelques distinctions ont été constatées, par exemple :

- la conversion du glucose en *fructose-1,6-di-P* (1) est une catalysée par la phosphofruktokinase dont l'activité est dépendante de l'ATP et du citrate, autrement dit, contrôlée par l'état énergétique de l'hépatocyte. Ce n'est pas le cas avec le fructose dont la conversion en *glyceraldehyde-3-phosphate* (2) est indépendante de l'insuline, *plus rapide*, et sans *feedback* négatif de l'ATP. Cela explique une déplétion temporaire de phosphate libre et une altération homéostatique du foie dans des modèles de stéatohépatite non-alcoolique chez le rat et l'humain (Cortez-Pinto, 1999).
- Par la conversion rapide en *glyceraldehyde-3-phosphate* hépatique, précurseur de la synthèse des acides gras, le fructose est considéré comme fortement lipogénique.
- Une grande proportion de glucose dérivé du fructose sera stockée par la synthèse de glycogène hépatique. L'administration de fructose aug-

mente la concentration de glycogène hépatique de façon plus marquée qu'une dose équivalente de glucose.

- Il a été montré que le fructose réduit la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans le foie, et favorise l'estérification des acides gras et la synthèse des triglycérides (Topping, 1972)

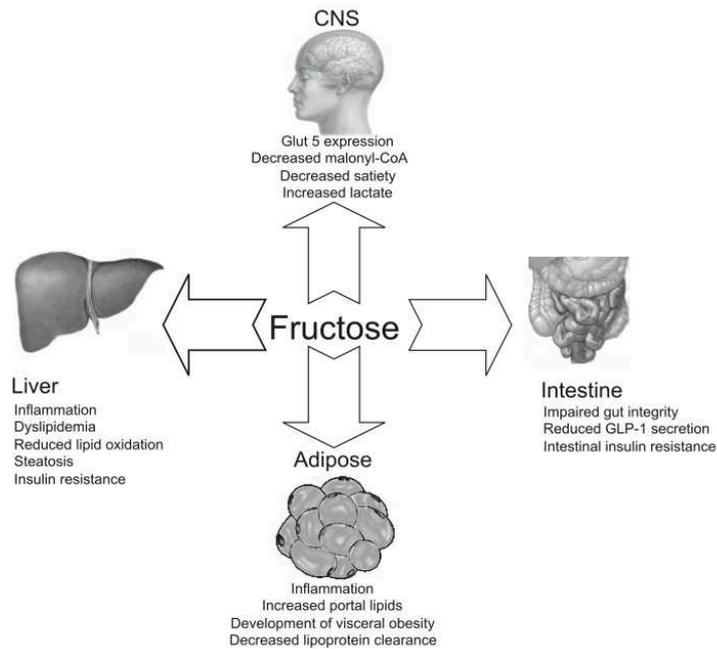


Figure 3.5 : Résumé des effets systémiques de la consommation chronique du fructose. Des altérations se produisent dans plusieurs tissus, tels que le foie, le tissu adipeux, le système digestif, et le système nerveux central. D'après Dekker (2010)

Ces éléments expliquent l'utilisation de fructose pour produire des modèles expérimentaux avec manifestations du SMet. En 8 semaines, Tay (2002) a réussi à générer une hyperinsulinémie et une hypertension artérielle chez des rats mâles Sprague-Dawley par administration orale *ad libitum* d'une boisson contenant 10% de fructose. Jurgens (2005) ont comparé l'effet de boissons à 15% de fructose par rapport à des boissons à 10% de saccharose sur l'accumulation de lipides hépatiques chez des souris. Ils ont constaté que le fructose favorisait le stockage lipidique hépatique et augmentait la masse grasse corporelle de façon significative. Mamikutty (2014) a récemment réussi à induire un modèle de SMet chez des rats Wistar avec une supplémentation par du fructose à 20% pendant 8 semaines.

#### 4. Pourquoi explorer l'Arginine et la Citrulline comme nouvelle piste thérapeutique pour le RCIU en période périnatale ?

A ce jour, l'aspirine est la seule molécule qui ait démontré une « certaine » efficacité pour la prévention de la PE chez des femmes enceintes porteuses d'un ou plusieurs des facteurs de risque identifiés par l'histoire individuelle ou l'examen au début de la grossesse. Cependant il est prouvé que cet effet dépend également du moment de l'initiation du traitement préventif : le traitement n'est pas efficace lorsqu'il est administré après 16 SA (Bujold, 2014). Pour une modélisation plus efficace du risque, plusieurs bio-marqueurs du sang maternel sont utilisés et intégrés dans le calcul de risque. Néanmoins ce calcul ne permet la discrimination des cas à haut risque qu'à partir du 2<sup>ème</sup> trimestre lorsque le placenta subit des modifications infra-cliniques pour s'adapter au stress, secondairement à une placentation défectueuse. Si l'on vise à traiter ou au moins à prolonger jusqu'au terme une grossesse compliquée d'origine placentaire, il y a donc la place pour d'autres interventions potentielles. C'est éventuellement le cas pour l'arginine et la citrulline.

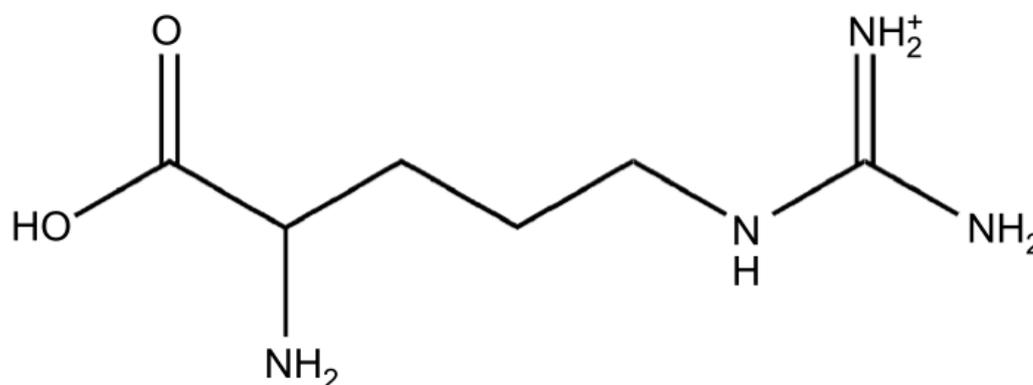


Figure 4.1 : Structure moléculaire de l'arginine. D'après Curis (2005).

L'arginine est un acide aminé semi-essentiel, qui a deux sources endogène : la protéolyse des protéines de l'organisme, mais aussi une synthèse *de novo*. Deux voies sont en compétition pour le catabolisme de l'arginine : d'une part, l'arginine peut être catabolisée en ornithine et urée par les arginases 1 (cytoplasmique) et 2 (mitochondriale). D'autre part, l'arginine peut être convertie en monoxyde d'azote (NO) (et en citrulline) par les NO-synthases : il existe 3 isoformes de NO-synthase (NOS): neuronale (NOS-1), endothéliale (NOS-2), et inductible (NOS-3) (Alderton, 2001). L'arginine est en effet le seul précurseur endogène du NO dans l'organisme.

Or, comme on l'a évoqué plus haut, le rôle du NO paraît important comme médiateur du VEGF dans le contrôle de la vascularisation placentaire. Aussi l'arginine a-t-elle été étudiée et envisagée avec intérêt comme piste thérapeutique dans la PE, au vu des données concernant des lésions vasculaires observées dans le placenta des grossesses associées à une PE et/ou un RCIU (Johal, 2014; Kim, 2006; Sooranna, 1995).

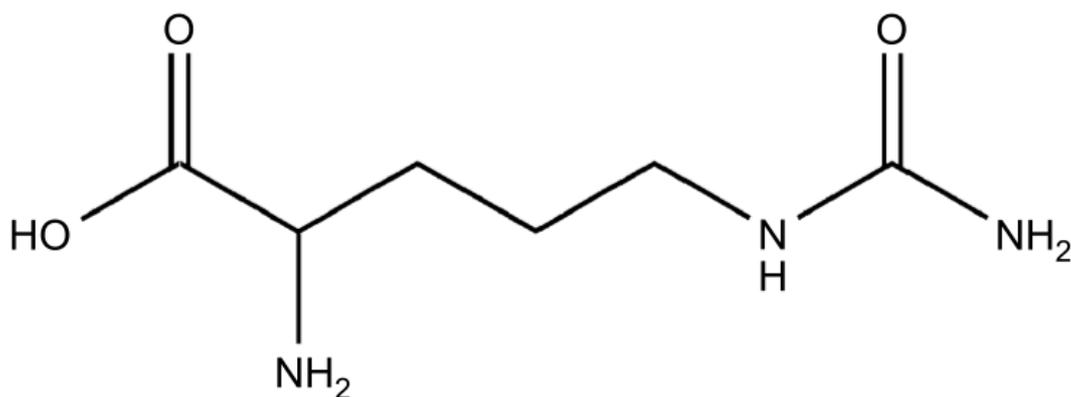


Figure 4.2 : Structure moléculaire de la citrulline. D'après Curis (Curis, 2005)

La citrulline est un acide aminé non essentiel et non incorporé dans les protéines. Pourtant, la citrulline attire l'attention en nutrition depuis une quinzaine d'années depuis que plusieurs études ont suggéré qu'elle jouait un rôle dans la régulation du métabolisme protéique et lipidique. La citrulline est produite dans l'organisme par deux voies de synthèse principale (Curis, 2005) :

- premièrement, la citrulline est produite à partir de la glutamine dans les entérocytes de l'intestin grêle (grâce à l'ornithine carbamoyltransferase-OCT). Contrairement à l'arginine, la citrulline parvenant au foie échappe en majeure partie à la captation hépatique, et est captée essentiellement par le rein. Sous l'effet de deux enzymes rénales, l'argino succinate synthase (ASS) et l'argino succinate lyase (ASL), la Citrulline est convertie en Arginine (83% de la citrulline d'origine intestinale) ; en conditions physiologiques, la conversion de citrulline en arginine par le rein de l'adulte est suffisante pour couvrir la demande en arginine de l'organisme (60% de l'arginine synthétisé *de novo* proviendrait de cette conversion).
- deuxièmement, dans la plupart des tissus produisant du NO, la NO synthase produit une molécule de citrulline pour chaque molécule de NO produite. La ci-

trulline peut être ensuite recyclée en arginine grâce à l'ASS et maintenir en conséquence, la disponibilité de l'arginine pour que la production in situ du NO soit maintenue.

Il a été montré que la supplémentation intraveineuse en citrulline est plus efficace qu'une supplémentation directe en arginine pour élever de façon prolongée la concentration plasmatique de l'arginine (Lassala, 2009).

Cela explique que de plus en plus de travaux de recherche utilisent l'administration de citrulline comme une alternative plus efficace que l'arginine, en particulier du fait de la séquestration splanchnique de ce dernier acide aminé.

L'intérêt de la citrulline en nutrition périnatale demeure à étudier, en particulier par rapport à l'arginine : en effet, les études de supplémentation en arginine dans la PE ont donné des résultats discordants, qui seront détaillés plus loin.

Enfin, la citrulline, possiblement par son effet antioxydant (Cynober, 2010) pourrait avoir un rôle dans la prévention des risques cardiovasculaires à long terme chez la mère puisque le risque cardiométabolique est accru après une grossesse pathologique d'origine placentaire (Murphy, 2015).

#### 4.1. Effets de la supplémentation en arginine au stade prénatal :

Chez la brebis gestante, la perfusion intraveineuse d'arginine prévient le retard de croissance intra-utérin induit par une restriction de 50% des apports nutritionnels maternels (Lassala, 2010). L'arginine orale stimule également la croissance fœtale dans un modèle de RCIU induit par l'hypoxie maternelle chez la rate gestante (Vosatka, 1998) et accroît le nombre de fœtus de porcelets vivants et leur poids de naissance (Mateo, 2007).

Néanmoins, les résultats des essais cliniques de supplémentation en arginine chez femmes atteintes de PE et/ou porteuses de fœtus avec RCIU sont plus décevants. Chez des femmes porteuses de fœtus avec un RCIU modéré, la perfusion intraveineuse d'arginine pendant 7 jours augmente l'excrétion urinaire de nitrates et de nitrites (index de la production de NO) et le poids de naissance (Xiao, 2005), mais la signification de cet essai randomisé est limitée puisque la moyenne de poids de naissance était proche de 2800g pour le groupe défini comme « RCIU ». Une étude randomisée en double aveugle, contrôlée versus placebo, portant sur 672 patientes

aux antécédents de PE, menée par Vadillo-Ortega (2011) retrouvait une diminution significative ( $p < 0,001$ ) de l'incidence de la PE dans le groupe recevant de l'arginine (à la dose de 6,6 g/jour) combinée avec des antioxydants par rapport aux deux autres groupes ne recevant pas d'arginine, lorsque la supplémentation était débutée avant 24SA. Néanmoins, l'incidence du RCIU n'était pas un critère de jugement, et ne différait pas entre groupes. Précédemment, l'étude randomisée contrôlée menée dans notre équipe par Winer (2009), et qui avait pour critère principal de jugement le poids de naissance dans un groupe de RCIU sévère d'origine vasculaire, n'a pas montré de bénéfice attendu avec une supplémentation en arginine à la dose de 14 g/jour. A noter que l'excrétion urinaire de nitrites et nitrates, index de la production de NO au niveau du corps entier, n'était pas augmentée dans le groupe supplémenté en arginine dans cette étude.

Ces discordances pourraient être liées à l'activation de l'arginase 2 qui dégrade l'arginine. L'activation exagérée de l'arginase pourrait être une compensation à l'expression élevée de l'eNOS observée lors du RCIU (Barut, 2010). Malgré une expression élevée, l'activité de l'eNOS en cas de RCIU est diminuée du fait de la diminution de sa phosphorylation (Ser1177) (Krause, 2013).

D'autres arguments suggèrent que l'utilisation de la citrulline *per os* pourrait être plus efficace. Sur le plan théorique, la citrulline, à l'inverse de l'arginine, échappe à la captation hépatique (Curis, 2005). En présence d'une activité arginase élevée, une étude de Wijnands (2015) a indiqué que la citrulline améliore la perfusion micro-circulaire d'organe (la muqueuse jéjunale chez des souris recevant des injections d'arginase). En outre, le transport intracellulaire de la citrulline est indépendant du système  $\gamma^+$  qui transporte l'arginine (Wu, 1998), et qui est altéré dans le RCIU (Casanello, 2002).

#### 4.2. Pourquoi explorer la supplémentation en citrulline en période postnatale :

Les enfants nés avec un RCIU sont souvent nourris avec des laits « enrichis » en protéines pour assurer une croissance de rattrapage. Ce rattrapage est indispensable puisque le développement cérébral, donc le développement psychomoteur, est corrélié à la vitesse de croissance dans les premiers mois (Ehrenkranz, 2006). Cependant, des données apparues dans la dernière décennie suggèrent qu'une vitesse de crois-

sance accélérée dans les premières semaines de vie néonatale pourrait avoir un effet délétère à long terme: le gain de poids des 4 premiers mois de la vie est corrélé à la prévalence de l'obésité plusieurs années plus tard (Stettler, 2002). D'autres études ont mis en évidence un lien entre la vitesse initiale de croissance et le risque d'insulino-résistance, de diabète de type 2 et de maladie cardiovasculaire à l'âge adulte (Eriksson, 1999; Jaquet, 2005). Bien que les mécanismes responsables de ce phénomène restent à établir, il est intéressant de noter que la plupart des études évaluaient la croissance initiale uniquement en termes de gain pondéral. Or ces effets délétères d'un rapide gain de poids pourraient être liés à l'accumulation de graisse viscérale : ainsi des enfants de 2 ans qui avaient reçu des formules enrichies avaient une masse grasse viscérale accrue, comparés à ceux qui avaient reçu une formule standard, et on sait que la résistance à l'insuline est corrélée à la masse grasse viscérale chez des enfants en surpoids. Aussi les apports nutritionnels des premiers mois de vie devraient-ils, en particulier chez les enfants nés avec un RCIU, viser avant tout à promouvoir l'accrétion protéique, c.à.d. le gain de masse maigre, plutôt que le seul poids corporel, puisque un gain de poids rapide traduit souvent un gain de masse grasse. Augmenter simplement l'apport protéique global chez le nouveau-né RCIU n'est pourtant pas la meilleure option. Nous avons montré récemment qu'une augmentation de 50% de l'apport protéique en période néonatale chez des rats nouveau-nés en nutrition artificielle, induisait une augmentation de la masse grasse et une résistance à l'insuline à un stade beaucoup plus tardif de la vie, lorsque les rats atteignaient l'âge adulte (Delamaire, 2012). L'altération de la signalisation de leptine, la régulation perturbée de l'appétit devraient être impliquées (Coupe, 2009; 2012).

Par ailleurs, une concentration basse d'arginine est souvent observée dans le plasma chez le nouveau-né (Wu, 2004). Contrairement à ce qui se passe chez l'adulte, la synthèse de novo de l'arginine à partir de la citrulline se produit également au niveau intestinal chez le nouveau-né, peut-être pour compenser la concentration faible de l'arginine dans le lait maternel (Le Floc'h, 2000). Une supplémentation postnatale en arginine stimule la croissance chez le porcelet nouveau-né (Kim, 2004). En outre, chez le porcelet nouveau-né recevant un régime pauvre en arginine, la citrulline est un précurseur plus efficace d'arginine que la proline ou l'ornithine

(Urschel, 2006). C'est aussi le cas chez le chien (Czarnecki, 1984) et le rat (Hartman, 1994). Par ailleurs, il a été établi que la citrulline a un effet anabolisant sur la synthèse protéique dans le muscle dans d'autres modèles de dénutrition chez le rat adulte entérectomisé ou le rat âgé (Osowska, 2006).

*Collectivement, ces données suggèrent que la supplémentation tant anténatale que néonatale en citrulline pourrait avoir des effets bénéfiques dans le contexte du RCIU.*

## 5. Objectif de ce travail sur la supplémentation périnatale en citrulline

### 5.1. Citrulline dans la croissance et fonction placentaire :

#### 5.1.1. Effet de la citrulline sur la restriction maternelle en protéine :

Au sein de notre équipe, plusieurs travaux ont déjà été menés sur un modèle rat de RCIU et semblent montrer un intérêt de la supplémentation en Citrulline sur la croissance fœtale. Bourdon (2016) a montré dans un modèle de RCIU induit par restriction protéique chez des rates gestantes que la supplémentation en Citrulline augmentait le poids fœtal et stimulait puissamment la synthèse protéique au niveau du muscle fœtal, mesurée par l'incorporation de valine marquée dans le muscle fœtal, au 20<sup>ème</sup> jour de gestation. Hannigsberg (Hannigsberg, 2013) a trouvé une augmentation significative du poids des fœtus RCIU nés de mères supplémentées en Citrulline à partir du premier jour de gestation, par rapport au groupe contrôle. Un des mécanismes évoqués serait celui de l'augmentation de l'expression placentaire de facteurs de croissance (IGF2) ainsi que l'augmentation de l'expression des transporteurs placentaires des acides aminés permettant de favoriser la croissance fœtale (Miserbert, 2014 non publié).

#### 5.1.2. Les objectifs de la 1<sup>ère</sup> partie du travail de thèse étaient donc de :

- Mesurer les modifications induites tout au long de la gestation par la supplémentation en citrulline dans le même modèle, sur la croissance fœtale et l'efficacité placentaire
- A l'aide d'une analyse ciblée, étudier l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation fonctionnelle du placenta, concernant deux axes : 1) croissance (*Igf2*) et 2) angiogénèse (*Vegf* et son récepteur *Vegfr-1*)
- Mettre au point des analyses morphologiques du placenta de rat dans un modèle d'expérimentation nutritionnelle.

### 5.2. Citrulline a-t-elle une place en période postnatale précoce ?

#### 5.2.1. Impact du modèle de restriction maternelle en protéines sur la programmation fœtale

Une restriction en protéines du régime maternel depuis la conception jusqu'au sevrage reste un des modèles expérimentaux les plus utilisés pour ex-

plorer l'effet de programmation *in utero* de la descendance [Warner 2010]. Ce modèle est maîtrisé de longue date au sein de notre unité. Néanmoins, pour la première fois, nous menons une telle restriction maternelle sévère (4%) pour étudier le devenir à long terme des rats nés RCIU.

Pour étudier le devenir métabolique des nouveau-nés RCIU, nous avons donc choisi l'exposition post-sevrage à un régime riche en fructose.

#### 5.2.2. Impact de la citrulline en période néonatale :

Notre équipe a déjà montré que la citrulline stimule la synthèse protéique dans le compartiment fœtal dès la vie intra-utérine (Bourdon, 2016), mais, à notre connaissance, aucune étude n'a déterminé si la supplémentation postnatale en citrulline produit le même effet bénéfique pendant la période d'allaitement. Tain (2014a; 2014b) a montré que l'allaitement de rats par des mères supplémentées en citrulline corrigeait chez la descendance la pression artérielle dans leur modèle d'hypertension artérielle en agissant sur des gènes rénaux. Ses deux études soulignent la rareté des données sur l'impact à long terme de la supplémentation néonatale en citrulline en termes de prévention des manifestations du SMet. Or des travaux chez le rat adulte suggèrent un effet bénéfique de la supplémentation en arginine, qui atténue l'accumulation de masse grasse dans un modèle de diabète de type 2 chez le rat Zucker (Wu, 2007) et un modèle d'obésité induite par un *Western diet* (Nall, 2009). En outre, des données plus récentes suggèrent un effet possible de la citrulline dans des modèles de stéatose induite par le fructose chez le rat adulte (Jegatheesan, 2016), comme cela est détaillé plus loin.

#### 5.2.3. Objectifs de la 2<sup>e</sup> partie du travail de thèse :

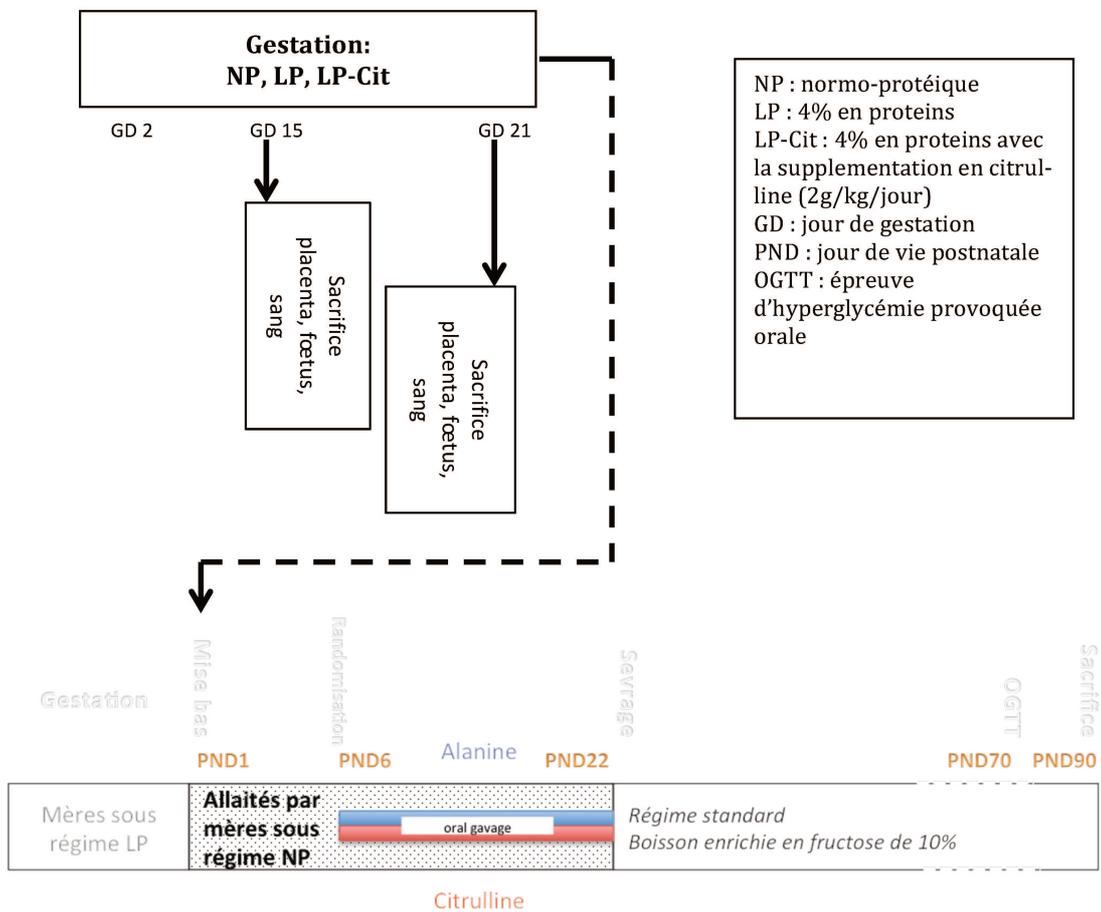
Nous formulons l'hypothèse que la citrulline pourrait stimuler la synthèse protéique, donc la croissance post-natale chez des rats nouveau-nés RCIU. Si c'est le cas, la supplémentation en citrulline pourrait, en stimulant préférentiellement la croissance de la masse maigre plutôt que de la masse grasse, avoir un effet bénéfique à long terme dans la prévention du syndrome métabolique chez les adultes nés avec un faible poids de naissance. A notre

connaissance, l'effet putatif de la supplémentation en citrulline sur la croissance de rattrapage dans le RCIU n'a jamais été testé.

Les objectifs de l'étude étaient donc de déterminer chez des rats nouveau-nés des mères restreintes en protéines :

- Si la supplémentation précoce en citrulline pendant la phase d'allaitement modifierait la croissance jusqu'au sevrage.
- et si, dans un environnement développemental « néfaste » (exposition chronique au fructose) la citrulline prévient des dysfonctions métaboliques au début de l'âge d'adulte.

### 5.3. Schéma simplifié du protocole d'expérimentation



## 6. Résultats

6.1. Phase prénatale : Article intitulé « *Maternal citrulline supplementation enhances placental function and fetal growth in a rat model of IUGR involvement of insulin-like growth factor 2 and angiogenic factors* »

### 6.1.1. Résumé

Trois groupes de rates gestantes étaient nourris pendant toute la gestation de façon randomisée par l'un des 3 régimes suivants : 1) régime standard (20% de protéines) pour fournir des placentas et fœtus témoins (NP), 2) régime restreint en 4% de protéines pour produire des fœtus RCIU (LP), et 3) régime restreint en protéines associé à une supplémentation en citrulline par la boisson à dose de 2g/kg/jour (LP-CIT). Les rates ont été sacrifiées au 15<sup>ème</sup> (G15) ou au 21<sup>ème</sup> (G21) jour de gestation et les fœtus et placentas prélevés. La croissance fœtale et placentaire a été décrite à deux moments GD15 et GD21. Le niveau d'expression des gènes impliqués dans le développement du placenta et son angiogénèse a été étudié par la qPCR.

Cette étude a confirmé que la restriction maternelle en protéines produisait à G21 une réduction de poids fœtal de 9,1% (vs NP,  $p < 0,01$ ). Par ailleurs, l'administration de citrulline, a augmenté le poids fœtal de 4% (vs LP,  $p < 0,01$ ). L'efficacité placentaire, calculée par le rapport de masse fœtus/placenta, était améliorée dans les deux groupes restreints (LP et LP-CIT) à partir du G15, cependant, cet effet n'a été maintenu qu'en cas de la présence de la citrulline à G21 (LP-CIT vs LP,  $p < 0,001$ ). Ce fait devrait être attribué à une augmentation significative mesurée à GD21 de la zone LZ où se produit l'échange fœto-maternel (LP-CIT vs LP,  $p < 0,01$ ). Le gène *Igf2* a montré une tendance de surexpression dans le groupe LP-CIT dès G15 (vs NP,  $p = 0,05$ ), et est devenu significativement surexprimé à GD21 (vs LP,  $p < 0,01$ ). Le transcrite P0, celui qui est impliqué dans le développement de la LZ du placenta murin, était en revanche surexprimé d'une manière significative et consistante depuis GD15 jusqu'à GD 21 seulement dans le groupe LP-CIT. Ainsi, le niveau d'expression des ARNm des gènes *Vegf* et *Vegfr-1*, impliqués dans la voie de l'angiogénèse, était également élevé précocement à partir de GD15 dans le groupe LP-CIT.

Ces résultats confirment que la supplémentation en citrulline pendant la gestation atténue le RCIU dans ce modèle murin. Nos résultats montrent que l'efficacité placentaire s'améliore lors de la supplémentation en citrulline à G15. Cet effet pourrait être modulé par IGF2, acteur essentiel de la croissance fœtale et pourrait impliquer l'activation de gènes clés de l'angiogénèse.

6.1.2. Article accepté dans le *Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*



ORIGINAL ARTICLE

## Maternal citrulline supplementation enhances placental function and fetal growth in a rat model of IUGR: involvement of insulin-like growth factor 2 and angiogenic factors

Nhat-Thang Tran<sup>1,2,3</sup>, Valerie Amarger<sup>1</sup>, Aurelie Bourdon<sup>1</sup>, Emilie Misbert<sup>2</sup>, Isabelle Grit<sup>1</sup>, Norbert Winer<sup>1,2</sup>, and Dominique Darmaun<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>UMR PHAN, INRA, & Université de Nantes, IMAD, CRNH-Ouest, Nantes, France, <sup>2</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, CHU de Nantes, Nantes, France, <sup>3</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh City, Vietnam, and <sup>4</sup>Nutrition Support Team, IMAD, CHU de Nantes, Nantes, France

### Abstract

**Objective:** To determine the effects of maternal citrulline supplementation on fetal growth and placental efficiency in a rat model of intrauterine growth restriction (IUGR) induced by maternal protein restriction.

**Methods:** Pregnant Sprague–Dawley rats were randomly assigned to three groups: NP (receiving a control 20% protein diet), LP (a 4% protein diet), or LP-CIT (an LP diet along with L-citrulline, 2 g/kg/d in drinking water). On the 15th and 21st day of gestation (GD15 and GD21, respectively), dams underwent a C-section, by which fetuses and placentas were extracted. The expression of genes involved in placental growth and angiogenesis was studied by quantitative RT-PCR.

**Results:** Maternal citrulline supplementation increased fetal weight at GD21, and fetal weight/placental weight ratio, an index of placental efficiency, from mid gestation ( $p < 0.001$ ). The expression of *Igf2-P0*, a placenta-specific variant of insulin-like growth factor 2 (*Igf2*) gene, and *Vegf* and *Flt-1*, involved in angiogenic pathways, was enhanced in the LP-CIT group (versus NP,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ , and  $p < 0.05$  for *Igf2-P0*, *Vegf*, and *Flt-1*, respectively).

**Conclusions:** In a model of IUGR induced by protein deprivation, citrulline enhances fetal growth, placental efficiency, and the expression of genes involved in angiogenesis. The relevance of such effect in human pregnancies complicated by IUGR warrants further study.

### Keywords

Amino acids, angiogenesis, growth factor, placenta, transporter

### History

Received 23 June 2016

Accepted 18 August 2016

Published online 19 September 2016

### Introduction

Intrauterine growth restriction (IUGR) is a major cause of perinatal mortality and morbidity [1]. Additionally, growing evidence links this condition to the long-term risk of cardiovascular and metabolic disease in adulthood [2]. IUGR most commonly arises from maternal undernutrition in developing countries, and from impaired placentation in developed countries. However, regardless of the mechanism involved, fetal growth restriction results from an imbalance between the placental capacity to supply oxygen and/or nutrients and fetal demand [3]. Clinical trials aimed at increasing placental blood flow through NO-donor administration or angiogenic factor gene therapy (EVERREST Project – NCT02097667) are currently ongoing. Yet manipulation of maternal diet also warrants investigation as an alternative, noninvasive approach. Arginine is the only endogenous precursor of NO, which is thought to improve

placental vascular regulation, and may thus to be helpful in human pregnancies complicated by preeclampsia or IUGR [4]. Unfortunately, clinical trials of arginine supplementation have produced disappointing results in IUGR [5]. Increased arginine degradation by liver arginase or placental arginase and/or increased concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA), a competing analog of L-arginine, are observed in human IUGR [6,7], and may account for such lack of efficacy. Citrulline, a nonprotein amino acid that is virtually absent from regular diet, is a precursor of arginine, and is an attractive alternative nutrient as it escapes liver metabolism, has high bioavailability, and is quantitatively converted to arginine *in vivo* [8]. In a recent study, we showed that this amino acid improves fetal growth in an animal model of IUGR induced by maternal dietary protein restriction [9]. The mechanisms, however, remain to be identified particularly regarding placental changes since increased NO production, hence a possible NO-regulated angiogenesis as well, was found to be involved. The objectives of the current study therefore were to determine whether citrulline started early in gestation enhances the angiogenic pathways in placenta, and

hence prevents fetal growth restriction. To our knowledge, the current study is first to address the time-dependent effects of citrulline on placental function over the course of gestation.

## Methods

### Materials

Citrulline was purchased from Inresa (Bartenheim, France), and the drinking solution was prepared three times/week using deionized water, and then stored at 4 °C until use.

### Experimental design

All procedures were carried out in accordance with current institutional guidelines on animal experimentation in France with the approval of the animal Ethics Committee of Pays de La Loire (Protocol number CEEA.2010.8).

Pregnant Sprague–Dawley rats were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest Saint Isle, France). Delivered to our animal facilities on the 1st gestational day (GD1), they were individually housed under controlled conditions (22 °C, 12:12-h dark–light cycle) and had free access to an adequate protein diet (NP, 20% protein) or an isoenergetic, low protein diet (4% protein). Diets were customized and provided by Arie Block BV (Woerden, The Netherlands). Pellet intake was recorded daily. On GD2, dams of the low protein group were randomized to be supplemented or not by citrulline-enriched water. Drink intake was monitored daily so as to ensure citrulline was administered orally at a dose of 2 g/kg/d. They all had free access to additional water besides.

On gestational day 15 or 21 (GD15 or GD21, respectively), dams (3–4 rats/diet/gestational day) were anesthetized with iso-fluorane and then underwent a cesarean section. Fetuses and placentas were weighed individually. Placentas were harvested, rapidly rinsed in cold 0.9% NaCl solution, then snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until further analysis, or fixed in 4% paraformaldehyde for 48 h before being embedded in paraffin.

### Real-time quantitative PCR

Total mRNA was purified from 30 mg-placental samples (whole thickness section) ( $n = 9–12$ /diet/gestational day) using the RNA isolation kit (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel, Germany) following the manufacturer's instruction. The RNA was quantified using the Nanovue spectrophotometer (GE Health Care, France), and its integrity was confirmed by agarose gel electrophoresis. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 µg of mRNA using random hexamers (Promega) and the M-MLV reverse transcriptase (Promega).

The relative expression of mRNA transcripts was measured by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Two reference genes were used as internal control, *Gapdh*, and *Ywhaz*. They were chosen and validated using the Genorm® Software (<https://genorm.cmgg.be/>).

A dissociation melt curve analysis was performed to demonstrate amplicon homogeneity. The reaction mix for qRT-PCR consisted of 7 µl of 1 SYBR Green (Biorad®), 1.5 µl of each primers (2.5 mM), and 5 µl of 1/40 diluted cDNA.

A negative control was included for each primer pair. mRNA expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [10]. Control group values were used as calibrator.

### Placental morphologic analysis

Paraffin-embedded placentas were cut into 6 µm-thickness sections. Placentas were stained with hematoxylin and eosin for general morphology. The central third part was identified by the presence of maternal artery channel as described elsewhere [11]. The thickness of each individual zone, namely labyrinthine and junctional spongiotrophoblast zones (LZ and SZ, respectively), was measured by tracing perpendicularly to the fetal side with the aid of the NanoZoomer Digital Pathology System (Hamamatsu, Japan).

### Statistical methods

Data are expressed as means ± SEM. Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney *U* test were used for between groups comparison. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0® (San Diego, CA), and results were considered significant if *p* values was <0.05.

## Results

As expected, at 15 days of gestation, no effect of maternal dietary protein restriction on fetal weight was detected. Yet the low protein diet (LP) resulted in IUGR with a 9.1% decrease in fetal weight near term (at day 21), in comparison with NP ( $p < 0.01$ ). Citrulline administration increased fetal weight by 4%, compared with LP at day 21 ( $p < 0.01$ ) (Figure 1A, see Table 1 in Supplemental online material for more details).

The ratio of fetal mass to placental mass (FPR) is commonly used as an index of placental efficiency [12]. At day 15, a significant increase in FPR was found in both restricted groups, and the rise was further enhanced in the group receiving citrulline, compared with the unsupplemented group (Figure 1B). Nonetheless, this effect was sustained throughout gestation only in LP-CIT group (LP-CIT versus LP,  $p < 0.001$ ) (Figure 1C). The surface area for maternal-fetal exchange was estimated by the thickness of LZ, as described in ‘‘Methods’’ section. It was significantly reduced in the LP group and simultaneously enhanced in the LP-CIT group by the end of gestation (Figure 1D).

The expression of *Igf2* gene was measured on GD15 and GD21. Maternal protein restriction did not alter the expression of total *Igf2* on GD15, but enhanced its expression on GD21 (LP versus NP,  $p < 0.01$ ) (Figure 2A and B). Noteworthy, there was a trend toward enhanced transcription of *Igf2* on GD15 (LP-CIT versus NP,  $p = 0.0502$ ) and the rise achieved significance at the end of gestation with citrulline administration (LP-CIT versus LP,  $p < 0.01$ ) (Figure 2B). We studied the P0 transcript of *Igf2*, a variant that is exclusively expressed in the LZ of murine placenta [13]. This transcript was overexpressed early from mid gestation through the end of gestation with citrulline ( $p < 0.001$ ), whereas the rise in expression was only significant by the end of gestation in LP group (Figure 2C and D). The genes *Igf1r* (Insulin-like growth factor 1 receptor) and *Igf2r* (Insulin-like growth factor 2

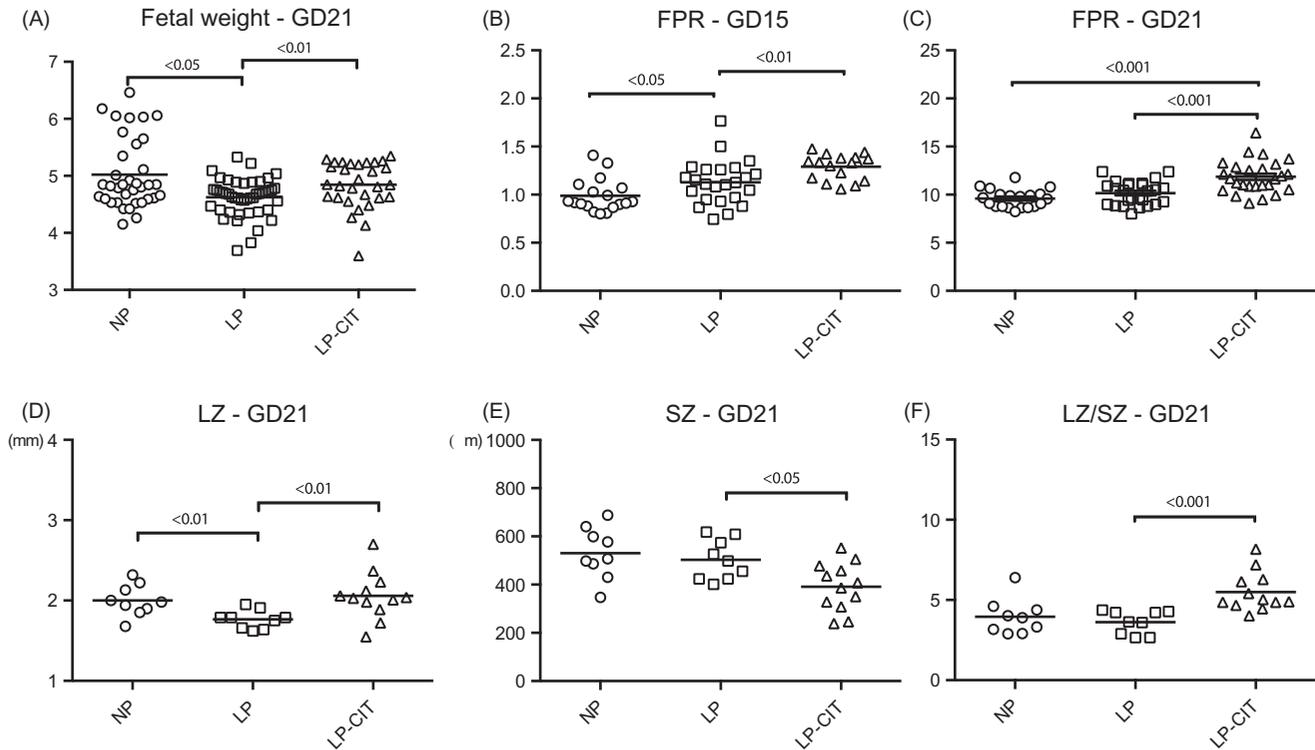


Figure 1. Fetal weight (A), placental efficiency (B and C), defined by the Fetal Placenta Ratio (FPR = fetal mass/placenta mass), and morphology, defined by the thickness of the labyrinthine zone-LZ (D) and the junctional-spongiotrophoblast zone-SZ (E), and the LZ/SZ ratio (F) at gestational days 15 (GD15) or 21 (GD21).

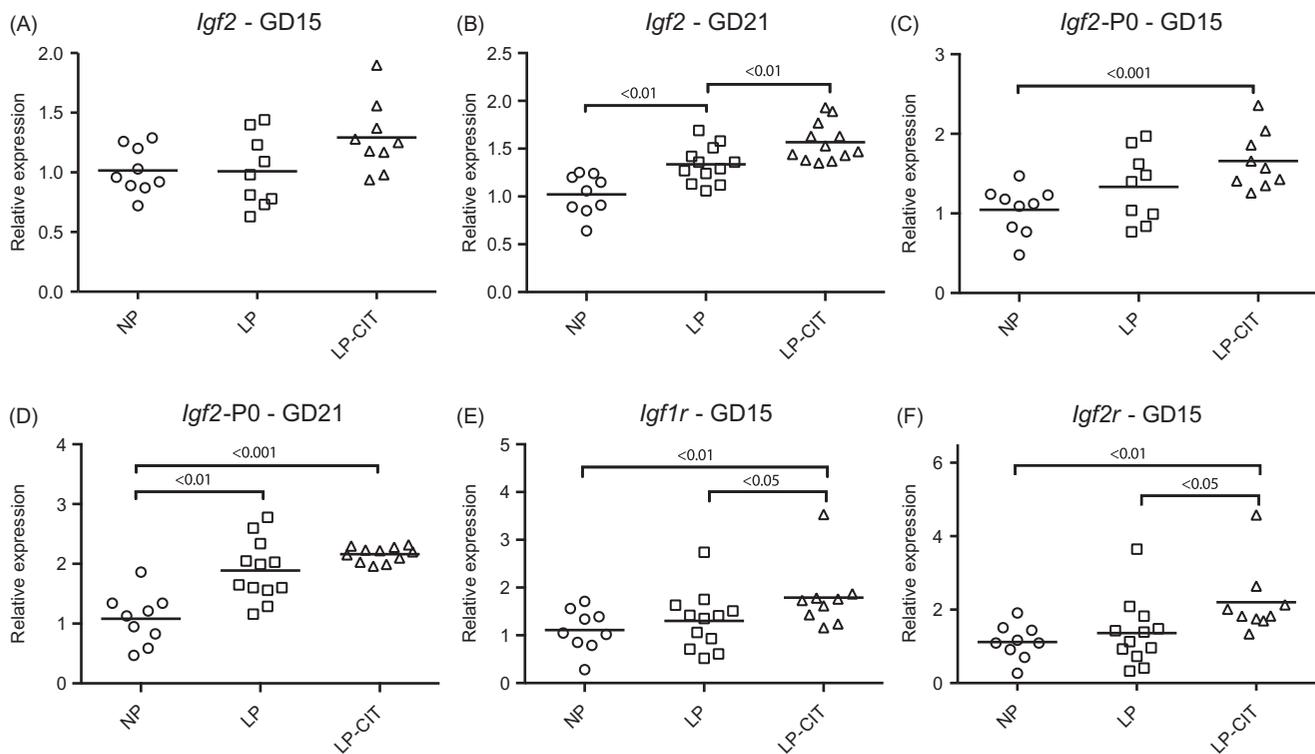


Figure 2. Relative expression level of the *Igf2* (A and B), *Igf2-P0* (C and D), *Igf1r* (E), and *Igf2r* (F) genes in placenta at gestational days 15 (GD15) or 21 (GD21).

receptor) were significantly more expressed in LP-CIT than in LP group on GD15 (Figure 2E and F).

Because angiogenesis contributes to the development of placental vascular system in LZ, we studied the expression of

the gene encoding Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptor Flt-1 (FMS-related tyrosine kinase 1) on GD15. The transcription of both genes was significantly enhanced in the group receiving citrulline (Figure 3A and B).

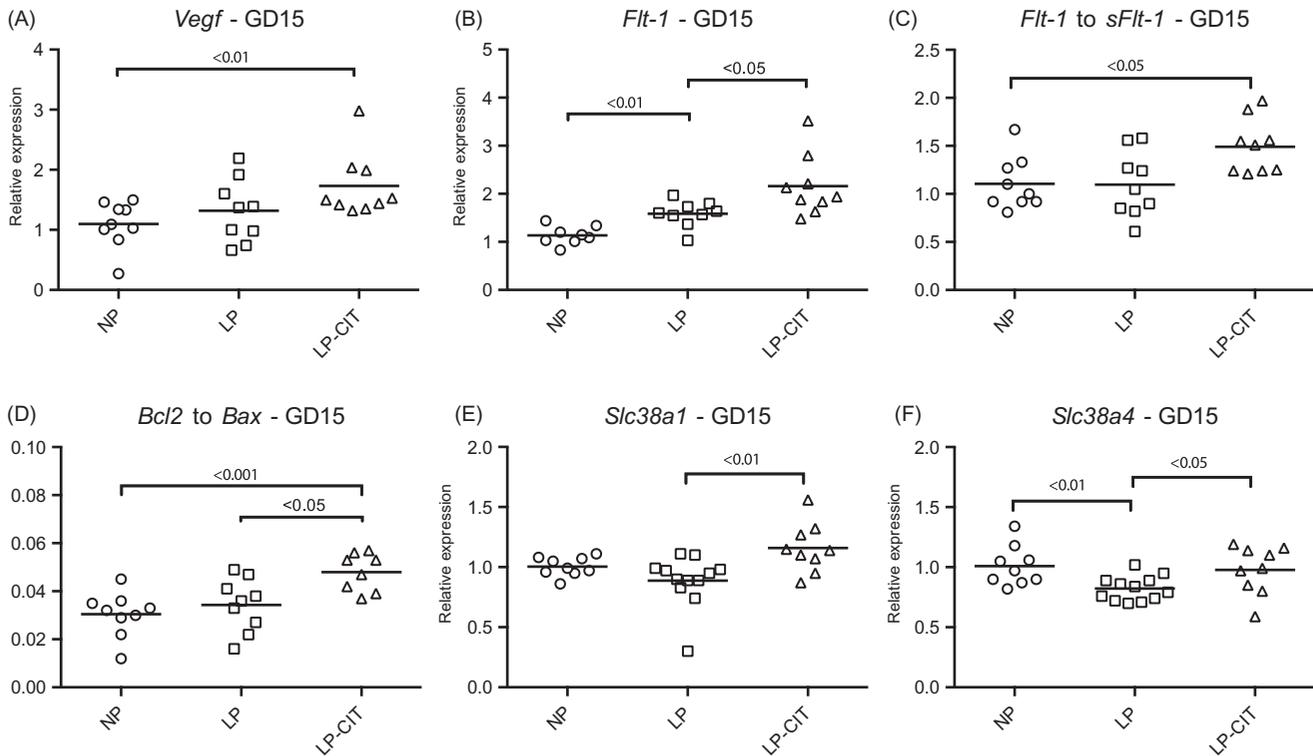


Figure 3. Relative expression level of the *Vegf* (A) and *Flt1* (B) genes in placenta at gestational day 15 (GD15). Ratio of the relative expression levels of the *Flt1*/*sFlt1* (C) and *Bcl2*/*Bax* (D) genes. Relative expression level of the *Slc38a1* (E) and *Slc38a4* (F) genes in placenta at gestational day 15 (GD15).

We designed the primers in order to separately estimate the mRNA level of two distinct variants: *Flt-1* and soluble VEGFR-1 (*sFlt-1*). The relative expression of *sFlt-1* was reduced in LP-CIT, in comparison with NP ( $p < 0.05$ ) (Figure 3C).

The activation of either growth factor or angiogenesis pathway might involve the trophoblast apoptotic state. The *Bcl2* (B-cell CLL/lymphoma 2) and *Bax* (Bcl2-associated X protein) genes encode antiapoptotic and proapoptotic regulators, respectively, and their transcription level was studied on GD15. *Bcl2*/*Bax* ratio transcription level was found to be enhanced in LP-CIT (Figure 3D).

The *Igf2*-P0 transcript was proven to be a mediator of placental adaptive responses in case of undernutrition through modifications in System A placental amino acid transporters (SNAT1 and SNAT4) [14] encoded by the genes *Slc38a1* and *Slc38a4*, respectively. These two genes were overexpressed in the LP-CIT group at GD15 (Figure 3E and F); however, such effect was no longer detected on GD21 (Figure 4A and B in Supplemental online material).

## Discussion

### Main findings

In recent studies, we demonstrated that maternal dietary citrulline supplementation enhanced fetal growth in an animal model of IUGR [9]. The current study not only confirms the benefit of citrulline supplementation on fetal growth but also demonstrates that citrulline supplementation impacts the expression of placental genes playing a key role

in placental growth, angiogenesis, and maternal–fetal nutrient exchange.

### Impact of citrulline supplementation on placental *Igf2* expression

In the current study, the upregulation of placental *IGF2* was observed in dams receiving citrulline supplementation. In rodents, *Igf2*-P0 is expressed exclusively in trophoblast cells of LZ where maternal–fetal exchange takes place [13]. In our study, P0 transcript was upregulated early (on GD15) and maintained throughout gestation in dams receiving citrulline. Such increase may account for the increased LZ surface area found on GD21 in LP-CIT.

The role of *Igf2*-P0 was clearly established by deleting or partially inactivating its transcription in mouse placenta [14]. Deficient *Igf2*-P0 transcription impairs the growth of placenta, several days before it impacts fetal growth [15], suggesting *Igf2*-P0 plays a significant role under conditions of malnutrition, but this effect may operate only over a limited time window, mainly in early and mid-gestation, the critical stages of placental development. Though upregulation of nutrient transporters has been observed, *Igf2*-P0 null placentas show a lesser surface area for exchange and a thicker barrier between the maternal and fetal vessels in the labyrinthine zone compared to their wild-type counterparts [16].

In our study, we found a trend toward upregulation of *Igf2*-P0 transcription throughout gestation in dams fed an LP diet, but the rise was significant as early as GD15 only in dams

receiving citrulline. The rise in *Igf2*-P0 was accompanied by a decrease in *Slc38a1* and *Slc38a4* expression at mid gestation; however, this diminution was effectively corrected with citrulline as demonstrated in our results. Such finding suggests early and timely administration of citrulline may interact with the adaptation of placenta to undernutrition, trigger the adaptive transport by system A, and enhance the growth of fetuses born from undernourished dams. In fact, in our restricted dams supplemented with citrulline, we observed enhanced expression of *Slc38a1* and *Slc38a4* but this was limited to GD15, which underlines the time-dependent impact of *Igf2*-P0 transcript on the SNAT transporter system.

Alternatively, because citrulline is transported by system A, the ability of citrulline to increase SNAT activity may enhance local citrulline availability, and thereby stimulate its target, i.e. endothelial NOS/NO machinery, in arterial endothelial cells [17]. It is noteworthy that *eNOS* transcription was enhanced in LP-Cit without a significant change in *iNOS* mRNA level on GD15 in the present study (data not shown). Since *eNOS*-derived NO can strongly induce the *iNOS* expression under some circumstances [18], this finding suggests that citrulline administration may not activate *iNOS*, thus avoiding the harmful effects of excess NO production associated with inflammatory response.

### Implication of *Igf2* in placental angiogenesis

The present study suggests the effect of citrulline supplementation may involve improved establishment of placental vascular network. In fact, our study suggests that the placental adaptation to low protein diet could be mediated through IGFII, and might induce the expression of genes in VEGF pathway, as *Vegf* and *Flt-1* m-RNA transcription was substantially increased. Indeed, VEGF is known to be a trigger for early vasculogenesis and an important regulator of angiogenesis in placental vascular growth [19]. This ligand exerts its multiple biologic effects through its interaction with two receptor tyrosine kinases, Flt-1 (VEGF receptor 1, VEGFR-1) and KDR (VEGF receptor 2, VEGFR-2). Flt-1 is required for endothelial morphogenesis, whereas VEGFR-2 is involved primarily in mitogenesis [20]. We measured the expression of both *Flt-1* and *sFlt-1*, the latter encoding a soluble variant known to be an endogenous inhibitor of VEGFR-1 [21]. There was a trend toward an increased *Flt-1* to *sFlt-1* ratio ( $p=0.07$ , LP versus LP-CIT). In other models of preeclampsia/IUGR induced by hypoxia or ischemia, *sFlt-1* production is known to be clearly increased [22]. As our model did not involve hypoxia, we speculate that this may reflect an adaptive response of placenta to undernutrition, designed to prioritize angiogenesis rather than placental growth. Citrulline-supplementation predominantly affected functional receptor (*Flt-1*) expression so citrulline may improve the efficacy in adaptive responses to the low protein diet.

In the present study, the enhanced expression of *Igf2* and its receptors, especially *Igf2r*, may be linked to the simultaneous increased transcription of VEGF and Flt-1, especially in the absence of a hypoxic trigger. Indeed, Herr et al. showed that IGFII regulates placental growth by promoting endothelial cell migration and uterine vessel formation under

physiological conditions, *in vitro* and *in vivo* [23]. Interestingly, the expression of *Igf1r* and *Igf2r* was enhanced on GD15 only in LP-CIT. This finding is in accordance with our initial hypothesis whereby citrulline administration may enhance the ability of placenta to survive under adverse nutritional conditions, and this ability is mediated through IGFII, its placental variant, and their receptors.

A crosstalk between VEGF and Bcl2 has been demonstrated by several *in vitro* studies. The addition of VEGF to serum-starved human umbilical vein endothelial (HUVE) cells enhanced the expression of Bcl2 after 36 h [24]. Interestingly, HUVE cells grown in standard 10% fetal calf serum did not respond to VEGF stimulation. Early dietary protein restriction in pregnant rats was found to blunt the vasodilatory effect of VEGF on uterine artery [25]. In such setting, the significant rise in *Flt-1* transcription we observed in LP-CIT (versus LP), in combination with the enhanced induction of *Bcl2* and increased LZ thickness, suggests that citrulline improved the efficacy of VEGF pathway. The underlying mechanisms warrant further investigation.

Finally, the current findings raise two intriguing questions. First, is the effect observed on placental gene expression specific for citrulline? Even though no placebo was tested in the current study, the effect of citrulline is unlikely to be due to nitrogen supply *per se*, since supplementation of pregnant rats with an isonitrogenous mix of nonessential amino acids failed to improve fetal growth [9]. Second, is the effect of citrulline relevant to human pregnancies affected by IUGR? The experimental model used likely is relevant for the IUGR observed in the developing world, where >30 million infants are born with IUGR yearly as a consequence of maternal undernutrition [1]. In contrast, alterations in placental blood flow and preeclampsia are the leading causes of IUGR in Western societies. However, literature evidence suggests that both settings share similarities. Protein restriction or maternal undernutrition reduce placental blood flow in pregnant ewes and rodents [26], and impair vasodilation in uterine arteries in pregnant rats [25]. Similarly, impaired placental transport of amino acids has been found to precede growth alterations in a rat model of IUGR induced by low protein diet [27], implying decreased amino acid transport may be a cause, rather than a consequence of IUGR in that model. As mentioned above, alterations in placental amino acid transport have been documented in human IUGR of vascular origin [28]. Such evidence collectively argues for the potential relevance of the experimental model used in the current study for human IUGR. In addition, the recent trial of citrulline supplementation by Powers et al. in obese pregnant women did not mention any adverse outcomes [29]. The latter trial was also the sole clinical trial to date published regarding citrulline supplementation in pregnancy, and showed a significant decrease of uterine pulse index, which reflected improved placentation.

### Conclusion

In summary, the current report confirms maternal oral supplementation with citrulline enhances fetal growth and placental efficiency in a rat model of IUGR induced by a low protein diet. Our findings furthermore support the hypothesis

that citrulline ameliorates placental adaptation by enhancing the expression of *Igf2*, and the expression of pivotal genes for placental angiogenesis and survival. The putative benefit of dietary citrulline supplementation in human pregnancies with IUGR would clearly warrant investigation.

### Acknowledgements

We thank Guillaume Poupeau and Vincent Dochez for their help with surgical procedures, Myriam Robard and her technicians for their staining procedure of placentas.

N.-T.T., A.B., N.W. and D.D. designed the research; N.-T.T., A.B., V.A., E.M. and I.G. conducted the experiments; N.-T.T., V.A. and D.D. wrote the article; N.W. and D.D. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

### Declaration of interest

None of the authors had any conflict of interest. N.-T.T. received fellowship grants from SFNEP (French Society for Clinical Nutrition and Metabolism), Nestlé-SFP (French Society of Pediatrics), and SanTDige Foundation. This research was funded, in part, by a 3ARP prize from Ajinomoto (to D.D.).

### References

- Katz J, Lee AC, Kozuki N, et al. Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle-income countries: a pooled country analysis. *Lancet* 2013;382:417–25.
- Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol* 2006;49:270–83.
- Sibley CP, Brownbill P, Dilworth M, Glazier JD. Review: adaptation in placental nutrient supply to meet fetal growth demand: implications for programming. *Placenta* 2010;31:S70–4.
- Dorniak-Wall T, Grivell RM, Dekker GA, et al. The role of L-arginine in the prevention and treatment of pre-eclampsia: a systematic review of randomised trials. *J Human Hypertens* 2014; 28:230–5.
- Winer N, Branger B, Azria E, et al. L-Arginine treatment for severe vascular fetal intrauterine growth restriction: a randomized double-blind controlled trial. *Clin Nutr* 2009;28:243–8.
- Krause BJ, Carrasco-Wong I, Caniuguir A, et al. Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels. *Placenta* 2013;34:20–8.
- Laskowska M, Laskowska K, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. Asymmetric dimethylarginine in normotensive pregnant women with isolated fetal intrauterine growth restriction: a comparison with preeclamptic women with and without intrauterine growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011;24:936–42.
- Curis E, Nicolis I, Moinard C, et al. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids* 2005;29:177–205.
- Bourdon A, Parnet P, Nowak C, et al. L-Citrulline supplementation enhances fetal growth and protein synthesis in rats with intrauterine growth restriction. *J Nutr* 2016;146:532–41.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, et al. Toxicological pathology in the rat placenta. *J Toxicol Pathol* 2011;24:95–111.

- Fowden AL, Sferruzzi-Perri AN, Coan PM, et al. Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. *J Physiol (Lond)* 2009;587:3459–72.
- Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta* 2002;23:3–19.
- Sferruzzi-Perri AN, Vaughan OR, Coan PM, et al. Placental-specific Igf2 deficiency alters developmental adaptations to under-nutrition in mice. *Endocrinology* 2011;152:3202–12.
- Constancia M, Angiolini E, Sandovici I, et al. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:19219–24.
- Coan PM, Fowden AL, Constancia M, et al. Disproportional effects of Igf2 knockout on placental morphology and diffusional exchange characteristics in the mouse. *J Physiol (Lond)* 2008; 586:5023–32.
- Dikalova A, Fagiana A, Aschner JL, et al. Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1 (SNAT1) modulates L-citrulline transport and nitric oxide (NO) signaling in piglet pulmonary arterial endothelial cells. *PLoS One* 2014;9:e85730.
- Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, et al. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem* 2003;278: 26480–7.
- Demir R, Kayisli UA, Seval Y, et al. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2004;25:560–72.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66–70.
- Ahmad S, Hewett PW, Al-Ani B, et al. Autocrine activity of soluble Flt-1 controls endothelial cell function and angiogenesis. *Vasc Cell* 2011;3:15.
- Tal R, Shaish A, Barshack I, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression in pregnant mice: possible implications for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol* 2010;177:2950–62.
- Herr F, Liang OD, Herrero J, et al. Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4811–17.
- Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:13313–16.
- Itoh S, Brawley L, Wheeler T, et al. Vasodilation to vascular endothelial growth factor in the uterine artery of the pregnant rat is blunted by low dietary protein intake. *Pediatr Res* 2002;51: 485–91.
- Rutland CS, Latunde-Dada AO, Thorpe A, et al. Effect of gestational nutrition on vascular integrity in the murine placenta. *Placenta* 2007;28:734–42.
- Jansson N. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. *J Physiol (Lond)* 2006;576:935–46.
- Glazier JD, Cetin I, Perugino G, et al. Association between the activity of the system A amino acid transporter in the microvillous plasma membrane of the human placenta and severity of fetal compromise in intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 1997;42: 514–19.
- Powers R, Weissgerber TL, McGonigal S, et al. [7-or]-L-Citrulline administration increases the arginine/ADMA ratio, decreases blood pressure and improves vascular function in obese pregnant women. *Pregn Hypertens* 2015;5:4.

## 6.2. Phase postnatale : Article en cours de développement sous le titre « *Does neonatal citrulline supplementation affect growth and metabolism in rats receiving a high fructose diet?* »

### 6.2.1. Résumé

Un faible poids de naissance traduit, dans la majorité des cas, un retard de croissance intra-utérin (RCIU), et augmente non seulement la mortalité périnatale, mais aussi le risque de survenue d'un « syndrome métabolique » une fois atteint l'âge adulte. Nous avons précédemment confirmé qu'une supplémentation prénatale en citrulline stimule la croissance fœtale dans un modèle expérimental de RCIU. Néanmoins, le rôle de cette molécule dans la prévention d'un effet « programmation fœtale » chez des descendantes n'est pas encore étudié. La prolongation de cette supplémentation après la gestation et durant la période d'allaitement a été très peu étudiée dans la littérature, et seulement dans d'autres modèles de « programmation fœtale » (hypertension artérielle induite par l'administration maternelle de L-NAME ou dexaméthasone) (Tain, 2015; Tain, 2014b).

Par ailleurs, des données épidémiologiques suggèrent qu'une alimentation riche en fructose accroît le risque de SMet chez l'homme. Chez l'animal adulte, un régime riche en fructose entraîne une résistance à l'insuline et une hypertension artérielle chez le rat adulte, mais une supplémentation en arginine, est capable de prévenir la résistance à l'insuline induite par ce régime. Or la citrulline est connue pour être un excellent précurseur d'arginine par sa conversion importante en arginine dans le rein. Ainsi la supplémentation en citrulline pourrait elle être intéressante à considérer en période postnatale chez des rats nés avec un RCIU et exposés au risque de syndrome métabolique.

Contrairement à cette hypothèse de travail, les résultats que nous avons obtenus et qui sont exposés dans cet article montrent qu'une supplémentation précoce en période périnatale par gavage oral en citrulline ne serait pas justifiée à court terme puisqu'elle n'a pas d'effet sur la croissance des rats nouveau-nés RCIU pendant la lactation. De plus, à long terme, chez ces animaux supplémentés en citrulline durant la lactation et qui sont soumis ultérieure-

ment à un régime riche en fructose, le métabolisme lipidique au niveau hépatique montre un profil distinct qui incite à la vigilance.

6.2.2. Article en préparation pour soumission à *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* :

# **Neonatal citrulline supplementation, early growth, and metabolism at adulthood: a pilot study in rats born with low birth weight and exposed to high fructose diet after weaning**

Nhat-Thang Tran<sup>1,2</sup>, Marie-Cécile Alexandre-Gouabau<sup>1</sup>, Anthony Pagniez<sup>1</sup>, Khadija Ougueram<sup>1</sup>, Clair-Yves Boquien<sup>1</sup>, Norbert Winer<sup>1,2</sup>, Dominique Darmaun<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 1280, Physiology of Nutritional Adaptations, University of Nantes, IMAD, and CRNH-Ouest, Nantes, France

<sup>2</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, Centre Hospitalier Universitaire Hotel-Dieu, Nantes, France

<sup>3</sup>Nutrition Support Team, IMAD, University Medical Center of Nantes, France

Short running title: Long term impact of neonatal citrulline

## ABSTRACT (250 words)

Intrauterine growth restriction (IUGR) exposes to a higher risk of metabolic syndrome in adulthood. In earlier studies, maternal citrulline supplementation enhanced fetal growth in a rat model of IUGR, and literature suggests citrulline supplementation in adulthood prevents the effect of high fructose diet on energy metabolism. Little is known about the impact of early postnatal citrulline supplementation on growth or adult energy metabolism in rats born with IUGR. This study was therefore aimed at determining whether postnatal oral citrulline supplementation would affect early growth and energy metabolism in the long term. IUGR pups born to dams fed a low (4%) protein diet, were nursed by normally-fed dams and received isonitrogenous supplements of either L-citrulline or L-alanine by gavage from the 6<sup>th</sup> day of life until weaning. From weaning to 90 days of age, rats were exposed to 10%-fructose in drinking water, and an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed on the 70<sup>th</sup> day (PND70). Rats were sacrificed on the 90<sup>th</sup> day of life (PND90). Pre-weaning citrulline supplementation failed to alter growth trajectory, baseline blood glucose, plasma triglycerides, OGTT at PND70, or fat mass accretion at PND90. Adult rats that had received citrulline in early life, however, displayed increased liver triglycerides, decreased liver total cholesterols, and a distinct liver lipidomic profile that may predispose to liver disease. These results suggest pre-weaning supplementation with citrulline did not impact early growth in a model of severe IUGR. They further suggest that the nature of an amino acid supplement received in early life might impact fat metabolism in adulthood.

Key words: developmental origins of health and disease (DOHaD); amino acids; metabolic syndrome

## INTRODUCTION

Intrauterine growth restriction (IUGR), defined as a birth weight below the 10<sup>th</sup> percentile for gestational age, is not only a leading cause of perinatal mortality,<sup>1</sup> but also a risk factor for the subsequent development of chronic disease such as obesity, type-2 diabetes, and cardiovascular disease in the future adult.<sup>2</sup>

On the other hand, excess dietary fructose intake has long been suspected to favor body fat accretion in humans. A recent meta-analysis concludes that prolonged exposure to high fructose intake is associated with elevation of fasting plasma glucose and triglycerides and blood pressure in humans.<sup>3</sup> Accordingly, a high fructose diet is associated with increased lipogenesis, insulin resistance, and hypertension in adult rats.<sup>4</sup>

In the last decade, arginine, a semi-essential amino acid that is the sole endogenous precursor of nitric oxide (NO), was shown to impact both protein anabolism and energy metabolism. For instance, arginine supplementation was found to prevent excess weight gain and improve glucose tolerance in genetically obese rats,<sup>5</sup> as well as rats fed a Western diet.<sup>6</sup> Increased endothelial nitric-oxide synthase expression reduced hypertension and hyperinsulinemia in fructose-fed rats<sup>7</sup>. Inhibition of arginase, the main enzyme accounting for arginine disposal, alleviated the hypertension produced by high fructose intake in rats,<sup>8</sup> and long-term oral L-arginine administration improved peripheral and hepatic insulin sensitivity in humans with type-2 diabetes.<sup>9</sup>

Citrulline, a non-essential amino acid that is not incorporated into protein, is produced in small intestine.<sup>10</sup> Contrary to arginine, citrulline, whether endogenous or exogenous, escapes splanchnic uptake, and is taken up by kidney where it is converted to arginine.<sup>11</sup> Accordingly, oral citrulline was shown to be an attractive alternative to arginine since oral citrulline enhanced arginine bioavailability in both adult humans,<sup>12</sup> and pregnant rats.<sup>13</sup> Moreover, recent

work suggests citrulline supplementation may prevent liver fat accretion in a model of non-alcoholic fatty acid liver disease (NFALD) induced either by high fructose intake<sup>14</sup> or Western diet<sup>15</sup> in adult rodents.

Finally, in a recent study, we demonstrated that oral citrulline supplementation during gestation enhanced fetal growth and protein anabolism in a model of IUGR induced by dietary protein restriction in pregnant rats.<sup>16</sup> To our knowledge, whether postnatal citrulline supplementation impacts growth or glucose metabolism in IUGR is not known.

The objective of the current study therefore was to determine whether postnatal oral citrulline supplementation affected (1) early growth before weaning; and (2) fat mass accretion and glucose tolerance in adulthood when rats born with IUGR received were exposed to a high fructose diet after weaning.

## METHODS

*Experimental design.* All procedures were carried out in accordance with current institutional guidelines on animal experimentation in France and approved by the Animal Ethics Committee of Pays de La Loire (Protocol number *CEEA.2010.8*). Female Sprague-Dawley rats weighing 200 to 250 g were purchased from Janvier® (Le Genest Saint Isle, France), and delivered to our facility on gestational day 1 (GD1). After the first day of acclimation, they were randomized to receive either a standard diet (NP; n=4), or a low protein (LP; n=8) chow diet containing 4% protein. Dams were housed individually in a room kept at the constant temperature of  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  with a fixed 12 h light–dark cycle, and were allowed free access to the experimental chow and drinking water during the entire gestation. Pups were not weighed immediately at birth (PND1) to prevent maternal stress, which could lead to a rejection, even cannibalism. On day 2 (PND2), pups born to NP dams and female pups born to LP dams were discarded, and male pups born to LP mothers were fostered by the NP mothers until weaning, with a standardized litter size of 8-pups per dam. The male offspring were also randomly assigned to two groups (n=14/group) to receive by oral daily gavage either L-Citrulline (2g/kg/d) or an isonitrogenous amount of L-Alanine (3g/kg/d) starting on day 6 of life and continued until weaning. After weaning, drinking water was replaced for 8 weeks with a 10% fructose solution (w/v) in both groups (Fig 1). Fresh solution was prepared daily and drinking containers were cleansed every other day. Food and fluid intake, and rat body weight were recorded every week. At 70 days of age (PND70), rats were submitted to an oral glucose tolerance test. At the end of the study (90 days of age-PND90), and after an overnight fast, blood was sampled from a tail vein under light anesthesia with isoflurane. Blood glucose was performed with Accu-check® reagent strips, then additional blood was collected into EDTA tubes. Finally rats were sacrificed by cervical dislocation. Liver and adipose tissue were dis-

sected and stored. Plasma was separated by a 10-min centrifugation at 4000 rpm and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

*Biochemical measures.* Plasma hepatic transaminases, triglycerides and HDL cholesterol levels were determined by using appropriate enzymatic assay kits (Roche Cobas®). Plasma insulin levels were measured using a kit purchased from Milipore® according to recommendations from manufacturer's instructions.

Liver triglycerides and total cholesterol levels were determined by using DiaSys kit (Diagnostic System, Grabels, France) following a preliminary organic phase extraction according to Bligh & Dyer's method.<sup>17</sup> Briefly, 50  $\mu\text{g}$  of liver samples were crushed with 500  $\mu\text{L}$  of 150mM sodium chloride. Then 150  $\mu\text{L}$  of liver homogenates were extracted with 600  $\mu\text{L}$  of a methanol-chloroform mixture (1:1, v/v). The organic layers were collected after centrifugation (10,000g for 10 min) and dried under nitrogen. Dry samples were reconstituted in 37.5  $\mu\text{L}$  of isopropanol/acetonitrile/water mixture (2:1:1, v:v:v) and 10  $\mu\text{L}$  were analyzed according to the manufacturer recommendations.

*Non-targeted liver phenotyping by using liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry*

Liver samples of PND90 rats were extracted as described above. Dried organic layers were reconstituted in 400  $\mu\text{L}$  of isopropanol/acetonitrile/water mixture and then 10  $\mu\text{L}$  were injected into the LC-MSE system (a Waters Acquity H-Class® UPLC-Synapt G2 HDMS) on an Acquity UPLC CSH C18 1.7  $\mu\text{m}$ , 100  $\times$  2.1mm reverse-phase column (Waters). Electrospray ionization (ESI) was used in a  $m/z$  range from 100 to 1,200 in both positive and negative modes. Lipidomic data were processed, using the open-source XCMS® (Accessible at <http://metlin.scripps.edu/xcms/>) and all the [ $m/z$ ;RT] features were manually checked for the quality of their integration on liquid chromatogram and their validity in quality controls

(CV<30%). Among 6701 [m/z;RT] features detected in positive mode and 3741 in negative mode, only 2747 and 671 features respectively met both of the criteria cited above. Annotation of the generated lipidomic profiles and subsequent identification of putative biomarkers of interest were achieved using an in-house reference databank.<sup>18</sup>

#### *RNA isolation and Real time RT-PCR*

Total RNA was extracted from aliquots of  $\approx$ 30-mg aliquots of frozen liver in PND90 rats using an RNA isolation kit (NucleoSpin RNA®, Macherey-Nagel, Germany) according to manufacturer's instructions. mRNA of genes involved in (1) fatty acid and triglyceride synthesis [fatty acid synthase (FAS)], di- and tri-acylglycerol [acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferases (DGAT1 or DGAT2)], with triacylglycerol synthesized by DGAT1 being preferentially channelled towards oxidation, whereas DGAT2 synthesizes triacylglycerol destined for very low-density lipoprotein assembly, unsaturated fatty acids [stearoyl-CoA desaturase (SCD1)] or cholesterol [3-hydroxy-methyl-glutaryl-CoA-synthase (HMGc1)] synthesis, (2) hepatic cholesterol degradation to bile acids [cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (Cyp7a)] and (3) transcription factors involved in the regulation of lipid synthesis [sterol regulatory element-binding transcription (Srebf1)] or lipid oxidation [peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\alpha$ )], were quantified by real-time RT-PCR. Primers were designed on the basis of the sequences available at the National Center for Biology Information gene bank using the "PerlPrimer" program (v.1.1.17) and synthesized by Eurogentec (San Diego, CA). mRNA expression was calculated as previously described.<sup>19</sup>

*Oral Glucose Tolerance Test.* At the end of the 7<sup>th</sup> post-weaning week (PND70), plasma insulin and glucose concentrations were measured in response to an oral glucose load. On the day before the test (at 9 PM), food was removed in all groups and fructose solution was replaced with regular drinking water. On the morning of the test (at 10 AM), a baseline blood sample

(0 min) was drawn from the tail vein. Each animal then received an oral glucose dose of 1g/kg administered as a 50% (weight/volume) solution by oral gavage. Blood samples were collected at 15, 30, 60, 90 and 120 min after the oral glucose load and Accu-check® was used to determine blood glucose concentration. *Peripheral IS index (ISI) during OGTT (ISI<sub>0,120</sub>)* – an index that was found to be tightly correlated with the insulin sensitivity index determined using the hyperinsulinemic euglycemic clamp<sup>20</sup> – was estimated using the equation:  $ISI_{0,120} = m/MPG/\log(MSI)$ , where MPG is mean plasma glucose concentration (mg/L, mean of the 0 and 120 glucose values from the OGTT), MSI is the mean serum insulin concentration (mU/L, mean of the 0 and 120 insulin values from the OGTT), and m is glucose uptake rate (mg/min), calculated as follows:  $\text{glucose load (mg)} + (0 \text{ min glucose} - 120 \text{ min glucose, mg/L}) \times 0.19 \text{ (glucose space, L)} \times \text{BW (body weight, kg)}/120 \text{ min}$ , as previously described in humans<sup>20</sup> and rats.<sup>21</sup> The area under the curve (AUC) of blood glucose was calculated using Graphpad Prism®.

*Statistical analysis.* Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Differences among nutritional groups were analyzed by the non-parametric Mann-Whitney U-test using Graphpad Prism®, software version 6.0, and a value of  $p < 0.05$  was considered as a significant difference between groups. Principal components analysis (PCA) of LC/MS data was performed using SIMCA software package (version 13.0, Umetrics, Umea, Sweden) in order to visualize any groupings of the generated data set and identify potential atypical or outlier individual data. The susceptibility of hepatic lipidomic phenotypes to citrulline supplementation was assessed by using a supervised method, Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). These PLS-DA models were applied to point out the variables with major influence on the cluster membership. The quality and robustness of the PLS-DA were evaluated by several goodness-of-fit parameters and criteria including:  $R^2(X)$ , the proportion of the total variance of the dependent variables that is explained by the model;  $R^2(Y)$ , defining the proportion of the total

variance of the response variable (i.e. the class of the samples) explained by the model and  $Q^2$ , a seven-round internal cross-validation of the data reflecting the goodness of prediction of the model. A good prediction model is achieved when  $Q^2 > 0.5$ , and if  $Q^2 > 0.9$ , it is regarded as excellent predictive ability. The Variable importance to the projection (VIP) values (VIP above 1.0), by using multivariate PLS-DA, were used to select discriminating metabolites in liver lipidome associated to citrulline supplementation.

For Peer Review

## RESULTS

Post-weaning energy intake was estimated based on daily food and fluid intakes and the caloric values of rat chow (2.8Kcal/g, A03 formula – Safe®) and fructose (4Kcal/g). In the Cit group, there was trend towards increased pellet consumption, but a slight decrease in fluid intake, compared with the Ala group. Overall energy intake did not differ between Cit and Ala groups (Fig 2).

There was no significant difference in body weight during the nursing period, nor after weaning or during the fructose supplementation period through the end of study at PND90 (Fig 3). Notably, there was a high neonatal mortality, but it was comparable in both groups, very likely due to the IGUR induced by profound maternal protein-deprivation: out of total number of 46 male pups on PND2, 28 remainders survived on the day of randomization (PND5) (n=14 in each group) and 8 died due to technique-related incidents during oral gavage so that the data presented arise from a total of 20 adult rats (n = 11 and 9 in Cit and Ala group, respectively).

Blood glucose concentrations during the OGTT and the AUC are shown in Fig 4a. Baseline glucose concentrations (0 min) were comparable in both groups. Blood glucose levels were higher in rats from the Cit group at 15 and 30 min after oral glucose load, but returned to values indistinguishable from the Ala group at 60, 90 and 120 min. The AUC, however, did not differ significantly between the two groups. Insulin sensitivity index, calculated based on blood glucose and serum insulin concentrations at 0 and 120 min, did not differ (Fig 4b).

Plasma TG and HDL cholesterol concentrations were similar in the two groups (Fig 5a and 5b). Unexpectedly, liver TG level was significantly increased ( $p<0.01$ ) and total cholesterol level was lower ( $p<0.001$ ) in Cit rats when compared with Ala rats (Fig 5c and 5c). These findings were observed along with a significant increase in two hepatic transcripts involved in

lipids biosynthesis (Fas and Srebf1) showed by qPCR, besides a significant decrease in the key enzyme involved in cholesterol biosynthesis (HMGc1) (Fig 6).

An exploratory principal component analysis (PCA) analysis of the LC-MS lipidomics data in positive and negative modes was performed. The score plot of the first two PCs, which expressed almost 41% and 86% of the total variability for profiles LC-MS acquired in the positive (Figure 7a) and negative (Figure 7c) modes, respectively, showed a clear differentiation, particularly in negative mode, between the Cit and Ala groups, reflected by a high goodness of fit and predictability as indicated by an R2 value of 0.86 and by a Q2 value of 0.79, in negative mode (Figure 7c). PLS-DA confirmed an equally good clustering of the samples with a high estimated goodness of prediction (Q2 around 85% and 99% for the first 2 components in the positive (Figure 7b) and negative (Figure 7d) mode, respectively) for the effect of early citrulline supplementation on adult lipodomics profiles (Figure 7b and 7c). The analysis of the corresponding loading plot revealed, among 1073 variables (i.e. [m/z;RT] features), 71 features could be annotated with our home database<sup>18</sup> including 42 variables of importance for the clustering (VIP above 1.0) (tableau 2 and supplementary Table 1). More specifically, among the 42 annotated VIP selected for the discrimination of Cit and Ala groups in PLS-DA, 16 VIP presented a significant mean discrepancy between two groups with specificities in several phospholipids (table 2). Indeed, a significant decrease was observed in the Cit group in phosphatidylcholines PC(16:0/16:0) and PC(16:0/18:1) containing saturated palmitic acid but an increase in PC(18:2/20:3). In addition, the Cit group presented a significant enhance, in several phosphatidylethanolamines such as PE(16:0/20:4), PE(18:1/18:3), PE(18:0/20:4) and PE(18:2/20:4) but a trend towards a decrease in PE containing DHA as a fatty acid (i.e. PE(16:0/22:6), PE(18:0/22:6) and PE(18:1/22:6)). Furthermore, the Cit group had higher levels of hepatic phosphatidylinositol PI(16:0/18:2) and phosphatidylserine PS(18:0/20:4) but lower levels of one long-chain sphingomyeline SM(d18:1/24:1) besides no significant change

in total triglycerides and diglycerides that could have been annotated, as compared with the Ala group (tableau 2 and supplementary Table 1, Fig 7).

For Peer Review

## DISCUSSION

### *Oral citrulline administration during lactation period did not alter pre-weaning growth*

To the best of our knowledge, the current study is the first to address the effect of early post-natal citrulline supplementation on pup growth in a model of intrauterine growth restriction. The lack of anabolic effect of citrulline in current study contrasts with the stimulation of fetal growth observed with antenatal maternal citrulline supplementation.<sup>16</sup> As citrulline may exert its effect through citrulline conversion to arginine, our finding also contrasts with the anabolic effect of postnatal arginine in neonatal piglets.<sup>22,23</sup> Such discrepancies may arise from inter-specific differences between rats and pigs. Alternatively, the anabolic effect of arginine supplementation was observed in piglets receiving artificial feeding, whereas pups were nursed and received mother milk in the current study. Moreover, IUGR pups were adopted by normally nourished foster dams in the current study: nursing by normally-fed dams likely produced effective catch-up growth before PND6 regardless of the nature of the supplement administered by oral gavage between day 6 and 22.

### *Oral citrulline administration before weaning may impact on liver lipid metabolism in the long run*

In the current study, citrulline supplementation affected neither fat mass accretion nor plasma triglyceride concentration. This contrasts with previous studies. In adult rats fructose supplementation led to non-alcoholic fat liver disease with significantly higher visceral fat mass, lower lean body mass, insulin resistance, and increased plasma triglycerides.<sup>15</sup> This was corrected by both non-essential amino acids and citrulline supplementation. Similarly, Jegatheesan et al<sup>24</sup> fed 200-g rats for 4 weeks with a 60% fructose diet, with or without 0.15g/d citrulline (approximately 0.75g/kg/d). They observed that fructose supplementation produced liver

steatosis and elevation of plasma triglycerides, without altering glucose tolerance. Citrulline supplementation prevented hypertriglyceridemia and attenuated liver fat accumulation.

Differences in study design could account for this discrepancy. Firstly, much higher amounts of dietary fructose were given in earlier studies: fructose accounted for 60% of diet in the earlier studies so protein intake might have been decreased in the fructose-supplemented rats. In contrast, in the current study, rats were fed an adequate protein diet, along with 10% fructose in drinking water, as the rationale was to mimic a normal diet associated with soft drink ingestion in humans. Secondly, in the current study citrulline or alanine were given only in the pre-weaning period, whereas none was given along with fructose after weaning, as the purpose of the current study was to address the long-term, rather than the immediate effect of citrulline supplementation. Thirdly, in earlier studies, non-essential amino acids were shown to mimic some of the metabolic effects of citrulline: so the alanine-enriched drinking water used in the current study may produce effects similar to those of citrulline. Finally, a clear limitation of the current study is the lack of a control group receiving unsupplemented drinking water, so the effect of fructose on metabolism cannot be ascertained from the current data.

Surprisingly, the most dramatic effects of citrulline observed in this study were found in hepatic lipid metabolism. Non-targeted liver phenotyping demonstrated a clear discrimination between the two groups; furthermore, a significantly higher concentration in triglycerides extracted from liver at PND90 in the Cit group suggests neonatal citrulline administration may leave a potentially deleterious “imprinting” effect on liver metabolism. PCR analysis of genes involved in liver lipid metabolism confirmed a relatively “lipogenic” profile in Cit rats. The elevation of liver triglycerides concentration and of one long-chain sphingomyelin, SM(d18:1/24:1), is consistent with a trend towards elevation of blood glucose during OGTT (PND70) since both lipid compounds have been shown to be involved in insulin resistance.<sup>25</sup>

Tain et al<sup>26-28</sup> have shown that maternal citrulline supplementation prevents in long-term the disorders in renal function and blood pressure in offspring exposed prenatally to maternal caloric restriction, or dexamethasone, or L-NAME, respectively. However, in all these studies citrulline supplementation was given *via* mothers during gestation and lactation, and no analysis was performed in pups either at birth, nor at weaning. The specific time period (gestation or lactation) when citrulline exerted its effects in Tain's studies therefore remains uncertain, since in separate studies we found very low concentrations of citrulline in the milk of lactating dams receiving large dose citrulline supplementation (Boquien et al, unpublished data).

In summary, the current study suggests that post-natal, pre-weaning supplementation with citrulline does not impact growth, fat accretion or glucose tolerance in rats born with a low birth weight and exposed to high fructose ingestion after weaning. The potential impact of pre-weaning citrulline supplementation on liver lipid metabolism in adulthood warrants further exploration.

### **Acknowledgements**

We thank Guillaume Poupeau and Maeva Robert for their help with surgical procedures, Isabelle Grit for her support in biochemical analyses. The authors would like to thank specifically Mikäel Croyal (LC-MS platform of Centre de Recherche en Nutrition Humaine Ouest (CRNH), Nantes, France) for validation of lipids annotation by MS-MS.

### **Financial Support**

N-T.T. received grants from SFNEP (French Society for Clinical Nutrition and Metabolism), Nestlé-SFP (French Society of Pediatrics), SanTDige Foundation, and the [French College of Gynecologists and Obstetricians](#) (CNGOF-Prix des 1000 jours-Danone) in 2015

This research was funded, in part, by a 3ARP prize from Ajinomoto (to DD)

**Conflicts of Interest:** None

## REFERENCES

1. Bernstein IM, Horbar JD, Badger GJ, Ohlsson A, Golan A. Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *American journal of obstetrics and gynecology*. Jan 2000;182(1 Pt 1):198-206.
2. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *The American journal of clinical nutrition*. May 2000;71(5 Suppl):1344S-1352S.
3. Kelishadi R, Mansourian M, Heidari-Beni M. Association of fructose consumption and components of metabolic syndrome in human studies: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition*. May 2014;30(5):503-510.
4. Bursac BN, Vasiljevic AD, Nestorovic NM, et al. High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats--do glucocorticoids play a role? *The Journal of nutritional biochemistry*. Apr 2014;25(4):446-455.
5. Wu G, Collins JK, Perkins-Veazie P, et al. Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats. *The Journal of nutrition*. Dec 2007;137(12):2680-2685.
6. Jobgen W, Meininger CJ, Jobgen SC, et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *The Journal of nutrition*. Feb 2009;139(2):230-237.
7. Zhao CX, Xu X, Cui Y, et al. Increased endothelial nitric-oxide synthase expression reduces hypertension and hyperinsulinemia in fructose-treated rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. Feb 2009;328(2):610-620.
8. El-Bassossy HM, El-Fawal R, Fahmy A, Watson ML. Arginase inhibition alleviates hypertension in the metabolic syndrome. *British journal of pharmacology*. Jun 2013;169(3):693-703.
9. Piatti PM, Monti LD, Valsecchi G, et al. Long-term oral L-arginine administration improves peripheral and hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Diabetes care*. May 2001;24(5):875-880.
10. Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *The American journal of physiology*. Dec 1981;241(6):E473-480.
11. Curis E, Nicolis I, Moinard C, et al. Almost all about citrulline in mammals. *Amino acids*. Nov 2005;29(3):177-205.
12. Rougé C, Des Robert C, Robins A, et al. Manipulation of citrulline availability in humans. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. Nov 2007;293(5):G1061-1067.
13. Hannigsberg J, Bourdon A, Tran T, et al. O27 Effets de la supplémentation orale en citrulline sur la croissance foétale dans un modèle animal de retard de croissance intra-utérin. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 2013;27:S36-S37.
14. Jegatheesan P, Beutheu S, Ventura G, et al. Citrulline and Nonessential Amino Acids Prevent Fructose-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats. *The Journal of nutrition*. Oct 2015;145(10):2273-2279.
15. Jegatheesan P, Beutheu S, Freese K, et al. Preventive effects of citrulline on Western diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *The British journal of nutrition*. Jul 2016;116(2):191-203.
16. Bourdon A, Parnet P, Nowak C, et al. L-Citrulline Supplementation Enhances Fetal Growth and Protein Synthesis in Rats with Intrauterine Growth Restriction. *The Journal of nutrition*. Mar 2016;146(3):532-541.
17. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. Aug 1959;37(8):911-917.
18. Ferchaud-Roucher V, Croyal M, Krempf M, Ouguerram K. Plasma lipidome characterization using UHPLC-HRMS and ion mobility of hypertriglyceridemic patients on nicotinic acid. *Atherosclerosis*. 2015;241(1):e123-e124.

19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. Dec 2001;25(4):402-408.
20. Gutt M, Davis CL, Spitzer SB, et al. Validation of the insulin sensitivity index (ISI(0,120)): comparison with other measures. *Diabetes research and clinical practice*. Mar 2000;47(3):177-184.
21. Martin Agnoux A, Antignac JP, Simard G, et al. Time window-dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity and energy substrate oxidation in adult male offspring. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2014;307(2):R184-R197.
22. Kim SW, Wu G. Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young pigs. *The Journal of nutrition*. Mar 2004;134(3):625-630.
23. Yao K, Yin YL, Chu W, et al. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *The Journal of nutrition*. May 2008;138(5):867-872.
24. Jegatheesan P, Beutheu S, Ventura G, et al. Effect of specific amino acids on hepatic lipid metabolism in fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical nutrition*. Feb 2016;35(1):175-182.
25. Ilan Y. Compounds of the sphingomyelin-ceramide-glycosphingolipid pathways as secondary messenger molecules: new targets for novel therapies for fatty liver disease and insulin resistance. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. Jun 1 2016;310(11):G1102-1117.
26. Tain YL, Hsieh CS, Lin IC, et al. Effects of maternal L-citrulline supplementation on renal function and blood pressure in offspring exposed to maternal caloric restriction: the impact of nitric oxide pathway. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. Aug 1 2010;23(1):34-41.
27. Tain YL, Lee CT, Huang LT. Long-term effects of maternal citrulline supplementation on renal transcriptome prevention of nitric oxide depletion-related programmed hypertension: the impact of gene-nutrient interactions. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(12):23255-23268.
28. Tain YL, Sheen JM, Chen CC, et al. Maternal citrulline supplementation prevents prenatal dexamethasone-induced programmed hypertension. *Free radical research*. May 2014;48(5):580-586.

**Table 1**

Body fat, lean body mass, and liver weight at the end of the study (PND90)

	Citrulline group (n=11) (mean $\pm$ SEM)	Alanine group (n=9) (mean $\pm$ SEM)	
White adipose tissue (WAT) (intra-abdominal)	21.19 $\pm$ 1.4 g	21.63 $\pm$ 1.8 g	NS
Intra-abdominal WAT/total WAT ratio	0.67 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.02	NS
Estimated lean body mass / body weight ratio	0.94 $\pm$ 0.00	0.94 $\pm$ 0.00	NS
Liver mass/body weight ratio	0.035 $\pm$ 0.001	0.036 $\pm$ 0.002	NS

For Peer Review

**Table 2**

List of liver metabolites of interest in the discrimination of HPLC-ESI-HRMS based lipidomic profiles on both positive and negative ionization mode and presented a significant difference (*t* test on features mean, expressed as % of lipidomic profiles, with significant *p*-value<0.05) between citrulline and alanine group at PND90.

Lipid class	Mode	Marker	Adduct	Citrulline Mean	Alanine Mean	p-value – Unpaired t test with Welch's correction
phosphatidylcholines	ESI+	PC(32:0) PC(16:0/16:0)	[M+H] <sup>+</sup>	2.885	3.266	0.0444
	ESI-	PC(34:1) PC(18:1/16:0)	[M+HCO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	2.866	0.0000	<0.0001
	ESI+	PC(34:1) PC(18:1/16:0)	[M+H] <sup>+</sup>	4.8434	5.3756	0.0137
	ESI+	PC(38:5)	[M+H] <sup>+</sup>	0.0574	0.0342	0.0227
	ESI-	PC(38:5)	[M+HCO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	2.7150	0.3008	<0.0001
	ESI-	PC(38:6)	[M+HCO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	3.6600	0.0000	<0.0001
phosphatidylethanolamines	ESI-	PE (36:2)	[M-H] <sup>-</sup>	3.6840	0.0000	<0.0001
	ESI-	PE(36:4)	[M-H] <sup>-</sup>	11.4000	0.0000	<0.0001
	ESI-	PE(36:4)	[M-H] <sup>-</sup>	1.8010	0.0000	<0.0001
	ESI+	PE(38:4)	[M+H] <sup>+</sup>	0.1040	0.1219	0.0479
	ESI-	PE(38:5)	[M-H] <sup>-</sup>	13.6400	0.0000	<0.0001
	ESI+	PE (38:5)	[M+H] <sup>+</sup>	1.3860	1.5560	0.0098
	ESI-	PE(38:6)	[M-H] <sup>-</sup>	0.5036	0.0000	<0.0001
	ESI+	PE(38:6)	[M+H] <sup>+</sup>	0.8097	0.8858	0.0575
	ESI+	PE(40:6)	[M+H] <sup>+</sup>	0.4043	0.4734	0.0043
	ESI+	PE(40:6)	[M+H] <sup>+</sup>	0.0136	0.0202	0.0085
	ESI+	PE(40:7)	[M+H] <sup>+</sup>	0.1834	0.2133	0.0624
	ESI-	PI(34:2)	[M-H] <sup>-</sup>	1.4680	0.0000	<0.0001
Phosphatidylserines	ESI-	PS(38:4)	[M-H] <sup>-</sup>	5.8520	0.0000	<0.0001
Ceramides	ESI-	Cer(d18:1/20:0)	[M+HCO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	0.2765	1.670	0.0015
Sphingomyelins	ESI+	SM(d18:1/24:1)	[M+H] <sup>+</sup>	2.6510	3.0650	0.0075

## Figure legends

**Figure 1.** Protocol design

**Figure 2.** Consumption of 10%-fructose solution (F10; mL/g body weight/week), food pellets (g/g body weight/week), and overall energy intake (kcal/g body weight/week). (\*)  $p < 0.05$  Cit vs Ala rats (Mann-Whitney U test)

**Figure 3.** Body weight in rats born with IUGR and receiving fructose supplementation in drinking water after weaning; effect of pre-weaning supplementation with citrulline (Cit) or alanine (Ala)

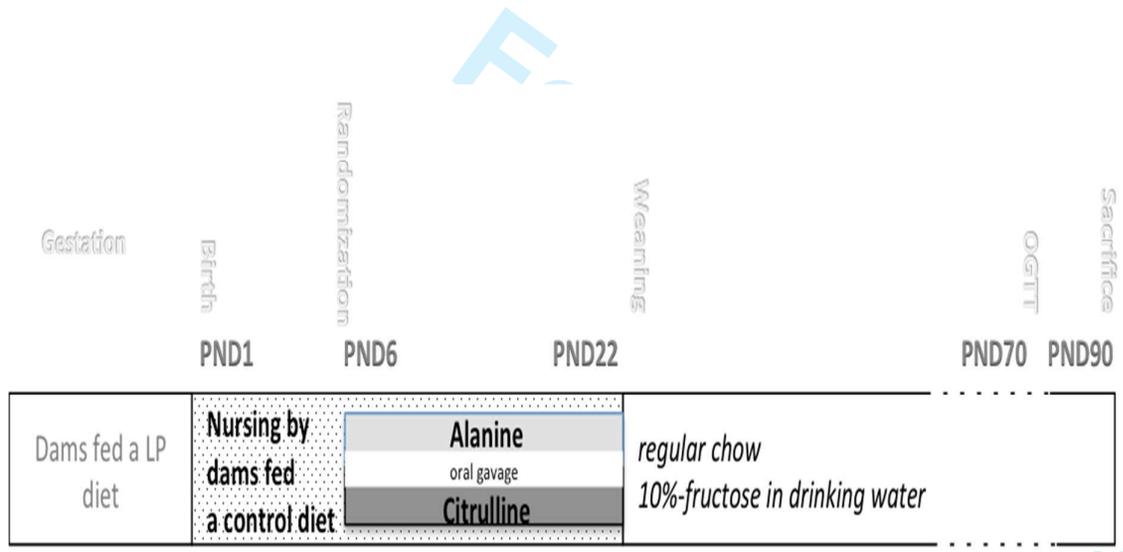
**Figure 4.** (A) Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) performed at 70-d of age in rats born with IUGR and receiving fructose supplementation in drinking water after weaning; effect of pre-weaning supplementation with citrulline (Cit) or alanine (Ala) on blood glucose and OGTT area under the curve (AUC; insert). (B) Insulin sensitivity index (ISI-0-120). (\*)  $p < 0.05$  Cit vs Ala rats (Mann-Whitney U test).

**Figure 5.** Plasma concentrations of triglycerides and HDL-cholesterol, liver triglyceride and total cholesterol concentrations in adult rats born with IUGR, pre-weaning supplemented with citrulline (Cit) or alanine (Ala), and receiving fructose supplementation in drinking water after weaning (Mann-Whitney U test).

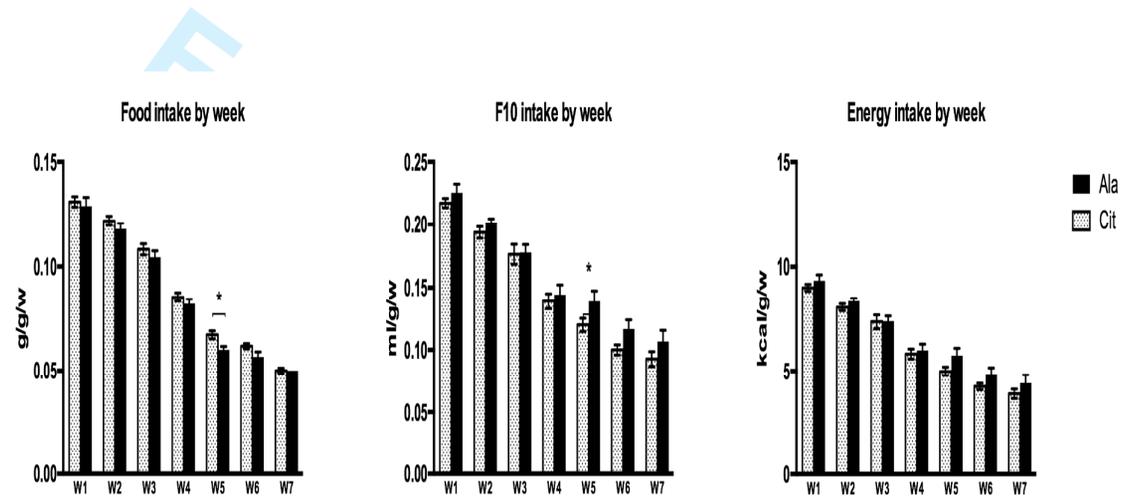
**Figure 6.** Relative expression level of genes involved in liver lipid synthesis between the citrulline (Cit) or alanine (Ala) groups.

**Figure 7.** PCA and PLS-DA scatter plot of liver LC-ESI+ (7A and 7B) or ESI- (7C and 7D) liver lipidomic profiles in adult rats born with IUGR and receiving fructose supplementation in drinking water after weaning; effect of pre-weaning supplementation with citrulline (Cit) or alanine (Ala).

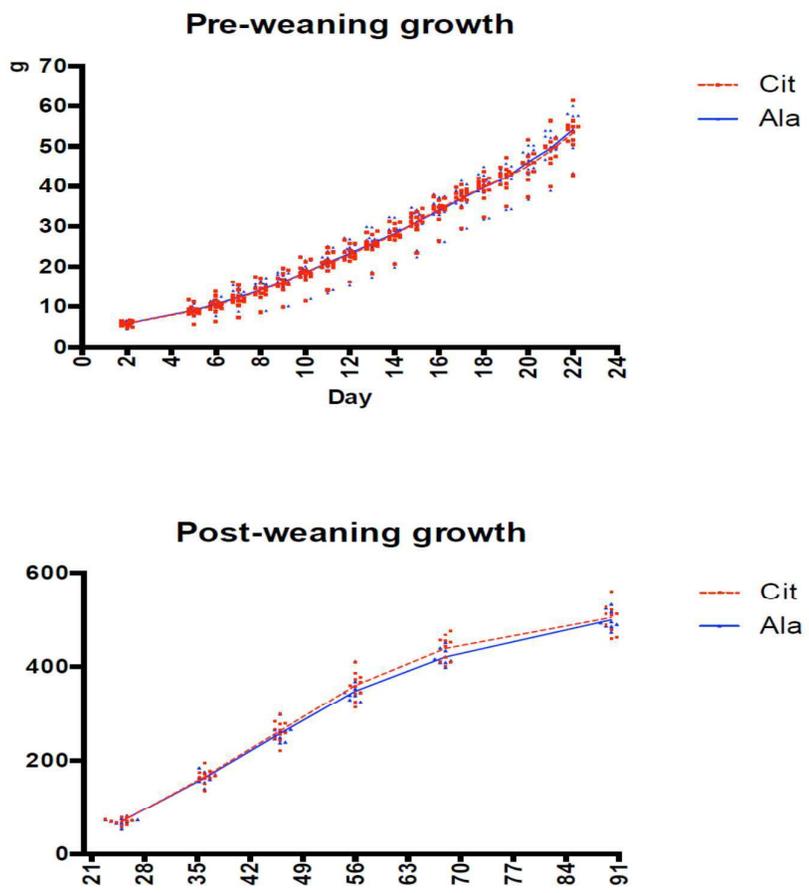
Figure 1. Protocol design



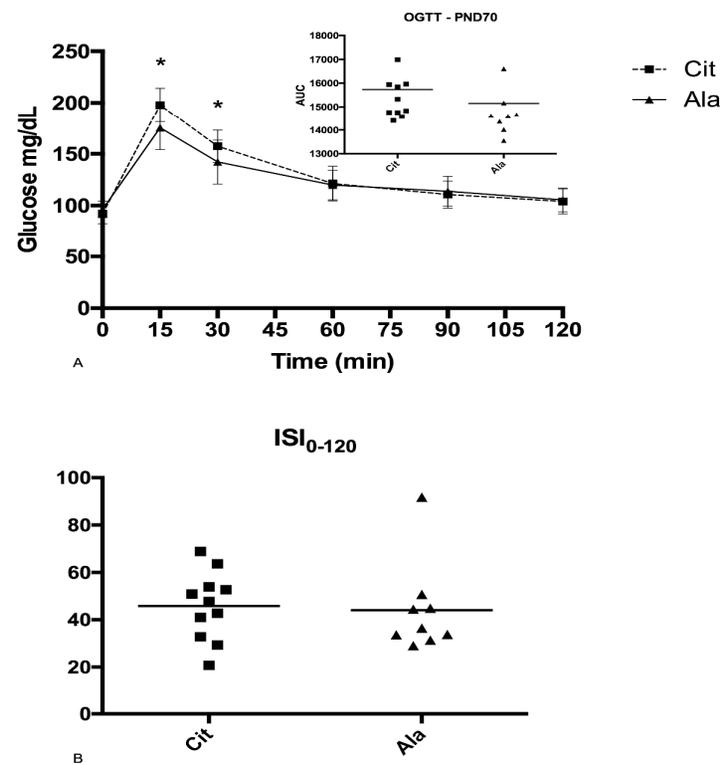
**Figure 2.** Consumption of 10%-fructose solution (F10; mL/g body weight/week), food pellets (g/g body weight/week), and overall energy intake (kcal/g body weight/week). (\*)  $p < 0.05$  Cit vs Ala rats (Mann-Whitney U test)



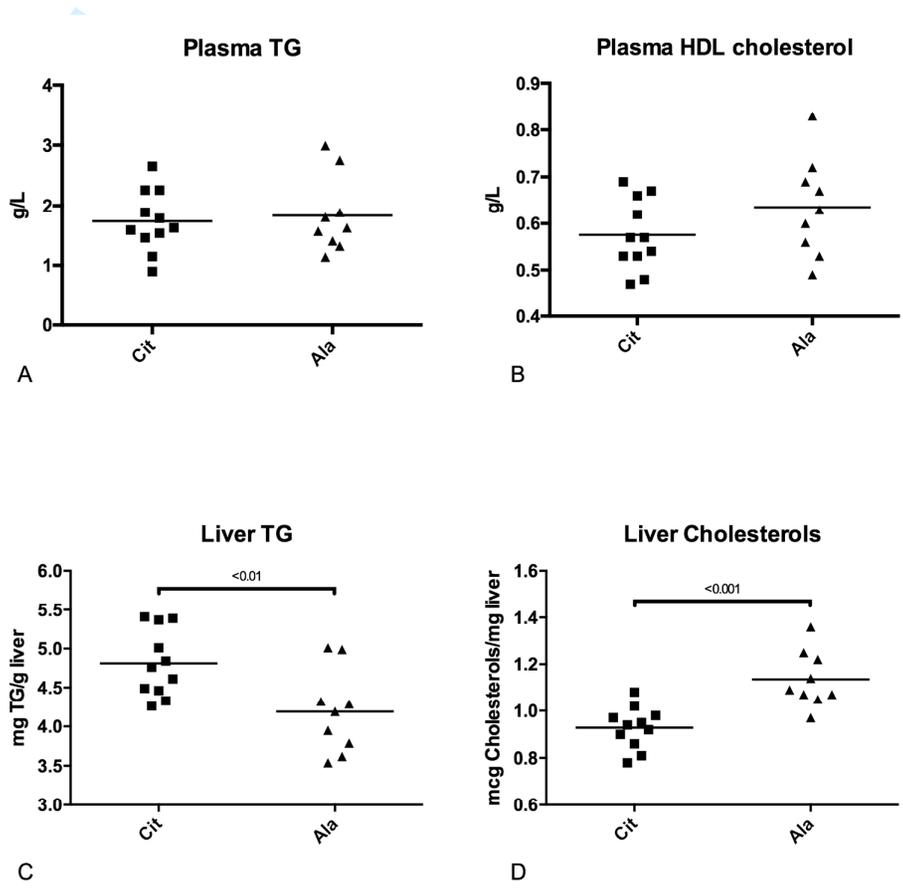
**Figure 3.** Body weight in rats born with IUGR and receiving fructose supplementation in drinking water after weaning; effect of pre-weaning supplementation with citrulline (Cit) or alanine (Ala)



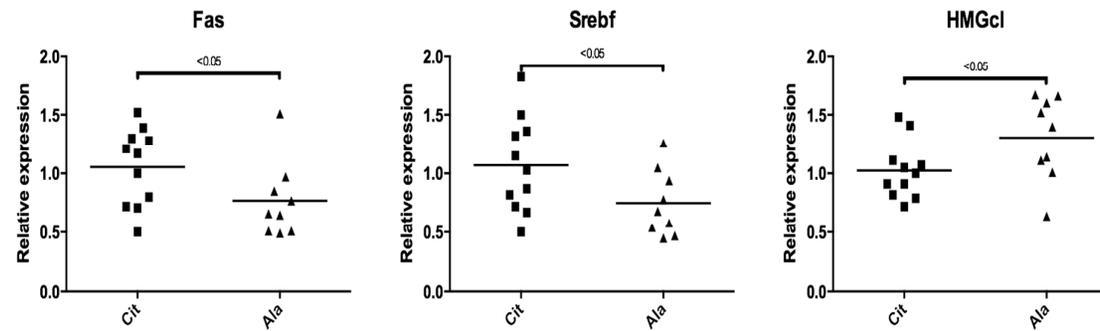
**Figure 4.** (A) Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) performed at 70-d of age in rats born with IUGR and receiving fructose supplementation in drinking water after weaning; effect of pre-weaning supplementation with citrulline (Cit) or alanine (Ala) on blood glucose and OGTT area under the curve (AUC; insert). (B) Insulin sensitivity index (ISI-0-120). (\*)  $p < 0.05$  Cit vs Ala rats (Mann-Whitney U test).



**Figure 5.** Plasma concentrations of triglycerides and HDL-cholesterol, liver triglyceride and total cholesterol concentrations in adult rats born with IUGR, pre-weaning supplemented with citrulline (Cit) or alanine (Ala), and receiving fructose supplementation in drinking water after weaning (Mann-Whitney U test).

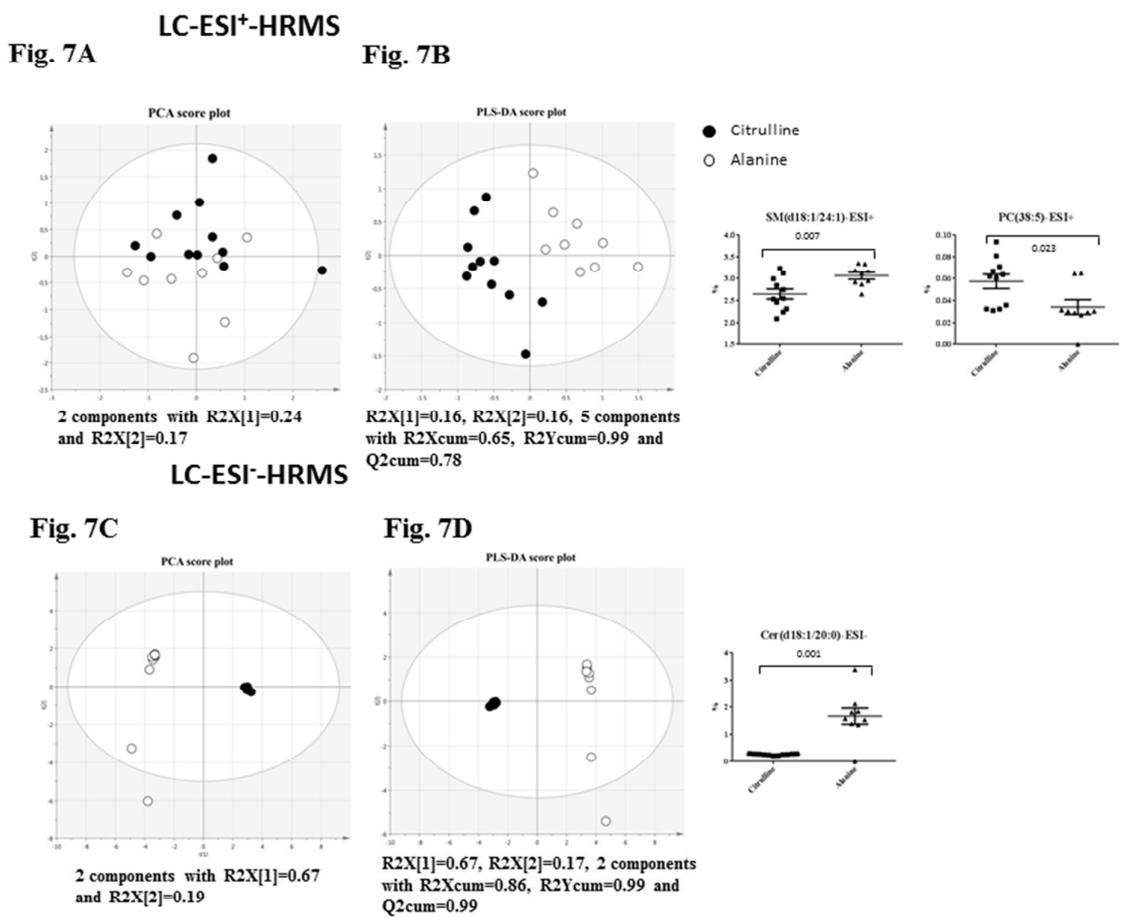


**Figure 6.** Relative expression level of genes involved in liver lipid synthesis between the citrulline (Cit) or alanine (Ala) groups.



Review

**Figure 7.** PCA and PLS-DA scatter plot of liver LC-ESI+ (7A and 7B) or ESI- (7C and 7D) liver lipidomic profiles in adult rats born with IUGR and receiving fructose supplementation in drinking water after weaning; effect of pre-weaning supplementation with citrulline (Cit) or alanine (Ala).



## Supplementary Table 1

List of liver metabolites of interest (VIP) discriminating (VIP above 1.0) HPLC-ESI-HRMS based lipidomic profiles on both positive and negative ionization mode. CI represented the mean confidence range at 95% for citrulline and alanine group and p-value resulted from a *t* test on features mean (expressed as % of lipidomic profiles) in citrulline group versus alanine group determined for each variable [mz, RT] of interest with correction of Aspin-Welch.

mz	RT (min)	VIP	Mode	Marker	Adduct	Citrulline Mean	Lower and Upper 95% of CI Citrulline Mean	Alanine Mean	Lower and Upper 95% of CI Alanine Mean	p-value - Unpaired t test with Welch's correction
734,5698	8,79	4,51748	ESI+	PC(32:0) PC(16:0/16:0)	[M+H] <sup>+</sup>	2.885	[2.624-3.147]	3.266	[2.965-3.568]	0.0444
760,586	8,98	4,75155	ESI+	PC(34:1) PC(16:0/18:1)	[M+H] <sup>+</sup>	4.8434	[4.5490-5.1380]	5.3756	[5.0470-5.7040]	0.0137
786,602	9,58	5,24183	ESI+	PC(36:2) PC(18:0/18:2)	[M+H] <sup>+</sup>	6.4770	[4.9970-7.9560]	6.6490	[6.3070-6.9900]	0.8052
784,5859	7,81	3,86064	ESI+	PC(36:3) PC(16:0/20:3)	[M+H] <sup>+</sup>	0.9710	[0.8094-1.1320]	1.1740	[0.8925-1.4560]	0.1754
810,6012	8,77	2,41782	ESI+	PC(38:4) PC(18:0/20:4)	[M+H] <sup>+</sup>	0.3727	[0.3253-0.4200]	0.4145	[0.3692-0.4599]	0.1655
808,5828	9,65	2,29117	ESI+	PC(38:5) PC(18:2/20:3)	[M+H] <sup>+</sup>	0.0574	[0.0430-0.0719]	0.0342	[0.0189-0.0495]	0.0227
806,5703	6,41	1,67912	ESI+	PC(38:6) PC(16:0/22:6)	[M+H] <sup>+</sup>	5.2610	[4.9670-5.5560]	5.3040	[4.9690-5.6380]	0.8315
836,6174	9,23	1,10939	ESI+	PC(40:5) PC(18:0/22:5)	[M+H] <sup>+</sup>	0.3715	[0.3519-0.3911]	0.3792	[0.3354-0.4230]	0.7206
742,5395	10,39	2,25131	ESI-	PE(36:2) PE(18:0/18:2)	[M-H] <sup>-</sup>	3.6840	[3.3900-3.9790]	0.0000	[0.0000-0.0000]	<0.0001
738,5074	7,47	2,88267	ESI-	PE(36:4) PE(16:0/20:4)	[M-H] <sup>-</sup>	11.4000	[10.8800-11.9200]	0.0000	[0.0000-0.0000]	<0.0001
740,5226	7,99	1,83326	ESI-	PE(36:4) PE(18:1/18:3)	[M-H] <sup>-</sup>	1.8010	[1.6230-1.9780]	0.0000	[0.0000-0.0000]	<0.0001
766,5386	9,92	2,9731	ESI-	PE(38:4) PE(18:0/20:4)	[M-H] <sup>-</sup>	13.6400	[12.6200-14.6600]	0.0000	[0.0000-0.0000]	<0.0001
766,539	7,56	4,37945	ESI+	PE(38:5) PE(18:1/20:4)	[M+H] <sup>+</sup>	1.3860	[1.3070-1.4640]	1.5560	[1.4500-1.6630]	0.0098
762,5077	6,14	1,1471	ESI-	PE(38:6) PE(18:2/20:4)	[M-H] <sup>-</sup>	0.5036	[0.4460-0.5613]	0.0000	[0.0000-0.0000]	<0.0001
764,5236	6,93	2,8921	ESI+	PE(38:6) PE(16:0/22:6)	[M+H] <sup>+</sup>	0.8097	[0.7467-0.8727]	0.8858	[0.84291-0.9425]	0.0575
792,5545	9,13	3,76617	ESI+	PE(40:6) PE(18:0/22:6)	[M+H] <sup>+</sup>	0.4043	[0.3740-0.4345]	0.4734	[0.4367-0.5101]	0.0043
792,5543	8,76	1,31613	ESI+	PE(40:6) PE(20:2/20:4)	[M+H] <sup>+</sup>	0.0136	[0.0099-0.0172]	0.0202	[0.0166-0.0237]	0.0085
790,539	7,04	2,34628	ESI+	PE(40:7) PE(18:1/22:6)	[M+H] <sup>+</sup>	0.1834	[0.1649-0.2019]	0.2133	[0.1850-0.2415]	0.0624
833,5186	5,45	1,70888	ESI-	PI(34:2) PI(16:0/18:2)	[M-H] <sup>-</sup>	1.4680	[1.2810-1.6550]	0.0000	[0.0000-0.0000]	<0.0001
904,5916	6,78	1,50106	ESI+	PI(38:4) PI(18:0/20:4)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.1130	[0.1029-0.1231]	0.1000	[0.0843-0.1157]	0.1351
790,5398	9,15	2,51845	ESI-	PS(38:4) PS(18:0/20:4)	[M-H] <sup>-</sup>	5.8520	[5.5080-6.1950]	0.0000	[0.0000-0.0000]	<0.0001
520,5088	9,02	1,16611	ESI+	Cer(d18:1/16:0)	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	0.0986	[0.0834-0.1138]	0.1097	[0.0977-0.1216]	0.2146

630,6181	14,57	2,52012	ESI+	Cer(d18:1/24:1)	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	0.5801	[0.5262-0.6340]	0.5509	[0.5242-0.7747]	0,8434
703,5753	6,53	2,88216	ESI+	SM(d18:1/16:0)	[M+H] <sup>+</sup>	2.0644	[1.8780-2.2510]	2.2316	[2.0420-2.4210]	0.1710
815,7007	14,51	2,84658	ESI+	SM(d18:1/24:0)	[M+H] <sup>+</sup>	3.4592	[3.1090-3.8090]	3.4055	[2.9830-3.8280]	0.8266
<b>813,686</b>	<b>13,82</b>	<b>5,40671</b>	<b>ESI+</b>	<b>SM(d18:1/24:1)</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	<b>2.6510</b>	<b>[2.4020-2.9010]</b>	<b>3.0650</b>	<b>[2.8850-3.2450]</b>	<b>0.0075</b>
822,7556	16,59	1,4861	ESI+	TG(48:1) TG(16:0/16:0/16:1)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.5692	[0.4920-0.6464]	0.5346	[0.4758-0.5933]	0.4317
820,7399	16,33	1,4619	ESI+	TG(48:2) TG(16:0/16:1/16:1)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.4677	[0.4066-0.5287]	0.5085	[0.390-0.6263]	0.4937
846,7556	16,27	2,00024	ESI+	TG(50:3) TG(16:0/16:1/18:2)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	4.286	[4.0300-4.5420]	4.250	[4.0040-4.4950]	0.8192
874,7871	16,59	2,14958	ESI+	TG(52:3) TG(16:0/18:1/18:2)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1.2091	[1.0240-1.3950]	1.2321	[0.9863-1.4780]	0.8688
872,7715	16,3	2,90936	ESI+	TG(52:4) TG(16:0/18:2/18:2)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	3.4240	[3.1230-3.7250]	3.2460	[3.0410-3.4510]	0.2862
870,7556	16,04	3,0785	ESI+	TG(52:5) TG(16:1/18:2/18:2)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.7585	[0.6624-0.8547]	0.6963	[0.6443-0.7482]	0.2205
898,787	16,36	1,7226	ESI+	TG(54:5) TG(16:0/18:1/20:4)	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	0.7801	[0.6290-0.9312]	0.7105	[0.5907-0.8302]	0.4259

**Supplementary Table 2.**

Primer sequences used for analyses of mRNA expression

<b>Gene</b>	<b>5'- Sense primer -3'</b>	<b>5'- Antisense primer -3'</b>
<b>FASN</b>	CGCCGTGGTGCTGGAGATTG	CTTGCCGAGGTTGGTGAGGAAG
<b>HMGcl</b>	GTGAGTCCACTAGCCAGCAGAG	GAGCCCACCATTTCAGCAAAGG
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	CACGATGCTGCCTCCTTGATG	ATGATGTCGCAGAATGGCTTCC
<b>Srebf1</b>	GCAGCTGATGGAGACAGGGA	CGACAGCGTCAGAACAGCTA
<b><math>\beta</math>-actin</b>	TCCTGGGTATGGAATCCTGTGG	TCTCCTTCTGCATCCTGTCAGC
<b>DGAT1</b>	GGCATCATACTCCATCATCTTC	CCCCTGACCTTCTTCCC
<b>DGAT2</b>	GGTCATCTCAGTCCTACAG	CTATCAGCCAGCAGTCAG
<b>Cyp7a</b>	GCGAAGGCATTTGGACACAGA	TCTCCCTGGAGGGTTTTGGT
<b>SCD1</b>	GTTGGGTGCCTTATCGTTTCC	CTCCAGCCAGCCTCTTGTCTAC

For Peer Review

## 7. Discussion - Perspectives

7.1. L'effet de la supplémentation prénatale en citrulline se confirme de manière reproductible :

7.1.1. La croissance fœtale est améliorée :

Notre travail confirme *l'effet bénéfique de la citrulline sur la croissance fœtale*, déjà montré par Bourdon (2016), et documente un effet au niveau placentaire. Une autre expérimentation à laquelle j'ai également contribué, menée par Hannigsberg (2013) avec le même modèle de restriction et d'administration en citrulline, a conduit à un même effet sur la croissance fœtale. Il a caractérisé en plus des modifications du flux des nutriments, en termes d'acides aminés, sur ce modèle animal en présence de la citrulline. Précisément, la supplémentation maternelle en citrulline durant la gestation a été efficace pour augmenter fortement la concentration sanguine en citrulline et arginine dans les deux compartiments maternel et fœtal. Ce travail confirme que, au cours de la supplémentation, la citrulline se trouve à une concentration très élevée dans le sang au contact de l'endothélium capillaire fœtal. Ces résultats sont compatibles avec ceux de mon travail sur les gènes placentaires. En effet, nous avons montré au cours de la supplémentation en citrulline, une expression augmentée des transporteurs SNAT (cf. nos résultats dans l'article 1), probablement secondaire à la sécrétion accrue d'*Igf2*, par un mécanisme d'adaptation du placenta à la restriction en protéines. Le transport placentaire accru de la citrulline a ainsi accru la disponibilité endothéliale de la citrulline. Cet effet a pu conduire à une augmentation de l'activité de la voie du VEGF et du NO (eNOS). Ces effets pourraient traduire une synergie entre l'effet sur le transport et sur la vascularité placentaire, conduisant à une efficacité placentaire accrue.

7.1.2. Quel est le site principal de l'effet de la citrulline ?

La citrulline agit-elle *in situ* au niveau placentaire par un mécanisme distinct ? L'effet que nous avons observé au niveau placentaire est-il compatible avec les données acquises par ailleurs ?

Il est possible que la citrulline agisse par elle-même, par un mécanisme indépendant de sa conversion en arginine au niveau du rein maternel. Selon Dikalova (2014) la citrulline améliorerait directement la machinerie eNOS (par le recouplage) sur des cellules endothéliales porcines en culture, ainsi que le transport intracellulaire médié par le SNAT1. La citrulline corrigeait le niveau de phosphorylation de l'eNOS (Ser1177), ce qui aurait un effet protecteur sur l'endothélium des artères coronaires porcines prétraitées avec l'ADMA (*asymmetric dimethylarginine*), compétiteur direct de l'arginine dans l'utilisation par l'eNOS) par la production de NO et la suppression de l'ion superoxyde (Xuan, 2015). Or, une concentration élevée de l'ADMA a été rapportée avant l'apparition des signes cliniques au cours des grossesses compliquées de l'origine placentaire (Khalil, 2013; Lopez-Alarcon, 2015; Savidou, 2003). Le fait que la citrulline soit transportée par un système distinct (SNAT) de celui de l'arginine (système y+) souligne l'avantage de l'utilisation de cet acide aminé dans des situations où la disponibilité est altérée (Wijnands, 2015).

En plus, Mehta (2012) a observé une surexpression seulement à court terme de l'eNOS (en 4-7 jours) lors de leur expérimentation de transfection de VEGF par un vecteur adénovirus. Le même profil transitoire d'expression du gène *eNOS* a été trouvé dans notre expérimentation (données non publiées dans l'article). Cet effet transitoire pourrait être considéré comme bénéfique puisque l'activation trop prolongée de la voie eNOS par la citrulline pourrait conduire à un effet néfaste par excès de NO au niveau du réseau vasculaire placentaire.

Concernant l'angiogénèse en période périnatale, le développement du placenta ressemble au développement du poumon des nouveau-nés. Il est connu aussi que l'installation d'une hypertension pulmonaire à la suite d'une hyperoxie chronique est associée à une signalisation perturbée du NO qui se retrouve également dans le placenta de la PE et/ou RCIU. Or, Vadivel (2010) a testé l'effet d'une supplémentation en citrulline sur le réseau vasculaire du poumon de rats nouveau-nés exposés à une « hyperoxie chronique ». De façon inattendue, l'auteur a trouvé que la citrulline, apportée par la voie

sous-cutanée à dose forte (8g/m<sup>2</sup>/j), conduisait à une surexpression de l'arginase II, même en conditions normoxiques. Rappelons qu'une augmentation de l'expression de l'arginase a été retrouvée également (en l'absence de supplémentation en citrulline) dans d'autres études sur des placentas de RCIU, et pourrait expliquer la disponibilité faible de l'arginine *in situ*. Toutefois, une augmentation de la quantité d'enzyme n'est pas synonyme d'augmentation de son activité. En effet, malgré une augmentation de la quantité de protéine enzymatique (arginase II), Vadivel a observé que la présence de la citrulline empêchait l'effet de stimulation de l'hyperoxie sur l'activité de l'arginase : sa présence normalisait l'activité de l'arginase en situation normo- ou hyperoxique. Ceci pourrait expliquer que la citrulline prévienne efficacement l'hypertension pulmonaire chez des rats ayant subi une hyperoxie chronique. Le même bénéfice en termes de vascularisation pulmonaire améliorée a été trouvé avec la dose 1g/kg/jour apportée à des rats nouveau-nés par Grisafi (2012).

7.1.3. Pour ce qui est de l'effet placentaire de la citrulline, quel est le *primum movens*, quelle est la séquence des événements ?

Nous avons montré que la supplémentation en citrulline produisait une série de modifications de l'expression des gènes placentaires mais nous n'avons pas eu la possibilité d'étudier l'expression des protéines concernées ni d'éventuelles modifications post-translationnelles de ces protéines. Nous ne pouvons donc pas affirmer avec certitude que le changement d'expression des gènes observé ait eu des conséquences fonctionnelles.

Concernant l'effet sur la voie de signalisation de l'IGFII, il exigerait une analyse approfondie des récepteurs ainsi que des protéines de liaison (IGFBP1-6). Dans des circonstances de RCIU humain, les données de la littérature nous montrent également une altération de l'expression de ces protéines de liaison (Madeleneau, 2015).

Le fait que l'activité du VEGF soit moins efficace dans le modèle de restriction protéique (Itoh, 2002) suggère l'existence, même dans ce modèle nutritionnel, d'une relative ischémie-reperfusion placentaire à l'intérieur de

la chambre intervillieuse où une dilatation vasculaire permanente est indispensable pour un échange continu de l'oxygène et des nutriments. Le stress oxydant pourrait être en cause dans l'activation de la voie de HIF-1 $\alpha$ , et il serait utile d'étudier cette voie dans l'ensemble de notre expérimentation pour une meilleure compréhension mécanistique concernant l'induction d'expression observée du VEGF. Nous n'avons pas pu par conséquent déterminer si le VEGF était induit par la voie de HIF-1 $\alpha$  ou celle des IGF dans notre modèle de manipulation nutritionnelle. Nous formulons l'hypothèse que la mise en restriction nutritionnelle sévère et aiguë lors du régime expérimental pourrait entraîner une chute aiguë du débit utérin ou une altération du tonus vasculaire utérine. Ensuite, cette perturbation circulatoire, quel qu'en soit le mécanisme, a été préservée par la supplémentation instantanée en Citrulline. Le placenta prélevé pourrait être extrait afin de tester le niveau de stress oxydant.

Enfin, les effets de l'arginine et de la citrulline devraient être comparés en terme d'effet anti-oxydant dans le même modèle de restriction, puisque dans le RCIU chez l'humain, se produit le plus souvent un stress oxydant dans le milieu utéro-placentaire. Avant d'extrapoler ces résultats au contexte clinique en général, il nous faut être vigilants puisqu'une augmentation du débit placentaire et/ou une hyperoxie prématurée en début de la gestation pourrait théoriquement conduire à une réduction de la voie du VEGF et un accroissement prématuré du PlGF, provoquant potentiellement un mauvais développement des villosités, voire un arrêt de grossesse (Jauniaux, 2000). C'était vraisemblablement le cas dans des essais cliniques de supplémentation en vitamines C et E qui n'ont pas montré de bénéfice (Roberts, 2010) mais ont, au contraire, eu un effet néfaste (Gallo, 2010) à cause de l'inhibition de la prolifération trophoblastique, voire d'une mort fœtale provoquée.

#### 7.1.4. Comment envisager une translation en médecine humaine et ultérieurement un essai clinique de supplémentation anténatale en citrulline ?

Nous avons observé une modification du rapport d'expression sFlt-1/Flt-1 au stade de transcription dans le tissu placentaire, alors que les données cliniques pertinentes concernent des dosages dans le sang maternel. Des étapes post-traductionnelles devraient être étudiées, voire des modifications de phosphorylation du récepteur. Ces aspects restent à creuser pour construire un axe de recherche de médecine translationnelle.

Le modèle de restriction sévère en protéines ne reproduit évidemment pas parfaitement le RCIU humain. Néanmoins, la littérature suggère qu'il existe dans ce modèle, si la mise en restriction est débutée dès les premiers jours de la gestation, un défaut de placentation et de croissance fœtale qui ressemble plus ou moins à la situation clinique. De même, bien qu'il n'existe pas de modèle animal idéal de PE (Doridot, 2012), il serait pertinent de tester l'effet de la citrulline sur des modèles animaux de PE.

Par ailleurs, il serait intéressant de rechercher sur des explants de placentas humains *in vitro* si la citrulline a un impact sur l'expression des gènes qui sont affectés chez la rate gestante. Le choix des placentas pourrait être cependant délicat : seuls des placentas issus de césariennes électives seraient utilisables pour éviter l'effet de la délivrance sur les gènes placentaires, et il serait difficile également d'obtenir des placentas témoins de grossesses parfaitement « normales » mais aboutissant à une césarienne. Si toutefois nous obtenions de tels placentas « normaux », nous pourrions tester de façon robuste des effets de la citrulline après l'ajout d'un inhibiteur comme un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF (la liaison du VEGF à ses récepteurs est inhibée) tel que le bevacizumab (Avastin®).

L'apparition des bio-marqueurs et la stratification en groupes à risques différents dès la fin du premier trimestre ou le début du 2<sup>ème</sup> trimestre de grossesse pourraient offrir une fenêtre précieuse pour que les acteurs de soin puissent mettre en place un traitement potentiellement préventif. Une approche de nutrition interventionnelle semblerait donc raison-

nable en termes de prévention. La citrulline est déjà commercialisée et utilisée comme un complément alimentaire chez le sujet âgé pour lutter contre la sarcopénie liée au vieillissement ou chez le sujet sportif pour augmenter la masse musculaire sans aucun effet néfaste décelé à ce jour (Kim, 2015; Moinard, 2015). Potter (2004) a rapporté une grossesse chez une patiente atteinte d'une maladie génétique, la citrullinémie, qui s'accompagne d'une élévation de la concentration en citrulline d'un facteur 10 à 20 dans le plasma, sans aucun événement périnatal notable ni effet délétère sur la santé du fœtus et du nouveau-né. Une concentration plasmatique maternelle très élevée en citrulline ne semble donc pas avoir d'effet tératogène. Le seul essai clinique de supplémentation en citrulline pendant la grossesse que nous ayons retrouvé sur le registre américain des essais cliniques ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)), est celui que l'équipe américaine de Powers (2015) a récemment mené chez des femmes enceintes obèses : ils n'ont pas rapporté de complications métaboliques, et ont ensuite, très récemment déposé un protocole similaire construit pour une autre population à risque : des patientes enceintes atteintes de diabète de type 2 (NCT02772887)

Il nous semble donc qu'un essai clinique de supplémentation précoce en citrulline avec un objectif préventif serait raisonnable si le recrutement est basé sur une sélection primaire de sujets classés comme « à risque intermédiaire », par exemple, par leurs antécédents et/ou des biomarqueurs.

*Au total, nous avons mis en évidence l'impact de la citrulline sur l'expression de toute une série de gènes impliqués dans plusieurs fonctions placentaires. Il reste à déterminer quel est le **primum movens**. Des études de supplémentation en citrulline sur des modèles d'animaux invalidés pour des gènes spécifiques, ou des inhibiteurs spécifiques de gènes pourraient résoudre cette question. La réflexion doit être engagée pour savoir comment mettre en route une démarche translationnelle et tester dans les meilleures conditions de rapport bénéfice risque les effets de la citrulline en médecine de la périnatalité.*

7.2. La supplémentation postnatale en citrulline reste à justifier en termes d'efficacité :

Comme ce travail ne nous a pas montré une efficacité attendue, de nombreuses questions se posent, parmi lesquelles :

- 1) quel est l'effet de la citrulline postnatale sur la croissance ?
- 2) quelle est la pertinence du régime enrichi en fructose dans l'induction d'un syndrome métabolique ? et
- 3) comment interpréter l'absence de bénéfice métabolique de la citrulline dans ce modèle

7.2.1. La citrulline post-natale est-elle sans effet sur la croissance précoce ?

Il est important de noter un certain nombre de limites de notre schéma d'expérimentation en phase postnatal. Tout d'abord, la croissance de rattrapage des ratons RCIU n'a pas pu être documentée, en l'absence d'un groupe témoin : dans notre schéma expérimental, tous les ratons RCIU ont été adoptés et allaités par des mères normalement nourries, et aucun raton eutrophique de témoin allaité par mères normales. Il est vraisemblable que l'allaitement par des mères normalement nourries pendant 5 jours (avant supplémentation par gavage), a été suffisant pour induire un rattrapage adéquat. Par ailleurs, le suivi de l'évolution de poids à partir de la naissance n'a pas mis en évidence de différence de croissance entre les groupes citrulline et alanine.

A noter que nous avons arbitrairement fixé la taille de portée à 8 ratons par mère ; la décision était basée sur la croissance observée lors d'une précédente expérimentation chez des ratons nés de mères soumises à une moindre restriction (régime à 8% de protéines, dans le travail de Martin Agnoux 2013). En comparant avec la courbe de croissance postnatale décrite dans ce dernier travail, nos animaux auraient effectivement accompli un rattrapage, mais en même temps qu'ils recevaient par gavage de la citrulline ou de l'alanine ; un effet éventuel non spécifique de l'apport d'un supplément d'azote ne peut être exclu. Une portée de 4 ratons par mère aurait peut-être permis une croissance de rattrapage plus visible comme

Bol (2008) l'a montré dans leur expérimentation. Cet auteur a ainsi trouvé une prolifération adipocytaire accélérée dans le tissu adipeux épидидymaire prélevé chez des ratons de 4 semaines de vie, nés des mères soumises pendant la gestation à 8% de protéines. Pour éviter un sacrifice précoce des animaux, une exploration non-invasive de la masse grasse corporelle par imagerie (la DEXA) serait indispensable pour suivre l'évolution de la composition corporelle, particulièrement au moment du sevrage et avant le démarrage de l'administration chronique en fructose.

#### 7.2.2. Le « régime enrichi en fructose » est-il un bon modèle d'induction du syndrome métabolique ?

Il est difficile de répondre à cette question puisque dans notre étude, du fait de la fragilité des ratons présentant un RCIU sévère, nous avons limité le nombre des groupes expérimentaux, et n'avons pas prévu de groupe « témoins » appariés mais non exposés au fructose.

La question sur l'efficacité du modèle d'induction de l'obésité et/ou du SMet par l'administration chronique en fructose chez des ratons nés RCIU reste posée. Il s'agissait aussi de la première mise en œuvre de cette manipulation dans notre unité. Effectivement, Tay (2002) a utilisé ce pourcentage de 10% de fructose dans la boisson quotidienne et réussi à induire au bout de 8 semaines une hypertension artérielle, une élévation des triglycérides plasmatiques et une résistance à l'insuline chez leurs rats adultes Sprague-Dawley. En revanche, il n'y avait pas de différence de poids entre des groupes. Toutefois, avec des rats Wistar de 3 mois de vie, l'équipe de Abdelkarem (2016) a observé un gain de poids important (de 64%) sous la supplémentation en fructose à la dose de 10% dans l'eau de boisson pendant seulement 4 semaines d'induction. Le SMet a été également reproduit par le fructose à 10% dans le régime chez des rats de même souche Wistar, avec des changements de pression artérielle, de bilan lipidique et de transaminases hépatiques (Bulboaca, 2016). Il apparaît que la réponse à ce type de stimulus pourrait dépendre de la souche de rat utilisé, des conditions *in utero*, et de l'âge, d'autant plus que nos ratons ont été exposés à ce régime

très jeunes (dès le sevrage) et avaient subi une restriction très importante *in utero*, pour laquelle la littérature ne fournit pas de données postnatales à long terme. La concentration et la durée optimale d'exposition au fructose dans ce modèle restent à déterminer.

### 7.2.3. Comment interpréter l'absence d'effet de la citrulline sur l'impact métabolique du fructose ?

Nous avons observé que sous régime riche en fructose, les transaminases hépatiques étaient élevées par rapport aux valeurs témoins publiées pour des rats nourris plus ou moins de même tranche d'âge par un régime normal (Al-Shaabi, 2016; Bak, 2016). Néanmoins, cette altération est-elle liée au fructose, ou bien peut-elle être une conséquence directe du RCIU lui-même? Nous ne pouvons pas l'affirmer puisque nous n'avons pas étudié de groupe RCIU sans supplémentation en fructose. Dans la littérature, une prédisposition accrue à une stéatose hépatique (*non-alcoholic steatohepatitis-NASH*) chez des individus nés RCIU a été révélée récemment par plusieurs études. Magee (2008) a trouvé que chez des ratons nés des mères soumises à une carence énergétique pendant la gestation il existe une expression diminuée des PPARs (gamma et beta) hépatiques dès le 1er jour de vie, persistant jusqu'au prélèvement à 9 mois de vie, ce qui expliquerait une augmentation des triglycérides hépatiques au 9ème mois. Yamada (2011) a observé ensuite une stéatose « microvésiculaire » dès le 20<sup>ème</sup> jour de vie fœtale des ratons dans le même modèle, en concomitance avec la surexpression des protéines lipogéniques du foie (SREBP1 et *fatty acid synthase-FAS*) chez des ratons au 1<sup>er</sup> jour de vie.

Le fait que les triglycérides hépatiques aient été augmentés dans notre groupe Cit suggère que la citrulline est inefficace en termes de prévention de la stéatose hépatique à long terme. Néanmoins, nous n'avons aucune donnée sur la concentration de triglycérides ou le niveau d'infiltration lipidique au niveau du foie des ratons RCIU (fœtus ou nouveau-né) de ce modèle en l'absence de supplémentation en citrulline ou alanine, avec une telle restriction à 4% de protéines. Il serait intéressant de retourner à notre

précédent travail (Bourdon, 2016) où le foie a été prélevé pour l'analyse de synthèse protéique au 20<sup>ème</sup> jour de gestation et d'explorer le contenu lipidique du foie de ces fœtus.

## 8. CONCLUSION

En utilisant un modèle expérimental de malnutrition maternelle induisant un sévère RCIU chez le rat, nous avons pu mettre en évidence le bénéfice de la supplémentation précoce en citrulline durant la gestation. La croissance fœtale améliorée des RCIU sous citrulline reproduit l'effet observé lors de nos précédentes expérimentations répétées dans plusieurs conditions différentes et au fil du temps (la première expérience date de 2009). Nous montrons que la supplémentation maternelle en citrulline agit dès le milieu de la gestation sur des gènes codant pour des facteurs de croissance, d'angiogénèse et de transporteurs d'acides aminés pour aboutir à une efficacité placentaire renforcée jusqu'à la fin de la gestation. Malheureusement, nous n'avons retrouvé aucun effet bénéfique de la supplémentation postnatale en citrulline chez des ratons nés dénutris, puis soumis à un régime déséquilibré riche en fructose, ni en termes de croissance, ni sur le métabolisme glucido-lipidique à l'âge adulte jeune. La vigilance impose davantage d'explorations mécanistiques avant d'envisager une étude translationnelle clinique à ce stade sensible de développement qu'est la période néonatale. En revanche, dans le cas de la période gestationnelle, nos résultats incitent à réfléchir à la mise en place d'essais cliniques pertinents pour cette pathologie de la croissance fœtale.

## 9. Annexe : Technique en cours de la mise au point

La mise en œuvre d'une analyse morphologique de haute qualité du placenta de rat a rencontré quelques difficultés, en particulier suite à un manque d'expérience personnelle et matérielle. Le prélèvement du placenta comme il était réalisé de façon habituelle ne paraît pas approprié pour l'étude d'expression des gènes différents sélectivement dans les zones distinctes (JZ et LZ). Nous avons testé, pour la première fois dans l'unité, le prélèvement en bloc des placentas au milieu de la gestation (GD15), notamment avec la paroi utérine attachée, pour que les repères anatomiques importantes d'une unité materno-fœto-placentaire soient respectés.

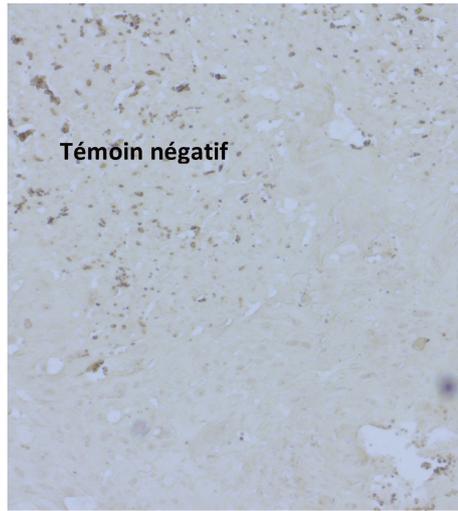
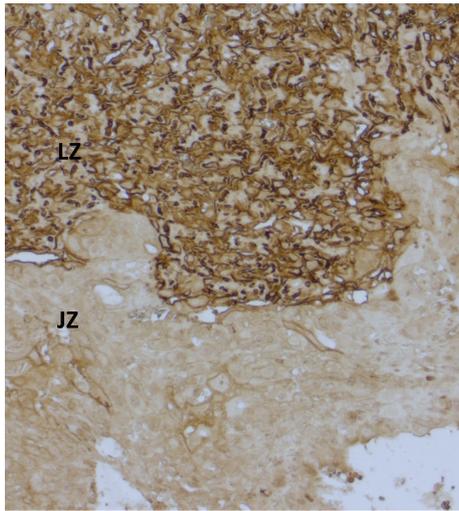
L'anticorps CD31 (*cluster of differentiation 31*) aussi connu sous le nom de PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) marque les cellules endothéliales, les plaquettes, les macrophages, les granulocytes, les lymphocytes B et T, les mégacaryocytes, les polymorphes neutrophiles, certains lymphocytes, tous les monocytes, et occasionnellement les cellules plasmiques de la moelle osseuse. Etant localisé à la membrane, cet anticorps est très utile pour le marquage des vaisseaux. Nous avons décidé de choisir celui-ci pour l'immunomarquage de l'endothélium fœtal. L'objectif a été la mise en évidence de la vascularité fœtale dans le compartiment LZ. L'anticorps monoclonal anti-CD31 fait chez le lapin, commercialisé par Abcam® (Réf : ab28364), spécifique de la souris et de l'humain, a été utilisé. Il existe chez Abcam® un autre anticorps spécifique au rat (Réf : ab119339) mais qui a donné des marquages moins efficaces à la même dilution que nous avons testé.

Le recueil du placenta a été réalisé chez les rates gestantes sous l'anesthésie à GD15 et GD21. L'exposition des deux cornes utérines est suivie par le clamp des pédicules vasculaires principaux de cet organe, puis l'exérèse de l'utérus gravidique entier est faite. Dans le cas de GD21, la séparation du fœtus du placenta conduit à un détachement du placenta de la paroi utérine dans la majorité des cas par la rétraction spontanée importante de l'utérus à terme. Ce fait ne nous permet pas d'obtenir le bloc placentaire avec la décidue et le triangle mésométrial maternel en place dans tous les cas. A l'inverse, le recueil des placentas avec fœtus en bloc entier facilite la préservation anatomique, mais cela nous ne permettra pas la détermination du sexe fœtal si l'analyse de placenta en fonction de sexe est exigée. En plus, nous n'avons pas réalisé une perfusion de PBS au cours de la césarienne et avant la

fixation des échantillons en PFA 4%. Ce détail a conduit à une présence très importante des hématies dans le placenta, et par conséquent des artéfacts en étape de mise en évidence l'immunomarquage à la fluorescence. Une mise au point optimisée de la technique sera donc nécessaire.

*Protocole d'immunohistochimie :*

Etape	Réactif	Durée d'incubation	Conditions
Déparaffinage	Xylène	3 x 5 min	T° ambiante
Réhydratation	Ethanol 100% Ethanol 95% Ethanol 70% PB 0.1M	3 x 5 min 5 min 5 min 5 min	T° ambiante
Démasquage	Tampon citrate pH6 frais	45 min (puis refroidissement spontané)	Bain-marie 95°C
Saturation des pe- roxydases endogènes	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5%	20 min	T° ambiante
Rinçage	PB 0.1M	3 x 5 min	T° ambiante
Blocage	PB 0.1M BSA 4% Triton 0.4%	60-90 min	T° ambiante
Anticorps primaire	ab28364 au <b>1/50</b> (rabit anti-CD31)	La nuit	Chambre humide 4°C
Rinçage	PB 0.1M	4 x 5 min	T° ambiante
Anticorps secondaire	PB 0.1M BSA 1% Triton 0.1% Goat anti-rabit biotin au 1/1000	60 min	Chambre humide T° ambiante
Amplification	Kit ABC (Vector PK- 7100)	30 min	T° ambiante
Rinçage	PB 0.1M	5 min	T° ambiante
Révélation	DAB Substrat (Vector SK-4100)	10 min	T° ambiante
Rinçage	Eau distillée	5 min	T° ambiante
Contre-coloration	Pas nécessaire		
Déshydratation	Ethanol 70% Ethanol 95% Ethanol 100% Xylène	1 min 1 min 1 min	T° ambiante
Montage	Eukitt		



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelkarem, H. M., L. H. Fadda, et al. (2016). "Potential Intervention of alpha- Lipoic Acid and Carnitine on Insulin Sensitivity and Anti-Inflammatory Cytokines Levels in Fructose-Fed Rats, a Model of Metabolic Syndrome." J Diet Suppl: 1-11.
- ACOG (2013). "Fetal growth restriction. Practice Bulletin No. 134. American College of Obstetricians and Gynecologists." Obstet Gynecol **121**: 1122-1133.
- Adamson, S. L., Y. Lu, et al. (2002). "Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta." Developmental Biology **250**(2): 358-373.
- Ahmad, S. and A. Ahmed (2004). "Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia." Circ Res **95**(9): 884-891.
- Ahmad, S., P. W. Hewett, et al. (2011). "Autocrine activity of soluble Flt-1 controls endothelial cell function and angiogenesis." Vasc Cell **3**(1): 15.
- Ahmed, A., C. Dunk, et al. (2000). "Regulation of Placental Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth Factor (PlGF) and Soluble Flt-1 by Oxygen— A Review." Placenta **21**: S16-S24.
- Al-Shaabi, S. N., M. I. Waly, et al. (2016). "Ameliorative Effects of Pomegranate Peel Extract against Dietary-Induced Nonalcoholic Fatty Liver in Rats." Prev Nutr Food Sci **21**(1): 14-23.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper, et al. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
- Autiero, M., J. Waltenberger, et al. (2003). "Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1." Nat Med **9**(7): 936-943.
- Bacchetta, J., J. Harambat, et al. (2009). "Devenir rénal des enfants nés grands prématurés : un suivi simple mais régulier est nécessaire." Archives de Pédiatrie **16**: S42-S48.
- Bajoria, R., S. R. Sooranna, et al. (2001). "Placental transport rather than maternal concentration of amino acids regulates fetal growth in monozygotic twins: implications for fetal origin hypothesis." Am J Obstet Gynecol **185**(5): 1239-1246.
- Bak, M. J., V. L. Truong, et al. (2016). "Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Procyanidins from Wild Grape (*Vitis amurensis*) Seeds in Ethanol-Induced Cells and Rats." Int J Mol Sci **17**(5).
- Barker, D. J. (2006). "Adult consequences of fetal growth restriction." Clin Obstet Gynecol **49**(2): 270-283.
- Barker, D. J. P., C. N. Hales, et al. (1993). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth." Diabetologia **36**(1): 62-67.
- Barut, F., A. Barut, et al. (2010). "Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis." Diagn Pathol **5**: 24.
- Bates, D. O. (2011). "An unexpected tail of VEGF and PlGF in pre-eclampsia." Biochem Soc Trans **39**(6): 1576-1582.

- Belkacemi, L., C. H. Chen, et al. (2009). "Increased placental apoptosis in maternal food restricted gestations: role of the Fas pathway." Placenta **30**(9): 739-751.
- Belkacemi, L., M. Desai, et al. (2011). "Altered mitochondrial apoptotic pathway in placentas from undernourished rat gestations." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **301**(6): R1599-1615.
- Belkacemi, L., D. M. Nelson, et al. (2010). "Maternal undernutrition influences placental-fetal development." Biol Reprod **83**(3): 325-331.
- Benton, S. J., L. M. McCowan, et al. (2016). "Placental growth factor as a marker of fetal growth restriction caused by placental dysfunction." Placenta **42**: 1-8.
- Bol, V. V., B. M. Reusens, et al. (2008). "Postnatal catch-up growth after fetal protein restriction programs proliferation of rat preadipocytes." Obesity (Silver Spring) **16**(12): 2760-2763.
- Bourdon, A., P. Parnet, et al. (2016). "l-Citrulline Supplementation Enhances Fetal Growth and Protein Synthesis in Rats with Intrauterine Growth Restriction." J Nutr **146**(3): 532-541.
- Bray, G. A. (2004). "Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity." Am J Clin Nutr **79**(4): 537-543.
- Brosens, I., R. Pijnenborg, et al. (2011). "The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation." Am J Obstet Gynecol **204**(3): 193-201.
- Bujold, E., S. Roberge, et al. (2014). "Low-dose aspirin for prevention of adverse outcomes related to abnormal placentation." Prenat Diagn **34**(7): 642-648.
- Bulboaca, A., S. D. Bolboaca, et al. (2016). "Protective effect of curcumin in fructose-induced metabolic syndrome and in streptozotocin-induced diabetes in rats." Iran J Basic Med Sci **19**(6): 585-593.
- Burton, G. J., D. S. Charnock-Jones, et al. (2009a). "Regulation of vascular growth and function in the human placenta." Reproduction **138**(6): 895-902.
- Burton, G. J. and E. Jauniaux (2011). "Oxidative stress." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **25**(3): 287-299.
- Burton, G. J., A. W. Woods, et al. (2009b). "Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy." Placenta **30**(6): 473-482.
- Burton, G. J., H. W. Yung, et al. (2009c). "Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia." Placenta **30 Suppl A**: S43-48.
- Burton, G. J., H. W. Yung, et al. (2016). "Mitochondrial - Endoplasmic reticulum interactions in the trophoblast: Stress and senescence." Placenta.
- Carmody, J. B. and J. R. Charlton (2013). "Short-term gestation, long-term risk: prematurity and chronic kidney disease." Pediatrics **131**(6): 1168-1179.
- Carter, A. M., K. Nygard, et al. (2006). "The expression of insulin-like growth factor and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in mouse placenta." Placenta **27**(2-3): 278-290.
- Casanello, P. (2002). "Intrauterine Growth Retardation Is Associated With Reduced Activity and Expression of the Cationic Amino Acid Transport Systems y+/hCAT-1 and y+/hCAT-2B and

- Lower Activity of Nitric Oxide Synthase in Human Umbilical Vein Endothelial Cells." Circulation Research **91**(2): 127-134.
- Charnock-Jones, D. S. (2015). "Placental hypoxia, endoplasmic reticulum stress and maternal endothelial sensitisation by sFLT1 in pre-eclampsia." J Reprod Immunol.
- Choi, W. S., G. J. Cho, et al. (2005). "Expression of placenta growth factor mRNA in the rat placenta during mid-late pregnancy." J Vet Sci **6**(3): 179-183.
- Cindrova-Davies, T., M. T. van Patot, et al. (2015). "Energy status and HIF signalling in chorionic villi show no evidence of hypoxic stress during human early placental development." Mol Hum Reprod **21**(3): 296-308.
- Coan, P. M., N. Conroy, et al. (2006). "Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta." Dev Dyn **235**(12): 3280-3294.
- Cohen, J. M., M. Beddaoui, et al. (2015). "Maternal Antioxidant Levels in Pregnancy and Risk of Preeclampsia and Small for Gestational Age Birth: A Systematic Review and Meta-Analysis." PLoS One **10**(8): e0135192.
- Constancia, M., E. Angiolini, et al. (2005). "Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 19219-19224.
- Constancia, M., M. Hemberger, et al. (2002). "Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth." Nature **417**(6892): 945-948.
- Cortez-Pinto, H., J. Chatham, et al. (1999). "Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study." JAMA **282**(17): 1659-1664.
- Coupe, B., I. Grit, et al. (2009). "The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **297**(3): R813-824.
- Coupe, B., I. Grit, et al. (2012). "Postnatal growth after intrauterine growth restriction alters central leptin signal and energy homeostasis." PLoS One **7**(1): e30616.
- Curis, E., I. Nicolis, et al. (2005). "Almost all about citrulline in mammals." Amino Acids **29**(3): 177-205.
- Cynober, L., C. Moinard, et al. (2010). "The 2009 ESPEN Sir David Cuthbertson. Citrulline: a new major signaling molecule or just another player in the pharmaconutrition game?" Clin Nutr **29**(5): 545-551.
- Czarnecki, G. L. and D. H. Baker (1984). "Urea cycle function in the dog with emphasis on the role of arginine." J Nutr **114**(3): 581-590.
- de Jong, F., M. C. Monuteaux, et al. (2012). "Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure." Hypertension **59**(2): 226-234.
- Dekker, M. J., Q. Su, et al. (2010). "Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome." Am J Physiol Endocrinol Metab **299**(5): E685-694.
- Delamaire, E., P. Parnet, et al. (2012). "Long term metabolic impact of high protein neonatal feeding: a preliminary study in male rat pups born with a low birth weight." Clin Nutr **31**(5): 741-748.

- Dikalova, A., A. Fagiana, et al. (2014). "Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1 (SNAT1) modulates L-citrulline transport and nitric oxide (NO) signaling in piglet pulmonary arterial endothelial cells." PLoS One **9**(1): e85730.
- Doridot, L., C. Mehats, et al. (2012). "[Comparative analysis of mice models for preeclampsia]." Ann Cardiol Angeiol (Paris) **61**(3): 234-238.
- Duan, J., E. Perdrille-Galet, et al. (2015). "Angiographie Doppler 3D placentaire : applications actuelles et à venir." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **44**(2): 107-118.
- Edeline, J., C. Vigneau, et al. (2010). "[Signalling pathways in renal-cell carcinoma: from the molecular biology to the future therapy]." Bull Cancer **97**: 5-15.
- Ego, A. (2013). "Définitions : petit poids pour l'âge gestationnel et retard de croissance intra-utérin [Definitions: small for gestational age and intrauterine growth retardation]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **42**(8): 872-894.
- Ehrenkranz, R. A., A. M. Dusick, et al. (2006). "Growth in the neonatal intensive care unit influences neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants." Pediatrics **117**(4): 1253-1261.
- Ericsson, A. (2005). "Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta." Human Reproduction **20**(2): 521-530.
- Eriksson, J. G., T. Forsen, et al. (1999). "Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study." BMJ **318**(7181): 427-431.
- Feldser, D., F. Agani, et al. (1999). "Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2." Cancer Res **59**(16): 3915-3918.
- Forbes, K., M. Westwood, et al. (2008). "Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta." Am J Physiol Cell Physiol **294**(6): C1313-1322.
- Fowden, A. L. (2003). "The insulin-like growth factors and feto-placental growth." Placenta **24**(8-9): 803-812.
- Freemark, M. (2010). "Placental hormones and the control of fetal growth." J Clin Endocrinol Metab **95**(5): 2054-2057.
- Gallo, C., P. Renzi, et al. (2010). "Potential therapeutic effects of vitamin e and C on placental oxidative stress induced by nicotine: an in vitro evidence." Open Biochem J **4**: 77-82.
- Gardosi, J., V. Madurasinghe, et al. (2013). "Maternal and fetal risk factors for stillbirth: population based study." BMJ **346**: f108.
- Georgiades, P., A. C. Ferguson-Smith, et al. (2002). "Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae." Placenta **23**(1): 3-19.
- Gerber, H. P., F. Condorelli, et al. (1997). "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia." J Biol Chem **272**(38): 23659-23667.
- Gilbert, J. S., S. A. Babcock, et al. (2007). "Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression." Hypertension **50**(6): 1142-1147.

- Gonzalez, P. N., M. Gasperowicz, et al. (2016). "Chronic Protein Restriction in Mice Impacts Placental Function and Maternal Body Weight before Fetal Growth." PLoS One **11**(3): e0152227.
- Grisafi, D., E. Tassone, et al. (2012). "L-citrulline prevents alveolar and vascular derangement in a rat model of moderate hyperoxia-induced lung injury." Lung **190**(4): 419-430.
- Guibourdenche, J., D. Porquet, et al. (2001). "Hormones placentaires et croissance foetale." Gynecol Obstet Fertil **29**(7-8): 532-533.
- Hales, C. N. (2001). "The thrifty phenotype hypothesis." British Medical Bulletin **60**(1): 5-20.
- Han, J., D.-Z. Li, et al. (2016). "Maternal serum PIGF (placental growth factor) in Chinese women in the first trimester undergoing screening for Down syndrome." European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.
- Han, V. K., N. Bassett, et al. (1996). "The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface." J Clin Endocrinol Metab **81**(7): 2680-2693.
- Hannigsberg, J., A. Bourdon, et al. (2013). "O27 Effets de la supplémentation orale en citrulline sur la croissance foetale dans un modèle animal de retard de croissance intra-utérin." Nutrition Clinique et Métabolisme **27**: S36-S37.
- Harris, L. K., I. P. Crocker, et al. (2011). "IGF2 actions on trophoblast in human placenta are regulated by the insulin-like growth factor 2 receptor, which can function as both a signaling and clearance receptor." Biol Reprod **84**(3): 440-446.
- Hartman, W. J., P. M. Torre, et al. (1994). "Dietary citrulline but not ornithine counteracts dietary arginine deficiency in rats by increasing splanchnic release of citrulline." J Nutr **124**(10): 1950-1960.
- Hawkins, P., C. Steyn, et al. (2000). "Effect of maternal undernutrition in early gestation on ovine fetal blood pressure and cardiovascular reflexes." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **279**(1): R340-348.
- Helske, S. (2001). "Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies." Molecular Human Reproduction **7**(2): 205-210.
- Herr, F., O. D. Liang, et al. (2003). "Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy." J Clin Endocrinol Metab **88**(10): 4811-4817.
- Herraiz, I., E. Simon, et al. (2015). "Angiogenesis-Related Biomarkers (sFlt-1/PLGF) in the Prediction and Diagnosis of Placental Dysfunction: An Approach for Clinical Integration." Int J Mol Sci **16**(8): 19009-19026.
- Hills, F. A., M. G. Elder, et al. (2004). "Regulation of human villous trophoblast by insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding protein-1." J Endocrinol **183**(3): 487-496.
- Hills, F. A., H. Mehmet, et al. (2012). "Insulin-like growth factor-II and heparin are anti-apoptotic survival factors in human villous cytotrophoblast." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **163**(1): 11-16.
- Hsieh, T. T., S. F. Chen, et al. (2012). "The association between maternal oxidative stress at mid-gestation and subsequent pregnancy complications." Reprod Sci **19**(5): 505-512.

- Itoh, S., L. Brawley, et al. (2002). "Vasodilation to vascular endothelial growth factor in the uterine artery of the pregnant rat is blunted by low dietary protein intake." *Pediatr Res* **51**(4): 485-491.
- Jansson, N. (2006). "Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet." *J Physiol* **576**(Pt 3): 935-946.
- Jansson, T., I. L. Aye, et al. (2012). "The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing." *Placenta* **33 Suppl 2**: e23-29.
- Jansson, T., K. Ylven, et al. (2002). "Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal plasma membranes in intrauterine growth restriction." *Placenta* **23**(5): 392-399.
- Jaquet, D., S. Deghmoun, et al. (2005). "Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth." *Diabetologia* **48**(5): 849-855.
- Jauniaux, E., B. Gulbis, et al. (2003). "The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus--a review." *Placenta* **24 Suppl A**: S86-93.
- Jauniaux, E., A. L. Watson, et al. (2000). "Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure." *Am J Pathol* **157**(6): 2111-2122.
- Jegatheesan, P., S. Beutheu, et al. (2016). "Effect of specific amino acids on hepatic lipid metabolism in fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease." *Clin Nutr* **35**(1): 175-182.
- Johal, T., C. C. Lees, et al. (2014). "The nitric oxide pathway and possible therapeutic options in pre-eclampsia." *Br J Clin Pharmacol* **78**(2): 244-257.
- Jones, H. N., T. L. Powell, et al. (2007). "Regulation of placental nutrient transport--a review." *Placenta* **28**(8-9): 763-774.
- Jurgens, H., W. Haass, et al. (2005). "Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice." *Obes Res* **13**(7): 1146-1156.
- Katz, J., A. C. Lee, et al. (2013). "Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle-income countries: a pooled country analysis." *Lancet* **382**(9890): 417-425.
- Kaufmann, P., T. M. Mayhew, et al. (2004). "Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy." *Placenta* **25**(2-3): 114-126.
- Kawakami, T., M. Yoshimi, et al. (2014). "Prolonged endoplasmic reticulum stress alters placental morphology and causes low birth weight." *Toxicol Appl Pharmacol* **275**(2): 134-144.
- Kelishadi, R., M. Mansourian, et al. (2014). "Association of fructose consumption and components of metabolic syndrome in human studies: a systematic review and meta-analysis." *Nutrition* **30**(5): 503-510.
- Khalil, A. A., D. Tsikas, et al. (2013). "Asymmetric dimethylarginine, arginine and homoarginine at 11-13 weeks' gestation and preeclampsia: a case-control study." *J Hum Hypertens* **27**(1): 38-43.
- Khaliq, A., C. Dunk, et al. (1999a). "Hypoxia down-regulates placenta growth factor, whereas fetal growth restriction up-regulates placenta growth factor expression: molecular evidence for "placental hyperoxia" in intrauterine growth restriction." *Lab Invest* **79**(2): 151-170.

- Khaliq, A., X. F. Li, et al. (1999b). "Localisation of Placenta Growth Factor (PIGF) in Human Term Placenta." Growth Factors **13**(3-4): 243-250.
- Kim, I. Y., S. E. Schutzler, et al. (2015). "Acute ingestion of citrulline stimulates nitric oxide synthesis but does not increase blood flow in healthy young and older adults with heart failure." Am J Physiol Endocrinol Metab **309**(11): E915-924.
- Kim, S. W. and G. Wu (2004). "Dietary arginine supplementation enhances the growth of milk-fed young pigs." J Nutr **134**(3): 625-630.
- Kim, Y. J., H. S. Park, et al. (2006). "Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia." Placenta **27**(4-5): 438-444.
- Kingdom, J., B. Huppertz, et al. (2000). "Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **92**(1): 35-43.
- Krause, B. J., I. Carrasco-Wong, et al. (2013). "Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels." Placenta **34**(1): 20-28.
- Lager, S. and T. L. Powell (2012). "Regulation of nutrient transport across the placenta." J Pregnancy **2012**: 179827.
- Lassala, A., F. W. Bazer, et al. (2010). "Parenteral administration of L-arginine prevents fetal growth restriction in undernourished ewes." J Nutr **140**(7): 1242-1248.
- Lassala, A., F. W. Bazer, et al. (2009). "Intravenous administration of L-citrulline to pregnant ewes is more effective than L-arginine for increasing arginine availability in the fetus." J Nutr **139**(4): 660-665.
- Le Floc'h, N. and B. Seve (2000). "Le devenir des protéines et des acides aminés dans l'intestin du porc : de la digestion à l'apparition dans la veine porte." INRA Prod. Anim. **13**(5): 303-314.
- Lee, A. C. C., J. Katz, et al. (2013). "National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010." The Lancet Global Health **1**(1): e26-e36.
- Levine, R. J., S. E. Maynard, et al. (2004). "Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia." N Engl J Med **350**(7): 672-683.
- Levy, L. and A. A. Jackson (1993). "Modest restriction of dietary protein during pregnancy in the rat: fetal and placental growth." J Dev Physiol **19**(3): 113-118.
- Levy, R., S. D. Smith, et al. (2002). "Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression." American Journal of Obstetrics and Gynecology **186**(5): 1056-1061.
- Lian, I. A., M. Loset, et al. (2011). "Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia." Placenta **32**(11): 823-829.
- Liu, X., Y. Lin, et al. (2014). "Maternal protein restriction alters VEGF signaling and decreases pulmonary alveolar in fetal rats." Int J Clin Exp Pathol **7**(6): 3101-3111.
- Lopez-Alarcon, M., I. Montalvo-Velarde, et al. (2015). "Serial determinations of asymmetric dimethylarginine and homocysteine during pregnancy to predict pre-eclampsia: a longitudinal study." BJOG **122**(12): 1586-1592.

- Loret de Mola, C., G. V. Araujo de Franca, et al. (2014). "Low birth weight, preterm birth and small for gestational age association with adult depression: systematic review and meta-analysis." Br J Psychiatry **205**(5): 340-347.
- Lumey, L. H. (1998). "Compensatory placental growth after restricted maternal nutrition in early pregnancy." Placenta **19**(1): 105-111.
- Madeleneau, D., C. Buffat, et al. (2015). "Transcriptomic analysis of human placenta in intrauterine growth restriction." Pediatr Res **77**(6): 799-807.
- Magee, T. R., G. Han, et al. (2008). "Down-regulation of transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor in programmed hepatic lipid dysregulation and inflammation in intrauterine growth-restricted offspring." Am J Obstet Gynecol **199**(3): 271 e271-275.
- Malin, G. L., R. K. Morris, et al. (2014). "When is birthweight at term abnormally low? A systematic review and meta-analysis of the association and predictive ability of current birthweight standards for neonatal outcomes." BJOG **121**(5): 515-526.
- Malin, G. L., R. K. Morris, et al. (2015). "When is birthweight at term ( $\geq 37$  weeks' gestation) abnormally low? A systematic review and meta-analysis of the prognostic and predictive ability of current birthweight standards for childhood and adult outcomes." Bjog **122**(5): 634-642.
- Mamikutty, N., Z. C. Thent, et al. (2014). "The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats." Biomed Res Int **2014**: 263897.
- Martin Agnoux, A., J. P. Antignac, et al. (2014). "Time window-dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity and energy substrate oxidation in adult male offspring." AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **307**(2): R184-R197.
- Mateo, R. D., G. Wu, et al. (2007). "Dietary L-arginine supplementation enhances the reproductive performance of gilts." J Nutr **137**(3): 652-656.
- Mehta, V., K. N. Abi-Nader, et al. (2012). "Long-term increase in uterine blood flow is achieved by local overexpression of VEGF-A(165) in the uterine arteries of pregnant sheep." Gene Ther **19**(9): 925-935.
- Mizuuchi, M., T. Cindrova-Davies, et al. (2016). "Placental endoplasmic reticulum stress negatively regulates transcription of placental growth factor via ATF4 and ATF6beta: implications for the pathophysiology of human pregnancy complications." J Pathol **238**(4): 550-561.
- Moinard, C., S. Le Plenier, et al. (2015). "Citrulline Supplementation Induces Changes in Body Composition and Limits Age-Related Metabolic Changes in Healthy Male Rats." J Nutr **145**(7): 1429-1437.
- Monier, I., B. Blondel, et al. (2015). "Poor effectiveness of antenatal detection of fetal growth restriction and consequences for obstetric management and neonatal outcomes: a French national study." BJOG **122**(4): 518-527.
- Movafagh, S., S. Crook, et al. (2015). "Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate." J Cell Biochem **116**(5): 696-703.
- Murphy, M. S., C. Tayade, et al. (2015). "Evidence of inflammation and predisposition toward metabolic syndrome after pre-eclampsia." Pregnancy Hypertens **5**(4): 354-358.

- Nall, J. L., G. Wu, et al. (2009). "Dietary supplementation of L-arginine and conjugated linoleic acid reduces retroperitoneal fat mass and increases lean body mass in rats." *J Nutr* **139**(7): 1279-1285.
- Netchine, I., S. Azzi, et al. (2011). "Défauts d'action de l'hormone de croissance : phénotypes cliniques, biologiques et moléculaires." *Médecine Clinique : Endocrinologie & Diabète Hors-série*(Mai): 20-27.
- Nevo, O., N. Soleymanlou, et al. (2006). "Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**(4): R1085-1093.
- Osol, G., G. Celia, et al. (2008). "Placental growth factor is a potent vasodilator of rat and human resistance arteries." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(3): H1381-1387.
- Oowska, S., T. Duchemann, et al. (2006). "Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**(3): E582-586.
- Paolini, C. L., A. M. Marconi, et al. (2001). "Placental transport of leucine, phenylalanine, glycine, and proline in intrauterine growth-restricted pregnancies." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(11): 5427-5432.
- Parkinson, J. R., M. J. Hyde, et al. (2013). "Preterm birth and the metabolic syndrome in adult life: a systematic review and meta-analysis." *Pediatrics* **131**(4): e1240-1263.
- Pereira, E. R., K. Frudd, et al. (2014). "Endoplasmic reticulum (ER) stress and hypoxia response pathways interact to potentiate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) transcriptional activity on targets like vascular endothelial growth factor (VEGF)." *J Biol Chem* **289**(6): 3352-3364.
- Popkin, B. M., L. S. Adair, et al. (2012). "Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries." *Nutr Rev* **70**(1): 3-21.
- Potter, M. A., S. Zeesman, et al. (2004). "Pregnancy in a healthy woman with untreated citrullinemia." *Am J Med Genet A* **129A**(1): 77-82.
- Powers, R., T. L. Weissgerber, et al. (2015). "[7-or]: L-Citrulline administration increases the arginine/ADMA ratio, decreases blood pressure and improves vascular function in obese pregnant women." *Pregnancy Hypertension* **5**(1): 4.
- Rajakumar, A., A. Jeyabalan, et al. (2007). "Placental HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, membrane and soluble VEGF receptor-1 proteins are not increased in normotensive pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**(2): R766-774.
- Rath, G., R. Aggarwal, et al. (2014). "HIF-1 Alpha and Placental Growth Factor in Pregnancies Complicated With Preeclampsia: A Qualitative and Quantitative Analysis." *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **30**(1): n/a-n/a.
- Rebelato, H. J., M. A. Esquisatto, et al. (2013). "Gestational protein restriction induces alterations in placental morphology and mitochondrial function in rats during late pregnancy." *J Mol Histol* **44**(6): 629-637.
- Roberts, J. M., L. Myatt, et al. (2010). "Vitamins C and E to prevent complications of pregnancy-associated hypertension." *N Engl J Med* **362**(14): 1282-1291.
- Romero, R., J. K. Nien, et al. (2008). "A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1)

- factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate." J Matern Fetal Neonatal Med **21**(1): 9-23.
- Rosso, P. and R. Kava (1980). "Effects of Food Restriction on Cardiac Output and Blood Flow to the Uterus and Placenta in the Pregnant Rat." The Journal of Nutrition **110**(12): 2350-2354.
- Rutland, C. S., A. O. Latunde-Dada, et al. (2007). "Effect of gestational nutrition on vascular integrity in the murine placenta." Placenta **28**(7): 734-742.
- Savvidou, M. D., A. D. Hingorani, et al. (2003). "Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia." Lancet **361**(9368): 1511-1517.
- Sferruzzi-Perri, A. N., O. R. Vaughan, et al. (2011). "Placental-specific Igf2 deficiency alters developmental adaptations to undernutrition in mice." Endocrinology **152**(8): 3202-3212.
- Sgambati, E., M. Marini, et al. (2004). "VEGF expression in the placenta from pregnancies complicated by hypertensive disorders." BJOG **111**(6): 564-570.
- Shibata, E., C. A. Hubel, et al. (2008). "Placental system A amino acid transport is reduced in pregnancies with small for gestational age (SGA) infants but not in preeclampsia with SGA infants." Placenta **29**(10): 879-882.
- Shibata, E., A. Rajakumar, et al. (2005). "Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor." J Clin Endocrinol Metab **90**(8): 4895-4903.
- Shibuya, M. (2001). "Structure and Function of VEGF/VEGF-receptor System Involved in Angiogenesis." Cell Structure and Function **26**(1): 25-35.
- Simeoni, U., A. Bocquet, et al. (2016). "[Early origins of adult disease]." Arch Pediatr **23**(5): 443-446.
- Simmons, D. G. and J. C. Cross (2005). "Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta." Dev Biol **284**(1): 12-24.
- Solomon, E., R. Avni, et al. (2014). "Major mouse placental compartments revealed by diffusion-weighted MRI, contrast-enhanced MRI, and fluorescence imaging." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(28): 10353-10358.
- Sooranna, S. R., N. H. Morris, et al. (1995). "Placental nitric oxide metabolism." Reprod Fertil Dev **7**(6): 1525-1531.
- Spencer, R. N., D. J. Carr, et al. (2014). "Treatment of poor placentation and the prevention of associated adverse outcomes - what does the future hold?" Prenat Diagn.
- Stepan, H., I. Herraiz, et al. (2015). "Implementation of the sFlt-1/PIGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice." Ultrasound Obstet Gynecol **45**(3): 241-246.
- Stettler, N., B. S. Zemel, et al. (2002). "Infant weight gain and childhood overweight status in a multicenter, cohort study." Pediatrics **109**(2): 194-199.
- Strakovsky, R. S., D. Zhou, et al. (2010). "A low-protein diet during gestation in rats activates the placental mammalian amino acid response pathway and programs the growth capacity of offspring." J Nutr **140**(12): 2116-2120.

- Symonds, M. E., S. P. Sebert, et al. (2009). "Nutritional programming of the metabolic syndrome." Nat Rev Endocrinol **5**(11): 604-610.
- Tain, Y. L., L. T. Huang, et al. (2015). "Maternal citrulline supplementation prevents prenatal N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME)-induced programmed hypertension in rats." Biol Reprod **92**(1): 7.
- Tain, Y. L., C. T. Lee, et al. (2014a). "Long-term effects of maternal citrulline supplementation on renal transcriptome prevention of nitric oxide depletion-related programmed hypertension: the impact of gene-nutrient interactions." Int J Mol Sci **15**(12): 23255-23268.
- Tain, Y. L., J. M. Sheen, et al. (2014b). "Maternal citrulline supplementation prevents prenatal dexamethasone-induced programmed hypertension." Free Radic Res **48**(5): 580-586.
- Tappy, L. and K. A. Le (2010). "Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity." Physiol Rev **90**(1): 23-46.
- Tay, A., A. T. Ozcelikay, et al. (2002). "Effects of L-arginine on blood pressure and metabolic changes in fructose-hypertensive rats." Am J Hypertens **15**(1 Pt 1): 72-77.
- Topping, D. L. and P. A. Mayes (1972). "The immediate effects of insulin and fructose on the metabolism of the perfused liver. Changes in lipoprotein secretion, fatty acid oxidation and esterification, lipogenesis and carbohydrate metabolism." Biochem J **126**(2): 295-311.
- Urschel, K. L., A. K. Shoveller, et al. (2006). "Citrulline is an effective arginine precursor in enterally fed neonatal piglets." J Nutr **136**(7): 1806-1813.
- Vadillo-Ortega, F., O. Perichart-Perera, et al. (2011). "Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on pre-eclampsia in high risk population: randomised controlled trial." BMJ **342**: d2901.
- Vadivel, A., J. L. Aschner, et al. (2010). "L-citrulline attenuates arrested alveolar growth and pulmonary hypertension in oxygen-induced lung injury in newborn rats." Pediatr Res **68**(6): 519-525.
- van den Akker, C. H., H. Schierbeek, et al. (2011). "Amino acid metabolism in the human fetus at term: leucine, valine, and methionine kinetics." Pediatr Res **70**(6): 566-571.
- Verhaeghe, J. (2008). "Does the physiological acromegaly of pregnancy benefit the fetus?" Gynecol Obstet Invest **66**(4): 217-226.
- Vosatka, R. J., P. M. Hassoun, et al. (1998). "Dietary L-arginine prevents fetal growth restriction in rats." Am J Obstet Gynecol **178**(2): 242-246.
- Wang, S. F., L. Shu, et al. (2014). "Birth weight and risk of coronary heart disease in adults: a meta-analysis of prospective cohort studies." J Dev Orig Health Dis **5**(6): 408-419.
- Warner, M. J. and S. E. Ozanne (2010). "Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease." Biochem J **427**(3): 333-347.
- Watson, E. D. and J. C. Cross (2005). "Development of structures and transport functions in the mouse placenta." Physiology (Bethesda) **20**: 180-193.
- Wigglesworth, J. S. (1974). "Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat." Am J Pathol **77**(2): 347-350.

- Wijnands, K. A., D. M. Meesters, et al. (2015). "Citrulline Supplementation Improves Organ Perfusion and Arginine Availability under Conditions with Enhanced Arginase Activity." Nutrients **7**(7): 5217-5238.
- Winer, N., B. Branger, et al. (2009). "L-Arginine treatment for severe vascular fetal intrauterine growth restriction: a randomized double-blind controlled trial." Clin Nutr **28**(3): 243-248.
- Wu, G., J. K. Collins, et al. (2007). "Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats." J Nutr **137**(12): 2680-2685.
- Wu, G., L. A. Jaeger, et al. (2004). "Arginine deficiency in preterm infants: biochemical mechanisms and nutritional implications." J Nutr Biochem **15**(8): 442-451.
- Wu, G. and S. M. Morris, Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." Biochem J **336** (Pt 1)(1): 1-17.
- Xiao, X. M. and L. P. Li (2005). "L-Arginine treatment for asymmetric fetal growth restriction." Int J Gynaecol Obstet **88**(1): 15-18.
- Xu, X. F., Y. J. Li, et al. (2014). "Effect of low birth weight on childhood asthma: a meta-analysis." BMC Pediatr **14**: 275.
- Xuan, C., L. M. Lun, et al. (2015). "L-citrulline for protection of endothelial function from ADMA-induced injury in porcine coronary artery." Sci Rep **5**: 10987.
- Yamada, M., D. Wolfe, et al. (2011). "Early onset of fatty liver in growth-restricted rat fetuses and newborns." Congenit Anom (Kyoto) **51**(4): 167-173.
- Yung, H. W., D. Atkinson, et al. (2014). "Differential activation of placental unfolded protein response pathways implies heterogeneity in causation of early- and late-onset pre-eclampsia." J Pathol **234**(2): 262-276.
- Yung, H. W., S. Calabrese, et al. (2008). "Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction." Am J Pathol **173**(2): 451-462.
- Yung, H. W., M. Cox, et al. (2012). "Evidence of endoplasmic reticulum stress and protein synthesis inhibition in the placenta of non-native women at high altitude." FASEB J **26**(5): 1970-1981.
- Zeisler, H., E. Llorba, et al. (2016). "Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia." N Engl J Med **374**(1): 13-22.

# Thèse de Doctorat

Nhat-Thang TRAN

**La citrulline, un nouvel agent en thérapeutique pour le retard de croissance intra-utérin (RCIU) ? Impact sur le placenta, la croissance fœtale et questions ouvertes sur la supplémentation néonatale dans un modèle animal de RCIU.**

## Résumé

Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) reste une complication fréquente de la grossesse et expose non seulement à une mortalité néonatale plus élevée, mais également au risque d'un cortège de pathologies chroniques (cardio-métaboliques) à l'âge adulte. Etant un fardeau important pour la santé publique dans le monde entier, il n'existe pas encore à ce jour de traitement curatif autre qu'une extraction plus précoce avec éventuellement une prématurité. Une étude récente de notre équipe a montré que l'administration de citrulline pendant la gestation améliore la croissance et la synthèse protéique fœtales dans un modèle de RCIU induit chez la rate par la restriction sévère en protéines. L'objectif de ce travail de thèse était donc d'explorer les mécanismes d'action de la supplémentation en citrulline pendant la période périnatale (gestation et allaitement) dans le même modèle. Notre première partie de ce travail confirme que la citrulline stimule la croissance en nous montrant que la supplémentation anténatale en citrulline agit dès le milieu de la gestation sur des gènes codant pour des facteurs de croissance, d'angiogénèse et de transporteurs d'acides aminés pour aboutir à une efficacité placentaire renforcée jusqu'à la fin de la gestation fœtale. Dans la deuxième partie, nous n'avons pas mis en évidence d'effet bénéfique de cette supplémentation postnatale chez des rats nés dénutris, puis soumis à un régime déséquilibré riche en fructose, ni en termes de croissance, ni sur le métabolisme glucido-lipidique à l'âge adulte jeune. La vigilance impose davantage d'explorations mécanistiques avant d'envisager une étude translationnelle clinique à ce stade sensible de développement qu'est la période néonatale. En revanche, dans le cas de la période gestationnelle, nos résultats incitent à réfléchir à la mise en place d'essais cliniques pertinents pour cette pathologie de la croissance fœtale.

## Mots clés

Retard de croissance intra-utérin, placenta, facteurs de croissance, facteurs d'angiogénèse, programmation fœtale, syndrome métabolique, modèle animal

## Abstract

Intra-uterine growth restriction (IUGR) remains a common pregnancy-related complication resulting not only in a significant neonatal mortality, but in an increased risk of chronic cardio-metabolic diseases in adulthood as well. This condition represents a serious burden to public health across the world due to lack of a curative treatment except early cessation of gestation with induced prematurity. Developing alternative strategies aimed towards targeted therapy would thus be highly desirable. In recent studies, we showed that citrulline supplementation during gestation in rats under severe dietary protein restriction enhanced fetal growth and protein synthesis. The objective of this work was to further investigate the mechanisms mediating the effect of citrulline during the perinatal period, i.e. gestation and nursing in the same model. In the first part, we confirmed that citrulline improved fetal growth, and further demonstrated that citrulline activated placental genes coding for growth factors, angiogenesis and amino acid transporters early from mid-gestation, resulting in improved fetal weight. However, in the second part of the current work, we failed to observe any beneficial effect of neonatal citrulline supplementation neither on growth, nor on the prevention of alterations of glucose and lipid metabolism in IUGR rats that were later exposed to an unbalanced, fructose-enriched diet. Therefore, further explorations are needed for a better mechanistic understanding before postnatal citrulline supplementation can be considered in translational trials. Otherwise, the results obtained in the gestational period in this work suggest clinical trials should be envisioned for prenatal citrulline supplementation in targeted populations of patients.

## Key Words

Intrauterin growth restriction, placenta, growth factors, angiogenic factors, fetal programming, metabolic syndrome, animal model