



**UNIL** | Université de Lausanne

Unicentre

CH-1015 Lausanne

<http://serval.unil.ch>

---

*Year : 2015*

## Altérations dans le cordon ombilical de nouveau-nés avec une restriction de la croissance intra-utérine

Flavien Delhaes

Flavien Delhaes, 2015, Altérations dans le cordon ombilical de nouveau-nés avec une restriction de la croissance intra-utérine

Originally published at : Thesis, University of Lausanne

Posted at the University of Lausanne Open Archive <http://serval.unil.ch>

Document URN : urn:nbn:ch:serval-BIB\_BB59C40B42045

### **Droits d'auteur**

L'Université de Lausanne attire expressément l'attention des utilisateurs sur le fait que tous les documents publiés dans l'Archive SERVAL sont protégés par le droit d'auteur, conformément à la loi fédérale sur le droit d'auteur et les droits voisins (LDA). A ce titre, il est indispensable d'obtenir le consentement préalable de l'auteur et/ou de l'éditeur avant toute utilisation d'une oeuvre ou d'une partie d'une oeuvre ne relevant pas d'une utilisation à des fins personnelles au sens de la LDA (art. 19, al. 1 lettre a). A défaut, tout contrevenant s'expose aux sanctions prévues par cette loi. Nous déclinons toute responsabilité en la matière.

### **Copyright**

The University of Lausanne expressly draws the attention of users to the fact that all documents published in the SERVAL Archive are protected by copyright in accordance with federal law on copyright and similar rights (LDA). Accordingly it is indispensable to obtain prior consent from the author and/or publisher before any use of a work or part of a work for purposes other than personal use within the meaning of LDA (art. 19, para. 1 letter a). Failure to do so will expose offenders to the sanctions laid down by this law. We accept no liability in this respect.



**UNIL** | Université de Lausanne

Faculté de biologie  
et de médecine

**Département Médico-Chirurgical de Pédiatrie**

**Altérations dans le cordon ombilical de nouveau-nés  
avec une restriction de la croissance intra-utérine**

**Thèse de doctorat ès sciences de la vie (PhD)**

présentée à la

Faculté de biologie et de médecine  
de l'Université de Lausanne

par

**Flavien Delhaes**

Master en Biologie Cellulaire et Physiopathologie  
De l'Université de Bordeaux

**Jury**

Prof. Lucas Liaudet, Président  
Prof. Jean-François Tolsa, Directeur de thèse  
Dr. Anne-Christine Peyter, Co-directeur  
Prof. Umberto Simeoni, expert  
Prof. Olivier Claris, expert

Lausanne 2015

# Imprimatur

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

<b>Président · e</b>	Monsieur Prof. Lucas <b>Liaudet</b>
<b>Directeur · rrice de thèse</b>	Monsieur Prof. Jean-François <b>Tolsa</b>
<b>Co-directeur · rrice</b>	Madame Dr Anne-Christine <b>Peyter</b>
<b>Experts · es</b>	Monsieur Prof. Umberto <b>Simeoni</b>
	Monsieur Prof. Olivier <b>Claris</b>

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

## **Monsieur Flavien Delhaes**

Masteren biologie cellulaire et physiopathologie DE L' Université de Bordeaux, France

intitulée

### **Altérations dans le cordon ombilical de nouveau-nés avec une restriction de la croissance intra-utérine**

Lausanne, le 16 décembre 2015

pour le Doyen  
de la Faculté de biologie et de médecine

Prof. Lucas Liaudet









# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury de thèse pour l'attention que vous avez portée à ce travail. Merci au Pr. Lucas Liaudet, d'avoir accepté de présider ce comité et aux Pr. Umberto Simeoni et Pr. Olivier Claris d'avoir accepté d'être experts de cette thèse, merci également au Dr. David Baud pour son expertise et ses conseils. Je tiens à exprimer ma gratitude envers vous tous.

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements au Pr. Jean-François Tolsa et au Dr. Anne-Christine Peyter. Merci de m'avoir dirigé et encadré pour ce travail de thèse. Merci à vous deux pour votre confiance et pour avoir contribué à mon épanouissement professionnel. Jean-François, je tiens à te remercier tout particulièrement, non seulement tu m'as accepté dans ton équipe, mais tu as proposé et appuyé ma candidature pour une collaboration à Québec. Merci pour les connaissances et l'ouverture d'esprit que j'en ai retiré, c'était une aventure superbe et très enrichissante, tant sur le plan humain que professionnel. Un très grand merci à toi Anne-Christine pour m'avoir guidé tout au long de ce travail, pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour tous tes conseils, j'ai beaucoup appris à tes côtés.

Un grand merci aux membres du groupe. A Giacomo Diaceri et Steeve Menetrey, mes deux supers techniciens. J'ai vraiment apprécié travailler à vos côtés. Merci pour toutes les connaissances techniques et les conseils que vous m'avez transmis. Merci pour les discussions et les rires, ainsi que pour les différentes propositions de Post-doc : "ah tiens, c'est intéressant ça !! Bon tu sais quoi faire pour les 3 prochaines années...". Un merci également à Coralie pour son aide précieuse. Je te souhaite bon courage ainsi que beaucoup de réussite dans le futur.

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements aux Pr. Aida Bairam et Pr. Richard Kinkead pour m'avoir accepté dans leur équipe dans le cadre d'une collaboration. Merci de m'avoir fait découvrir le monde complexe de "la respiration et de sa régulation".

Je remercie ceux qui m'ont soutenu en dehors du labo, ceux qui m'ont fait rire, ceux qui m'ont fait vivre mille aventures, ceux qui m'ont fait me sentir chez moi quel que soit l'endroit où j'étais, ceux qui malgré l'éloignement géographique ont toujours su rester proches. Mille mercis à toutes ces "pépites", celles que j'ai depuis des années : William et Mathilde B, Thibaud, Thibault, Daniel, Chloé, Florian, Romain L, Romain C, Romain G, Fiona, Flore, Mathilde, Agathe, Quentin, Amaia et à celles que j'ai trouvé durant ces quatre incroyables années : Céline, Cécile, Alima, Orlane R et B, François, J-P, Raphael, Caroline, Nicolas, Célia G, Oliver, Ana, Aurélie, Magalie, Stéphane, Laure, Bernard, Celia P, Mickaël, Lugdivine, Marion et Mathieu (M&M's) et Samia.

Un clin d'œil à tous les membres de l'association Rock Affinity. Merci pour tous ces moments partagés ensemble, à la bonne humeur et l'énergie que vous apportez à chaque soirée.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille, en particulier mes parents. Merci pour votre amour et votre soutien sans faille, pour nous avoir toujours poussé à aller de l'avant, autant moi que Cédric. Merci pour l'éducation et les valeurs que vous nous avez inculquées. Merci à Cédric et Lydie pour leurs passages en Suisse, c'était bon de vous avoir avec moi et d'avoir pu vous faire découvrir mon univers.

Ce manuscrit est organisé en deux parties. La première décrit l'ensemble des travaux menés sur "les altérations survenant dans le cordon ombilical de nouveau-nés avec une restriction de croissance intra-utérine". Ce travail a été réalisé en Suisse, dans le Laboratoire de Recherche en Néonatalogie (LRN), sous la direction du Pr. Jean-François Tolsa et du Dr. Anne-Christine Peyter. La deuxième partie décrit l'ensemble des résultats obtenus sur "les conséquences d'un stress gestationnel sur la modulation GABAergique de l'activité respiratoire chez des nouveau-nés en développement", travail réalisé au Québec, dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Neurophysiologie Respiratoire, sous la direction du Pr. Richard Kinkead et du Dr. Aida Bairam.

Ces deux projets étudient les conséquences de problèmes survenant durant la période périnatale et s'appuient sur l'hypothèse de Barker. En effet, le stress gestationnel, comme le retard de croissance intra-utérin entraînent tous deux chez l'individu concerné un risque accru de développer certaines pathologies au cours de sa vie adulte.

# Résumé

*Introduction:* Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) est défini comme une incapacité du fœtus à atteindre son plein potentiel de croissance. C'est une complication fréquente (affectant ~8% des grossesses), associée à un risque accru de mortalité et morbidité périnatales et de maladies chroniques à l'âge adulte, telles que les maladies coronariennes, l'hypertension, ou le diabète. Une croissance fœtale adéquate est déterminée principalement par la disponibilité en oxygène et nutriments apportés au fœtus par la circulation ombilico-placentaire. Chez l'homme, le tonus vasculaire ombilical est régulé majoritairement par la voie du monoxyde d'azote (NO)/GMPC. Nous avons émis l'hypothèse que le RCIU pourrait être associé à des altérations dans la régulation de la circulation ombilicale, en particulier dans la voie du NO/GMPC.

*Méthodes:* Cette étude a été conçue pour identifier dans des cordons ombilicaux, les changements structurels, fonctionnels et moléculaires survenant en cas de RCIU, en particulier dans la veine ombilicale.

*Résultats:* De façon générale, le diamètre du cordon ombilical était significativement réduit chez les nouveau-nés avec RCIU par rapport aux contrôles. Les mesures histomorphométriques ont mis en évidence une diminution significative de la surface transversale totale ainsi que de muscle lisse dans la veine ombilicale en cas de RCIU. Les études pharmacologiques effectuées sur des anneaux vasculaires de veines ombilicales ont montré une diminution de la tension maximale induite par des vasoconstricteurs chez les garçons avec RCIU, et une réduction significative de la relaxation induite par le NO chez les filles avec RCIU. Cette altération de la relaxation s'accompagne de modifications de plusieurs composants de la voie du NO/GMPC au niveau du muscle lisse de la veine ombilicale des filles avec RCIU. Enfin l'addition d'un inhibiteur non-spécifique des phosphodiesterases (PDEs) a permis d'améliorer la réponse au NO dans tous les groupes et surtout de compenser la réduction de la relaxation induite par le NO chez les filles avec RCIU.

*Conclusion:* Cette étude a permis de mettre en évidence des modifications structurelles dans le cordon ombilical de nouveau-nés présentant un RCIU, ainsi que des changements fonctionnels et moléculaires dans la veine ombilicale, en particulier dans la voie du NO/GMPC, qui pourraient contribuer au développement du RCIU. L'effet bénéfique de l'inhibition des PDEs sur la relaxation suggère qu'elles pourraient constituer des cibles thérapeutiques potentielles.

**Mots-clés** : restriction de croissance intra-utérine, veine ombilicale humaine, cordon ombilical, morphométrie, vasodilatation, oxyde nitrique, Guanylate Cyclase soluble, Guanosine monophosphate cyclique, protéine kinase dépendant du GMPC, phosphodiesterases, différences liées au genre

# Abstract

*Introduction:* Intrauterine growth restriction (IUGR) is defined as a failure of the fetus to reach its full growth potential. It is a common complication (affecting ~8% of all pregnancies), associated with an increased risk of perinatal mortality and morbidity, as well as chronic diseases later in life (like coronary heart disease, systemic hypertension, or diabetes). Adequate fetal growth is primarily determined by the availability of oxygen and nutrients, which are carried to the fetus by the umbilico-placental circulation. In humans, umbilical vascular tone is mainly regulated by the nitric oxide (NO)/cGMP pathway. We therefore hypothesized that IUGR could be associated with alterations in the regulation of umbilical circulation, and particularly in the NO/cGMP pathway.

*Methods:* This study was designed to identify in umbilical cords collected at birth structural, molecular and functional changes occurring in growth-restricted newborns, in particular in the umbilical vein.

*Results:* In our cohort, umbilical cord diameter was significantly reduced in growth-restricted neonates compared to controls. Histomorphometrical measurements displayed a significant decrease in total cross-sectional area and smooth muscle area of the umbilical vein in case of IUGR. Pharmacological studies of isolated umbilical vein rings showed a decrease in maximal vasoconstrictive response in growth-restricted males, and a significantly reduced NO-induced relaxation in growth-restricted females compared to controls. This altered relaxation was accompanied, in growth-restricted females, by changes in several components of the NO/cGMP pathway in smooth muscle of the umbilical vein. Finally, addition of a non-specific inhibitor of phosphodiesterases (PDEs) improved the relaxant response to NO in all groups and restored NO-induced relaxation in growth-restricted females.

*Conclusion:* The present study showed structural modifications in umbilical cord of growth-restricted newborns, as well as functional and molecular changes in the NO/cGMP pathway of the umbilical vein, which could contribute to the development of IUGR. The beneficial effect of PDEs inhibition suggests that PDEs could represent potential targets for therapeutic intervention.

**Keywords:** Intrauterine growth restriction, human umbilical vein, umbilical cord, morphometry, vasodilation, nitric oxide, soluble guanylyl cyclase, cyclic guanosine monophosphate, GMPc-dependent protein kinase, Phosphodiesterases, gender differences

# Table des matières

Remerciements.....	v
Résumé.....	vii
Abstract.....	ix
Table des matières.....	xi
Liste des figures.....	xiv
Liste des tableaux.....	xvi
Abréviations.....	xvii
<b>Partie 1. Stress gestationnel et RCIU, une étude sur un modèle humain.....</b>	<b>20</b>
<b>I. Introduction : Des perturbations de la croissance fœtale aux maladies chez l'adulte.....</b>	<b>21</b>
<b>1. Physiologie de la croissance fœtale et régulation.....</b>	<b>23</b>
1.1 Physiologie de la croissance fœtale.....	23
1.2 Nutrition prénatale et régulation hormonale.....	27
1.2.1 Nutrition et métabolisme énergétique.....	27
1.2.1 La respiration fœtale.....	31
1.2.2 Régulation hormonale.....	32
1.3 Altération de la croissance et programmation fœtale.....	35
1.3.1 L'hypothèse de Barker.....	35
1.3.2 Programmation fœtale.....	36
<b>2. Circulation fœto-placentaire et croissance fœtale.....</b>	<b>41</b>
2.1 Rôle de la circulation fœto-placentaire dans le développement du fœtus.....	42
2.1.1 Anatomie du cordon ombilical.....	42
2.1.2 Hémodynamique et physiologie de la circulation ombilicale.....	48
2.1.3 Vaisseaux ombilicaux et RCIU.....	51
2.2 Régulation de la circulation ombilico-placentaire, le rôle du monoxyde d'azote (NO) dans la relaxation.....	52
2.2.1 Le monoxyde d'azote (NO) : généralités et synthèse.....	52
2.2.2 Mécanismes de régulation du NO et mode d'action.....	56
2.2.3 Relation entre NO et RCIU.....	60
<b>3. RCIU et faible poids de naissance.....</b>	<b>63</b>
3.1 Définition et épidémiologie.....	63
3.2 Etiologie du RCIU.....	69
3.3 Identification et classification du RCIU.....	78
3.4 Effets à court terme d'un RCIU.....	84
3.5 Effets à long terme d'un RCIU.....	86
3.6 Stratégies thérapeutiques et prise en charge.....	90
<b>II. But de l'étude.....</b>	<b>92</b>
<b>III. Démarches expérimentales et méthodologie.....</b>	<b>95</b>
<b>1. Patients et groupes d'études.....</b>	<b>96</b>
1.1 Critères d'inclusion et d'exclusion.....	97



1.2	Groupes expérimentaux .....	98
<b>2.</b>	<b>Méthodes .....</b>	<b>99</b>
2.1	Prélèvement et dissection des cordons ombilicaux .....	99
2.2	Préparation des coupes histologiques .....	100
2.3	Marquages immunohistochimiques .....	101
2.4	Colorations et analyse histomorphométrique .....	103
2.5	Etude de la réactivité des vaisseaux du cordon ombilical .....	107
2.6	Western blot .....	110
2.7	Dosage du GMPc par ELISA, étude de la cinétique .....	115
2.8	Mesure du GMPc par ELISA .....	116
2.9	Analyses statistiques .....	117
<b>IV.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>118</b>
<b>1.</b>	<b>Les données démographiques .....</b>	<b>119</b>
1.1	Les données démographiques totales .....	119
1.2	La répartition des patients à l'intérieur des groupes expérimentaux .....	122
<b>2.</b>	<b>Examen histologique et histomorphométrique des vaisseaux du cordon .....</b>	<b>123</b>
2.1	Examen histologique .....	123
2.2	Mesures histomorphométriques .....	129
<b>3.</b>	<b>Etudes pharmacologiques .....</b>	<b>132</b>
3.1	Contraction induite avec le 5-HT et U46619 .....	132
3.2	Relaxation induite par le DEA/NO .....	133
3.3	Blocage de la dégradation du GMPc par l'IBMX .....	136
3.4	Rôle fonctionnel des phosphodiesterases .....	137
<b>4.</b>	<b>Etudes moléculaires .....</b>	<b>142</b>
4.1	Western blot .....	142
4.2	Dosage du GMPc par ELISA, étude de la cinétique .....	144
4.3	Dosage du GMPc par ELISA, comparaison entre CTR et RCIU .....	145
<b>V.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>148</b>
<b>1.</b>	<b>Données démographiques .....</b>	<b>149</b>
<b>2.</b>	<b>Relation entre poids du placenta, diamètre du cordon ombilical et poids fœtal .....</b>	<b>150</b>
<b>3.</b>	<b>Mesures histologiques des vaisseaux .....</b>	<b>152</b>
<b>4.</b>	<b>Réactivité de la veine ombilicale isolée .....</b>	<b>153</b>
<b>5.</b>	<b>Etude des composants impliqués dans la voie de relaxation du NO/GMPc et sa régulation .....</b>	<b>156</b>
<b>VI.</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>163</b>
<b>Partie 2.</b>	<b>Stress gestationnel et activité respiratoire, une étude sur modèle animal .....</b>	<b>167</b>
	<b>Résumé .....</b>	<b>168</b>
	<b>Abstract .....</b>	<b>170</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>171</b>
<b>2.</b>	<b>Conséquences d'un stress gestationnel sur la modulation GABAergique de l'activité respiratoire chez des nouveau-nés en développement .....</b>	<b>173</b>
<b>3.</b>	<b>Principaux résultats .....</b>	<b>182</b>

<b>VII. Conclusion générale .....</b>	<b>183</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>185</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>198</b>

# Liste des figures

Figure 1:1 Croissance fœtale, mesure du poids et de la taille selon l'âge gestationnel. ....	25
Figure 1:2 Représentation des pressions partielles en oxygène par compartiment, de l'air ambiant jusqu'aux tissus fœtaux.....	32
Figure 1:3 Déterminants principaux de la nutrition fœtale et de la croissance. ....	39
Figure 1:4 Représentation schématique de l'unité fœto-placentaire.....	42
Figure 1:5 Diamètre et aire du cordon ombilical selon l'âge gestationnel. ....	43
Figure 1:6 Aspect extérieur du cordon ombilical à la naissance. ....	43
Figure 1:7 Insertion du cordon ombilical au niveau placentaire. ....	44
Figure 1:8 Structure du cordon ombilical.....	45
Figure 1:9 Représentation schématique de la structure d'une veine et d'une artère. ....	47
Figure 1:10 Représentation schématique d'une coupe transverse d'un placenta à terme. ....	49
Figure 1:11 Représentation de l'évolution du flux veineux selon l'âge gestationnel. ....	51
Figure 1:12 Représentation schématique de la synthèse endogène du monoxyde d'azote. ....	54
Figure 1:13 Représentation schématique de la cascade de relaxation activée par le NO.....	58
Figure 1:14 Comparaison des différents profils de croissance foetale en condition normale et pathologique. ....	65
Figure 1:15 Pourcentage de naissances vivantes avec un poids inférieur à 2500 g selon les pays d'Europe. ....	68
Figure 1:16 Incidence du faible poids à la naissance au niveau mondial. ....	69
Figure 1:17 Doppler ombilical. ....	81
Figure 1:18 Comparaison de la forme d'onde Doppler en condition normale et pathologique. ....	81
Figure 1:19 Répartition de l'ensemble des naissances, mortinaissances et décès infantiles selon le poids. ....	86
Figure 2:1 Proposition de mécanisme conduisant au développement d'un RCIU.....	93
Figure 3:1 Description de la dissection d'un cordon ombilical.....	100
Figure 3:2 Représentation schématique du complexe avidine-biotine-peroxidase.....	102
Figure 3:3 Description du processus de mesure et d'analyse de la surface du cordon.....	106
Figure 3:4 Représentation du système de cuves à organe isolé et du myographe.....	109
Figure 3:5 Représentation du système de transfert des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane de nitrocellulose.....	113
Figure 4:1 Corrélation entre le poids corporel à la naissance et le poids placentaire ou le diamètre du cordon ombilical.....	121
Figure 4:2 Détection par immunohistochimie du muscle lisse et de l'endothélium.....	125

<b>Figure 4:3 Comparaison des différentes colorations histologiques obtenues avec le double marquage immunohistochimique (objectif 7.8X).....</b>	<b>126</b>
<b>Figure 4:4 Comparaison des différentes colorations histologiques obtenues avec le double marquage immunohistochimique (objectif 25X). .....</b>	<b>128</b>
<b>Figure 4:5 Mesures histomorphométriques de la veine ombilicale de nouveau-nés avec une croissance normale (Ctr) ou un retard de croissance intra-utérin (RCIU).....</b>	<b>131</b>
<b>Figure 4:6 Relaxation induite par des doses cumulatives de DEA/NO sur des veines ombilicales de nouveau-nés avec une croissance normale (Ctr) ou un retard de croissance intra-utérin (RCIU).....</b>	<b>134</b>
<b>Figure 4:7 Relaxation induite par des doses cumulatives de DEA/NO sur des veines ombilicales isolées, comparaison selon le sexe.....</b>	<b>135</b>
<b>Figure 4:8 Relaxation induite par des doses cumulées d'IBMX sur des veines ombilicales isolées. ....</b>	<b>137</b>
<b>Figure 4:9 Relaxation induite par des doses cumulatives de DEA/NO sur des veines ombilicales isolées, en présence ou absence d'IBMX.....</b>	<b>139</b>
<b>Figure 4:10 Quantification relative des protéines impliquées dans la voie NO/GMPc à partir de veines ombilicales de nouveau-nés avec une croissance normale (Ctr) ou un retard de croissance intra-utérin (RCIU).....</b>	<b>143</b>
<b>Figure 4:11 Quantification de la production de GMPc dans une veine ombilicale isolée de fille en présence de DEA/NO à différents temps (0, 2, 4, 6 et 10 min).....</b>	<b>145</b>
<b>Figure 4:12 Quantification de la production de GMPc à partir de veines ombilicales de nouveau-nés avec une croissance normale (Ctr) ou un retard de croissance intra-utérin (RCIU).....</b>	<b>147</b>
<b>Figure 1':1 Proposition de mécanisme conduisant aux pathologies respiratoires chez le nouveau-né.....</b>	<b>172</b>

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1:1 Croissance fœtale, mesure du poids et de la taille selon l'âge gestationnel.</b> .....	24
<b>Tableau 1:2 Répartition de la prise de poids durant la grossesse.</b> .....	26
<b>Tableau 1:3 Prise de poids recommandée durant la grossesse en fonction de l'indice de masse corporel (IMC) de la mère au moment de la conception.</b> .....	27
<b>Tableau 1:4 Coût énergétique théorique de la grossesse et de ses composants.</b> .....	28
<b>Tableau 1:5 Principales caractéristiques des familles de phosphodiésterases.</b> .....	60
<b>Tableau 4:1 Données démographiques relatives à tous les patients inclus dans cette étude.</b> .....	120
<b>Tableau 4:2 Représentation de la distribution des patients dans les différents sous-groupes selon leur percentile.</b> .....	122
<b>Tableau 4:3 Mesures histomorphométriques de coupes de cordons ombilicaux inclus en paraffine.</b> .....	130
<b>Tableau 4:4 Tension de repos optimale et résiduelle de veine ombilicale isolée contractée au U46619 ou à la 5-HT .</b> .....	132
<b>Tableau 4:5 EC<sub>50</sub> et Emax calculées à partir des courbes de relaxation induites au DEA/NO.</b> .....	136
<b>Tableau 4:6 Tension de repos optimale et tension résiduelle de veine ombilicale isolée contractée au thromboxane A2 (U46619) ou à la sérotonine (5-HT) en absence ou présence d'IBMX.</b> .....	138
<b>Tableau 4:7 EC<sub>50</sub> et Emax calculées par analyse de régression non linéaire à partir des courbes de relaxation induites au DEA/NO, en présence ou absence d'IBMX.</b> .....	140

## Abréviations

Les abréviations et acronymes utilisés dans ce mémoire sont explicités ci-dessous. Certains ont été laissés sous leur forme anglaise, plus couramment utilisée dans le langage scientifique (leur traduction en français est présentée entre parenthèses).

11 $\beta$ -HSD2	11 $\beta$ -hydroxystéroïde deshydrogénase de type 2
5-HT	Sérotonine
AGA	Adapted for Gestational Age (Adaptés pour l'âge gestationnel)
AST	aire de la section transversale
ATP	Adénosine TriPhosphate
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CO	Cordon Ombilical
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CTR	Contrôle
DEA/NO	2-(N,N-DiEthylAmino)-diazénolate-2-Oxide
DOHaD	Developmental Origins of Health and Disease (Origines développementales de la santé et des maladies)
EC <sub>50</sub>	Median Effective Concentration (Concentration Efficace médiane)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Dosage d'ImmunoAdsorption par Enzyme Liée)
Emax	Effet maximal
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase (Oxyde Nitrique Synthase endothéliale)
FPN	Faible Poids à la Naissance
GABA	Gamma-AminoButyric Acid (Acide Gamma-AminoButyrique)
GCs	Guanylate Cyclase soluble
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GTP	Guanosine TriPhosphate
H&E	Hématoxyline et Eosine
HHS	Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell (Cellules Endothéliales de Veine Ombilicale Humaine)
IBMX	3-IsoButyl-1-MethylXanthine
IGF	Insulin Growth Factor (Facteur de croissance ressemblant à l'insuline)
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase (Oxyde Nitrique Synthase inductible)

LF	Longueur du Fémur
MEC	Matrice ExtraCellulaire
NLA	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginine
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthase (Oxyde Nitrique Synthase neuronale)
NO	Oxyde Nitrique
NOS	NO synthase
O <sub>2</sub>	Dioxygène
OC	Organ Chamber (Chambre à Organe)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Périmètre Abdominal
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampon Phosphate Salin)
PC	Périmètre Céphalique
PDEs	PhosphoDiEsterases
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandine I <sub>2</sub>
PKG	Protéine kinase dépendant du GMPC
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
RCIU	Retard de Croissance Intra-Utérin
R&F	Résorcine et Fuchsine
SA	Semaine d'Aménorrhée
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electrophorèse en Gel de PolyAcrylamide)
SAM	Syndrome d'Aspiration Méconiale
SG	Stress Gestationnel
SGA	Small for Gestational Age (petit pour l'âge gestationnel)
SMC	Smooth Muscle Cell (Cellule Musculaire Lisse)
TM	Trichrome de Masson
TBS-T	Tris-Buffered Saline and Tween 20 (Tampon Salin de Tris et Tween 20)
Txa <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
UA	Umbilical Artery (artère ombilicale)
UNICEF	United Nations of International Children's Emergency Fund (Le Fonds des Nations unies pour l'enfance)
UV	Umbilical Vein (veine ombilicale)
U46619	Analogue du Thromboxane A <sub>2</sub>
VIH	virus de l'immunodéficience humaine





# **Partie 1.**

**Stress gestationnel et RCIU,**

**une étude sur un modèle**

**humain**

# **I. Introduction :**

## **Des perturbations de la croissance fœtale aux maladies chez l'adulte**



# 1. Physiologie de la croissance fœtale et régulation

## 1.1 Physiologie de la croissance fœtale

La croissance fœtale est un processus extrêmement complexe et organisé, caractérisé par la constitution de tissus, une augmentation de la taille et une maturation des structures. C'est un phénomène multifactoriel, qui va dépendre non seulement du potentiel de croissance inscrit dans le génome fœtal, mais aussi de l'environnement maternel et placentaire. Le développement fœtal correspond à un mécanisme dynamique : durant tout le temps que dure la grossesse, l'organisme va coordonner des modifications au niveau moléculaire et cellulaire, afin de permettre un développement harmonieux. Chez l'être humain, la durée de la grossesse est en moyenne de 266 jours (soit 38 semaines). Cependant, en obstétrique, le calcul des semaines de grossesse se fait généralement à compter du premier jour des dernières règles. On parle alors en semaines d'aménorrhée (SA). Sur cette base de calcul, la grossesse dure donc 41 semaines. La croissance fœtale peut se décomposer en deux phases successives: une période embryonnaire et une période fœtale. La période embryonnaire débute dès la fécondation jusqu'à la 9<sup>e</sup> semaine de gestation. Durant cette phase embryonnaire, la plupart des organes se développent. Il est estimé que 90 % des structures tissulaires répertoriées chez l'adulte apparaissent à l'état d'ébauche durant ce stade (1). La phase fœtale commence après cette période, et s'étend jusqu'au terme de la grossesse. Durant la période fœtale, les organes vont croître et subir différents stades de maturation. Ces deux phénomènes ont lieu en parallèle. La maturation concerne l'aspect qualitatif et correspond au processus de différenciation cellulaire. La croissance quant à elle concerne l'aspect quantitatif et est basée sur deux

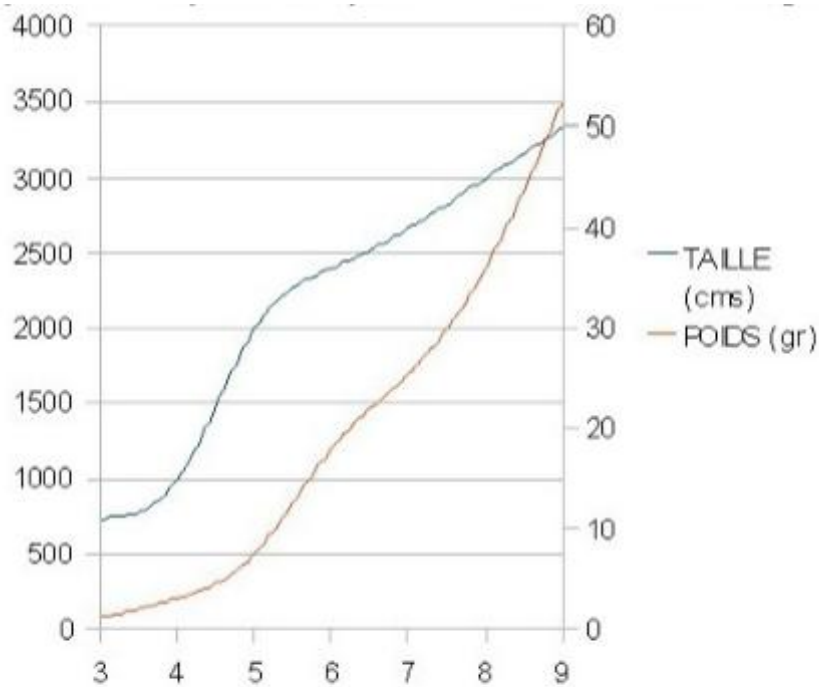
phénomènes, l'hyperplasie cellulaire (croissance par multiplication cellulaire) et l'hypertrophie cellulaire (croissance de la taille cellulaire). La croissance fœtale s'effectue principalement par multiplication cellulaire jusqu'à la 20<sup>ème</sup> semaine, puis par l'augmentation de la taille des cellules. La mise en place de ces processus est d'une importance cruciale pour le bon développement des tissus/structures et leur fonctionnement à la naissance.

La croissance du fœtus tout au long de la grossesse peut être évaluée par deux paramètres facilement quantifiables, la taille et le poids. L'augmentation de la taille est liée à celle du squelette, alors que l'augmentation du poids du fœtus est proportionnelle à celle du placenta. De manière générale, entre la 10<sup>e</sup> SA à la 40<sup>e</sup> SA, la taille du fœtus passe de 3 à 50 centimètres et son poids de 5 à 3500 g (tableau 1:1). L'augmentation du poids et de la taille durant la grossesse n'est pas obligatoirement homogène (Figure 1:1). Chez l'être humain, l'augmentation de poids est lente jusqu'à la 23<sup>e</sup> semaine de gestation puis s'accélère et atteint un pic vers la 34<sup>e</sup> semaine (le poids fœtal double durant les dix dernières semaines). Au contraire, l'augmentation de la taille est rapide durant les 20 premières semaines de gestation, puis ralentit progressivement jusqu'au terme.

<b>TERME</b> (mois)	<b>TAILLE</b> (cm)	<b>POIDS</b> (gr)
<b>3</b>	11	70
<b>4</b>	15	200
<b>5</b>	30	500
<b>6</b>	36	1 200
<b>7</b>	40	1 700
<b>8</b>	45	2 400
<b>9</b>	50	3 500

*Source : UVMaF*

**Tableau 1:1 Croissance fœtale, mesure du poids et de la taille selon l'âge gestationnel.**  
(D'après UVMaF: Université Virtuelle de Maïeutique Francophone).



Source : UVMaF

**Figure 1:1 Croissance fœtale, mesure du poids et de la taille selon l'âge gestationnel.**  
(D'après UVMaF: Université Virtuelle de Maïeutique Francophone).

La prise de poids totale pendant la grossesse est un autre paramètre facilement quantifiable, et peut être corrélée à la croissance fœtale. Hytten et Leitch ont analysé plusieurs études traitant du gain de poids durant la gestation et ont conclu que l'augmentation du poids de la mère durant la grossesse était en moyenne de 12 kg (poids observé à terme chez des femmes primipares en bonne santé) (2). La prise de poids durant la grossesse inclut le poids du fœtus, du placenta, et du liquide amniotique mais également l'augmentation des tissus maternels (tissus utérin, tissus adipeux et volume sanguin) (Tableau 1:2). Les données recensées ont montré que la prise de poids avant et pendant la grossesse étaient indépendantes, mais pouvaient avoir un effet additif sur le poids du nouveau-né. Par exemple, un poids maternel élevé avant la grossesse associé à une forte augmentation du poids pendant la grossesse favorise la naissance d'enfants avec un

poids plus élevé que des mères avec un plus faible poids avant la grossesse ayant également pris du poids de manière importante pendant la grossesse. La prise optimale conseillée durant la grossesse va dépendre du poids de la mère au début de la grossesse (Tableau 1:3)(3).

Le changement de poids total pendant la grossesse et la croissance fœtale associée vont donc fortement varier selon la mère, pouvant aller de la perte de poids à un gain de plus de 30 kg. Les deux cas extrêmes que sont la maigreur constitutionnelle ou le surpoids (voire l'obésité) vont grandement influencer la croissance fœtale et peuvent être source de complications comme le RCIU et la macrosomie respectivement). Cette variation est principalement attribuable aux apports en nutriments et en oxygène durant la grossesse, ainsi qu'aux modulateurs endocriniens. Le rôle et l'importance de ces facteurs seront abordés dans la section suivante (cf. 1.2 Nutrition prénatale et régulation hormonale).

**Tableau 1 : Répartition de la prise de poids durant la grossesse. D'après (Polonovski, 1992).**

Accroissement en poids	10 <sup>ème</sup> semaine	20 <sup>ème</sup> semaine	30 <sup>ème</sup> semaine	40 <sup>ème</sup> semaine
Fœtus (g)	15	320	1500	3500
Placenta et liquide amniotique (g)	40	400	1050	1250
Utérus et seins (g)	150	750	1100	1300
Sang (g)	100	500	1100 - 1300	1100 - 1200
Liquide interstitiel (g)	100	200 - 400	400 - 800	1000 - 1200
Réserves adipeuses (g)	200 - 300	800 - 1600	2000 - 3500	2000 - 4000
<b>Prise de poids totale (g)</b>	<b>600 - 700</b>	<b>3000 - 4000</b>	<b>7000 - 9000</b>	<b>12000 - 12500</b>

**Tableau 1:2 Répartition de la prise de poids durant la grossesse.**  
(D'après Polonovski et al., 1992).

Weight-for-height category	Recommended total gain (kg)
Low (BMI < 19.8)	12.5–18
Normal (BMI 19.8–26.0)	11.5–16
High (BMI > 26.0–29.0) <sup>2</sup>	7–11.5

**Tableau 1:3** Prise de poids recommandée durant la grossesse en fonction de l'indice de masse corporel (IMC) de la mère au moment de la conception.  
(D'après Abrams *et al.*, 2000).

## 1.2 Nutrition prénatale et régulation hormonale

### 1.2.1 Nutrition et métabolisme énergétique

Le développement optimal du fœtus dépend principalement d'un apport continu en nutriments (glucose, acides aminés, lipides, vitamines et oligo-éléments) et oxygène (O<sub>2</sub>) fournis par la circulation maternelle, ainsi que de la capacité du placenta et du fœtus à les utiliser (4-6). Durant la grossesse, l'apport d'énergie permet d'assurer l'accrétion tissulaire (maternelle et fœtale), l'augmentation du métabolisme de base lié à la grossesse, la constitution de réserves énergétiques (lipides dans le tissu adipeux maternel), ainsi que la couverture des besoins du fœtus et de ses annexes (utérus, placenta, liquide amniotique). Le coût total théorique d'une grossesse est estimé à environ 85 000 kcal (7), et équivaut à une consommation journalière moyenne de 300 kcal. Les dépenses énergétiques se répartissent entre la composition protéique (5 000 kcal), la constitution des réserves lipidiques de la mère et du fœtus (35 000 kcal), l'augmentation du métabolisme maternel de base (35 000 kcal) et les besoins additionnels (10 000 kcal). La plus grande partie des dépenses énergétiques n'est donc pas liée au fœtus (tableau 1:4).



Component	Energy Cost, kcal/day (Mean Daily Increments of Protein and Fat, g/day) by Period of Gestation, wk				Cumulative Total, kcal (g)
	0-10	10-20	20-30	30-40	
Protein deposition	3.6 (0.64) <sup>b</sup>	10.3 (1.84)	26.7 (4.76)	34.2 (6.1)	5,186 (925)
Fat deposition	55.6 (5.85)	235.6 (24.80)	207.6 (21.85)	31.3 (3.3)	36,329 (3,825)
Increase in basal metabolism	44.8	99.0	148.2	227.2	35,717
Total net energy	104.0	344.9	382.5	292.7	77,234
Additional energy required from food (total net energy + 10%)	114.0	379.0	421.0	322.0	84,957

<sup>a</sup> From Hytten (1980), with permission from Blackwell Scientific Publications, Inc.

<sup>b</sup> Heat of combustion defined as 5.6 kcal/g for protein and 9.5 kcal/g for fat.

**Tableau 1:4 Coût énergétique théorique de la grossesse et de ses composants.**  
(D'après Hytten et al. 1980)(7).

Parmi les nutriments, le glucose joue un rôle primordial dans les apports énergétiques (5, 8). En effet, il assure environ 50% du métabolisme énergétique fœtal, l'autre moitié servant à la croissance du fœtus ainsi qu'à la synthèse de glycogène et de triglycérides pour la constitution de réserves (9, 10). Du fait de l'absence de production significative de glucose chez le fœtus humain, sa présence au niveau fœtal est donc entièrement liée à l'apport maternel. Dans des conditions physiologiques, la glycémie fœtale étant inférieure à la glycémie maternelle, le transfert de glucose se fait par diffusion facilitée à travers le placenta et suit le gradient de concentration. Le placenta est lui-même un grand consommateur et utilise 60% du glucose extrait de la circulation maternelle pour son propre métabolisme, les 40% restant étant pour le fœtus (11). Le lactate constitue une autre source de substrat énergétique pour le fœtus. A la différence du glucose, le lactate est produit par le placenta et équivaut à la moitié des apports de glucose maternel.

Les acides aminés extraits de la circulation maternelle sont essentiellement utilisés par le fœtus et très peu par le placenta (12). Les acides aminés sont fournis au fœtus par un

mécanisme de transfert actif à travers le placenta contre leur gradient de concentration. Ainsi la concentration en acides aminés dans le plasma fœtal est à peu près le double de celle observée chez la mère. Les acides aminés sont utilisés pour la synthèse de protéines fœtales, comme métabolites énergétiques et comme précurseurs des substances non protéiques (nucléotides, polyamines, neurotransmetteurs, etc). Enfin, ils permettent la constitution de réserves protéiques et glucidiques.

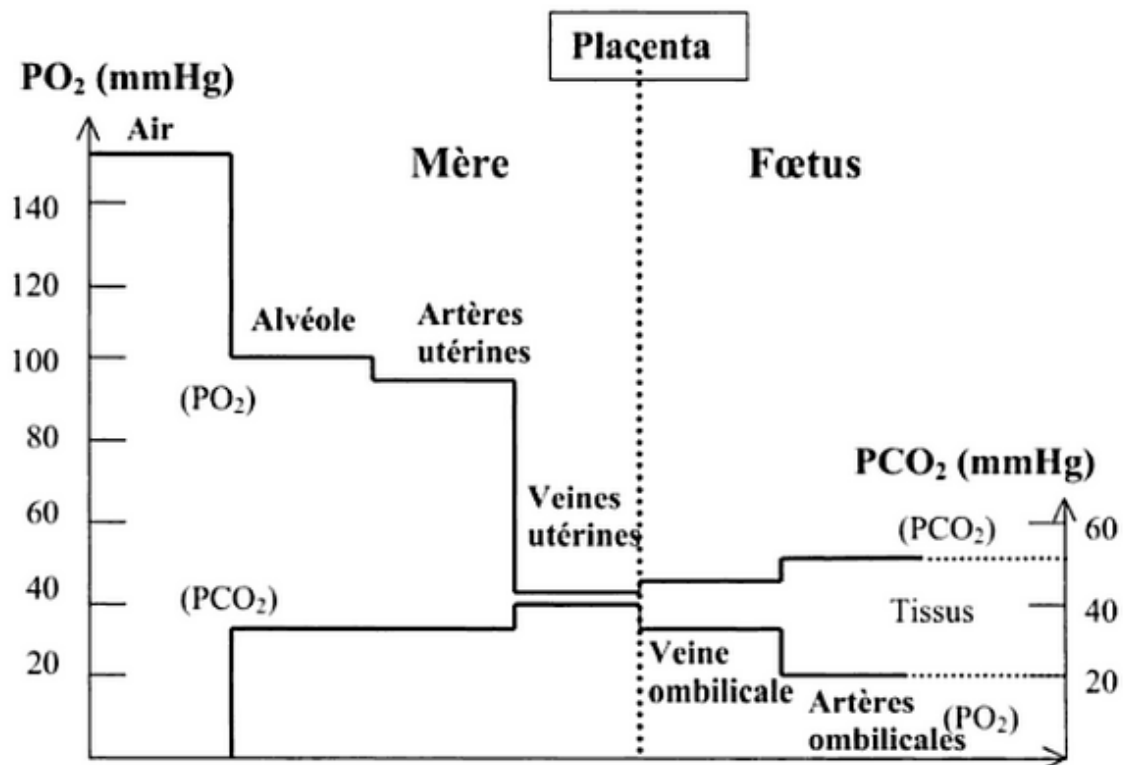
Le fœtus a également besoin d'un apport en acides gras essentiels et de leurs dérivés comme l'acide arachidonique (n-6) et docosahexaénoïque (n-3) (13, 14). Les concentrations de lipides (cholestérol, triglycérides, acides gras libres) et de lipoprotéines augmentent dans le sang maternel, surtout en fin de grossesse ; environ un tiers de ces composés est utilisé par le placenta, les deux tiers restant servant au fœtus (15). Le transfert des acides gras au fœtus dépend principalement de la concentration plasmatique maternelle et s'effectue par diffusion simple ; en revanche, d'autres acides gras comme l'acide linoléique ou arachidonique sont transférés préférentiellement au fœtus par un transport actif à travers le placenta (13). Les lipides ne traversent pas la membrane placentaire et sont synthétisés par le fœtus à partir de constituants de plus faible poids moléculaire, tel que des acétates libres et certains acides gras libres (13). Les acides gras libres contribuent peu au métabolisme oxydatif du fœtus et vont être essentiellement utilisés pour la création de réserves lipidiques et glucidiques. Les lipides sont importants pour une bonne adaptation à la vie extra-utérine, car ils constituent une réserve d'énergie utilisable dès la naissance. De plus, certains acides gras (familles n-3 et n-6) sont indispensables au bon fonctionnement des cellules. En effet, autant le fœtus que le placenta ont besoin d'acides gras pour la synthèse de lipides complexes nécessaires à la biogenèse des membranes plasmiques et des organelles. D'autre part, la formation des cellules du système nerveux va nécessiter une grande quantité de lipides.

Le rôle des micronutriments est essentiel à chaque étape de la croissance et du développement fœtal. Ainsi l'acide rétinolique est essentiel pour la signalisation, le zinc stabilise les enzymes et les facteurs de transcription, il a également un rôle primordial pour l'activité catalytique, comme le cuivre et le fer (16). Une carence en fer va être associée à une anémie maternelle et à un risque accru d'hémorragie maternelle. Les vitamines liposolubles, de par leur rôle antioxydant, protègent les cellules contre les dommages induits par les radicaux libres.

Les besoins nutritionnels et le métabolisme vont varier au cours de la grossesse. Au début de la grossesse, le fœtus est relativement petit. Malgré une multiplication cellulaire rapide, la quantité de substrats nécessaire au développement reste faible, le surplus de nutriments étant utilisé pour la création de réserves adipeuses maternelles (lipide et molécules azotées). Cette période correspond à la phase anabolique de la grossesse ; les réserves énergétiques engrangées seront utilisées plus tard pour répondre aux besoins grandissant du fœtus. A partir de la 25<sup>e</sup> semaine, le fœtus se développe à un rythme exponentiel (le poids fœtal double dans les dix dernières semaines) et doit compléter la formation de structures importantes, tel que le système nerveux central. On entre alors dans la phase catabolique de la grossesse, où la mère va dégrader les réserves précédemment constituées afin de subvenir aux besoins du fœtus. Il a été estimé que, pour un fœtus à terme, 40-50 kcal/kg/j sont utilisés pour la formation des tissus, tandis que 50 kcal/kg/j vont servir à des fins d'oxydation (17). Les études chez des femmes en bonne santé et sous-alimentées montrent que, jusqu'au dernier trimestre, il y a peu de différence au niveau du poids fœtal entre les deux groupes, les changements visibles dans le poids se produisant principalement entre la 25<sup>e</sup> et la 40<sup>e</sup> semaine de grossesse.

### 1.2.1 La respiration fœtale

Le développement optimal du fœtus dépend étroitement d'un apport constant en oxygène fourni par la circulation maternelle et de la capacité du placenta à l'extraire afin de l'acheminer au fœtus via le cordon ombilical. L'oxygène transporté dans le sang par l'hémoglobine diffuse d'une zone de haute pression partielle vers une zone de basse pression partielle de façon passive. Ainsi l'oxygène va diffuser depuis les poumons de la mère (100 mm Hg) vers le sang artériel maternel (95 mm Hg), puis vers le sang fœtal après son passage dans le placenta, il va être transféré (35-55 mm Hg) pour être finalement acheminé aux tissus (10-15 mm Hg). Ce processus peut être comparé à une "cascade" de l'oxygène depuis l'air ambiant jusqu'aux tissus du fœtus où il est consommé (Figure 1:2) (18). Durant la grossesse de nombreux mécanismes adaptatifs se mettent en place chez la mère. Cependant, l'affinité de l'hémoglobine maternelle pour l'oxygène elle n'est pas modifiée et la pression partielle en oxygène artérielle reste élevée: en conséquence, le sang artériel reste proche de la saturation ( $O_2 = 16 \text{ ml}/100 \text{ ml}$  de sang). De façon très intéressante, la saturation en oxygène est similaire dans la veine ombilicale, malgré une pression partielle en oxygène pourtant plus basse. Ceci est dû, d'une part, à une affinité plus élevée de l'hémoglobine fœtale pour l'oxygène, et d'autre part à une hémoglobinémie fœtale élevée (16,5 g/100 ml). Le sang maternel apporte donc en moyenne un volume d'oxygène égal à 70 ml/min, ce qui couvre grandement les besoins du fœtus qui sont de 8 ml/min par kg. L'oxygène est utilisé pour l'oxydation du glucose, qui représente la principale source d'énergie du placenta et du fœtus. Le placenta utilise la moitié de l'oxygène total pour son propre métabolisme, l'autre moitié étant utilisée par le fœtus.



**Figure 1:2** Représentation des pressions partielles en oxygène par compartiment, de l'air ambiant jusqu'aux tissus fœtaux.

(D'après l'embryon chez l'homme et l'animal, chapitre "les circulations maternelle et fœtale" par Bonnin P, p.233).

### 1.2.2 Régulation hormonale

Les facteurs de croissance maternels, fœtaux et placentaires jouent un rôle prépondérant dans le maintien de la gestation et dans la modulation de la croissance fœtale. En outre, les hormones jouent un rôle de senseur de la disponibilité en oxygène et en nutriments. Elles peuvent alors stimuler ou inhiber la croissance du fœtus en agissant sur le métabolisme fœtal (réactions anaboliques et cataboliques). Ainsi face à un apport insuffisant en nutriments, le taux d'hormones circulant est modifié et va signaler au fœtus qu'il doit adapter son métabolisme afin de devenir "économe", ce qui a pour conséquence un ralentissement de la croissance. Elles peuvent également agir indirectement en modifiant la capacité de transfert des éléments nutritifs et la fonction endocrine du placenta. Les hormones vont contrôler la croissance fœtale en régulant la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation dans de nombreux tissus fœtaux (19). Les

hormones, telles que l'insuline, les glucocorticoïdes et les IGFs, sont particulièrement sensibles aux changements de l'environnement intra-utérin et leurs rôles sur la croissance fœtale sont aujourd'hui bien compris.

Le système insuline-IGF (Insulin Growth Factor) est le principal axe de régulation de la croissance fœtale. L'insuline est un indicateur de la disponibilité en nutriments, sa production étant régulée par les apports. Une réduction de la quantité de nutriments est en effet associée à une diminution du taux d'insuline circulante. Les mécanismes d'action de l'insuline sont variés: l'insuline va stimuler la croissance du fœtus en augmentant le transport d'acides aminés vers les cellules, ainsi que la prolifération cellulaire (19, 20). L'insuline facilite aussi une plus grande diffusion du glucose à travers la barrière placentaire et l'absorption cellulaire (21). Une étude a ainsi montré que la concentration d'insuline prélevée au niveau de la veine ombilicale était significativement diminuée chez les nouveau-nés SGA (Small for Gestational Age) et était corrélée avec le poids du nouveau-né ainsi que le poids du placenta (22). Enfin, elle stimule la synthèse du glycogène et des protéines (19).

L'insuline va également agir de façon indirecte sur la croissance fœtale en activant la sécrétion d'IGF. Comme l'insuline, les facteurs de croissance ressemblant à l'insuline (IGF-1 et IGF-2) stimulent la croissance *in utero* (23). Les IGF ont un rôle mitogène et peuvent induire la différenciation cellulaire (24). Ces facteurs de croissance ont également un rôle important dans la régulation de la capacité de transfert des éléments nutritifs par le placenta. IGF-I semble agir directement sur la prolifération des cellules fœtales, alors qu'IGF-II semble influencer le placenta (25). Par exemple, l'inactivation du gène IGF-I chez des souris donne des nouveau-nés 60% plus petits que leurs congénères de type sauvage, sans altération de la taille du placenta (26).

Les principales hormones inhibitrices de la croissance *in utero* sont les glucocorticoïdes. Une augmentation de leur concentration est observée en réponse à une hypoxie fœtale ou une hypoglycémie (27). Ces hormones agissent alors comme un signal d'insuffisance en nutriments et vont activer la gluconéogenèse, la protéolyse et l'oxydation des acides aminés (28). Le stress maternel (anxiété, perte d'un proche, dépression, tremblement de terre, guerre, etc) durant la grossesse peut également perturber la production de glucocorticoïdes via l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HHS ou corticotrope) (29). Dans des concentrations physiologiques, les glucocorticoïdes sont responsables d'un ralentissement naturel de la croissance lorsque l'on approche du terme. Par contre, dans des conditions néfastes le facteur de stress va induire une augmentation importante de la concentration de glucocorticoïdes fœtaux, contribuant au développement d'un RCIU. Cet effet inhibiteur sur la croissance a été observé dans différentes espèces : l'administration de glucocorticoïdes synthétiques exogènes inhibe la croissance du fœtus, avec un plus grand effet chez les animaux recevant des doses répétées (29). L'action des glucocorticoïdes sur la croissance du fœtus peut être associée, en partie, à une altération du placenta. En effet, chez les moutons, les rats et les souris, l'administration de glucocorticoïdes synthétiques en fin de gestation réduit le poids du placenta (30, 31). Les glucocorticoïdes ont donc un effet néfaste sur la croissance du placenta et du fœtus. Ils jouent cependant un rôle essentiel dans le bon développement du fœtus en agissant sur la maturation des organes du fœtus, permettant ainsi une meilleure adaptation du nouveau-né à la vie extra-utérine.

En résumé, la croissance fœtale va dépendre du "mélange sanguin" apporté au fœtus via le cordon ombilical, résultant de l'interaction entre les apports maternels (nutriments et O<sub>2</sub>), le métabolisme, la régulation endocrine et la perfusion placentaire. La grossesse est

une période où le fœtus en croissance rapide est très sensible aux modifications de l'approvisionnement alimentaire. Les unités maternelle et placentaire doivent donc être coordonnées afin d'apporter au fœtus une quantité précise de substrats en fonction du stade de développement. Une diminution des apports ou une capacité réduite de l'unité utéro-placentaire à fournir de l'oxygène et des nutriments au fœtus peut induire un RCIU. Une modification du milieu intra-utérin va être perçue par le fœtus, qui va tenter de s'adapter en conséquence. Cette adaptation passe par un processus clé : la programmation fœtale. Cette "reprogrammation" va permettre d'optimiser le développement et la maturation du fœtus pour permettre sa survie et peut-être atteindre le terme malgré des conditions intra-utérines moins favorables. L'objectif final est de réussir la transition de la vie fœtale à celle de nouveau-né, ou en d'autre terme, l'adaptation à la vie extra-utérine.

### 1.3 Altération de la croissance et programmation fœtale

#### 1.3.1 L'hypothèse de Barker

C'est à partir des années 1980 que le concept de "programmation fœtale" est apparu. Durant cette période, le Dr Barker et ses collègues ont observé que le taux de maladie coronarienne chez l'adulte était étroitement corrélé au poids de naissance des individus. En effet, les adultes ayant eu un faible poids de naissance (moins de 2500g) avaient un risque de mortalité due à une maladie coronarienne significativement plus important que ceux nés avec un poids plus élevé. Le Dr Barker a alors émis l'hypothèse que les enfants avec un faible poids de naissance étaient exposés à un risque accru de maladie coronarienne plus tard dans la vie (32, 33). Depuis, d'autres études épidémiologiques ont confirmé cette hypothèse et ont montré que l'altération de la croissance fœtale augmente le risque de développer un large spectre de maladies chroniques à l'âge adulte



(cardiopathies coronariennes, hypertension ou un diabète non insulino-dépendant) (34-38). Ces résultats ont mené au développement du concept de DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease), littéralement "les origines développementales de la santé et des maladies" (36). De nombreuses études épidémiologiques, cliniques et expérimentales ont mis en évidence une association entre des événements pathologiques survenant pendant la période fœtale et le développement de maladies chroniques chez l'adulte. Les conséquences à long terme en lien avec le RCIU seront détaillées plus loin (cf. 3.3 Effets à long terme d'un RCIU). Une croissance fœtale suboptimale pourrait entraîner une modification de l'expression des gènes par des mécanismes épigénétiques et jouer un rôle important dans l'apparition de maladies. Ce phénomène porte actuellement le nom de "programmation fœtale".

### 1.3.2 Programmation fœtale

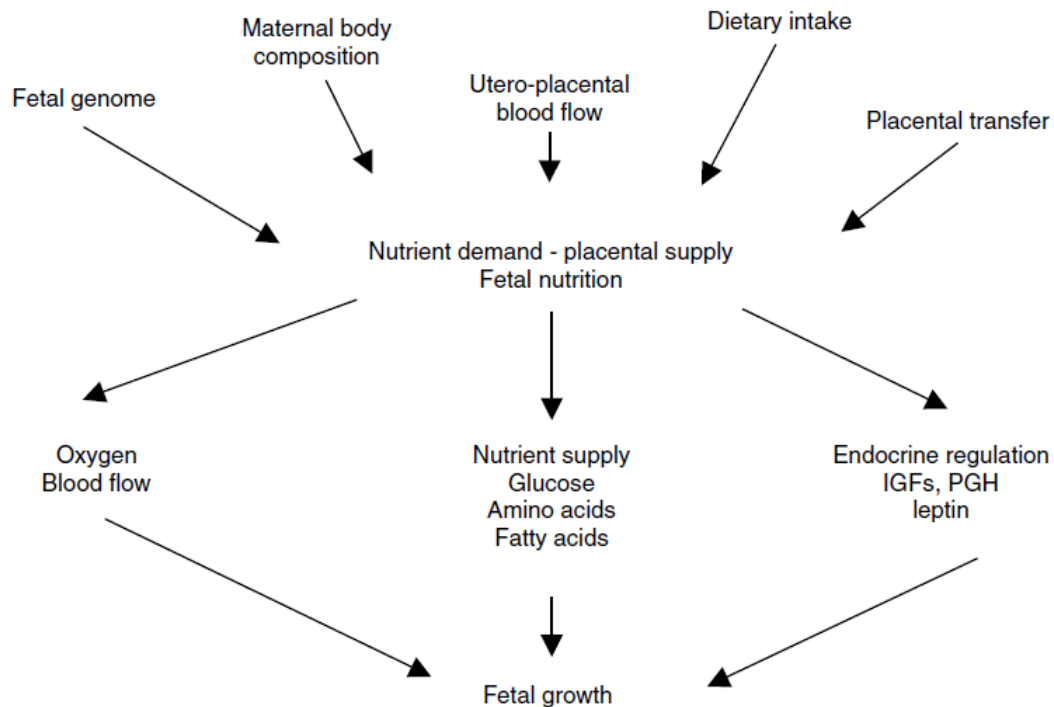
L'association entre une croissance altérée/suboptimale et une vulnérabilité accrue aux maladies chroniques (maladies cardiovasculaires, hypertension, diabète et syndrome métabolique) pourrait être liée à une altération de la programmation fœtale. Au niveau moléculaire, les modifications épigénétiques jouent un rôle prépondérant dans cette "reprogrammation".

L'épigénétique correspond à l'étude des changements dans l'expression des gènes induits par l'environnement (alimentation, tabagisme, stress, etc), sans mutation de la séquence d'ADN. Pour que le processus de synthèse soit possible, le gène doit être "lisible", c'est-à-dire accessible à différents complexes protéiques. Concrètement, la "lisibilité" de la séquence ADN est modulée par différents processus, notamment la méthylation/déméthylation de l'ADN et la modification des histones (protéines structurant

l'ADN). De manière générale, la méthylation de la séquence ADN favorise l'inactivation des gènes, tandis que la déméthylation favorise leur activation. D'autre part, la modification chimique des histones (par méthylation et acétylation) régule le compactage de l'ADN, ce qui favorise ou au contraire limite l'accès aux gènes (36, 39, 40). Ces processus épigénétiques sont particulièrement importants durant la période de développement du fœtus. Un changement d'expression des gènes va induire des modifications structurelles, physiologiques et métaboliques chez le fœtus qui lui permettent de s'adapter au nouvel environnement intra-utérin et d'y survivre (41). Ce processus d'adaptation vise à conférer un avantage au nouveau-né pour faire face à des conditions intra-utérines défavorables. Ces modifications peuvent néanmoins être inappropriées si elles ne correspondent pas aux conditions extra-utérines et vont alors prédisposer le nouveau-né à différentes maladies chroniques à l'âge adulte. Ainsi, un environnement intra-utérin où les apports nutritifs sont réduits laisse supposer que la disponibilité en nutriments dans l'environnement postnatal le sera également. Le fœtus en croissance va donc développer un métabolisme plus efficace pour pallier aux faibles apports. De ce constat est née l'hypothèse du "phénotype d'épargne" ou "thrifty phenotype". A la naissance, si le fœtus se retrouve dans un environnement riche en nutriments, comme c'est le cas dans les pays développés, son adaptation n'est alors pas adéquate, ce qui le prédispose à l'obésité et aux maladies métaboliques. Cet exemple illustre comment un processus adaptatif favorisant la survie immédiate du fœtus *in utero* peut avoir des conséquences néfastes à l'âge adulte en cas de disparité entre le milieu intra et extra-utérin. Des études épidémiologiques faites chez des personnes exposées *in utero* à la famine d'Amsterdam, à la fin de la seconde guerre mondiale, ont permis de mettre en évidence non seulement l'importance d'une bonne nutrition durant la grossesse afin de limiter cette disparité, mais également l'influence de la "fenêtre d'exposition" (moment de la grossesse et durée d'expo-

sition) du fœtus à une dénutrition sur la programmation fœtale et en conséquence sur l'incidence de maladies chroniques à l'âge adulte. Les sujets exposés à la famine seulement en début de grossesse avaient un poids de naissance normal, mais présentaient un profil lipidique anormal (athérogène) et une tendance à l'obésité à l'âge adulte. L'incidence de maladie coronarienne, respiratoire, d'hypertension, de diabète et de cancer à 50 ans était significativement plus importante chez ces individus. Dans les cas d'exposition à la famine en milieu ou en fin de gestation, les conséquences étaient différentes : le poids à la naissance et le poids du placenta étaient réduits et les individus présentaient un taux plus important d'anomalies de la tolérance au glucose, d'obstructions respiratoires et d'hypertension à long terme (42-44).

Le développement du fœtus est donc un processus complexe dépendant de différents facteurs (génomique, endocrine, nutritionnel, circulatoire et métabolique) (Figure 1:3) et intégrant des changements moléculaires et cellulaires organisés et coordonnés dans le temps. Dans les cas de grossesses altérées, il existe une grande hétérogénéité dans la réponse observée. La nature de l'atteinte (hypoxie, dénutrition, stress maternel, etc), le moment de l'exposition (tout début ou fin de la grossesse), ainsi que le sexe de l'enfant vont avoir des conséquences différentes sur le développement du fœtus et sur sa "programmation", ce qui mène, à terme, à développer un large éventail de maladies chroniques.



**Figure 1:3 Déterminants principaux de la nutrition fœtale et de la croissance.**

La régulation de la croissance intra-utérine est le résultat d'interactions complexes entre le patrimoine génétique, l'environnement endocrinien et la disponibilité des nutriments pour le fœtus. (D'après Cetin I, 2005(45)).

La plupart des données obtenues chez l'homme sont basées sur des études épidémiologiques. Bien que, dans ces études, les biais soient minimisés autant que possible, il reste toutefois impossible d'en maîtriser tous les paramètres. Par conséquent, il est également intéressant d'utiliser une approche dite translationnelle faisant appel à des modèles animaux. Le modèle animal permet en effet d'avoir une plus grande maîtrise des paramètres de développement. Il rend possible un contrôle relativement fin des conditions d'exposition fœtale et les modifications qui en résultent permettent une meilleure compréhension des altérations se mettant en place.

Au vu de tous ces éléments, il est nécessaire de pouvoir déterminer le plus précisément possible la nature des facteurs pouvant perturber le développement durant la grossesse, ainsi que le moment où ils apparaissent, afin de comprendre leur mode d'action. C'est

pourquoi, durant ma thèse, j'ai travaillé dans un premier temps sur l'altération du cordon ombilicale chez le nouveau-né en retard de croissance. Cette étude humaine vous sera présentée dans la première partie de mon mémoire. Dans un deuxième temps je me suis intéressé aux conséquences d'un stress dit "psychologique" durant la grossesse sur le développement et la maturation du cerveau du fœtus. Nous avons regardé plus particulièrement l'influence du stress sur la genèse et la régulation du rythme respiratoire produit de façon autonome dans le tronc cérébral à la naissance. Ce travail a été réalisé sur un modèle animal de rat. Les résultats obtenus vous seront présentés dans la deuxième partie de ma thèse.

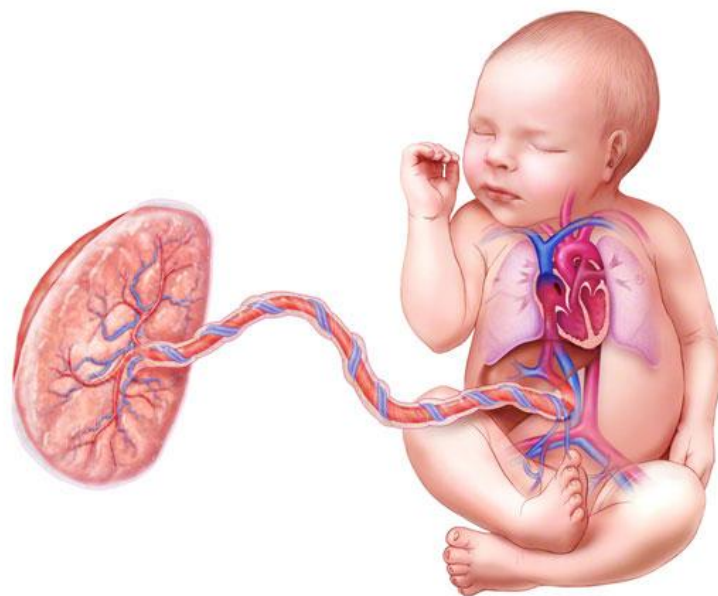
## 2. Circulation fœto-placentaire et croissance fœtale

La grossesse normale est caractérisée par une vasodilatation artérielle très précoce et une augmentation du débit cardiaque chez la femme enceinte (augmentation de 30 à 50 % par rapport à des valeurs normales chez la femme non enceinte) pour atteindre un maximum vers 20-24 semaines de gestation. Ces changements hémodynamiques associés à la mise en place de la circulation utéro-placentaire et fœto-placentaire sont obligatoires pour le développement et la croissance fœtale. L'augmentation marquée de la croissance du fœtus et du placenta dans la deuxième moitié de la grossesse se traduit par un changement d'équilibre entre l'offre et la demande : on passe en effet d'un état d'excédent de nutriments (stockés au début de la grossesse) à une situation de pénurie en fin de grossesse. Dans une certaine mesure, ces changements sont compensés par un remodelage morphologique et fonctionnel du placenta, une augmentation de la surface des villosités et une augmentation du débit sanguin à travers le cordon ombilical. La circulation ombilicale, sur laquelle porte cette étude, sera décrite plus en détail par la suite (cf. 2.1.2 Hémodynamique et physiologie de la circulation ombilicale).

## 2.1 Rôle de la circulation fœto-placentaire dans le développement du fœtus

### 2.1.1 Anatomie du cordon ombilical

La circulation ombilicale est de toute première importance puisqu'elle est l'unique lien entre le placenta et le fœtus. Un dysfonctionnement à ce niveau va être associé à une réduction de l'apport en oxygène et en nutriments au fœtus (Figure 1:4). Comprendre son fonctionnement et sa régulation est donc particulièrement important.



© Body Scientific International, LLC

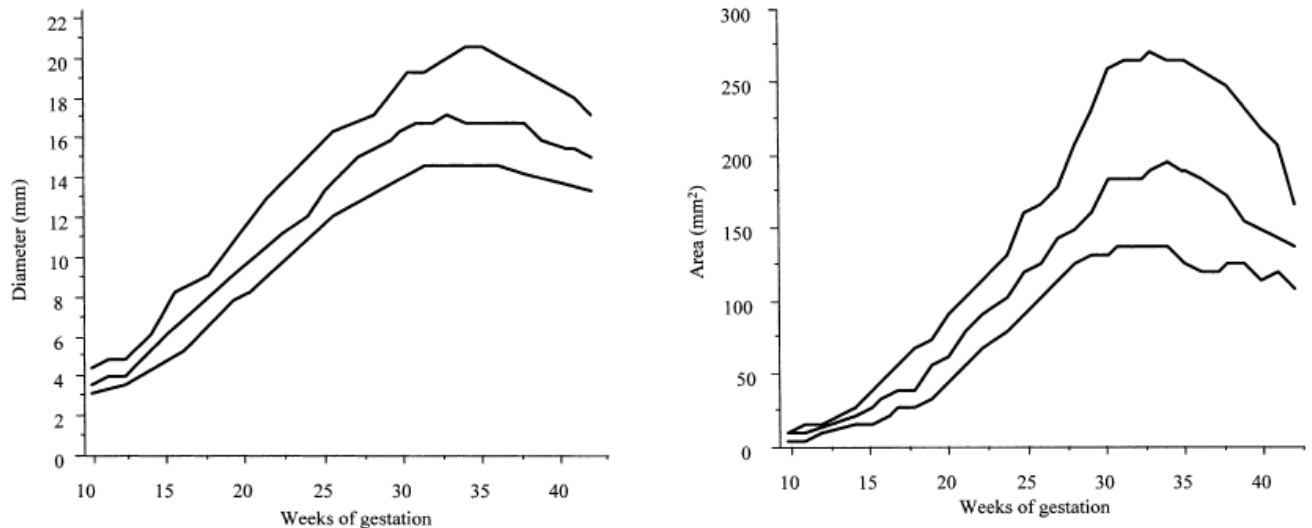
**Figure 1:4 Représentation schématique de l'unité fœto-placentaire.**

L'unité fœto-placentaire est composée du placenta, en contact avec la paroi utérine, qui permet les échanges en nutriments et oxygène avec la mère, du cordon ombilical, qui est l'unique organe qui relie physiquement le placenta au fœtus et transporte l'oxygène ainsi que les nutriments et enfin du fœtus, qui reçoit les apports maternels et les utilise pour son développement.

Le cordon commence à se former à partir de la cinquième semaine après la conception.

Il s'allonge progressivement jusqu'à la 28<sup>e</sup> SA, pour atteindre une longueur moyenne de 50-60 cm. Le diamètre du cordon ombilical augmente jusqu'à la 34<sup>e</sup> semaine de gestation, puis diminue légèrement à partir de la 35<sup>e</sup> semaine. La mesure de l'aire du cordon

ombilical donne des résultats similaires aux mesures du diamètre (Figure 1:5) (46). Le diamètre du cordon à terme est en moyenne de 15 mm.



**Figure 1:5 Diamètre et aire du cordon ombilical selon l'âge gestationnel.**

Représentation du diamètre du cordon ombilical (gauche) et de la surface du cordon (droite) en fonction de l'âge gestationnel. Les lignes représentent les 10<sup>e</sup>, 50<sup>e</sup>, et 90<sup>e</sup> percentiles respectivement. Les mesures ont été réalisées à partir de coupes transversales de cordon obtenues par diagnostic échographique. (D'après Di Naro, 2001)(46).

A la naissance, le cordon ombilical est une tige arrondie, de forme torsadée et blanchâtre. Le degré de spiralisation est le résultat de l'activité fœtale. Les vaisseaux ombili- caux à l'intérieur du cordon subissent également un mouvement global de torsade (46) (Figure 1:6).



**Figure 1:6 Aspect extérieur du cordon ombilical à la naissance.**

Photo d'un cordon ombilical (âge gestationnel = 38 SA). (Photo réalisée au Laboratoire de Recherche en Néonatalogie, LRN).



### *Insertion du cordon*

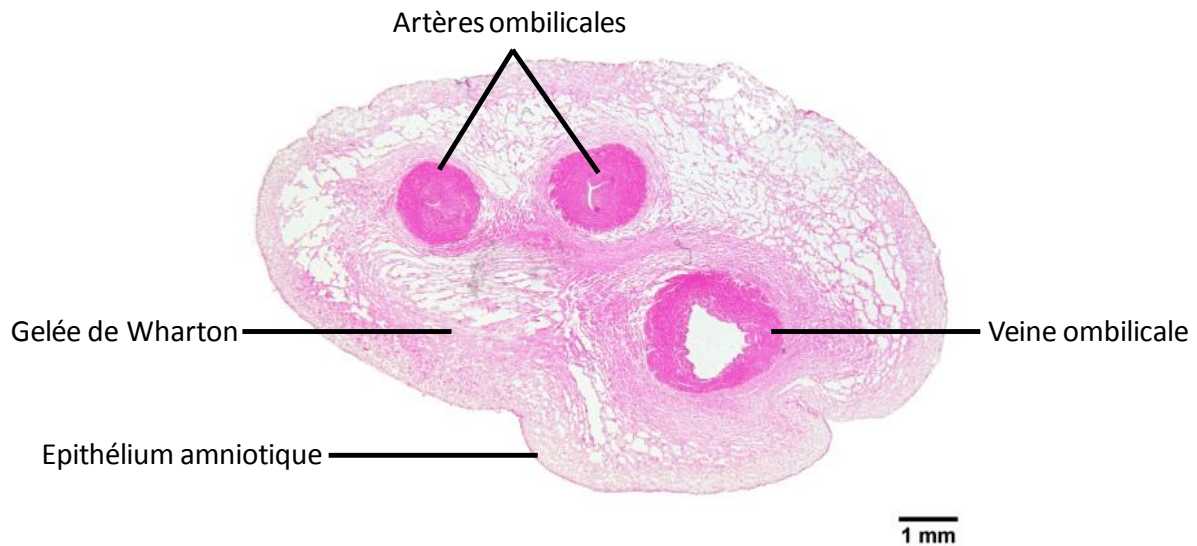
Le cordon ombilical relie le fœtus au placenta, assurant la communication entre les deux (Figure 1:4). Du côté fœtal, il s'insère au niveau de l'ombilic. Du côté placentaire, il est lié à la face fœtale du placenta (plaque chorionique). L'insertion au niveau placentaire peut varier selon les grossesses. L'insertion est dite "centrale" si elle se trouve à plus de 3 cm du bord (~90% des cas). Lorsque le cordon s'insère à moins de 3 cm du bord, on parle d'insertion marginale (~10% des cas). Il peut arriver dans de rares cas (1 %) que le cordon s'insère sur les membranes; on parle alors d'insertion vélamenteuse (Figure 1:7).



**Figure 1:7 Insertion du cordon ombilical au niveau placentaire.**

Représentation de l'insertion du cordon au niveau du placenta. L'insertion peut être centrale (A), marginale (B) ou vélamenteuse (C). (D'après Netter's atlas of human embryology, Larry Cochard).

Le cordon est composé d'une veine et de deux artères ombilicales, englobées dans la gelée de Wharton. Le tout recouvert est par l'épithélium amniotique (Figure 1:8).



**Figure 1:8 Structure du cordon ombilical.**

Image d'une coupe transversale de cordon ombilical colorée par la méthode Hématoxyline & éosine. Le cordon ombilical est composé de vaisseaux (deux artères et une veine), enrobés dans la gelée de Wharton, et est recouvert d'un épithélium amniotique. (Photo réalisée au Laboratoire de Recherche en Néonatalogie, LRN).

#### *Le revêtement amniotique*

Le revêtement amniotique entoure tout l'embryon et le fœtus, formant une gaine pour le cordon ombilical. Il est constitué de cellules amniotiques unicellulaires et cubiques. A proximité de l'ombilic, il s'épaissit et devient pluricellulaire, contrairement au côté placentaire. Le revêtement amniotique participe au maintien de la pression des fluides dans la gelée de Wharton (47).

#### *La gelée de Wharton*

La gelée de Wharton est un tissu conjonctif constitué de cellules et d'une matrice extracellulaire (MEC) hydrophile de consistance gélatineuse. La MEC est composée d'un assemblage de collagène, de protéoglycanes et de glycoprotéines qui forment un réseau tridimensionnel poreux. Les protéoglycanes, l'acide hyaluronique et d'autres molécules à l'intérieur de ce maillage interagissent avec l'eau pour former un liquide visqueux mucoïde (47). Cette matrice solide forme ainsi des pores interconnectés à travers lesquels

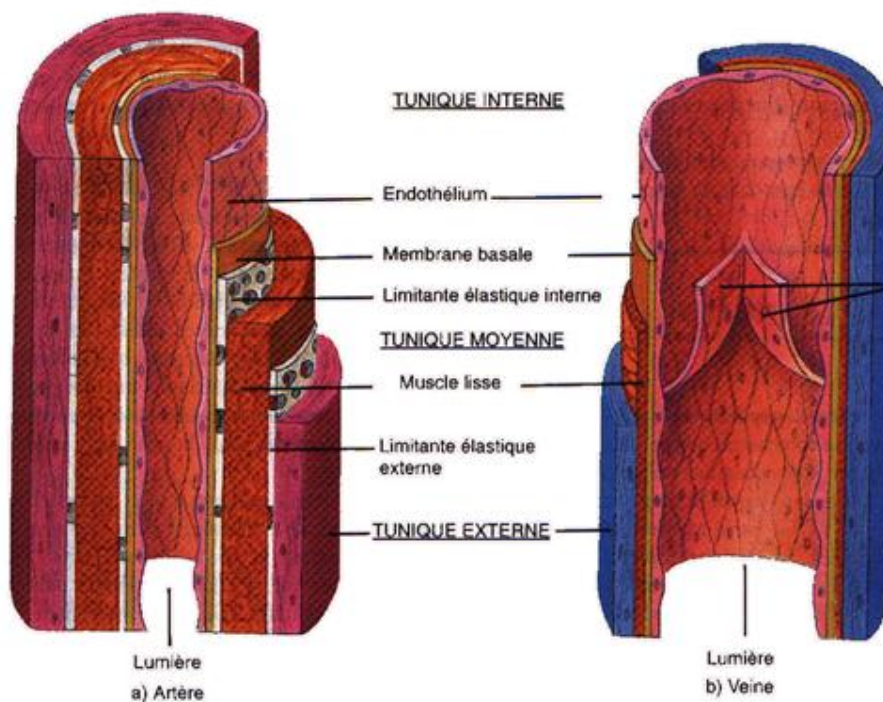
le fluide visqueux peut se déplacer lorsque le tissu est comprimé. La MEC contient aussi des myofibroblastes et des mastocytes, ainsi que quelques macrophages. On les retrouve concentrés autour des vaisseaux. La gelée de Wharton a donc différents rôles. Elle est tout d'abord un support structurel dans lequel s'ancrent les vaisseaux. Elle a également un rôle de protection puisqu'elle limite la compression ou la distension excessive des vaisseaux. Enfin, les cellules qu'elle contient jouent un rôle important dans la régulation de la vasomotricité, le stockage des métabolites, ainsi que la réponse immunitaire et inflammatoire.

#### *La veine et les artères ombilicales*

Dans le cordon ombilical, les artères sont au nombre de deux. Elles sont généralement accolées et s'enroulent autour de la veine de façon parallèle, formant des spires le plus souvent lévogyres. Les deux artères peuvent fusionner sur les derniers centimètres du côté de l'insertion placentaire. A terme, leur diamètre est d'environ 4,5 mm. Leur fonction est de ramener le sang appauvri en oxygène/nutriments et chargé en déchets métaboliques du fœtus au placenta.

La veine traversant le cordon est unique et forme également des spires. A terme son diamètre est d'environ 5,1 mm (48). Sa fonction est de transporter le sang riche en oxygène et en nutriments du placenta au fœtus. De façon générale, les veines et les artères de l'organisme ont une structure globale similaire : elles sont composées de trois tuniques, à savoir l'intima, la média et l'adventice (Figure 1:9). Leur importance et leur composition varient selon la localisation du vaisseau, leur conférant des propriétés mécaniques et biochimiques différentes. L'intima est la paroi la plus interne du vaisseau, elle est en contact avec le sang circulant. Elle est formée d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une membrane basale. La composition de la média varie grandement

en fonction de la localisation ; elle est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses, de collagène et de fibres élastiques (élastine). L'adventice a une structure fibreuse élastique et contient essentiellement des fibres de collagène ; elle permet l'ancrage du vaisseau aux tissus environnants. Elle reçoit les terminaisons nerveuses sympathiques et parasympathiques qui contrôlent la vasomotricité, ainsi que de petites artérioles (*vasa vasorum*). Néanmoins, dans le cordon ombilical, cette dernière couche n'est pas présente : en effet, la veine et les artères ombilicales ne possèdent pas d'adventice ; c'est la gelée de Wharton qui assure cette fonction. De même, il n'y a pas de fibres nerveuses décelables, excepté du côté foetal (49). Finalement, à la différence des veines, les artères possèdent en plus de fines membranes élastiques de part et d'autre de la média. La membrane élastique entre l'intima et la média est appelée "limitante élastique interne" alors que celle située entre la média et l'adventice est appelée "limitante élastique externe" (Figure 1:9).



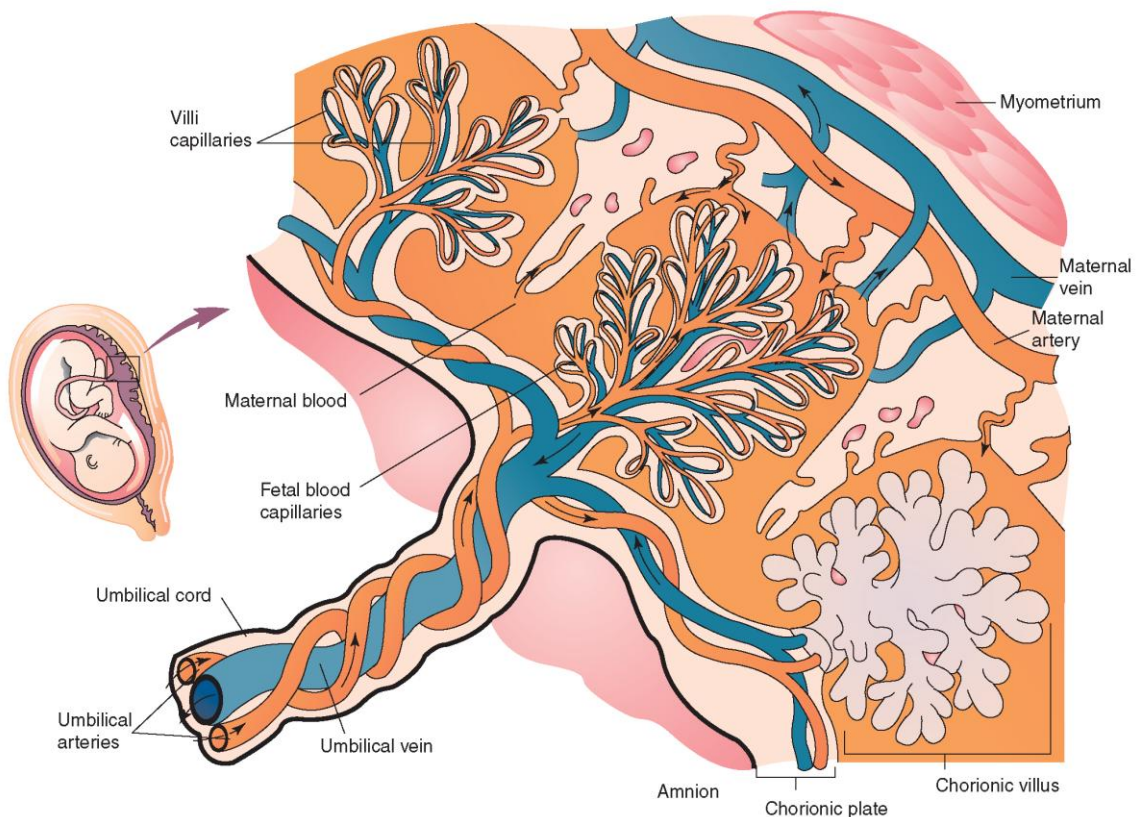
**Figure 1:9 Représentation schématique de la structure d'une veine et d'une artère.**  
(D'après <http://bio.m2osw.com/gcartable/cardiologie/arterveinetcap.htm>)

### 2.1.2 Hémodynamique et physiologie de la circulation ombilicale

Le sang riche en oxygène et en nutriments apporté par la mère parvient à l'utérus à travers les artères utérines, puis arrive dans les chambres intervilluses du placenta par les artères spiralées et repart par les veines utérines (Figure 1:10). En fin de grossesse, la chambre intervilluse contient environ 150 ml de sang maternel ; ce volume est totalement renouvelé trois à quatre fois par minute. Chaque chambre intervilluse comprend un ensemble de troncs villositaires. Le sang circule des zones de haute pression vers les zones de basse pression : la pression sanguine moyenne dans les vaisseaux spiralés est de 75-80 mm Hg, de 10 mm Hg dans la chambre intervilluse et de 5 mm Hg dans les veines utérines. Le placenta offre donc peu de résistance à l'écoulement du sang maternel, ce qui va favoriser la circulation et les échanges avec la circulation ombilicale vers le fœtus (Figure 1:10).

La circulation ombilicale est également un système à basse résistance. Le sang fœtal arrive avec une pression de 50 mmHg dans les capillaires artériels et repart dans les capillaires veineux à 20 mmHg (50). Cette circulation à basse pression va favoriser le passage du sang ainsi que les échanges avec le placenta. La circulation ombilicale possède la particularité d'être "inversée" comparée à la circulation systémique. En effet le sang chargé en dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et en déchets du métabolisme provenant du fœtus est transporté au placenta non pas par la veine, mais par les artères ombilicales. Au niveau placentaire, les artères ombilicales se divisent pour former les artères chorioniques, qui pénètrent dans les troncs villositaires sous forme d'artérioles. C'est au niveau de ce réseau extrêmement fin et ramifié que se font les échanges d'oxygène et de nutriments entre le sang maternel et fœtal (Figure 1:10). Le sang frais oxygéné et riche en nutriments repart par un réseau veineux, puis atteint la veine ombilicale unique qui apporte le sang du placenta au fœtus. La circulation ombilicale est cruciale pour le développe-

ment du fœtus ; elle permet de répondre aux besoins en oxygène et nutriments tout au long de la grossesse.



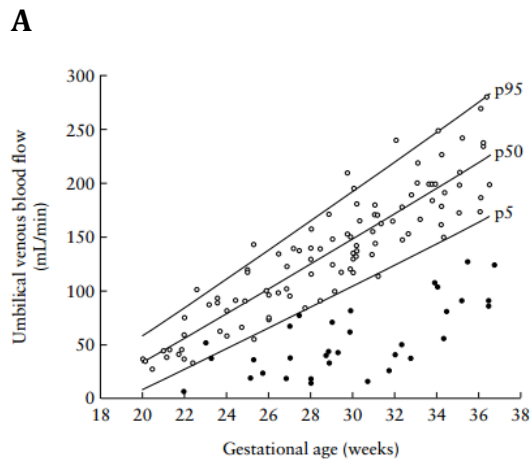
**Figure 1:10 Représentation schématique d'une coupe transverse d'un placenta à terme.**

Schéma représentant les échanges de nutriments et d'oxygène entre la circulation utéro-placentaire et foeto-placentaire. Le sang maternel se jette dans l'espace intervilloux et se trouve directement au contact des villosités chorionales où circule le sang fœtal. Les deux artères ombilicales cheminant le long du cordon ombilical apportent un sang fœtal pauvre en nutriments et en oxygène provenant du fœtus, mais riche en produits du métabolisme et en gaz carbonique. Les artères ombilicales s'insèrent dans le placenta et se ramifient pour former les troncs villositaires : c'est à ce niveau que se font les échanges entre le sang maternel et fœtal. Le retour du sang chargé en nutriments et oxygène s'effectue par la veine ombilicale unique qui chemine dans le cordon pour rejoindre le fœtus (D'après <http://what-when-how.com/nursing/normal-pregnancy-maternal-and-newborn-nursing-part-2/>).

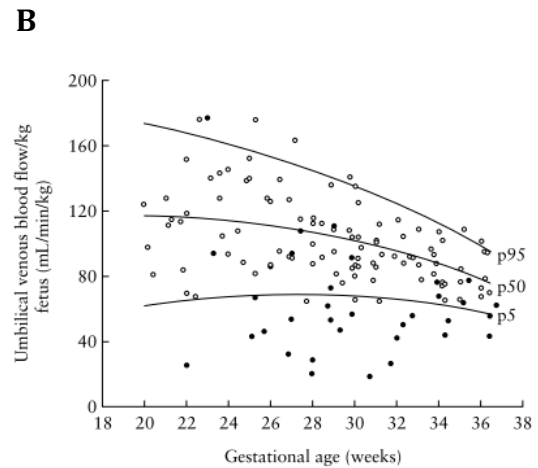
Chez l'humain, le flux veineux au niveau ombilical peut être mesuré par échographie Doppler. Les mesures obtenues sont le plus souvent exprimées en valeur absolue et/ou normalisées selon la masse fœtale. Pour les mesures en valeur absolue, les différentes études s'accordent sur une augmentation du débit tout au long de la grossesse : il passe de 33.2 ml/min à 20 semaines à 221 ml/min à 36 semaines de grossesse (Figure 1:11.A) (51). Mais dans le cas des valeurs normalisées selon la masse fœtale, les résultats diffè-

rent : pour certaines études, le flux diminue de manière significative entre la 20<sup>e</sup> et 36<sup>e</sup> semaine : il passe de 117,5 mL/min/kg à 78,3 mL/min/kg (Figure 1:11.B) (51-53), tandis que d'autres études montrent une stabilisation du débit dans les dernières semaines de grossesse (54, 55). L'augmentation du flux veineux absolu durant la grossesse est corrélée à la croissance des vaisseaux ombilicaux, comme en témoigne l'augmentation du diamètre de la veine ombilicale (Figure 1:5) (46, 55). Typiquement, le profil et la vitesse d'écoulement du sang dans la veine ombilicale au deuxième et troisième trimestre de la grossesse montrent un flux continu et non pulsatile (56). La circulation du sang dans la veine et son profil dépendent de la régulation du tonus vasculaire. La veine ombilicale est extrêmement longue et musclée, contribuant ainsi largement à la résistance ombilico-placentaire totale et peut donc réguler fortement le flux veineux (57). Il est également important de noter que la réactivité vasculaire ombilicale varie en fonction de l'emplacement le long du cordon ombilical : la valeur de l'indice de résistance de l'artère ombilicale est plus importante côté fœtal que côté placentaire et la contraction de l'artère ombilicale induite par étirement est moins importante du côté placentaire comparée au côté fœtal. De plus, l'analyse de résultats Doppler montrent que les indices de résistance et de pulsation sont significativement différents entre l'extrémité fœtale et placentaire (58, 59). La vasoréactivité dépend également de l'âge gestationnel : la sensibilité à la sérotonine (un vasoconstricteur) augmente dans le dernier trimestre (60). Enfin elle peut être influencée par les conditions expérimentales, en particulier le degré d'oxygénation : l'augmentation de la pression en oxygène induit une augmentation de la tension dans les veines et les artères ombilicales humaines, tout comme elle semble augmenter la sensibilité au NO (61-64).





**Figure 5** Umbilical venous volume flow (mL/min) relative to gestational age (GA). Open circles (O), individual normal values; solid line (—), 5th (p5), 50th (p50) and 95th (p95) centile reference lines; closed circles (●), SGA fetuses. p50: cubic fit =  $0.000328 \times GA^3 + 10.944931 \times GA - 188.288068$ . p5–95:  $p50 \pm 1.64(0.928218 \times GA - 6.422451)$ .



**Figure 6** Umbilical venous volume flow/kg estimated fetal weight (mL/min/kg) relative to gestational age (GA). Open circles (O), individual normal values; solid lines (—), 5th (p5), 50th (p50) and 95th (p95) centile reference lines; closed circles (●), SGA fetuses. p50: cubic fit =  $-0.001670 GA^3 + 1.579665 \times GA + 99.293341$ . p5–P95:  $p50 \pm 1.64(-1.076244 \times GA + 48.623154)$ .

### Figure 1:11 Représentation de l'évolution du flux veineux selon l'âge gestationnel.

Représentation de l'évolution du flux veineux selon l'âge gestationnel, exprimé en valeur absolue (A) ou normalisée par la masse fœtale (B). (D'après Boito, 2002)(51).

#### 2.1.3 Vaisseaux ombilicaux et RCIU

Le développement de la méthode Doppler a permis de grandes avancées dans la compréhension de la circulation fœto-placentaire, en particulier de la circulation ombilicale. L'évaluation du flux à travers le cordon ombilical, quantitativement et qualitativement, est importante pour la détection d'un RCIU. Ainsi différentes études ont montré que, quantitativement, une dépréciation du flux sanguin traversant la veine ombilicale (flux absolu ou normalisé par la masse du fœtus) peut être associée à un RCIU (51, 65-70). Ferrazzi et al. ont noté que les réductions les plus importantes dans la circulation veineuse se produisaient chez les fœtus ayant également une forme d'onde anormale au niveau de l'artère ombilicale. Qualitativement, il a été montré que la circulation ombilicale chez les RCIU peut montrer des signes d'une circulation anormale : en effet la mesure par doppler de la forme d'onde de l'artère ombilicale montre une composante diastolique diminuée, absente ou inversée (71-73). D'autres études ont également montré qu'une modification de l'écoulement à travers la veine ombilicale, en particulier l'appari-



tion d'un flux pulsatile (normalement linéaire) ou inversé, est associée à un mauvais pronostic (mort-né, mort à la naissance) (74-77).

Ces altérations du flux sanguin dans le cordon ombilical pourraient être en lien avec une altération de la motricité des vaisseaux. Le lit vasculaire ombilical n'étant pas innervé, excepté la partie la plus proche du fœtus (17-20 cm)(49), il est totalement soumis à la régulation endocrinienne. La régulation locale du tonus vasculaire résulte d'une combinaison équilibrée de la synthèse, la libération ainsi que de la bioactivité endothéliale des vasodilatateurs (par exemple, l'oxyde nitrique (NO) et les prostacyclines (PGI<sub>2</sub>) ) et des vasoconstricteurs (par exemple, la sérotonine (5-HT) et le thromboxane A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) ). En effet, parmi tous les régulateurs, la PGI<sub>2</sub> et le NO sont de puissants agents paracrines impliqués dans la vasodilatation, mais également dans l'inhibition de l'agrégation des plaquettes dans le sang. De par leur rôle vasodilatateur, le NO et la PGI<sub>2</sub> endogènes vont agir comme des antagonistes face aux vasoconstricteurs tels que le Txa<sub>2</sub> ou la 5-HT. Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes intéressés au NO, et à son rôle dans la régulation des vaisseaux ombilicaux (61, 78, 79).

## 2.2 Régulation de la circulation ombilico-placentaire, le rôle du monoxyde d'azote (NO) dans la relaxation

### 2.2.1 Le monoxyde d'azote (NO) : généralités et synthèse

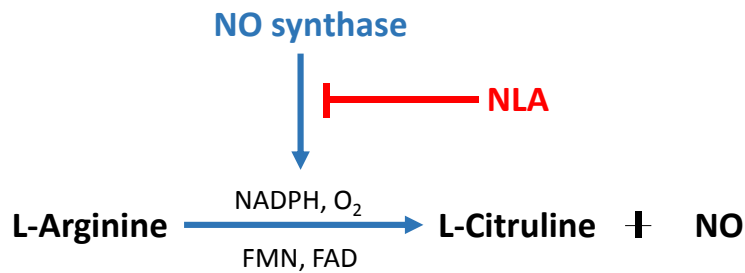
Le NO est une molécule endogène volatile, de faible poids moléculaire, hydrosoluble et liposoluble, pouvant donc diffuser aisément à travers les membranes cellulaires. Le NO a pour particularité d'être un vasodilatateur qui joue un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire. Le NO peut provenir de deux sources : la première source est liée à une production endogène par les cellules endothéliales; la deuxième source correspond

à une production exogène et vient de la pollution atmosphérique et des fumées de cigarettes. La biosynthèse du NO au niveau endothélial s'effectue à partir de L-arginine, un acide aminé présent en forte concentration dans le sang (60 – 80  $\mu\text{M}$ ). Cette synthèse nécessite une enzyme, la NO synthase (NOS), ainsi que de nombreux cofacteurs, qui sont le NADPH, l' $\text{O}_2$ , la tétrahydrobioptérine ( $\text{BH}_4$ ), le noyau hème (protoporphyrine IX de Fer), la flavine mononucléotide et la flavineadénine dinucléotide (FMN et FAD). La NOS va ainsi générer du NO et de la L-citrulline à partir de L-arginine et d'oxygène. Il est possible d'inhiber le fonctionnement de la NOS avec du  $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine (NLA). Le NLA est un analogue modifié de la L-arginine, capable de se fixer sur la NOS mais non métabolisable, bloquant ainsi son fonctionnement (Figure 1:12).

Il existe 3 isoformes de NOS, capables de produire du NO, localisées dans le cytosol ou ancrées dans les membranes cellulaires :

- la NOS endothéliale, endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS ou NOS-3)
- la NOS neuronale, neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS ou NOS-1)
- la NOS inductible, inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS ou NOS-2)

La eNOS et la nNOS présentent plusieurs similitudes : elles sont exprimées constitutivement et produisent du NO en permanence mais à de faibles concentrations. Le seul facteur limitant est la disponibilité en substrats et en cofacteurs. Ces deux isoformes sont fortement régulées par la concentration en ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). En effet, elles ne sont activées qu'après association avec le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline, ainsi que par phosphorylation (80). Leur activation va entraîner une libération immédiate de NO mais de courte durée.



**Figure 1:12 Représentation schématique de la synthèse endogène du monoxyde d'azote.**

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, FMN: flavine mononucléotide, FAD: flavine adénine dinucléotide, NLA: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine, O<sub>2</sub>: dioxygène.

La production de NO par la nNOS et la eNOS est loin d'être liée à un site unique, contrairement à ce que laisse croire leur dénomination, et peut se trouver dans différents types cellulaires. Ainsi, la nNOS, nommée "neuronale" car caractérisée pour la première fois dans le tissu cérébral (81), est également exprimée dans d'autres tissus tels que les cellules β pancréatiques, la macula densa rénale, le muscle squelettique ainsi que dans l'épithélium des poumons, de l'estomac et de l'utérus. Son rôle a été identifié dans la régulation du tonus musculaire, en particulier du tractus gastro-intestinal, des muscles squelettiques (82) et du muscle lisse (83). La nNOS semble également être présente dans les cellules endothéliales et dans le muscle lisse de la veine ombilicale humaine (84) (85).

La eNOS, elle, est exprimée dans une multitude de types cellulaires (comme l'épithélium des voies aériennes, les plaquettes, les myocytes cardiaques, les ostéoblastes et les neurones). Elle est présente au niveau des vaisseaux (en particulier dans l'endothélium vasculaire comme l'indique son nom, ainsi que dans les cellules musculaires lisses humaines (86, 87). On trouve ces deux isoformes à l'intérieur des cellules sous forme libre ou ancrée à la membrane plasmique, dans des structures appelées cavéoles. Ce cloisonnement facilite les interactions protéine-protéine et la transduction du signal calcique.

La troisième isoforme, iNOS, n'est pas ou très peu exprimée dans des conditions physiologiques normales. Son activation nécessite l'apparition de processus inflammatoires. Cette NOS inductible est exprimée sous l'action d'endotoxines ou de cytokines et peut être retrouvée dans quasiment tous les types cellulaires composant un individu, en fonction de l'apparition d'une inflammation ; ainsi la stimulation des cellules musculaires lisses vasculaires par des cytokines va induire l'expression de iNOS au bout de quelques heures (88, 89). Différentes études ont mis en évidence sa surexpression dans certaines pathologies telles que le diabète, l'obésité ou l'hypertension artérielle (90-92). D'autres études ont également montré qu'elle n'est pas seulement inductible, mais peut être exprimée de façon constitutive dans les plaquettes et dans l'épithélium respiratoire. Son mode de régulation est différent de la eNOS et nNOS : elle est directement active (la calmoduline est constitutivement liée à la iNOS) et n'est en aucun cas régulée par l'afflux de calcium. Ainsi, une libération forte et prolongée de NO va être observée lorsque la iNOS est présente.

La demi-vie du NO dans un milieu biologique est de 1 à 5 secondes (93) et peut aller jusqu'à 30 secondes (94). Les effets biologiques du NO sont de courte durée, en raison de sa nature radicalaire, le NO peut en effet réagir avec différents composés:

- au contact de l'oxygène, le NO est rapidement transformé en métabolites inactifs (nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et nitrates ( $\text{NO}_3^-$ )),

- il est capable d'interagir avec les métaux (fer, cuivre ou zinc) et avec les groupements prosthétiques d'enzymes ou de protéines, permettant ainsi au NO de réguler leur activité (le NO agit principalement sur la guanylate cyclase soluble (GCs))

- enfin le NO peut interagir avec les fonctions thiols et conduit à la formation de S-nitrosothiols (ce mécanisme permet également de réguler l'activité des enzymes).

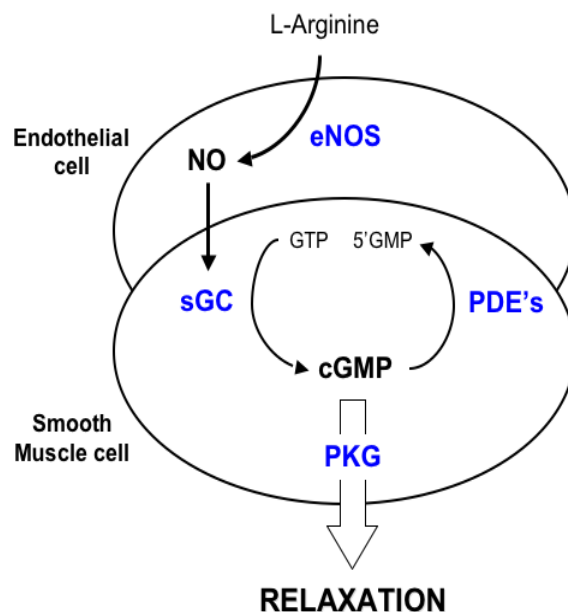
### 2.2.2 Mécanismes de régulation du NO et mode d'action

L'existence d'un facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF) a été proposée pour la première fois par Furchgott et Zawadzki après avoir découvert que la relaxation à l'acétylcholine de l'aorte de lapin était possible uniquement en présence d'un endothélium intact (95). Cette substance resta nommée EDRF jusqu'à ce que Palmer et al découvrent en 1987 qu'il s'agissait en fait du NO (96). Le NO a suscité beaucoup d'intérêt au cours des années qui suivirent sa découverte. Son rôle central dans la régulation du tonus musculaire est aujourd'hui bien connu et accepté dans la communauté scientifique (97).

Dans la paroi d'un vaisseau sanguin intact, la plupart du NO produit est présumé provenir de l'activité de la NOS endothéliale et sa production en continu permettrait de maintenir un faible tonus de base. Cela a été démontré en particulier dans la circulation périphérique (98), pulmonaire (99) et, de façon très intéressante, dans la circulation fœto-placentaire (100). La libération continue de NO par l'endothélium peut être stimulée entre autres par des stimuli physiques (contraintes de cisaillement due à l'écoulement du sang à travers les vaisseaux) et biochimiques (acétylcholine, histamine, thrombine, ADP, bradykinine, noradrénaline, substance P, isoprotérénol). Ces agonistes vont activer leurs récepteurs respectifs présents au niveau de la membrane cellulaire et induire une augmentation du taux de calcium libre intracellulaire, qui va activer la eNOS. Le NO produit au niveau des cellules endothéliales est capable de diffuser vers le muscle lisse où il agit en activant principalement la guanylate cyclase soluble (GCs). Le NO se lie au groupement hème de la GCs et induit une activation stable de l'enzyme (101). La GCs va alors synthétiser la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de guanosine triphosphate (GTP) (Figure 1:13). Le GMPc est capable de se lier à trois types de protéines impliquées dans la transduction du signal intracellulaire : les protéines kinases dépen-

dantes du GMPc (PKG), les canaux ioniques et certaines PDEs. La PKG appartient à la famille des sérine/thréonine kinases. Ces protéines fonctionnent comme des "interrupteurs moléculaires". Elles vont catalyser le transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP) au niveau de certains résidus Séréyls et Thréonyls ; la phosphorylation induit alors des modifications structurelles et fonctionnelles de la protéine cible. Ainsi, la phosphorylation de différents canaux et protéines par la PKG va induire le transport actif du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum, ce qui favorise la sortie de potassium ( $\text{K}^+$ ) et de  $\text{Ca}^{2+}$  hors de la cellule. La PKG favorise également une désensibilisation de l'appareil contractile, en activant la déphosphorylation des chaînes légères de myosine. Ces différents processus vont mener à une hyperpolarisation de la cellule, une diminution de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , ainsi qu'une diminution de la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ , entraînant une vasodilatation.

La régulation du tonus vasculaire par le NO passe principalement par l'augmentation de la concentration intracellulaire du GMPc. Une modification de la concentration en GMPc, en particulier due à sa dégradation par les phosphodiésterases (PDEs), va avoir des conséquences importantes sur la capacité des vaisseaux à se relâcher.



**Figure 1:13 Représentation schématique de la cascade de relaxation activée par le NO.**

eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase); NO (Nitric Oxide); GTP (guanosine triphosphate); sGC (soluble Guanylate cyclase); cGMP (cyclic guanosine monophosphate); PKG (Protein Kinase G); PDEs (Phospho-DiEsterases).

Les PDEs sont un groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des nucléotides cycliques, AMPc (adénosine 3',5' monophosphate cyclique) et GMPc (guanosine 3',5' monophosphate cyclique), en leur forme inactive "5' monophosphate" par clivage de la liaison phosphodiester entre les atomes de phosphore et d'oxygène à la position 3'. Jusqu'à présent, 11 isoformes ont été identifiées, pour un total de 48 sous-types. Ce classement est basé sur leurs séquences protéiques, leurs propriétés enzymatiques, leurs propriétés pharmacologiques, leur affinité pour le substrat et leurs mécanismes de régulation (102, 103). Il a ainsi été déterminé que les PDEs qui dégradent préférentiellement le GMPc sont les PDE 5, 6 et 9, tandis que les PDE 4, 7 et 8 hydrolysent sélectivement l'AMPc. Enfin les PDE 1, 2, 3, 10 et 11 dégradent à la fois l'AMPc et le GMPc (Tableau 1:5) (104).

L'expression des PDEs varie selon le tissu. Dans le cas du muscle lisse, les principales isoenzymes impliquées dans le tonus vasculaire sont PDE1, PDE3, PDE4 et PDE5 (Ta-

bleau 1:5). Ce sont les isoformes auxquelles nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce projet. La PDE4 et PDE5 en particulier semblent être des enzymes clés impliquées dans la régulation de la relaxation des vaisseaux ombilicaux humains (105).

Des études antérieures ont par ailleurs établi des relations entre une dérégulation de certaines PDEs et le développement de maladies chroniques. Par exemple, l'expression de la PDE1 et/ou PDE5 est régulée à la hausse dans l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque, ce qui démontre un rôle physiologique important (102, 106). L'augmentation de nucléotides cycliques dans la circulation fœto-placentaire pourrait être bénéfique pour améliorer la circulation sanguine entre l'unité maternelle, placentaire et fœtale (107). De plus, du fait de la multiplicité des isoformes existantes, mais aussi de leur régulation et de leur profil d'expression dans les tissus, les PDEs forment des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines PDEs pourrait conduire au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cas de retard de croissance (108, 109). Chez l'animal, différentes études montrent une amélioration de la relaxation des vaisseaux de la circulation fœto-placentaire chez les RCIU après un traitement au sildénafil (un inhibiteur préférentiel des PDE5) (110, 111). La croissance fœtale est améliorée chez le mouton, le cochon d'Inde et le rat lors d'un traitement au sildénafil (112-114) et le poids des nouveau-nés chez un modèle de souris RCIU est significativement augmenté chez les mères traitées avec du sildénafil durant la gestation (115). Chez l'humain, le sildénafil semble augmenter la vitesse de croissance du fœtus dans le cas de RCIU sévère (116). La mesure de la vélocimétrie par Doppler est également améliorée, avec une diminution de la résistance placentaire dans les grossesses compliquées par un RCIU (117, 118). Des expériences *in vitro* ont montré que le sildénafil améliorerait la relaxation des artères des villosités, du myomètre humain et des vaisseaux placentaires (110, 117). Au niveau de l'artère utérine, une revue systé-



matique menée par Villanueva-García et al. a montré des résultats contradictoires : dans certaines études le sildénafil améliore la relaxation, tandis que dans d'autres aucune différence n'est observée (119). Le rôle potentiel des différentes isoformes de PDEs dans la circulation fœto-placentaire humaine et leur implication éventuelle dans l'apparition de RCIU sont encore mal connus.

PDE	Main substrate	Km (µM) cAMP	Km (µM) cGMP	Tissue expression	Specific inhibitors	Reference
1	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-stimulated cAMP→cGMP	70-120	0.6-6.0	Heart, brain, lung, smooth muscle, T lymphocytes, sperm	KS505a, bepril, Vimpocetine, Flunarizine, Amiodarone <sup>a,b</sup>	Bender and Beavo (2006), Yan et al. (1995), Loughney et al. (1996), Yu et al. (1997), Ahn et al. (1991), Medina et al. (2006), Menniti et al. (2006), Truss et al. (2001), Zhang et al. (2004), Jeon et al. (2010), Reed et al. (2002), Filgueiras et al. (2010), Medina (2010)
2	cAMP→cGMP	30	10-24	Adrenal gland, heart, lung, liver, platelets	EHNA, BAY 60-7550, Oxindole, PDP <sup>c</sup>	Rosman et al. (1997), Rivet-Bastide et al. (1997), Sadhu et al. (1999), Suvarna and O'Donnell (2002), Podzuweit et al. (1995), Repaske et al. (1992), Boess et al. (2004), Rutten et al. (2009)
3	cAMP→cGMP	0.2-0.4	0.02-0.2	Heart, lung, liver, kidney, oocytes, adipocytes, T lymphocytes, platelets, inflammatory cells	Cilostamide, Cilostazol, Enoxamone, Milrinone, Siguzodan <sup>b,d</sup>	Palmer and Maurice (2000), Vandecasteele et al. (2001), Shin et al. (2007), Nohria et al. (2003), Carev et al. (2010)
4	cAMP	1.5-10	-	Kidney, brain, liver, lung, smooth muscle, cardiovascular tissues, Sertoli cells inflammatory cells	Rolipram, Roflumilast, Cilomilast, Drotaverine, ibudilast <sup>b,d,e</sup>	Tenor et al. (1995a,b,c), Essayan (2001), Scott et al. (1991), O'Byrne and Gauvreau (2009)
5	cGMP	290	2.9-6.2	Lung, platelets, vascular, smooth muscle	Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, Zaprinast <sup>b,d,e</sup>	Hamet and Coquil (1978), Coquil et al. (1980), Francis et al. (1980), Francis and Corbin (1988), Mouchada and Martin (1993), Sebkhi et al. (2003), Ghofrani et al. (2006), Milligan et al. (2002), Nichols et al. (2002), Muirhead et al. (2002), Burgess et al. (2008), Klotz et al. (2001), Gresser and Gleiter (2002), Stark et al. (2001), Ormrod et al. (2002), Eardley and Cartledge (2002), Bella and Brock (2003), Staab et al. (2004), Brock (2003), Porst et al. (2003), Curran and Keating (2003), Corbin et al. (2005), Wharton et al. (2005), Prickaerts et al. (2002), Baratti and Boccia (1999)
6	cGMP	610-700	15-17	Photoreceptor	Dipyridamole	Zhang et al. (2005), Estrade et al. (1998)
7	cAMP	0.03-0.2	-	Skeletal muscle, heart, kidney, brain, pancreas, T lymphocytes, eosinophils, neutrophils	BRL-50481, BC30 <sup>b</sup>	Gardner et al. (2000), Sasaki et al. (2000), Hetman et al. (2000a), Smith et al. (2003), Pits et al. (2004), Vergne et al. (2004), Zhang et al. (2008)
8	cAMP	0.06	-	Testis, eye, liver, skeletal muscle, heart, kidney, ovary, brain, T lymphocytes	PF-04957325 <sup>f</sup>	Perez-Torres et al. (2003), Wang et al. (2001), Hayashi et al. (2007), Kobayashi et al. (2003), Glavas et al. (2001), Dong et al. (2006), Vasta et al. (2006), Vang et al. (2010), Tsai et al. (2011), Dov et al. (2008)
9	cGMP	230	0.2-0.7	Kidney, liver, lung, brain, spleen, small intestine	BAY 73-6691	Soderling et al. (1998a,b), van der Staay et al. (2008)
10	cAMP→cGMP	0.2-1.0	13-14	Testis, brain	pyrazoloquinoline analogs	Soderling et al. (1999), Fujishige et al. (1999), Loughney et al. (1999), Hebb et al. (2004), Yang et al. (2012)
11	cAMP→cGMP	2.0-3.2	0.95-2.1	Skeletal muscle, prostate, kidney, liver, pituitary, testis, salivary glands	BC 11-38	Fawcett et al. (2000), Hetman et al. (2000b), Weeks et al. (2007), Ceyhan et al. (2012)

<sup>a</sup>Therapeutic action with neuronal effects (neural plasticity, memory loss, detrusor instabilities, and urgency incontinence,...); <sup>b</sup>Therapeutic action with anti-inflammatory effects; <sup>c</sup>Without therapeutic action; <sup>d</sup>therapeutic action for lung diseases (asthma, COPD); <sup>e</sup>Therapeutic action with cardiovascular effects (inotropic, vasodilator,...); <sup>f</sup>Therapeutic action for adrenal insufficiency.

**Tableau 1:5 Principales caractéristiques des familles de phosphodiésterases.**  
(D'après Noel *et al.*, 2012).

### 2.2.3 Relation entre NO et RCIU

Le NO joue donc un rôle particulièrement important dans la régulation du débit sanguin au niveau fœto-placentaire. Une perturbation de la production de NO peut donc avoir des conséquences sur le développement du fœtus. L'inhibition par mutagenèse de l'expression de la eNOS chez la souris et la réduction de la production endogène de NO due à l'administration d'un inhibiteur de la synthèse de NO chez des rates gestantes provoque un RCIU (120, 121).

Concernant l'expression de la NOS, les résultats obtenus diffèrent selon le tissu, le modèle animal ou le sous-type de NOS analysé. Dans un modèle bovin de RCIU, l'expression de la eNOS est diminuée dans le placenta (122) et dans l'artère ombilicale, mais augmentée dans les cotylédons (123) ; une autre étude ne montre aucun changement d'expression de la eNOS dans les artères utérines et les vaisseaux ombilicaux, alors que la concentration de NO est augmentée dans le sang (124).

Chez l'humain certaines études montrent une expression augmentée de la eNOS (125, 126), mais pas de la iNOS (127), dans le placenta (endothélium du syncytiotrophoblaste et villosités placentaires) ; une autre étude, au contraire, montre que l'expression de la eNOS n'est pas modifiée et celle de la iNOS est augmentée dans le placenta humain (cotylédon)(128) ; d'autres ont montré que l'expression de la eNOS était réduite dans les cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC) et augmentée dans les cellules endothéliales de l'artère ombilicale (HUAEC) (129). Le RCIU pourrait être associé à une altération de la synthèse de NO (130). Casanello et al. ont mis en évidence une activité diminuée de la eNOS dans des HUVEC en culture. Ces HUVEC montrent une production moins importante de L-citrulline, de nitrite et de GMPc chez les RCIU (131). Certaines études ont montré l'intérêt potentiel du NO dans la prévention du RCIU. L'utilisation de donneurs de NO, comme le nitroprussiate de sodium, permet de prévenir l'apparition d'un faible poids de naissance; la trinitrine améliore la perfusion placentaire (78) ainsi que les résultats de Doppler ombilical (132); l'utilisation de pentaerithrityl-tetranitrate (PETN) dans le cadre d'une étude en double aveugle montre une diminution de l'incidence du RCIU comparé au groupe traité avec un placebo (133). L'administration transdermique de nitroglycérine ou de sildenafil augmente en moyenne de 18 à 20% la relaxation de l'artère ombilicale chez les RCIU (134). Plus en amont, l'utilisation de L-arginine, le précurseur du NO, aurait également un rôle thérapeutique : son administra-

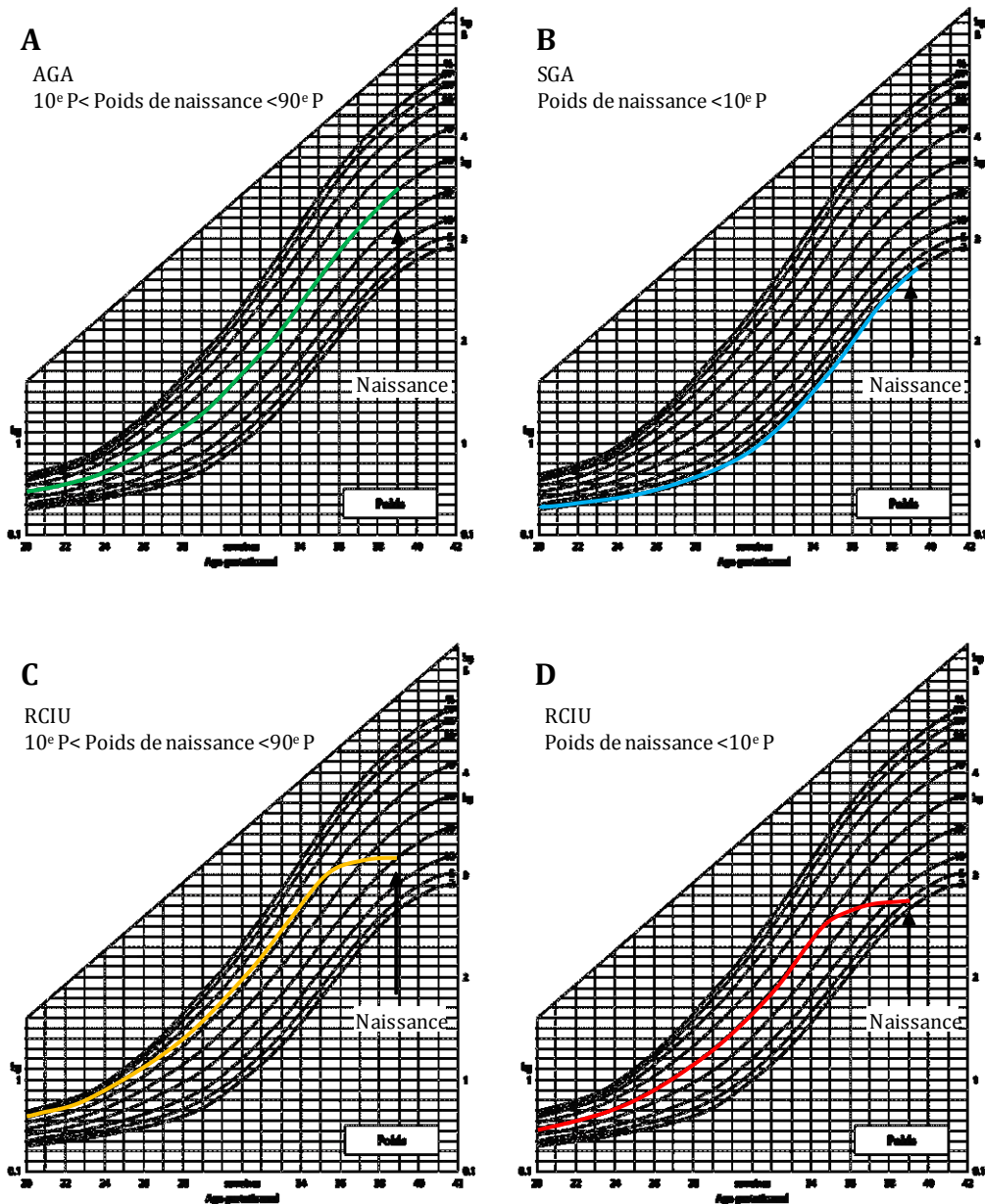
tion dans le cas de syndrome vasculo-rénal associé à un RCIU montre une amélioration de la vasodilatation artérielle et améliore les résultats du doppler utérin chez des mères présentant une résistance élevée, sans chute de la tension artérielle maternelle (135). Cependant, l'administration de donneurs de NO *in vivo* pose certains problèmes : d'une part des phénomènes de tolérance peuvent apparaître, d'autre part le NO peut avoir des effets secondaires néfastes, essentiellement dus aux phénomènes de nitrosylation et de peroxydation des molécules biologiques (protéines, lipides et acides nucléiques). Il est donc important de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette idée, les PDEs semblent particulièrement intéressantes.

## 3. RCIU et faible poids de naissance

### 3.1 Définition et épidémiologie

Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) correspond à une diminution anormale et pathologique de la croissance fœtale. C'est une complication fréquemment observée durant les grossesses et associée à une insuffisance placentaire dans la majorité des cas. Cette restriction de croissance peut conduire à un faible poids à la naissance (FPN) si le ralentissement se maintient durant la grossesse. A ce jour, différents termes médicaux sont utilisés pour décrire ce phénomène : on considère des nouveau-nés de "faible poids à la naissance" (FPN), "petits pour l'âge gestationnel" (SGA) ou présentant un "retard de croissance intra-utérin"(RCIU). Il est donc nécessaire dans un premier temps de définir le plus précisément possible chacun de ces termes afin de pouvoir les différencier. L'organisation mondiale de la santé définit le FPN comme un poids inférieur à 2500 g ; cette définition est basée sur différentes études épidémiologiques montrant que, chez ces nouveau-nés, l'incidence de la mortalité est 20 fois plus élevée, alors qu'un poids inférieur à 1500 g augmente la mortalité de 70 fois (136). Cette définition est difficilement utilisable du fait qu'elle est appliquée quel que soit l'âge gestationnel ; or le développement et la maturation du fœtus diffèrent grandement au cours de la grossesse. Pour ces raisons, des courbes de croissance standardisées (courbes de référence obtenues à partir des données de l'ensemble d'une population) correspondant au poids du fœtus en fonction de son âge gestationnel ont été développées (voir annexe) et permettent de suivre la croissance du fœtus tout au long de la grossesse. Ces courbes facilitent la distinction des nouveau-nés "adaptés pour l'âge gestationnel" (AGA), dont le poids est compris entre le 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentile, des "petits pour l'âge gestationnel" (SGA), qui ont un poids corporel au-dessous du 10<sup>e</sup> percentile. La distinction entre SGA et AGA basée

simplement sur cette courbe standardisée peut cependant poser certains problèmes. En effet, l'association d'un poids à un âge gestationnel ne permet pas de déterminer avec certitude si le poids estimé est pathologique ou s'il peut être considéré comme physiologique. En d'autres termes, il est nécessaire de distinguer un enfant constitutionnellement petit par rapport à la courbe de référence d'un enfant présentant un véritable retard de croissance lié à un processus pathologique. Pour un enfant constitutionnellement petit, le faible poids corporel observé est physiologique malgré le fait qu'il soit au-dessous de la moyenne, car il a atteint son plein potentiel de croissance. Au contraire, dans le cas d'un retard de croissance, le fœtus est incapable d'atteindre son plein potentiel de croissance, déterminé génétiquement, et présente un ralentissement ou un arrêt de la croissance intra-utérine ; ce ralentissement se traduit par une cassure de la courbe de croissance, qui ne peut être mise en évidence que par un suivi régulier de la croissance fœtale. Les nouveau-nés RCIU ont généralement un poids inférieur au 10<sup>e</sup> percentile, plus rarement, il est possible qu'un nouveau-né RCIU présente un poids de naissance situé dans les limites normales des courbes de référence (poids compris entre le 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentile), ce qui peut être dû à un ralentissement de la croissance à un âge gestationnel assez tardif, ou bien à un ralentissement de la croissance d'un bébé dont le poids attendu serait normalement particulièrement élevé (70<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentile) et qui se retrouve diminué dans des valeurs de percentile restant malgré tout dans les normes (Figure 1:14). La distinction entre SGA et RCIU repose donc sur une observation longitudinale de la grossesse. Par conséquent, bien que la plupart du temps ces deux termes soient utilisés indistinctement, il serait impératif de faire la différence entre les deux.



**Figure 1:14 Comparaison des différents profils de croissance foetale en condition normale et pathologique.**

Courbes représentant les différents profils de croissance de nouveau-nés, sans (A, B) ou avec (C, D) une cassure de courbe et dont le poids à la naissance est compris entre le 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> Percentile (A, C) ou au-dessous du 10<sup>e</sup> Percentile (B, D). Dans le premier cas, le nouveau-né est dit AGA (*Adapted for Gestational Age*) il a un poids compris entre le 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> Percentile, sans cassure de la courbe de croissance, il a atteint son plein potentiel de croissance et son développement est physiologique (A). Dans le deuxième cas, le nouveau-né est dit SGA (*Small for Gestational Age*): il a un poids au-dessous du 10<sup>e</sup> Percentile, mais sans cassure de courbe, il a atteint son plein potentiel de croissance et son développement est physiologique (B). Dans le troisième cas, le nouveau-né est dit AGA avec RCIU (*Retard de Croissance Intra-Utérin*): il a un poids compris entre le 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> Percentile avec une cassure de la courbe de croissance, il n'a pas atteint son plein potentiel de croissance et son développement est pathologique (C). Dans le quatrième cas, le nouveau-né est SGA avec RCIU: il a un poids au-dessous du 10<sup>e</sup> Percentile, il n'a pas atteint son plein potentiel de croissance et son développement est pathologique.

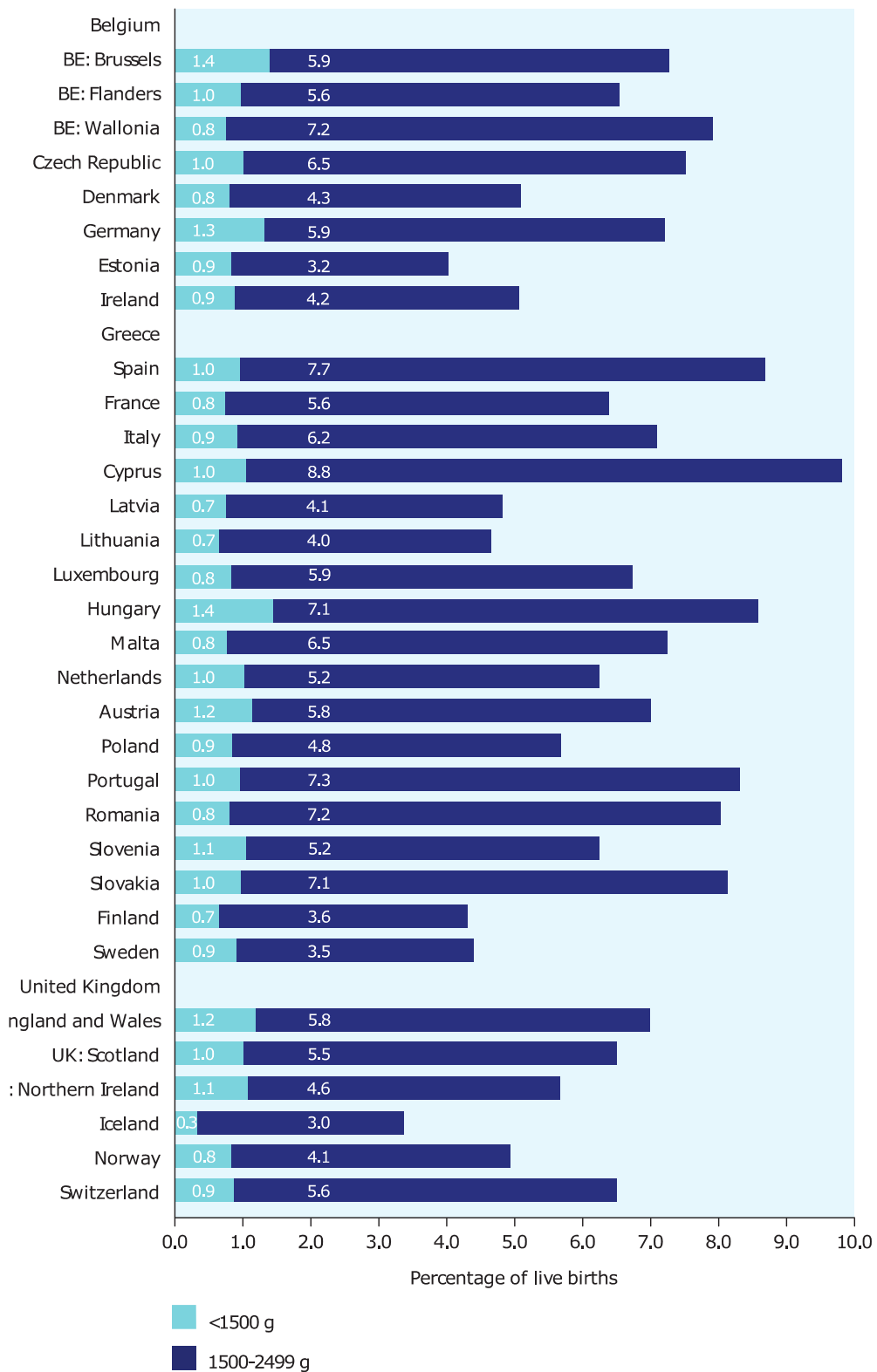
La définition du RCIU est donc une définition dynamique ; l'apparition d'un ralentissement de la croissance va dépendre du moment où un élément perturbateur/pathologique apparaît *in utero*. Le suivi longitudinal de la croissance au cours de la grossesse est donc d'une importance capitale pour la détection et la prise en charge de l'enfant. La détection du RCIU ne peut donc pas se baser seulement sur des données biophysiques mesurées à la naissance (poids et taille). En cas de suspicion de RCIU, les mesures biométriques échographiques du fœtus, ainsi que la mesure de la vélocimétrie par Doppler de certains vaisseaux sont utilisées pour évaluer et diagnostiquer une diminution de croissance.

L'incidence du faible poids à la naissance a été étudiée au niveau mondial par le Fonds des Nations Unies pour l'Enfance (UNICEF), et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans un rapport de 2013, "Improving child nutrition"; ils estiment à 15,5% le nombre de nouveau-nés touchés par ce problème au niveau mondial. Ce chiffre représente chaque année 20 millions de naissances dans le monde. Un rapport de l'European Perinatal Health en 2010 a estimé que l'incidence de naissances vivantes avec un poids inférieur à 2500 g en Europe variait entre 3,4% et 9,8% selon les pays. Les plus faibles pourcentages de petits poids de naissance ont été observés dans les pays d'Europe du Nord (Danemark, Estonie, Irlande, Lettonie, Lituanie, Finlande, Suède, Islande et Norvège) (Figure 1:15). La Suisse affiche un taux du même ordre de grandeur que ceux enregistrés dans les pays d'Europe; un rapport de l'Office Fédérale de la Statistique de 2013 indique que 9% de la population totale correspond à des SGA (résultats obtenus pour 82 000 naissances) (OFS, Mortinaissances et mortalité infantile 2003-2010). De plus, il est important de signaler que les risques de développer un RCIU sont plus élevés dans les pays en voie de développement (137). Ainsi l'Inde, le Pakistan, le Nigeria, les

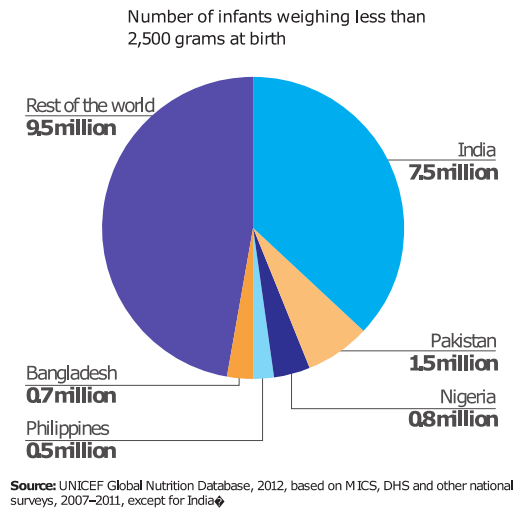
Philippines, et le Bangladesh comptent à eux seuls plus de la moitié du total des nouveau-nés avec un poids inférieur à 2500 g au niveau mondial (soit 34 millions de naissances) (UNICEF Global Nutrition Database 2012) (Figure 1:16).

L'identification d'un RCIU dépend de facteurs qui ne sont pas toujours mesurables en fonction du pays où a lieu la naissance, tandis que les données de poids à la naissance sont plus facilement enregistrées. Ainsi, dans les études épidémiologiques précédemment citées, les données de faible poids à la naissance (moins de 2500 g) ont été utilisées pour définir les caractéristiques d'une population, plutôt que le RCIU.





**Figure 1:15 Pourcentage de naissances vivantes avec un poids inférieur à 2500 g selon les pays d'Europe.**  
(D'après European perinatal health, 2010).



**Figure 1:16 Incidence du faible poids à la naissance au niveau mondial.**

Cinq pays comptent à eux seuls plus de la moitié du total des nouveau-nés avec un poids inférieur à 2500 g au niveau mondial. (D'après UNICEF Global Nutrition Database 2012).

### 3.2 Etiologie du RCIU

La régulation de la croissance du fœtus humain implique de nombreuses interactions multidirectionnelles entre la mère, le placenta et le fœtus (138). La mère fournit les nutriments et l'oxygène pour le fœtus via le placenta, le fœtus influe sur la demande en nutriments par la production d'hormones à travers le placenta et le placenta lui-même régule le métabolisme maternel et fœtal. Cependant, dans 30 % des cas, les causes d'un retard de croissance restent inconnues.

On distingue 3 grands groupes de causes impliquées dans la perturbation de la croissance intra-utérine :

- Maternelles
- Fœtales
- Utéro-placentaires

- ***Les causes maternelles***

*Physiologie maternelle et grossesse*

L'âge maternel au moment de la grossesse a une incidence sur le RCIU : un âge inférieur à 18 ans ou supérieur à 40 ans augmente le risque de faible poids pour le nouveau-né. L'intervalle entre les grossesses chez les femmes multipares est directement associé à des naissances SGA, le risque le plus élevé étant observé chez les femmes avec les intervalles les plus courts entre les grossesses.

Le poids de naissance est étroitement lié à la taille de la mère. Une étude menée sur des femmes mesurant moins de 1,57 m comparé à des femmes de 1,70 m montre un écart de poids d'environ 250 g chez les nouveau-nés (139). Brooks et al. ont étudié le rôle relatif d'une mère porteuse comparé au potentiel génétique de la mère donneuse dans la détermination du poids du nouveau-né, dans des cas de don d'ovule. Ils ont pu mettre en évidence que le poids de naissance du nouveau-né était corrélé au poids de la mère porteuse et non pas de la donneuse, ce qui signifie que l'environnement fourni par la mère est plus important que sa contribution génétique. Cette corrélation a été attribuée à des différences de croissance de l'appareil reproducteur : ainsi une femme qui est née SGA a un risque accru de donner naissance à des enfants de faible poids à la naissance (140).

*Malnutrition maternelle*

L'alimentation de la mère, l'apport calorique, et la fonction métabolique ont chacun un rôle important à jouer dans la fourniture de nutriments au fœtus. Différentes études ont mis en évidence une relation entre un faible apport en nutriments et une croissance insuffisante du fœtus (43). Le rationnement alimentaire obligatoire pendant la famine hollandaise (1944-1945) était si bas (400-800 calories par jour au pire de la crise) que cela a entraîné une réduction moyenne du poids de naissance de 300 g. Cette carence en nu-

triments est certainement une cause majeure du retard de croissance dans les pays en voie de développement. La prise de poids maternelle durant la grossesse est d'ailleurs un bon outil de prédiction à court et à long terme de la santé du fœtus. Des études épidémiologiques ont montré que les prises de poids trop faibles ou trop importantes sont associées à une augmentation de la morbidité. Il est donc important de prendre en compte le poids maternel avant la grossesse ainsi que le gain pondéral durant la grossesse.

### *Flux sanguin maternel*

L'augmentation du flux sanguin est essentielle pour répondre à la demande métabolique de l'utérus, du placenta et du fœtus en pleine croissance. Ainsi, le système hémodynamique de la mère enceinte subit d'importants changements caractérisés par une augmentation du débit cardiaque (35%) et du volume sanguin (40%) (141), associée à une baisse des résistances vasculaires systémique et pulmonaire. La chute de la résistance des vaisseaux est facilitée par la réorganisation structurelle de différents lits vasculaires, en particulier de l'aorte, et de l'utérus. Thaler et al. ont découvert que le débit de l'artère utérine augmentait plus de trois fois au cours de la grossesse (142), alors qu'Albaiges et al. ont montré qu'une résistance du flux sanguin dans l'artère utérine était associée à un risque accru de SGA (143).

Certaines pathologies maternelles, comme l'hypertension (138), la pré-éclampsie, ainsi que les maladies vasculaires et cardiaques, sont associées à un RCIU. La pré-éclampsie est souvent associée au RCIU ; elle apparaît en général dans la seconde moitié de la grossesse, suite à une augmentation de la résistance au niveau des artères utérines, ce qui provoque une hypertension artérielle gravidique, associée à une protéinurie. Le flux

sanguin utéro-placentaire peut être réduit jusqu'à 50% chez les femmes atteintes de pré-éclampsie (144).

### *Hypoxie maternelle*

Une hypoxie chronique, liée à la vie à haute altitude, a une forte incidence sur le RCIU. Des études ont montré une différence de 241 g en moyenne du poids de naissance entre les individus vivant à haute altitude (2744-3350 m) et basse altitude (915-1524 m) (145). Krampfl et al. ont effectué des mesures échographiques de la taille du fœtus de 14 à 42 semaines de gestation chez des femmes vivant au niveau de la mer et d'autres vivant à 4300 m d'altitude au Pérou ; ils ont constaté une réduction de la croissance fœtale dès la 25<sup>e</sup> semaine de grossesse, ainsi qu'une réduction du poids à la naissance (400 g en moyenne) (146).

### *Dépression et stress maternel*

Jusqu'à présent, les études relatives au stress psychologique maternel et à son impact sur le faible poids de naissance ont montré des résultats contradictoires. Certaines études ont mis en évidence une corrélation entre un stress psychologique prénatal et un faible poids de naissance (147-149) tandis que d'autres études n'arrivent pas aux mêmes conclusions (150-152). Les effets de la dépression prénatale sur le développement fœtal semblent être induits par l'hyperactivation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien pendant la grossesse et sont associés à des niveaux élevés de cortisol maternel (153, 154). Diego et al. ont ainsi mis en évidence une corrélation entre une augmentation significative du taux de cortisol prénatal de la mère, un faible poids fœtal (poids estimé entre 18 et 22 SA) et un faible poids de naissance (155). Une autre étude menée par Henrichs et al. a également montré une altération du poids fœtal, mais

plus tardive (>25 SA), associée à une diminution significative du périmètre céphalique et abdominal ainsi qu'à une incidence plus élevée de faible poids de naissance (156). L'apparition d'un stress pendant la grossesse et l'augmentation du taux de cortisol ont également un rôle sur le développement et la maturation de la régulation respiratoire, comme nous le verrons dans la 2<sup>ème</sup> partie de mon travail (cf. Partie 2. Stress gestationnel et activité respiratoire, une étude sur modèle animal).

### *Maladies inflammatoires maternelles*

La présence de maladies inflammatoires maternelles peut contribuer à réduire la croissance fœtale. Des études épidémiologiques antérieures ont lié la polyarthrite rhumatoïde (157), la maladie inflammatoire de l'intestin (158), le lupus érythémateux disséminé (159) et les maladies parodontales (160) à un risque accru de faible poids de naissance. De plus, la concentration de cytokines inflammatoires dans le sérum maternel et dans le placenta est significativement plus élevée chez les RCIU (161, 162).

### *Causes toxiques*

Le tabagisme maternel est associé à un faible poids de naissance : la consommation quotidienne de 15 cigarettes diminue le poids fœtal d'environ 300 g, avec un effet dose-dépendant (163). La nicotine traverse le placenta, et les quantités mesurées chez le fœtus sont supérieures de 15% à celles mesurées chez la mère (164). La consommation d'alcool est également un facteur de risque de survenue du RCIU (165) : l'alcool franchit facilement le placenta et la barrière hémato-encéphalique du fœtus (Julien, 1998). Il peut de plus entraîner un syndrome d'alcoolisme fœtal. Une étude a montré que la consommation d'un à deux verres de boisson alcoolisée par jour est suffisante pour modifier le poids de naissance (Mills *et al*, 1984).

A ce jour, malgré le nombre croissant d'études menées sur l'impact du tabac et de l'alcool, il est impossible de déterminer un seuil au-dessous duquel le risque est nul (Hankin, 2002; Huizink & Mulder, 2006). L'usage de drogues, comme la cocaïne ou la marijuana, est moins courant, mais a également des effets négatifs sur la croissance du fœtus. L'usage de cocaïne contribue à augmenter le nombre de nouveau-nés ayant un faible poids à la naissance, avec une réduction du poids moyen à la naissance de 93 g. De même, la consommation de marijuana durant la grossesse diminue le poids de 79 g (166).

- ***Les causes fœtales***

Quantitativement, les anomalies liées au fœtus et causant un RCIU sont rares, mais sont souvent associées à une restriction sévère de la croissance et un mauvais pronostic à long terme.

*Anomalies chromosomiques, génétiques et malformations*

Leur fréquence est difficile à préciser : elles constitueraient 5 à 20 % des RCIU (138). Dans les anomalies chromosomiques, on retrouve surtout les trisomies 13 et 18, les triploïdies, les délétions chromosomiques partielles, mais aussi la perte totale d'un chromosome sexuel dans le syndrome de Turner. La pratique d'une amniocentèse avec étude du caryotype fœtal fait partie de tout bilan d'hypotrophie précoce.

Pour les anomalies génétiques, il a été décrit des cas de RCIU dus à une délétion de l'IGF I ou à une mutation inactivant le récepteur de l'insuline (167), une mutation du gène de la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP2) (168) ou encore un polymorphisme rs2297660 du gène de la low-density lipoprotein receptor-related protein 8 (LRP8) (169).

Les malformations congénitales (1 à 2% des cas) ont également une incidence sur l'apparition d'un RCIU (138). Les malformations du système nerveux central, du système génito-urinaire, du squelette, ainsi que les malformations cardiaques sont associées au RCIU.

### *Infections*

Les pathologies infectieuses seraient en cause dans 1 à 5% des cas de RCIU (138) mais leur fréquence dépend beaucoup de la population étudiée. Les principales pathologies en cause sont la rubéole, l'infection à cytomégalovirus (CMV) et, dans une moindre mesure, l'herpès, le paludisme, la toxoplasmose, la varicelle, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le parvovirus B19 (170-173).

### *Grossesses multiples*

Les grossesses multiples sont responsables d'environ 3 % des cas de RCIU (138). Dans le cas de grossesses multiples, le poids moyen des fœtus va être inférieur à celui des grossesses uniques et proportionnel au nombre de fœtus. Il faut savoir que le nombre de grossesses multiples est en augmentation ces dernières années. Cela peut s'expliquer du fait du développement croissant des procréations médicalement assistées et par l'élévation de l'âge des mères. En 1990, il y avait en Suisse environ 23 naissances multiples pour 1000 naissances vivantes, alors qu'en 2010, il y a eu en moyenne 37 naissances multiples pour 1000 naissances vivantes (OFS, Mortinaissances et mortalité infantile 2003–2010, Evolutions, causes de décès et facteurs de risque).



- ***Les causes placentaires***

Plusieurs aspects du placenta sont critiques pour la croissance et le développement fœtal. Une mauvaise circulation foëto-placentaire va avoir une incidence importante sur la croissance du fœtus. En effet le placenta est le site d'échange des éléments nutritifs et des déchets entre la mère et le fœtus. De plus, il sécrète et transfère de nombreuses hormones stéroïdiennes et peptidiques qui modulent la croissance fœtale (174). Le RCIU est souvent associé à une insuffisance placentaire (175).

#### *Insertion placentaire et ombilicale*

Les pathologies placentaires couvrent un large spectre d'affections, qui comprend des anomalies d'implantation du placenta (*placenta prævia*), d'insertion du cordon ombilical (insertion marginale ou vélamenteuse) ou l'apparition de tumeurs et d'infarctus (176, 177).

#### *Circulation placentaire*

Différentes études ont montré une diminution de la densité vasculaire dans les placentas de RCIU (178-180). De même, l'existence d'une seule artère ombilicale peut être un facteur de risque du RCIU (181). En cas de retard de croissance, la surface des villosités placentaires et le volume placentaire sont diminués (180, 182).

#### *Transport, transfert et métabolisation des nutriments au niveau du placenta*

Il existe des altérations du transport des acides aminés par le placenta et de leur absorption par le fœtus chez les RCIU (183). Jansson et al. ont mis en évidence que l'absorption *in vitro* de la lysine et de la leucine était diminuée dans les grossesses RCIU, ce qui suggère une activité réduite des transporteurs d'acides aminés (184). Norberg et al. ont

démonstré que le transport de la taurine (un acide aminé essentiel pour le fœtus) était réduit en moyenne de 34% dans le placenta de fœtus avec un RCIU par rapport à ceux de grossesses normales (185). L'absorption d'acides gras essentiels semble également être modifiée chez les nouveau-nés en retard de croissance: le taux d'acide linoléique est significativement plus élevé, tandis que les taux d'acide docosahexaénoïque et d'acide arachidonique (19) sont significativement plus faibles chez les RCIU comparés à des grossesses normales (186). Ces observations peuvent être liées à un transport inadéquat durant la grossesse ainsi qu'à une perte des enzymes nécessaires à l'élongation des acides gras essentiels. En ce qui concerne le glucose, différentes études menées sur le placenta ont mis en évidence que son transport n'était pas modifié ; pourtant il existe une corrélation entre une hypoglycémie chez les fœtus et un faible poids de naissance. Dans une étude sur la perfusion, Challis et al. ont découvert que la consommation de base de glucose était deux fois plus élevée dans les placentas de RCIU que dans ceux des contrôles (187), ce qui suggère qu'une modification du métabolisme du placenta peut également jouer un rôle important et altérer la croissance en modifiant la concentration en glucose au niveau materno-fœtale. D'autre part, une réduction significative du gradient en acides aminés a été mise en évidence au niveau fœto-maternel dans les grossesses RCIU (188).

#### *Le placenta constitue "une barrière protectrice"*

Les glucocorticoïdes sont des hormones connues pour limiter la croissance (189) (155, 190, 191). Elles sont lipophiles et peuvent donc facilement traverser le placenta. Pourtant, durant toute la durée de la grossesse humaine, la concentration endogène de cortisol maternel est 5 à 10 fois plus élevée que la concentration de cortisol fœtale (192). Cette différence est due à la présence de 11 $\beta$ -hydroxystéroïde deshydrogénase de type 2

(11 $\beta$ -HSD2) dans le placenta. Cette enzyme catalyse l'oxydation du cortisol (forme active) en 11-cetone/cortisone (forme inactive), ce qui permet de contrôler les échanges et de réguler le niveau d'exposition du fœtus à ces hormones. Une réduction de l'activité de 11 $\beta$ -HSD2 est associée à une concentration importante de cortisol au niveau fœtal, ainsi qu'à une diminution de la croissance du fœtus. Shams et al. ont ainsi démontré qu'il y avait une réduction significative de l'activité enzymatique dans les placentas de grossesses compliquées par RCIU (193). Cela a également été montré dans différents modèles animaux : chez le cochon (194) et chez le rat, l'inhibition de la 11 $\beta$ -HSD2 diminue le poids de naissance (195).

L'apparition d'un ralentissement de la croissance durant le développement fœtal dépend donc d'une multitude de facteurs (maternels, placentaires et fœtaux). Le suivi de la croissance au cours de la grossesse ainsi que la détermination du contexte étiologique sont donc d'une importance capitale pour la détection et la prise en charge du fœtus.

### 3.3 Identification et classification du RCIU

Comme nous l'avons vu lors de la définition du terme RCIU, la mesure des paramètres biométriques à la naissance n'est pas suffisante pour déterminer si le fœtus se trouve en retard de croissance ou non. Il est nécessaire de mesurer plusieurs paramètres durant la grossesse afin d'évaluer la croissance et le bien-être du fœtus.

#### *L'âge gestationnel*

Il est important dans un premier temps de déterminer le plus précisément possible l'âge gestationnel. Cette estimation est fondée sur la date des dernières règles, en cas de doute elle peut également être déterminée à partir de la longueur fœtale obtenue par

échographie au premier trimestre. L'évaluation précise de l'âge gestationnel est cruciale puisqu'elle conditionne en grande partie le dépistage et le diagnostic du RCIU. Une erreur d'évaluation peut mener à une mauvaise interprétation des données (196, 197).

#### *Mesure de la hauteur utérine*

C'est une des méthodes les plus simples pour le dépistage du RCIU au cours de la surveillance de la grossesse : elle se mesure à l'aide d'un ruban métrique et correspond à la distance entre la symphyse pubienne et le fond utérin. La distance augmente de 4 cm par mois jusqu'à la 32<sup>e</sup> SA, puis de 2 cm par mois.

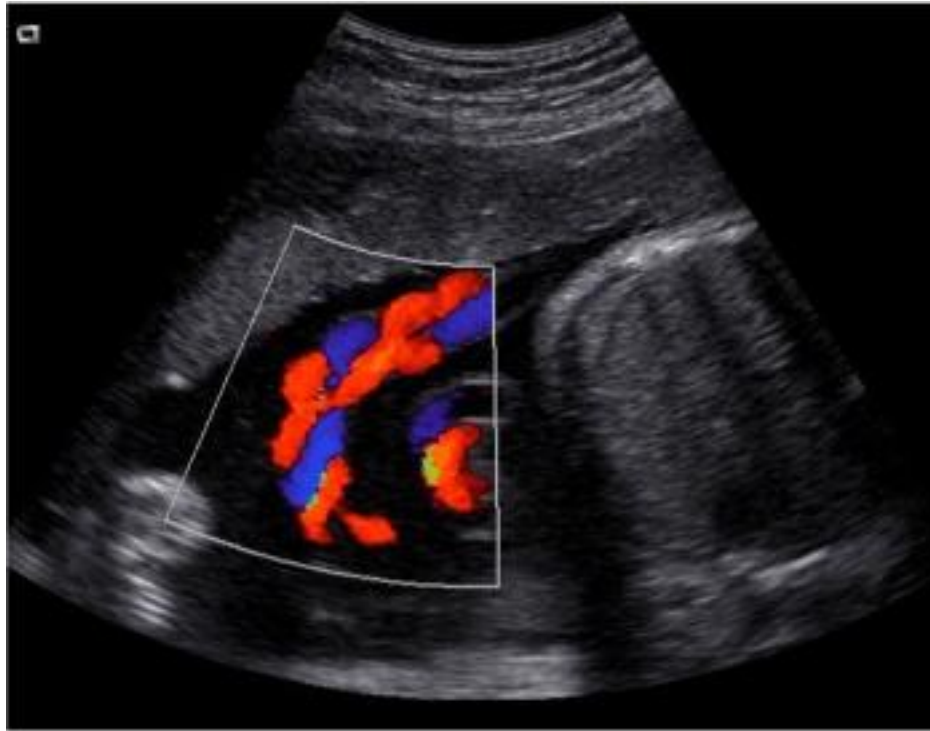
#### *Diagnostic échographique*

La mesure échographique est utilisée dans la surveillance de la croissance fœtale et dans le diagnostic du RCIU. C'est une technique performante permettant des mesures hémodynamiques et biométriques du fœtus. Le dépistage échographique repose sur des échographies effectuées à différents temps : 12<sup>e</sup> SA, 22<sup>e</sup> SA et de 32<sup>e</sup> SA. Pour les grossesses normales, c'est le plus souvent l'échographie réalisée à la 32<sup>e</sup> SA qui permet de détecter un RCIU. En cas de grossesse à risque, le RCIU sera recherché dès la 26<sup>e</sup> SA et la surveillance échographique sera également plus rapprochée.

Les principaux paramètres biométriques mesurés par échographie sont la longueur du fémur (LF), le périmètre abdominal (PA) et le périmètre céphalique (PC). Chacun de ces paramètres est reporté sur une courbe de croissance de référence, en fonction de l'âge gestationnel. La suspicion de RCIU est avancée lorsque la mesure du PA est inférieure au 5<sup>ème</sup> percentile. Ces paramètres permettent également d'estimer le poids du fœtus à partir de différentes formules, la formule d'Hadlock étant la plus utilisée. Cependant, cette technique n'est pas sans défaut puisqu'elle est soumise aux erreurs potentielles et à la

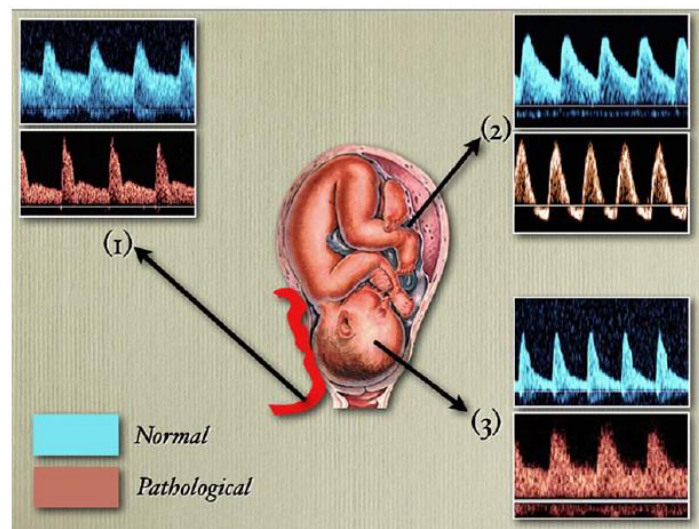
limite de précision des mesures biométriques. L'erreur moyenne de ces différentes formules va de 7 à 11%. Par ailleurs, l'estimation du poids fœtal ne semble fiable que pour des poids compris entre 1500 et 4000 g (196). L'estimation du poids fœtal est reportée sur une courbe de croissance de référence *in utero*, en fonction de l'âge gestationnel. Le fœtus est considéré en retard de croissance lorsque le poids fœtal estimé est au-dessous du 10<sup>ème</sup> percentile. Des mesures successives du poids tout au long de la grossesse permettent de détecter un ralentissement de la courbe de croissance et donc de diagnostiquer une anomalie de la croissance fœtale.

Les grossesses à risque peuvent également être suivies par échographie Doppler. Cette méthode permet l'étude hémodynamique de la circulation materno- et fœto-placentaire et l'estimation des résistances vasculaires (Figure 1:17). La mise en évidence d'un indice de résistance élevé est un facteur de mauvais pronostic périnatal, indiquant une perturbation des échanges materno-fœtaux (136). Le Doppler est donc un bon test de dépistage, mais également un facteur de pronostic en cas de pathologie avérée (198). Les mesures sont effectuées à 3 niveaux: les artères utérines maternelles, les artères ombilicales fœtales et les artères cérébrales fœtales (Figure 1:18). Les mesures échographiques permettent également de mesurer différents paramètres tels que la quantité de liquide amniotique, les mouvements respiratoires, le rythme cardiaque fœtal, le tonus et les mouvements fœtaux. Ces données sont utilisées pour calculer le score de Manning et permettent d'évaluer le bien-être fœtal.



**Figure 1:17 Doppler ombilical.**

Doppler couleur des artères et de la veine du cordon ombilical. Rouge: veine du cordon ombilical; bleu: artères du cordon ombilical. La couleur visible à l'intérieur du vaisseau reflète à la fois la vitesse du sang et sa direction par rapport à la sonde. (D'après <http://www.medical.siemens.com>).



**Figure 1:18 Comparaison de la forme d'onde Doppler en condition normale et pathologique.**

Comparaison de la forme d'onde Doppler en condition normale et pathologique, dans l'artère utérine (1), l'artère ombilicale (2) et l'artère cérébrale moyenne (3). Un fœtus avec une circulation compromise va montrer une forme d'onde de l'artère utérine avec "entaille", un flux inverse de la forme d'onde de l'artère ombilicale et une composante diastolique accrue dans l'artère cérébrale moyenne. (D'après Bamberg 2004)(197).

### *Courbes de référence*

Le retard de croissance est déterminé par un poids inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile, ainsi que par la présence d'une cassure de la courbe de croissance. Cette démarche permet de distinguer les RCIU, subissant une diminution importante de leur potentiel de croissance à cause d'un environnement néfaste, des enfants constitutivement "petits pour l'âge gestationnel", qui correspondent à des fœtus de faible poids corporel mais ayant une croissance dite harmonieuse, comme proposé par Barker et al. (199).

A ce jour, il existe différentes courbes de référence, tenant compte de l'ethnie, des caractéristiques maternelles, de la parité et du sexe foetal. Il est essentiel de bien choisir la courbe de référence à utiliser ; il est en effet préférable de se baser sur des courbes établies localement ou à partir d'une population similaire. Ces courbes doivent également être réactualisées car une population varie dans le temps. Différentes études ont montré que le poids moyen a augmenté entre 50 et 100 g en moyenne, en l'espace de seulement 20 ans, et ceci dans différentes populations (Canada, Royaume-Uni, Finlande ou Inde)(200-203). De façon surprenante, en Suisse, le poids moyen de l'ensemble des naissances a diminué d'une trentaine de grammes entre 1990 et 2010 (OFS, Mortinaissances et mortalité infantile 2003–2010).

La courbe de référence utilisée en Suisse pour le poids a été mise au point en 2011 à partir de naissances uniques survenues en Allemagne (une population similaire à la population suisse) au cours des années 1995 à 1997 (Voigt et al., Analyse des Neugeborenenkollektivs der Bundesrepublik Deutschland, Geburtsh Frauenheilk 2006; 66: 956–970.). Elle présente, pour chaque sexe, les valeurs allant du 3<sup>e</sup> au 90<sup>e</sup> percentile, dans l'intervalle de 20 à 42 semaines (voir annexes).

### *Classification*

Le retard de croissance fœtal peut être classé comme symétrique (Type I) ou asymétrique (Type II) ; la différence dépend principalement du moment d'apparition d'un processus pathologique pendant la grossesse. Lors d'un retard de croissance symétrique, les mesures biométriques de la tête, du squelette et de l'abdomen par échographie sont affectées de façon proportionnelle et sont associées à une réduction du nombre total de cellules fœtales. Cela représente 20-25 % des cas de RCIU et correspond généralement à une pathologie de début de grossesse, avant 24-26 SA.

Le RCIU asymétrique ou disharmonieux apparaît lorsque la croissance fœtale a été perturbée de façon tardive, après 30-32 SA, et représente 75-80 % des cas de RCIU. Lors d'un retard de croissance asymétrique, les nouveau-nés ont une diminution plus importante de la taille et de l'abdomen que de la tête. Ce type de RCIU est souvent associé à une insuffisance utéro-placentaire, le fœtus redistribuant alors sa circulation fœtale principalement vers les organes vitaux, que sont le cerveau et le cœur.

Il est important de déterminer si le RCIU est de type symétrique ou asymétrique, étant donné que les risques de morbidité et de mortalité vont grandement varier. En effet, le retard asymétrique est associé à un moins bon pronostic. Pour ce type de RCIU les causes sont plus sévères: anomalies chromosomique et génétique, infection précoce, anomalie de l'utérus, abus ou exposition à des substances tératogènes.

L'apparition du retard de croissance est un problème de santé majeur : il va avoir des conséquences non seulement à court terme, mais également à plus long terme, comme expliqué par la suite.

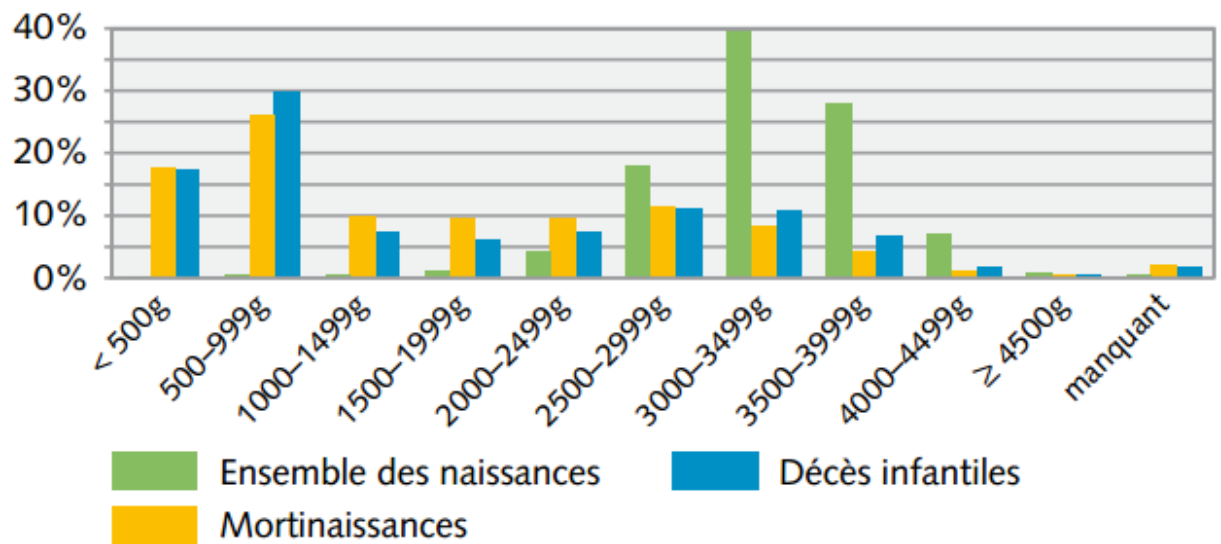


### 3.4 Effets à court terme d'un RCIU

Le RCIU, indépendamment de la prématurité, est un facteur important de morbidité et de mortalité périnatale. Les complications immédiates chez les RCIU peuvent être sévères ; ces nouveau-nés nécessitent souvent une prise en charge médicale à la naissance et une attention toute particulière. Chez les RCIU, le développement est souvent compromis du fait d'un environnement suboptimal (insuffisance placentaire, hypoxie chronique intra-utérine) et ils ont un risque plus important de syndrome d'aspiration méconiale (SAM) comparés aux nourrissons normalement développés. Dans les cas de SAM, le méconium (matière fécale tapissant normalement le tractus digestif) libéré dans le liquide amniotique peut être aspiré en cas de souffrance fœtale prolongée au niveau des voies respiratoires du fœtus. Ces différents environnements néfastes rendent les nouveau-nés RCIU plus enclins à l'asphyxie et à certaines complications respiratoires telles que l'hypertension pulmonaire persistante ou le syndrome de détresse respiratoire (204). Cette privation d'oxygène est une cause importante de séquelles neurologiques (encéphalopathie ischémique) et de mortalité périnatale (205, 206). L'hypoxie chronique durant la grossesse peut être responsable d'une augmentation de la masse de globules rouges (polyglobulie), ce qui entraîne une viscosité plus importante (207, 208). Il a également été montré que l'incidence d'hémorragies intra-ventriculaire et pulmonaire était significativement plus importante chez les RCIU. Les risques d'intubation à la naissance, de crises de convulsion au cours des premiers jours de vie et de septicémie sont plus importants comparés aux nouveau-nés normalement développés. Bien que chez les nouveau-nés RCIU la température rapportée soit plus élevée que la normale, ils ont un risque plus important d'hypothermie et nécessitent donc une prise en charge particulière (209). Le taux sérique de calcium est souvent plus faible chez les nourrissons RCIU (hypocalcémie) (210), ainsi que le taux de glucose (hypoglycémie). Ce risque

d'hypoglycémie est un sujet de préoccupation majeure chez le nouveau-né RCIU, durant les premiers jours de vie (211).

Le taux de mortinatalité (c'est-à-dire toutes les grossesses aboutissant à l'expulsion d'un fœtus mort après 22 semaines de gestation en Suisse, ou 28 semaines selon l'OMS) et le taux de mortalité néonatale (mortalité des enfants entre le jour de la naissance et la fin du 28ème jour de vie) sont augmentés chez les fœtus en retard de croissance (212-214). Le RCIU est un important facteur de risque dans les cas de mort intra-utérine soudaine ; ainsi 52 % des enfants décédés de façon inexplicable *in utero* présentaient un retard de croissance (215). En Suisse, plus de 40% des mortinaissances et décès infantiles (mortalité des enfants entre le jour de la naissance et la fin du 12ème mois de vie) concernent des enfants avec un poids de naissance de moins de 1000 g, malgré le fait que cette catégorie ne représente que 0,4% de l'ensemble des naissances. Globalement, les nouveau-nés présentant un RCIU ont un risque 5 fois plus élevé de mortinatalité et 3 fois plus élevé de mortalité infantile que des nouveau-nés normalement développés (OFS, Mortinaissances et mortalité infantile 2003–2010, Evolutions, causes de décès et facteurs de risque). Un "effet dose" est observé pour le taux de mortinatalité et de mortalité infantile : il est en effet bien plus élevé dans les catégories de poids les plus faibles (moins de 1000g) comparées aux catégories de poids un peu plus élevés (1000 à 2500g) ou aux AGA (Figure 1:19).



© OFS

**Figure 1:19 Répartition de l'ensemble des naissances, mortinaissances et décès infantiles selon le poids.**

Répartition de l'ensemble des naissances, mortinaissances et décès infantiles selon le poids en Suisse entre 2003 et 2010. (D'après l'OFS, Mortinaissances et mortalité infantile 2003-2010, Evolutions, causes de décès et facteurs de risque)

### 3.5 Effets à long terme d'un RCIU

Comme introduit précédemment (cf. 1.3 Altération de la croissance et programmation foétale), l'environnement utérin conditionne grandement la santé du nouveau-né dès premiers jours de vie jusqu'à l'âge adulte (concept également connu sous le nom de l'hypothèse de Barker). Nous allons aborder les implications d'un RCIU dans l'apparition de maladies chroniques à l'âge adulte.

Une première étude épidémiologique menée par Wadsworth et al. a permis de mettre en évidence un risque accru d'hypertension artérielle à l'âge de 36 ans chez les individus nés avec un petit poids de naissance (216). Cette corrélation fut ensuite confirmée par l'épidémiologiste David Barker, chez des individus âgés de 10 et 36 ans (217). Par la suite, il a également montré qu'un faible poids à la naissance et durant la période périnatale (jusqu'à un an d'âge) était associé à une plus grande mortalité liée à l'ischémie car-

diatique (218). La pression artérielle systolique peut également être rapportée au poids du placenta (rapport poids du placenta sur le poids de naissance) ; ainsi la pression sanguine est plus élevée chez les nouveau-nés de petits poids avec un grand placenta (219). Ces données épidémiologiques suggèrent donc que le faible poids à la naissance augmente le risque de troubles cardio-vasculaires à l'âge adulte (220, 221).

De nombreuses études épidémiologiques ont également établi une association entre une restriction de la croissance fœtale et le développement de syndrome métabolique à l'âge adulte, en particulier la survenue d'un diabète de type 2 ou d'insulino-résistance. Ainsi une méta-analyse de plusieurs études menée par Newsome et al. (222) a permis de mettre en évidence une relation inverse entre le poids de naissance et la concentration de glucose plasmatique à jeun (dans 15 articles sur les 25 analysés), la concentration d'insuline dans le sang lors d'un jeûne (20 sur 26), la concentration de glucose dans le sang deux heures après une injection de glucose (20 sur 25), la prévalence du diabète de type 2 (13 sur 16), les mesures de résistance à l'insuline (17 sur 22) et les mesures de la sécrétion d'insuline (16 sur 24 ). Hales et al. ont démontré une relation entre un faible poids à la naissance et un risque augmenté de développer un diabète de type 2 à l'âge adulte (223), ainsi qu'une intolérance glucidique lors du test d'hyperglycémie provoquée par voie orale chez les sujets nés SGA (223), associée à une augmentation de la résistance à l'insuline. Ong et al. ont confirmé une association entre un faible poids de naissance et une résistance à l'insuline de façon précoce et ont mis en évidence qu'une prise pondérale postnatale excessive aggravait la situation (224). Ainsi, le risque de développer des maladies chroniques à l'âge adulte n'est pas seulement associé au faible poids de naissance, mais également au milieu extra-utérin dans lequel se développe le nouveau-né. Chez les enfants nés avec un RCIU, plus la prise de poids est rapide (phé-

nomène de "rattrapage") durant la petite enfance, plus le risque de développer une insulino-résistance, une dyslipidémie et une hypertension artérielle est élevé à l'âge l'adulte.

Une croissance fœtale réduite a aussi une incidence sur l'apparition de maladies respiratoires chez les enfants et les adultes. On observe une augmentation du risque de détresse respiratoire néonatale pouvant nécessiter le recours à une assistance respiratoire (225, 226). Différentes études ont montré qu'un faible poids de naissance est associé à une capacité respiratoire amoindrie chez l'enfant ; il a été observé en particulier une réduction du volume expiratoire forcé à 1 seconde (FEV1) (227) ainsi que du flux expiratoire forcé (FEF) (228). Chez l'adulte, le faible poids à la naissance est associé à une dysfonction des voies respiratoires et à un risque augmenté de mortalité associée à une maladie pulmonaire obstructive chronique (229, 230). Lopuhaa et al. ont montré que des hommes et femmes exposés à la famine en milieu de grossesse présentaient un taux plus important de maladie pulmonaire obstructive (231). Ces données épidémiologiques suggèrent donc que le faible poids à la naissance augmente le risque d'altération de la fonction pulmonaire dans la petite enfance, l'enfance et l'âge adulte. Cependant, les processus sous-jacents ne sont pas encore élucidés.

Un faible poids de naissance a également un impact sur le développement du cerveau. Le développement de nouvelles techniques d'imagerie, toujours plus sophistiquées, permet aujourd'hui de caractériser avec plus de précision des altérations structurelles au niveau cérébral. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) chez les nouveau-nés présentant un RCIU a montré une diminution significative du volume cérébral total et de la substance grise corticale (232), une diminution de volume de l'hippocampe (233) et un retard de maturation de la myélinisation (234). Le RCIU semble également modifier le mé-

tabolisme énergétique. Story et al. ont ainsi pu mettre en évidence des modifications du taux de créatine et de lactate dans la matière blanche et grise du cerveau (235). Ainsi l'exposition fœtale à un stress mène à des modifications structurelles et altère de nombreux processus impliqués dans le développement et le fonctionnement cérébral global. Ces altérations sont corrélées avec des troubles cognitifs tels que les déficits d'attention, de mémoire, d'apprentissage et de raisonnement. En effet, différentes études psychosociales ont permis de mettre en évidence que le faible poids à la naissance est associé à une difficulté de concentration à l'âge de 10 ans (236). Breslau et al. ont quant eux montré qu'un faible poids à la naissance est associé à un QI moyen plus bas (cinq points de moins) chez des enfants de 6 ans sans atteinte neurologique (237), l'effet étant plus important chez les enfants avec la plus grande réduction de poids (moins de 1500 g) (236, 238). Ces altérations sont également corrélées avec des déficits locomoteurs (239) ainsi que différents troubles du développement et du comportement, tels que la dépression et la schizophrénie (240, 241). Enfin des études suggèrent qu'une hypotrophie à la naissance peut être associée à une altération du système nerveux endocrinien et du fonctionnement du système nerveux autonome. Par exemple, chez les agneaux nouveau-nés avec un RCIU l'activité parasympathique est augmentée (242).

En résumé, le RCIU est donc associé à un risque augmenté de développer différentes pathologies à l'âge adulte (34-38). Les conséquences varient en fonction du sexe du fœtus, de la nature de l'atteinte et du moment de la grossesse où intervient l'événement défavorable(36).

### 3.6 Stratégies thérapeutiques et prise en charge

Ces vingt dernières années ont été marquées par une nette diminution de la mortalité chez les nouveau-nés avec un petits poids de naissance, sans pour autant observer une diminution du nombre d'individus avec un RCIU (243). Comprendre l'étiologie du RCIU pour chaque grossesse est la base de la gestion clinique. Il n'y a actuellement pas de traitement médicamenteux efficace pour prévenir ou traiter un RCIU ; seules des approches préventives visant à réduire les facteurs de risque existent. La prévention ou l'atténuation des conséquences d'un RCIU nécessite une identification des grossesses à haut risque et passe principalement par la modification du comportement ainsi que des habitudes de la mère (244, 245). Le but étant d'optimiser le développement fœtal et de poursuivre la grossesse au maximum afin d'éviter une prématurité.

La prise en charge thérapeutique est différente selon le contexte étiologique. Dans une situation de famine aiguë ou chronique, une supplémentation en calories et vitamines spécifiques pour des femmes sous-alimentées permet d'augmenter le poids de naissance. Il est intéressant de noter que l'apport d'une seule sorte de supplément nutritionnel pendant la grossesse peut ne pas suffire. Une supplémentation en protéines est généralement insuffisante et ne va pas favoriser la croissance du fœtus. Une supplémentation en acide folique, en fer et en vitamine A à des femmes enceintes au Népal a entraîné une augmentation du poids moyen de 37 g à la naissance ainsi qu'une réduction de 16% du taux de faible poids à la naissance, en comparaison avec des femmes enceintes à qui l'on a donné seulement de la vitamine A (246). L'acide folique semble être particulièrement important : une étude américaine suggère une association entre une concentration élevée d'acide folique dans le sérum maternel à 30 semaines de gestation et un risque de RCIU plus faible, un poids de naissance plus élevé et un score d'Apgar plus éle-

vé (247). Scholl et al. (248) ont étudié l'impact de la supplémentation en multivitamines sur la grossesse et sur le devenir des nouveau-nés. Cette étude a permis de mettre en évidence une réduction du risque de faible poids de naissance d'environ deux fois dans le groupe supplémenté.

La consommation de tabac et d'alcool pendant la grossesse figure parmi les principaux risques menaçant le développement du fœtus dans les pays développés. Ce facteur de risque peut être évité par la mise place de programme de renoncement au tabac (244). Les femmes au moment des visites de contrôle sont donc informées et encouragées à renoncer au tabac ou à boire de l'alcool. Mac-Mahon et al. (249) ont ainsi pu établir que les femmes qui fument avant la grossesse, mais s'abstiennent pendant la grossesse, ont des enfants de taille similaire aux mères non fumeuses.

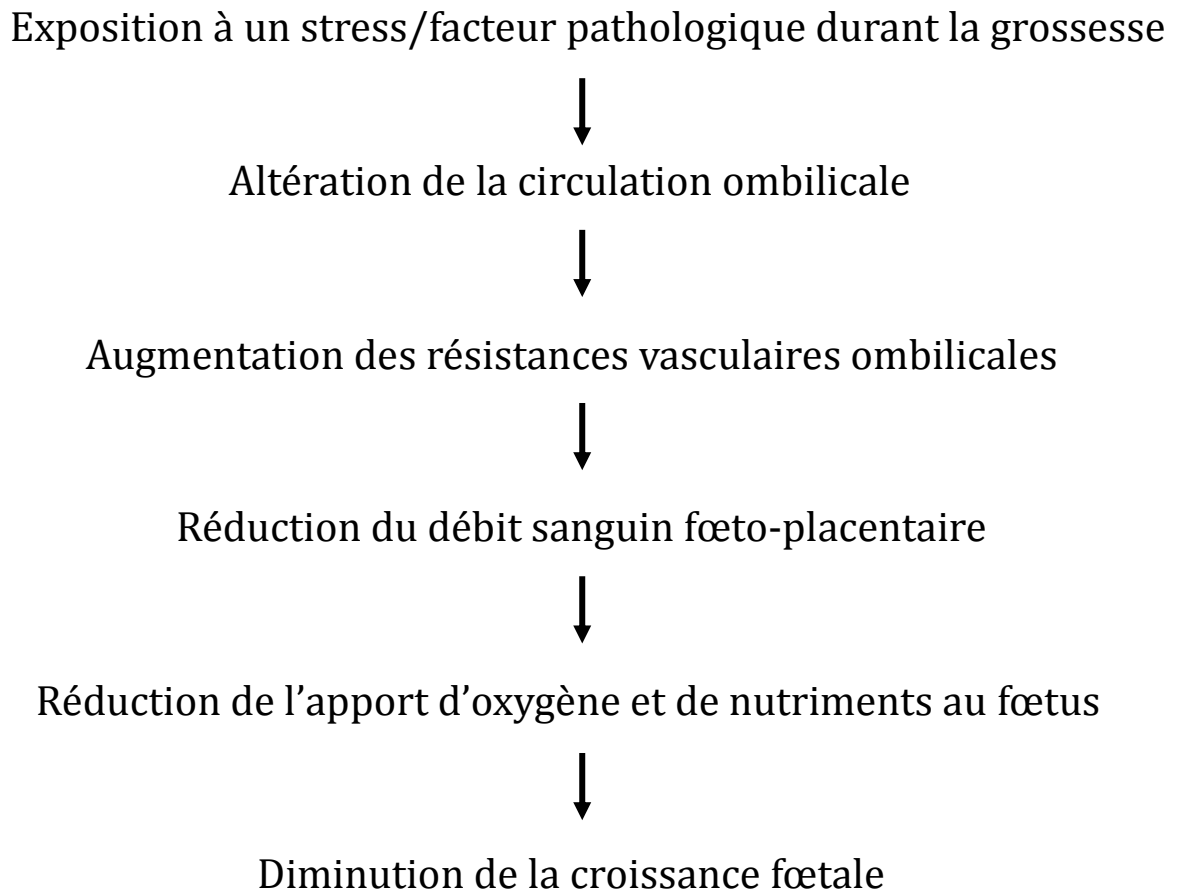
En résumé, l'étiologie du défaut de croissance fœtale est multiple (malformation chromosomique, génétique, virale, toxique, etc) et il n'existe aucun prédicteur unique du RCIU. Le dépistage et une prise en charge adéquate des femmes enceintes selon le risque encouru restent une difficulté majeure du retard de croissance (dans 40 % des RCIU, la cause reste inconnue). Il est donc particulièrement important de comprendre et d'appréhender au mieux les facteurs environnementaux et les processus pathologiques qui peuvent interférer avec la croissance normale du fœtus, en particulier les risques associés à une altération de la circulation fœto-placentaire.



## II. But de l'étude

Les données épidémiologiques indiquent que le RCIU est la 2<sup>e</sup> cause de mortalité et de morbidité néonatale. Il touche 5 à 12% des grossesses au niveau mondial, ce qui en fait un problème majeur de santé publique. Comme nous l'avons décrit, la circulation fœto-maternelle et sa régulation jouent un rôle extrêmement important dans le bon développement fœtal. Le RCIU est souvent associé à une insuffisance placentaire. Des mesures de la circulation ombilicale par Doppler ont mis en évidence que le flux sanguin au niveau de la veine ombilicale était significativement diminué chez les RCIU. La circulation au niveau ombilical semble donc altérée et pourrait contribuer à la sévérité d'un RCIU. Le cordon ombilical n'étant pas innervé, la régulation de sa vasomotricité passe principalement par un contrôle humoral. Le NO joue un rôle particulièrement important dans la régulation du débit fœto-maternel, en assurant le maintien d'un état dilaté ; la perturbation de la relaxation induite par le NO pourrait donc avoir des conséquences sur le développement du fœtus et être associée à un RCIU. Cependant, peu d'études ont évalué le rôle et l'importance de la régulation des vaisseaux ombilicaux dans la régulation de la circulation fœto-placentaire.

Nous avons émis l'hypothèse que l'insuffisance placentaire et la réduction de l'apport en oxygène et/ou en nutriments au fœtus pourraient être associées à des altérations dans la régulation du tonus vasculaire ombilical (Figure 2:1), en particulier de la vasorelaxation dépendant de la voie NO/GMPc, ce qui contribuerait au RCIU.



**Figure 2:1 Proposition de mécanisme conduisant au développement d'un RCIU.**

Une exposition à un stress durant la grossesse peut altérer la circulation sanguine au niveau du cordon ombilical, ce qui induit une diminution du flux sanguin et entraîne une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments. Au final, le fœtus ne peut pas atteindre son plein potentiel de croissance.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons dans un premier temps, mesuré le diamètre de cordons ombilicaux humains et analysé l'intégrité structurelle des parois vasculaires. Pour cela, nous avons étudié la présence et l'organisation des cellules endothéliales et musculaires lisses dans la veine et les artères ombilicales. Puis, nous avons effectué des mesures morphométriques afin d'évaluer la surface occupée par la veine et les artères, ainsi que par la gelée de Wharton. Nous avons ensuite comparé les valeurs obtenues entre des nouveau-nés RCIU et CTR.

Dans un deuxième temps, nous avons regardé les propriétés fonctionnelles de la veine, en particulier sa capacité à se relâcher. Nous avons évalué la relaxation induite par le NO, puis la contribution des PDEs dans cette relaxation. Pour ce faire, des veines ombilicales isolées ont été incubées avec des doses croissantes d'un donneur de NO, le 2-(N,N-Diethylamino)-diazénolate-2-oxide (DEA/NO) en chambres à organes (OC) et le rôle joué par les PDEs a été évalué à l'aide d'un inhibiteur non spécifique des PDEs, l'IBMX.

Enfin, nous avons mené une étude moléculaire sur les composants de la voie du NO, ainsi que la concentration intracellulaire de GMPc, afin d'évaluer leur importance dans la transduction du signal. Pour cela, nous avons mesuré l'expression protéique de la GCs, de la PKG et de différents isoformes de PDEs. La production de GMPc par la GCs et sa dégradation par les PDEs ont été évaluées par ELISA. Pour cela, la concentration intracellulaire de GMPc a été évaluée dans des veines isolées, en conditions basales ou sous activation (en absence ou en présence de DEA/NO respectivement) et en présence/absence d'IBMX (un inhibiteur non spécifique des PDEs), de vinpocétine (un inhibiteur préférentiel de la PDE1) ou de sildénafil (un inhibiteur préférentiel de la PDE5). Pour chacune des expériences, les tissus provenant de garçons et de filles ont été analysés séparément afin de déterminer les modifications spécifiques au genre.

# **III. Démarches expérimentales et méthodologie**

# 1. Patients et groupes d'études

La présente étude a reçu l'aval du comité d'éthique de la Faculté de Biologie et de Médecine de l'Université de Lausanne (numéro de protocole 134/08).

Cette étude a été réalisée au sein de la maternité du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), à Lausanne, en Suisse. Les cordons ombilicaux de 411 nouveau-nés ont été collectés entre juin 2009 et juin 2015. Les patientes concernées ont toutes accouché au CHUV. Elles avaient effectué leur suivi de grossesse en totalité ou en partie à la maternité du CHUV ou avaient été adressées à l'hôpital pour un suivi particulier. Nous avons collecté et étudié rétrospectivement les données démographiques et médicales de chaque patiente à partir de leurs dossiers médicaux.

Les principaux paramètres relevés concernent :

- L'âge maternel
- La durée de gestation
- Le poids, la taille et le périmètre crânien du nouveau-né
- Les pathologies durant la grossesse (hypertension, pré-eclampsie, diabète)
- La consommation de tabac, d'alcool ou de drogues
- La gestité (nombre de grossesses vécues par une femme) et la parité (nombre d'enfants mis au monde vivants par une femme)
- Les antécédents médicaux et obstétricaux de la patiente
- Le déroulement de la grossesse
- Les échographies et les dopplers
- La sérologie de la patiente (toxoplasmose, Rubéole, CMV, HVB, HVC, HIV, SGB)

- Le terme de diagnostic du retard de croissance (cassure de la courbe de croissance, paramètres biométriques : LF, PA, PC)
- Les modalités de l'accouchement (type d'anesthésie, voie basse/césarienne)
- L'adaptation de l'enfant à la naissance (score Apgar)
- L'analyse anatomo-pathologique du placenta
- Le diamètre du cordon
- Le nombre de vaisseaux et le pH du sang ombilical

## 1.1 Critères d'inclusion et d'exclusion

### *Les critères d'inclusion des patientes:*

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur des mères donnant naissance entre 37 et 41<sup>6/7</sup> semaines de gestation. Nous avons donc utilisé comme critère d'inclusion des patientes donnant naissance à des nouveau-nés à terme, RCIU et AGA, issus d'une grossesse unique.

### *Les critères d'exclusion des patientes:*

La sélection des nouveau-nés avec un RCIU pour cette étude englobe un autre problème de santé majeur : la prématurité. En effet, un nouveau-né peut être à la fois en retard de croissance et naître avant la 37<sup>e</sup> SA. Dans le cadre de ce travail, nous avons exclu les enfants prématurés, afin d'étudier et décrire le plus précisément possible les modifications liées uniquement à un RCIU (221). Les critères suivants sont également exclus:

- Femme enceinte prenant une médication composée d' $\alpha$  et de  $\beta$ -bloquants ou de bloqueurs de canaux calciques

- Femme enceinte avec une sérologie positive au VIH, hépatite A, B ou C, ou avec une sérologie inconnue
- Femme enceinte avec une pré-éclampsie
- Femme enceinte dont le nouveau-né présente une complication, telle qu'une malformation ou un syndrome génétique
- Femme enceinte avec une grossesse multiple
- Nouveau-né dont le cordon ombilical contient seulement 2 vaisseaux (1 artère et 1 veine) au lieu de 3 vaisseaux (2 artères et 1 veine)
- Nouveau-né dont le poids est supérieur au 90<sup>e</sup> percentile
- Les grossesses dépassant 42 semaines

## 1.2 Groupes expérimentaux

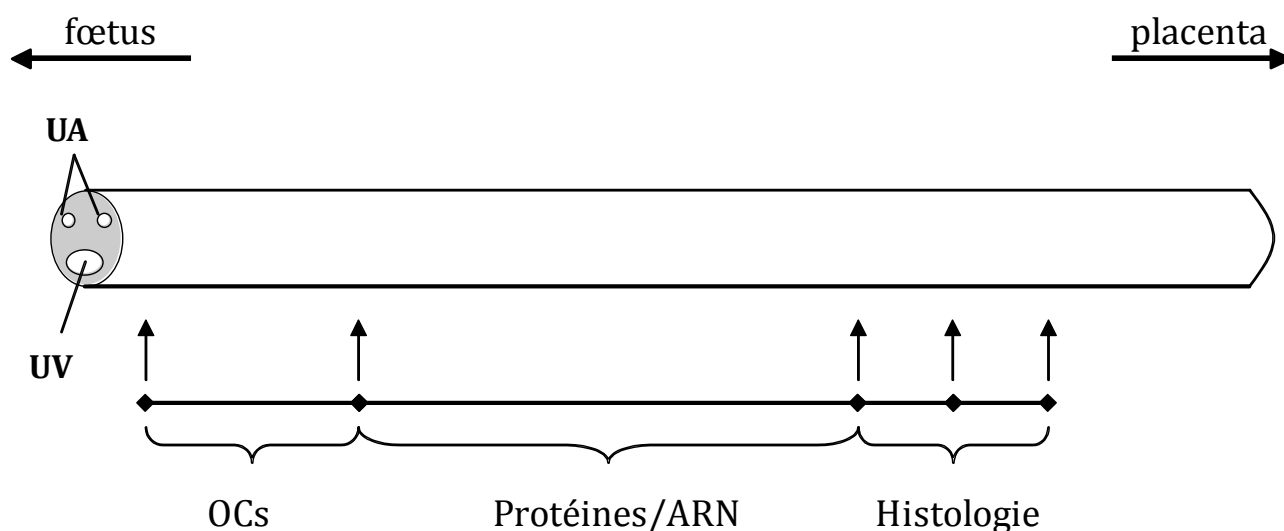
L'inclusion dans le groupe CTR était déterminée par un poids de naissance compris entre le 10<sup>e</sup> et le 90<sup>e</sup> percentile. L'inclusion dans le groupe RCIU était déterminée par un poids inférieur au 10<sup>e</sup> percentile, ainsi que par la présence d'une cassure de la courbe de croissance lorsque cette information était disponible. Ce dernier critère permet de distinguer les RCIU subissant une diminution importante de leur potentiel de croissance due à un environnement néfaste, des nouveau-nés constitutivement "petits pour l'âge gestationnel" qui correspondent à des fœtus de petits poids mais ayant une croissance dite harmonieuse comme proposé par Barker et al (199). Pour déterminer le percentile des nouveau-nés (poids à la naissance en fonction de l'âge gestationnel), nous avons utilisé comme valeurs de référence les courbes de croissance élaborées par le groupe de travail "courbes de croissance" de la clinique pédiatrique universitaire de Zurich (Paediatrica, 2012-09-15, Vol 22, No1), courbes approuvées par la Société Suisse de Pédiatrie (voir annexe).

## 2. Méthodes

### 2.1 Prélèvement et dissection des cordons ombilicaux

Les cordons ombilicaux ont été récupérés par les sages-femmes immédiatement après la naissance et utilisés dans les 24h. Comme la vasoréactivité varie tout au long du cordon (59), nous avons décidé de nous concentrer sur la partie la plus proche du fœtus. Un segment de cordon ombilical de 10 à 15 cm était coupé le plus proche possible du fœtus et conservé à 4°C dans une solution physiologique de Krebs-Ringer modifiée de la composition suivante : 118.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub> et 11.1 mM glucose. Avant dissection, le diamètre du cordon était mesuré à trois endroits différents, afin de calculer le diamètre moyen pour chaque cordon. Un lacet placé du côté placenta permettait d'orienter le segment de cordon au moment de la dissection. Chacune des portions du segment a été utilisée suivant le même ordre pour nos différentes expérimentations (Figure 3:1): la partie la plus proche du fœtus a été utilisée pour l'étude de la réactivité vasculaire, la deuxième partie pour l'analyse moléculaire (ARN et protéine) et la troisième pour l'histomorphométrie. Pour des raisons techniques, il n'a pas toujours été possible de réaliser tous les types d'expériences sur chaque cordon. Cependant, nous avons vérifié que chacun des sous-groupes d'échantillons utilisés pour les différentes expériences était représentatif de la population entière incluse dans cette étude.





**Figure 3:1 Description de la dissection d'un cordon ombilical.**

La dissection commence du côté fœtal du cordon ombilical. Les deux premiers cm serviront pour l'étude pharmacologique, les six cm suivant serviront pour l'analyse protéique et ARN. Finalement un cm de cordon sera utilisé pour l'analyse structurale. UA: Artères Ombilicales, UV: Veine Ombilicale.

## 2.2 Préparation des coupes histologiques

Une étude histologique a été réalisée afin de mesurer la surface totale du cordon, la surface occupée par les vaisseaux ombilicaux (les deux artères et la veine) et par la gelée de Wharton, ainsi que la surface de muscle lisse et de lumière pour chaque vaisseau (Figure 3:3).

Un fragment de 1 cm de cordon ombilical a été récupéré et fixé dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 2h à 4°C. Les morceaux de cordons ont été soumis à une série de bains d'alcool et de xylène permettant leur déshydratation et leur inclusion dans de la paraffine :

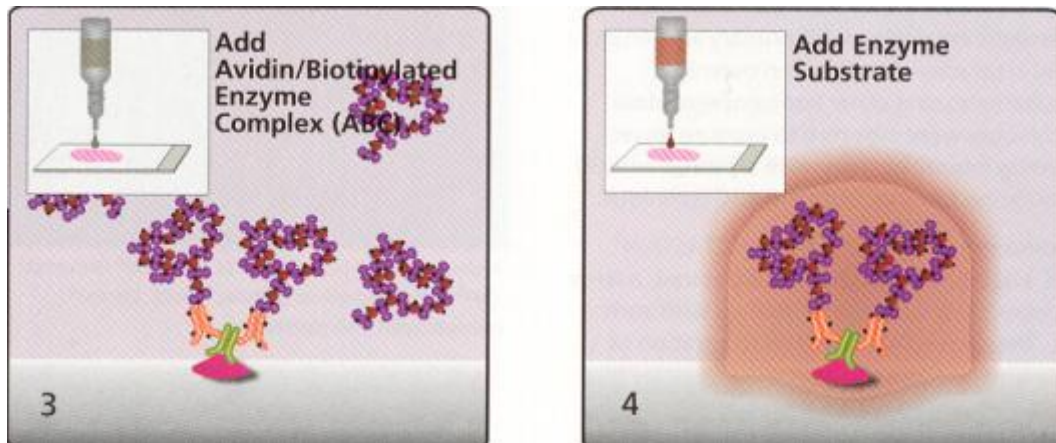
- 3 bains de PBS de 40 min à 4°C
- 3 bains d'alcool 70° de 40 min à 4°C
- 2 bains d'alcool 96° de 1h à 4°C
- 3 bains d'alcool absolu : 1 de 1h à 4°C et 2 de 1h puis 2h à RT
- 3 bains de xylène, 2 de 1h et 1 O/N

- 2 bains de paraffine liquide de 2h (60°, dans l'étuve)

Les prélèvements sont ensuite restés 1 nuit en paraffine chaude (60°), puis chaque fragment de cordon a été inclu de façon orientée dans un moule en métal. On a ensuite laissé les blocs durcir durant 1h à RT, puis O/N à 4°C. Les blocs de paraffine ont été coupés en sections de 5 µm d'épaisseur avec un microtome. Les coupes ont été recueillies sur des lames gold plus, et laissées à sécher 1 min à RT. Enfin les lames ont été chauffées 5 min à 56°C afin de bien fixer les coupes et stockées pour une utilisation ultérieure.

### 2.3 Marquages immunohistochimiques

Un double marquage immunologique a été effectué sur les coupes de cordons ombilicaux préalablement inclus en paraffine afin de vérifier l'intégrité structurelle des parois vasculaires. Nous avons regardé la localisation et la composition en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses dans les vaisseaux ombilicaux. Pour cela, nous avons utilisé deux anticorps polyclonaux : le premier, fabriqué chez le lapin (Dako, A0082), et dirigé contre le facteur von Willebrand (anti-Von Willebrand Factor human (vWF)), un facteur exprimé dans l'endothélium ; le second anticorps, fabriqué chez la souris (mouse polyclonal, Sigma, A2547), était dirigé contre l' $\alpha$ -actine, une forme spécifique du muscle lisse (anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)). Pour la révélation, nous avons utilisé des anticorps secondaires couplés à la biotine sur lesquels se fixait soit un complexe avidine-biotine-peroxydase (Vector red alkaline phosphatase substrate kit, Vector Laboratories, 9002-93-1), soit un complexe avidine-biotine-phosphatase alcaline (Substrate Vectastain ABC-AP Kit alkaline phosphatase universal, Vector Laboratories, AK-5200) (Figure 3:2).



**Figure 3:2 Représentation schématique du complexe avidine-biotine-peroxidase.**

(D'après <http://www.reactolab.ch/Vector/ABC%20Method.htm>).

Avant le marquage, les lames ont été déparaffinées à 56°C pendant 10 min, puis réhydratées par des bains successifs de xylène (3 bains de 10 min) puis d'alcool à des concentrations décroissantes :

- 2 bains d'alcool absolu, 20 trempages
- 2 bains d'alcool 90°, 20 trempages
- 1 bain d'alcool 80°, 20 trempages
- 1 bain d'alcool 70°, 20 trempages
- 2 bains d'eau distillée, 20 trempages

Les membranes cellulaires ont ensuite été perméabilisées 4 bains de 5 min dans du tampon PBS-Triton X100 0.5% (PBS-T 0.5%). Puis les coupes ont été incubées 20 min avec un sérum bloquant les sites non spécifiques (un sérum de la même origine animale que l'Ac secondaire utilisé, c'est-à-dire provenant soit de la souris, soit du lapin). Les anticorps primaires anti- $\alpha$ SMA (1 :1000) pour les SMC et anti-vWF (1 :250) pour les EC, ont été préparés dans du PBS. Les lames ont été incubées avec les anticorps primaires pendant 1 heure à température ambiante sous agitation lente. Après quatre lavages de 5

min dans du PBS-T 0.5%, les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé correspondant (dirigé soit contre la souris, soit contre le lapin (Vector Laboratories)) pendant 45 minutes à RT, sous agitation. Le réactif ABC adéquat (peroxydase ou phosphatase alcaline) a été préparé dans du PBS 30 min avant son utilisation. Après quatre lavages de 5 min avec du PBS-T 0.5%, les coupes ont été incubées avec la peroxydase couplée à l'avidine-biotine (kit ABC Vecstatain) ou la phosphatase alcaline couplée à l'avidine-biotine (kit ABC Vecstatain) pendant 45 minutes à RT, sous agitation. Après quatre lavages de 5 min dans du PBS-T 0.5%, le marquage de l' $\alpha$ -actine a été révélé par l'ajout d'un substrat de la peroxydase, le Vector red (préparé dans du Tris-HCl 0.1M, pH 8.4), tandis que pour le vWF, la révélation s'est faite par l'ajout de Vector blue (préparé dans du PBS, pH 7.5), un substrat de la phosphatase alcaline. Les cellules ont ensuite été déshydratées par un passage dans des bains d'alcool de concentrations croissantes, puis par un bain de xylène. Finalement, les lames ont été montées avec de la résine Eukitt (O. Kindler gmbh & co mikroskopische gläser) et observées au microscope.

## 2.4 Colorations et analyse histomorphométrique

Les coupes histologiques ont été colorées selon des procédures standards utilisant l'hématoxyline-éosine (H&E), le trichrome de Masson (TM) ou la résorcine-fuchsine (R&F).

### *La coloration Hématoxyline & Eosine (H&E)*

L'H&E est une coloration employée universellement pour l'examen microscopique des tissus. Elle facilite l'étude de la morphologie et de la structure du tissu. L'hématoxyline (Harris, Medite) est un colorant basique qui a une affinité pour les éléments acides des cellules et tissus et leur donne une coloration bleu-noir. L'hématoxyline se lie préféren-

tiellement au noyau cellulaire. L'éosine (Eosine-Y solution, Medite) est un colorant acide qui a une affinité pour les éléments basiques et qui leur donne une couleur rouge ou rosée. L'éosine se lie préférentiellement aux composants du cytoplasme (les mitochondries du cytoplasme et les fibres de collagène du tissu conjonctif).

Les lames ont été déparaffinées et réhydratées selon la même procédure que pour le marquage immunohistochimique (cf. 2.3 Marquage immunohistochimique). Puis elles ont été trempées dans les solutions suivantes :

- 1 bain d'alcool de PBS de 5 min
- 1 bain d'hématoxyline de 1 min
- 1 bain d'eau du robinet de 5 min, en laissant un flux d'eau continu traverser le

bain, cette étape permettant de bleuir les noyaux

- 2 bains PBS, 20 trempages
- 2 bains d'eau distillée, 20 trempages

Les lames ont été déshydratées par des bains d'alcool à des concentrations croissantes :

- 1 bain d'alcool 70°, 20 trempages
- 1 bain d'alcool 80°, 20 trempages
- 2 bains d'alcool 90°, 20 trempages
- 2 bains d'alcool absolu, 20 trempages
- 1 bain d'éosine de 20 sec
- 2 bains d'alcool absolu, 20 trempages
- 3 bains de xylène, 20 trempages

Les lames ont finalement été montées avec de la résine Eukitt.

*La coloration au Trichrome de Masson (TM)*

Le Trichrome de Masson (TM) est une coloration trichromique des coupes histologiques : l'hématoxyline de Harris colore les noyaux en bleu-noir, la solution de Fuchsin Ponceau colore le cytoplasme en rose-rouge et le vert lumière colore le collagène en vert.

Les lames ont été déparaffinées et réhydratées selon la même procédure que pour le marquage immunohistochimique (cf. 2.3 Marquage immunohistochimique), puis exposées aux solutions suivantes :

- 1 bain d'hématoxyline de 1 min
- 1 bain d'eau du robinet de 5 min, en laissant un flux d'eau continu traverser le bain, ce qui permet de bleuir les noyaux
- 1 bain de fuschine-ponceau de 10 min
- 1 bain d'acide phosphomolybdique de 3 min
- 1 bain de vert lumière de 1 min
- 1 bain d'eau acétifié 1%, 20 trempages
- 2 bains d'alcool absolu, 20 trempages
- 3 bains de xylène, 20 trempages

Les lames ont finalement été montées avec de la résine Eukitt.

#### *La coloration à la Résorcine-Fuchsin (R&F)*

La Résorcine-Fuchsin permet une coloration élective des fibres élastiques. La Résorcine-Fuchsin colore l'élastine en violet-noir.

Les lames ont été déparaffinées et réhydratées selon la même procédure que pour le marquage immunohistochimique (cf. 2.3 Marquage immunohistochimique), puis exposées aux solutions suivantes :

- 1 bain Résorcine-Fuchsin de 1h

- 1 bain d'alcool 96°, 20 trempages

Les lames ont été déshydratées par des bains d'alcool à des concentrations croissantes :

- 1 bain d'alcool 70°, 20 trempages

- 1 bain d'alcool 80°, 20 trempages

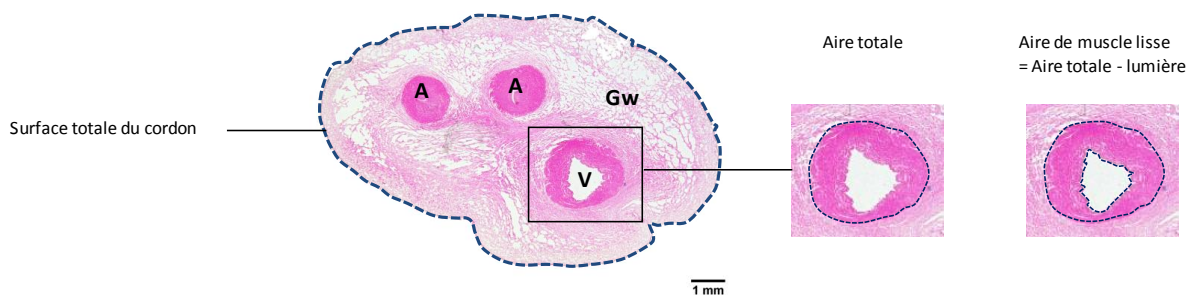
- 2 bains d'alcool 90°, 20 trempages

- 2 bains d'alcool absolu, 20 trempages

- 3 bains de xylène, 20 trempages

Les lames ont finalement été montées avec de la résine Eukitt.

Les mesures histomorphométriques ont été réalisées à l'aide d'un stéréomicroscope (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) et du logiciel ImageJ (National Institutes of Health) à partir des coupes de cordons colorées à l'H&E. Les mesures ont été réalisées comme indiqué sur la Figure 3:3. Dans un premier temps la surface totale du cordon, ainsi que la surface totale de la veine et des deux artères ont été mesurées, puis la surface occupée par les vaisseaux (1 veine + 2 artères) a été soustraite à la surface totale permettant ainsi de déterminer l'aire de la gelée de Wharton. Dans un deuxième temps, la surface de la lumière a été mesurée pour chacun des vaisseaux et a été soustraite à leur surface totale respective afin d'obtenir la surface de muscle lisse. Trois sections ont été analysées pour chacun des échantillons, par deux expérimentateurs indépendants. Les données histomorphologiques correspondent à la moyenne de ces mesures.



**Figure 3:3 Description du processus de mesure et d'analyse de la surface du cordon.**  
A: Artères, V: Veine, Gw: Gelée de Wharton.

## 2.5 Etude de la réactivité des vaisseaux du cordon ombilical

La réactivité de la veine ombilicale a été étudiée en chambre à organe (OCs) par des mesures de tension de vaisseaux isolés (Figure 3:4) pour différentes conditions. Les veines ombilicales ont été soigneusement disséquées dans une solution de Krebs-Ringer modifiée à 4°C. Après avoir enlevé la gelée de Wharton, ces vaisseaux ont été coupés en anneaux de 4-5 mm de longueur et montés sur le myographe, dans une chambre remplie de solution de Krebs-Ringer modifiée. Il a été démontré que la réactivité ombilicale dépendait grandement de la pression partielle en oxygène ( $PO_2$ ), de la température et du pH (62, 63). Nous avons donc reproduit aussi fidèlement que possible les conditions *in utero* dans les OCs. Pour la veine ombilicale, cela correspond à une  $PO_2$  de 23-29 mm de Hg et un pH de 7.35 (250, 251). Ces conditions physiologiques ont été obtenues par oxygénation en continu avec un mélange gazeux (contenant 21%  $O_2$  et 5%  $CO_2$ , équilibré au nitrogène) des OCs remplies avec 10 ml de solution de Krebs-Ringer, maintenue à 37.5°C. La  $PO_2$  a été évaluée à l'aide d'une électrode de pH comme décrit précédemment (252). Dans notre système, ces conditions expérimentales ont conduit à des valeurs de  $PO_2$  de 25 à 27 mm Hg et de pH compris entre 7.32 et 7.38. A titre de comparaison, nous avons observé que la solution de Krebs-Ringer bullée avec 95% de  $N_2$  et 5% de  $CO_2$  dans les mêmes conditions conduisait à des  $PO_2$  comprises entre 6 et 7 mmHg. Les anneaux vasculaires étaient montés entre deux crochets dont l'un était relié à un capteur de force, lui-même relié à un amplificateur et à un système d'acquisition et de traitement des données, permettant de suivre au cours du temps la force (en g) développée par le vaisseau. Les anneaux étaient étirés jusqu'à atteindre 2 g, afin de mimer la tension exercée par le flux sanguin dans les conditions *in vivo*. Cet étirement était suivi de 20 min d'équilibration, puis d'un lavage. L'anneau a tendance à se relâcher spontanément dans des conditions *in vitro*, c'est pourquoi l'étape consistant à imposer une pré-tension de 2



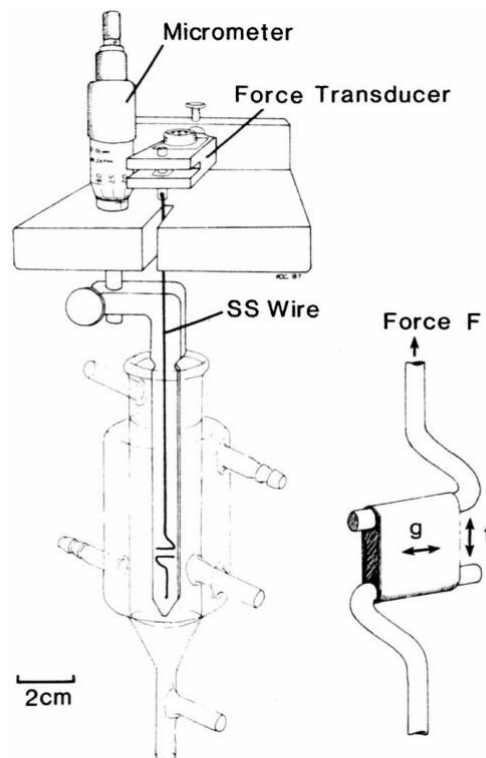
g suivie d'une équilibration et d'un lavage était répétée quatre fois, de sorte à atteindre une stabilisation de la tension dans le temps. Des expériences préliminaires testant différentes forces de tension avaient permis de déterminer qu'une pré-tension de la veine ombilicale avec une force d'environ 2 grammes permettait d'obtenir une réponse contractile maximale à 100 mM de KCl. En effet au début de chaque expérience, l'intégrité des vaisseaux était évaluée par une réponse contractile à une solution dépolarisante de KCl 100 mM. Les anneaux qui ne développaient pas de contraction n'ont pas été conservés pour la suite du protocole expérimental. Suite à l'évaluation de l'intégrité des tissus, les anneaux étaient lavés, puis du N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (NLA) ( $10^{-4}$  M) et de l'indométacine ( $10^{-5}$  M) étaient ajoutés afin d'exclure d'éventuelles interférences liées à la production endogène de NO et des prostanoïdes ; à cette étape, on laisse l'anneau se relâcher naturellement pendant en moyenne 1 h jusqu'à atteindre un état de stabilisation (obtention d'un plateau correspondant à une tension au repos). Les anneaux vasculaires étaient ensuite pré-contractés avec de la sérotonine (5-HT,  $10^{-5}$  M) ou un analogue du thromboxane A<sub>2</sub> (U46619,  $10^{-6}$  M), pendant environ 10-15 min jusqu'à atteindre sa stabilisation (obtention d'un plateau correspondant à la tension résiduelle). Lorsque la réponse contractile atteignait un état d'équilibre, la réponse relaxante à des concentrations cumulatives de différents agents vasodilatateurs était évaluée .

Dans une première série d'expériences, la réponse relaxante à des doses cumulatives d'un donneur de NO, le DEA/NO ( $10^{-8}$  to  $10^{-4}$  M), a ainsi été testée sur des RCIU et AGA.

Dans une seconde série d'expériences, la réponse relaxante à des doses cumulatives d'IBMX, un inhibiteur non spécifique des PDEs, a été évaluée.

Dans une troisième série d'expériences, la réponse relaxante au DEA/NO a été testée dans les veines prétraitées avec de l'IBMX ( $10^{-4}$  M).

Pour l'analyse, différentes mesures ont été utilisées afin de déterminer le pourcentage de relaxation des vaisseaux. La tension de repos correspond à la tension minimale mesurée lors de la relaxation du vaisseau. La tension résiduelle correspond à la tension mesurée pour chaque anneau vasculaire pré-contracté (au 5-HT ou U46619) au moment où l'on ajoute la première dose de vasodilatateur ; cette mesure est considérée comme le 100% de la contraction. Les réponses relaxantes pour chacune des doses de vasodilatateur sont exprimées en pourcentage de la tension résiduelle. La concentration produisant 50% de la réponse maximale ( $EC_{50}$ ) et l'effet maximum ( $E_{max}$ ) ont été déterminés en utilisant Prism 4.0 (logiciel GraphPad, San Diego, CA, USA). L' $EC_{50}$  a été calculée en utilisant l'équation suivante :  $Y = -X * E_{max} / (X + EC_{50\_decrease})$ . Toutes les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  ESM, où "n" représente le nombre d'individus.



**Figure 3:4 Représentation du système de cuves à organe isolé et du myographe.**  
(D'après Angus & Wright, 2000)(253).

## 2.6 Western blot

L'expression relative de protéines spécifiques a été étudiée dans des homogénats de veines ombilicales par la technique du Western blot.

### *Préparation des extraits protéiques*

Les veines ombilicales de nouveau-nés RCIU et CTR préalablement isolées ont été congelées à -80°C, puis broyées finement à l'aide d'un mortier cryogénique posé sur de la glace carbonique. Les protéines totales ont été extraites par homogénéisation dans un tampon de lyse dont la composition est la suivante (en mM) : Hepes 50, EDTA 1, EGTA 1, glycérol 10%, DTT 1, 3-[(3cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate CHAPS 20 (détergent) et un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases (pepstatin 5 µg/ml, aprotinine 3 µg/ml, leupeptine 10 µg/ml leupeptin, AEBSF), sodium fluoride 50, sodium vanadate ; 100 mg de tissu ont été homogénéisés dans un tube contenant 400 µl de tampon de lyse et incubés à 4°C pendant 3h. L'homogénat a ensuite été centrifugé pendant 10 min à 3000 g à 4°C et le surnageant récupéré. Cette opération permet d'éliminer les débris membranaires et les protéines insolubles.

### *Dosage des protéines*

La concentration protéique des surnageants a été mesurée à l'aide du Kit BCA Protein Assay de PIERCE. Cette méthode colorimétrique est basée sur la réaction de biuret en milieu alcalin, où les protéines vont réduire l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  en ion  $\text{Cu}^+$ . L'acide bicinchoninique (BCA) a la capacité de se lier aux ions  $\text{Cu}^+$  pour former un complexe coloré (pic d'absorbance 562 nm), dont la quantité est proportionnelle à la concentration en protéines. La mesure d'absorbance est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance mesurée pour chaque échantillon est reportée sur une droite-étalon obte-

nue à partir d'une gamme connue de concentrations de BSA (Bovin Serum Albumin) ayant subi la même réaction colorimétrique. Pour réaliser le dosage, 10 µl d'échantillon ou de standard (0 à 10 µg de BSA) sont mélangés à 100 µl de réactif constitué de 49 parts de réactif A (BCA dans du NaOH 0.2N) et 1 part de réactif B (CuSO<sub>4</sub> 4%). La plaque est incubée 30 min à 37°C et l'absorbance des échantillons est mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELx800, Biotek instruments.

En raison d'un déménagement du système que nous utilisons pour la révélation de nos membranes (chémiluminescence mesurée avec un appareil LAS 4000) nous avons été obligés de trouver nouveau système de révélation en remplacement (fluorescence mesurée avec un appareil Odyssey) et donc d'adapter notre méthode. Pour des raisons techniques, les étapes de séparation et de transfert, qui diffèrent légèrement entre les deux méthodes, vous sont présentées en parallèle, alors que la méthodologie pour l'immunomarquage vous est présentée sous deux paragraphes séparés.

Le système de révélation diffère (détection de fluorescence et non plus de luminescence), mais le principe de base du western blot reste le même.

#### *SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)*

Les échantillons (30 à 80 µg de protéines) ont été dilués dans du tampon de Laemmli (Tris-HCl 0,0675 M pH 6,8 - glycérol 10% - SDS 2% - β- mercaptoéthanol 4% - Bleu de Bromophénol 0,1%) et déposés dans les puits du gel après avoir été dénaturés à 95°C pendant 5 min ; cette étape entraîne une dénaturation des protéines par des détergents, des réducteurs et une élévation de la température.

Les protéines ont ensuite été séparées par migration électrophorétique dans un gel de polyacrylamide composé d'un gel de séparation à 7.5% sur lequel est coulé un gel de

concentration à 4%. Les protéines chargées négativement par le SDS contenu dans le tampon Laemmli, migrent en fonction de leur masse (Laemmli et al. 1970).

*Méthode ECL* : la migration a été effectuée dans du tampon de migration pendant 35 min à 200 Volts, à RT.

*Méthode Odyssey* : la migration a été effectuée dans du tampon de migration pendant 1h40 à 0,05 Ampère, à RT.

- *Gel de concentration* : polyacrylamide 4% (avec un rapport en acrylamide/bisacrylamide de 37,5 :1) - Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 - SDS 0,1% (p/v) - APS 0,1% (p/v) - TEMED 0,05% (v/v)
- *Gel de séparation* : polyacrylamide 7.5% (avec un rapport en acrylamide/bisacrylamide de 37,5:1) - Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 - SDS 0,1% (p/v) - APS 0,075% (p/v) - TEMED 0,05% (v/v)
- *Tampon de migration* : Tris 25mM – Glycine 192 mM – SDS 0.1%

#### *Transfert sur membrane*

*Méthode ECL* : après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF, Bio-Rad, Hercules, CA) préalablement réactivée au méthanol pendant quelques secondes puis humidifiée dans du tampon de transfert.

*Méthode Odyssey* : après la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Nitrocellulose Membrane, 0.2 $\mu$ M, Bio Rad) préalablement humidifiée dans du tampon de transfert.

Le montage était préparé comme le montre la Figure 3:5, en plaçant le gel et la membrane de nitrocellulose/PVDF entre deux papiers filtres (Bio-rad) puis le tout entre deux mousses (les papiers filtres et les mousses ayant été humidifiés avec du tampon de

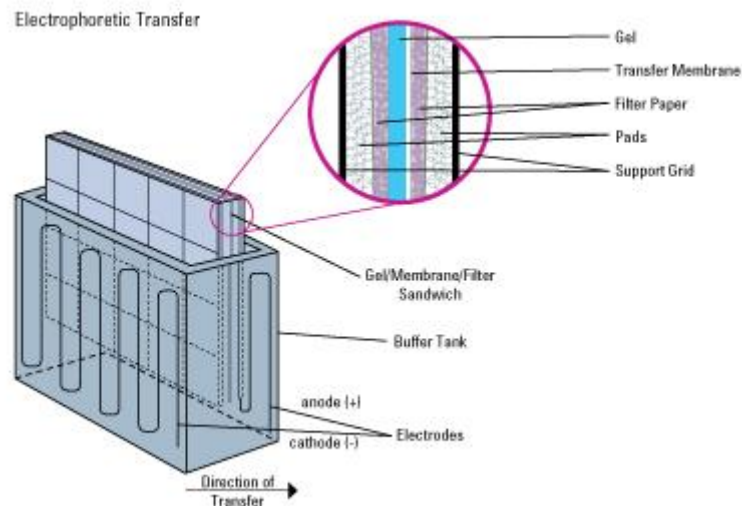
transfert). La cassette était soigneusement fermée et placée dans le bac contenant le tampon de transfert.

*Méthode ECL* : les protéines ont été transférées à un voltage constant de 100 volts pendant 2h à 4°C.

*Méthode Odyssey* : les protéines ont été transférées à un voltage constant de 30 volts O/N ou 2h à un ampérage constant de 0.39 Ampère à 4°C.

Les tailles apparentes des protéines ont été estimées à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein Dual Color Standards Bio-Rad).

- *Tampon de transfert* : Tris 25mM – Glycine 450 mM – Methanol 20%



**Figure 3:5 Représentation du système de transfert des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane de nitrocellulose.**

(D'après <https://www.lifetechnologies.com/ch/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-western-blotting.html>).

### *Blocage et immunomarquage (méthode ECL)*

Après le transfert, la membrane a été bloquée dans un tampon Tris-Buffered Saline and Tween 20 (TBS-T) contenant 5 % de lait en poudre à 4°C durant toute une nuit afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Puis, elle a été incubée pendant 1h (ou pendant la nuit à 4°C) avec l'anticorps primaire spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt.

Dans le cadre de nos recherches, nous avons dans le cadre de nos recherches utilisé un anticorps dirigé contre la PKG (1:1,000. Stressgen, ADI-KAP-PK005) dilué dans du TBS-T, ou contre la GCs (1:500. Cayman, 160895) ou l'actine (1:250, Sigma) dilués dans du TBS-T contenant 5 % de lait en poudre. La membrane a ensuite été rincée 3 fois au TBS-T pendant 5 min pour éliminer l'excédent d'anticorps primaire. Puis, elle a été incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin. La PKG et l'actine ont été testées selon la procédure classique, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-lapin (1:10,000; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) dilué dans du TBS-T. La GCs a été testée à l'aide d'une procédure augmentant la sensibilité de détection : le Vectastain peroxidase ABC kit (Vector Laboratories), selon les instructions du fournisseur. Pour les deux procédures, les anticorps secondaires ont été incubés pendant une heure à température ambiante. Enfin la membrane a été lavée 3 fois 5 min au TBS-T.

- *TBS-T* (Tris-Buffered Saline and Tween 20): Tris-HCl 10mM pH 8.0 - NaCl 150 mM - Tween 20 0,05%
- *TBS* (Tris-Buffered Saline): Tris-HCl 10mM pH 8.0 - NaCl 150 mM

La révélation des anticorps a été effectuée en utilisant le LAS4000 (Biorad). L'expression spécifique des protéines a été détectée par chémiluminescence et quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ. L'expression des protéines d'intérêt a été normalisée par la quantité d'actine et la quantité relative des homogénats du groupe RCIU a été rapportée à la quantité mesurée chez les contrôles.

### *Blocage et immunomarquage (méthode Odyssey)*

Après le transfert, la membrane a été bloquée dans de la caséine à RT pendant 30 min afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. Puis, elle a été incubée pendant 1h (ou pendant la nuit à 4°C) avec l'anticorps primaire spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt (dilué dans de la caséine contenant 0.1% Tween), en l'occurrence PDE1b (1:500. Gene Tex, GTX14600), PDE1c (1:100. Gene Tex, GTX14602), PDE3a (1:200. Gene Tex, GTX112305), PDE5a (1:250. SC, Sc-32884), eNOS (1:200. BD, 610296) et actinine (1:250. Sigma, A5044).

La membrane a ensuite été rincée 3 fois au TBS-T pendant 5 min pour éliminer l'excédent d'anticorps primaire. Puis, en fonction de la provenance des anticorps primaires elle a été incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin (LICOR, 926-68073) ou anti-souris (LICOR, 926-32212), couplé à un fluorochrome (dilué 10 000 fois dans de la caséine) pendant une heure à température ambiante. Enfin, la membrane a été lavée 2 fois 5 min au TBS-T 0.05% et 1 fois au TBS.

La révélation des anticorps a été effectuée en utilisant l'Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Lincoln, NE). L'expression spécifique des protéines a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ et normalisée par rapport à la quantité d'actinine. La quantité relative de protéine d'intérêt dans les homogénats du groupe RCIU a été rapportée à la quantité mesurée chez les contrôles.

## 2.7 Dosage du GMPc par ELISA, étude de la cinétique

La concentration en GMPc des veines ombilicales (Fille CTR) a été dosée en conditions basales et à différents temps (2, 4, 6 et 10 min) après stimulation au DEA/NO ( $10^{-4}$  M).



Les veines ombilicales ont été disséquées de la même façon que pour les expériences en OCs avant d'être incubées dans de la solution de Krebs-Ringer maintenue à 37°C et bulleée avec un mélange gazeux contenant 21% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>, le tout équilibré au nitrogène. Toutes les expériences ont été réalisées en présence d'indométacine (10<sup>-5</sup> M) et de NLA (10<sup>-4</sup> M) afin de reproduire les conditions utilisées pour les mesures de tension sur vaisseaux isolés, ainsi que d'IBMX (10<sup>-4</sup> M) afin d'inhiber la dégradation du GMPc par les PDEs. Cette incubation était suivie de 20 min d'équilibration avant d'ajouter le DEA/NO (10<sup>-4</sup> M). Puis, les veines ont été congelées à différents temps (2, 4, 6 et 10 min) dans de l'azote liquide afin de bloquer la stimulation par le DEA/NO. Elles ont ensuite été stockées à -80°C jusqu'au moment de l'analyse par ELISA. Les échantillons ont été broyés finement à l'aide d'un mortier cryogénique et homogénéisés dans du HCl 0.1 N (10 volumes). La quantification de la [GMPc] a été réalisée à l'aide d'un kit de dosage ELISA (DIRECT GMPc ELISA KIT, ADI-900-014 ENZO) en suivant les instructions du fabricant.

## 2.8 Mesure du GMPc par ELISA

La concentration en GMPc des veines ombilicales de nouveau-nés (RCIU/CTR, Filles/Garçons) a été dosée en conditions basales ou stimulées (avec ou sans DEA/NO 10<sup>-4</sup> M, respectivement), en absence ou en présence de différents inhibiteurs de PDEs: l'IBMX (10<sup>-4</sup> M), la vinpocétine (10<sup>-5</sup> M) ou le Sildénafil (10<sup>-7</sup> M).

Toutes les expériences ont été réalisées en présence d'indométacine (10<sup>-5</sup> M) et de NLA (10<sup>-4</sup> M) afin de reproduire les conditions utilisées pour les mesures de tension sur vaisseaux isolés. Les veines ont été incubées ou non avec l'un des inhibiteurs des PDEs : l'IBMX (10<sup>-4</sup> M) un inhibiteur non spécifique des PDEs, la vinpocétine un inhibiteur préférentiel de la PDE1 (10<sup>-5</sup> M) ou le Sildénafil (10<sup>-7</sup> M) un inhibiteur préférentiel de la PDE5. Cette incubation était suivie de 20 min d'équilibration avant d'ajouter le DEA/NO

( $10^{-4}$  M) pendant 4 min. Puis, les veines ont été congelées dans de l'azote liquide afin de bloquer la stimulation par le DEA/NO et stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment de l'analyse par ELISA.

Les échantillons ont été broyés finement à l'aide d'un mortier et homogénéisés dans du HCl 0.1 N (10 volumes). La quantification de la [GMPC] a été réalisée par dosage ELISA selon les instructions du fabricant. Les échantillons incubés avec de l'IBMX et du DEA/NO ont été testés selon la procédure classique. Au contraire, les échantillons contenant peu de GMPC, tels que les échantillons en conditions basales (non stimulés), ou en présence de vinpocétine, sildénafil avec ou sans DEA/NO ont été testés selon la procédure acétylée.

## 2.9 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec InStat 3.0 et Prism 4.0 (logiciel GraphPad, San Diego, CA, USA). Les valeurs sont exprimées en moyenne et erreur standard à la moyenne (moyenne  $\pm$  ESM). Sauf indication contraire, les données observées pour les RCIU ont été comparées aux contrôles avec le test de Mann-Whitney. Une ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour l'analyse des courbes dose-réponse pour l'étude de tension en vaisseaux isolés, ainsi que pour comparer la quantité de GMPC produite dans les différentes conditions.

Une analyse ANOVA à un facteur a été utilisée pour comparer la production de GMPC en présence ou en absence des inhibiteurs et/ou de DEA/NO. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives quand  $P < 0.05$ .

# IV. Résultats

# 1. Les données démographiques

## 1.1 Les données démographiques totales

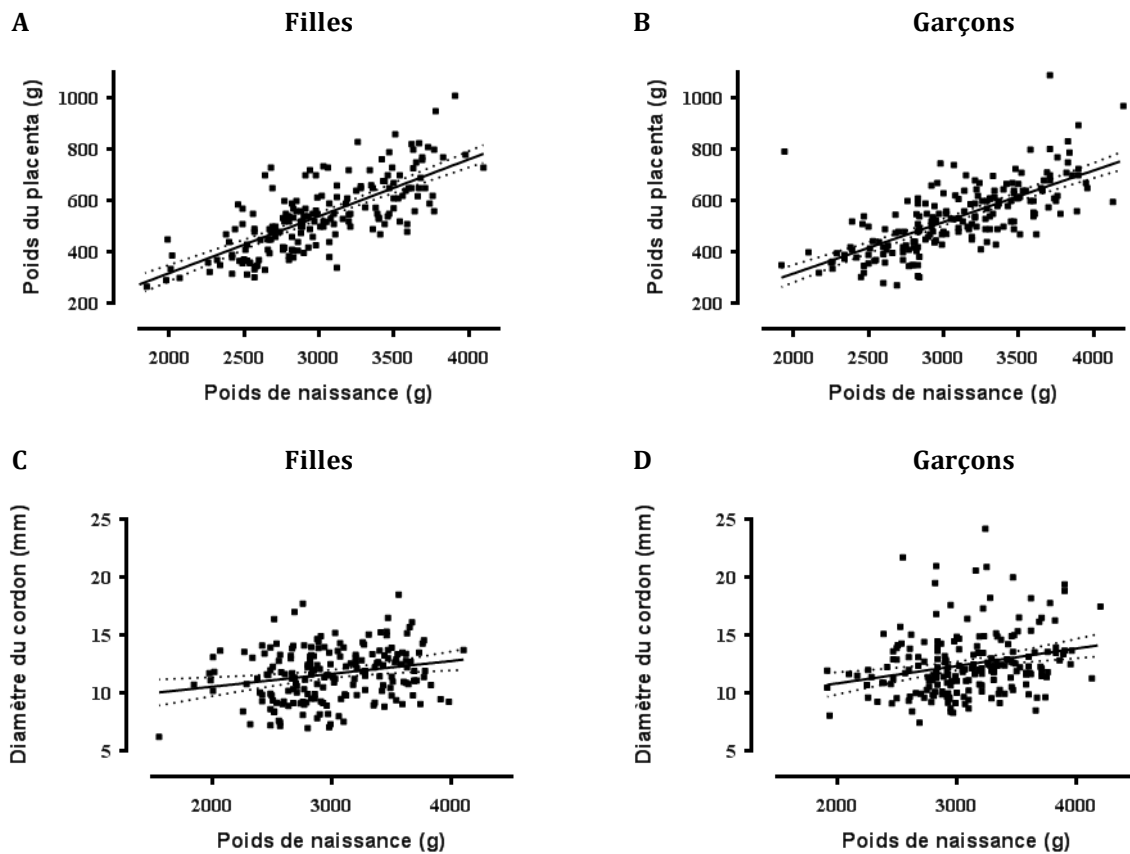
Dans un premier temps, nous avons comparé les données démographiques de nos différents groupes. Le tableau 4:1 résume les caractéristiques maternelles et néonatales de la population étudiée. Comme attendu, le poids, la longueur et la circonférence de la tête sont significativement diminués chez les RCIU comparés aux CTR. La longueur et la circonférence de la tête diminuent de ~5%, tandis que le poids diminue de ~21%. L'indice pondéral (poids x 100/taille<sup>3</sup>) est également diminué de ~8% chez les RCIU, ce qui suggère que les nouveau-nés en retard de croissance sont plus minces que les CTR. Le poids du placenta est ~27% plus bas chez les RCIU comparé au CTR. Le diamètre du cordon ombilical est lui aussi diminué de ~11-12% chez les nouveau-nés RCIU comparés au CTR.

	Filles			Garçons		
	Ctr	RCIU	Valeur de P	Ctr	RCIU	Valeur de P
Nombre de patients inclus	115	87		119	90	
<b>Données Maternelles</b>						
Age maternelle (années)	32.2± 5.4	31.5 ± 5.4	0.3330	32.4 ± 5.2	31.1 ± 5.6	0.1285
Tabac (oui/non)	12/64 (24 n/d)	16/52 (15 n/d)	0.2935 #	10/71(33 n/d)	26/40 (16 n/d) *	0.0002 #
Primigeste (%) (intervalle gestité)	29 (1-8)	42 (1-6)	0.1106 #	43 (1-6)	36 (1-7)	0.3748 #
Primiparité (%) (intervalle parité)	46 (1-5)	59 (1-5)	0.1269 #	58 (1-6)	65 (1-8)	0.3696 #
Doppler pathologique	1/59 (40 n/d)	1/55 (27 n/d)	1.0000 #	4/61(49 n/d)	5/51(26 n/d)	0.7314 #
<b>Données néonatales</b>						
Age gestationnel	39.5 ± 1.0	39.4 ± 1.1	0.6340	39.4 ± 1.0	39.3 ± 1.2	0.9087
Score Apgar 1 min (médiane, intervalle)	9 (1-10)	9 (3-10)	0.9604	9 (3-10)	9 (1-10)	0.4803
Score Apgar 5 min (médiane, intervalle)	10 (5-10)	10 (7-10)	0.3248	10 (7-10)	10 (6-10) *	0.0130
Score Apgar 10 min (médiane, intervalle)	10 (8-10)	10 (7-10)	0.9326	10 (7-10)	10 (7-10)	0.1732
pH UA	7.27 ± 0.07	7.25 ± 0.08	0.1080	7.257 ± 0.05	7.247 ± 0.07	0.5164
pH UV	7.35 ± 0.06	7.32 ± 0.08 *	0.0013	7.34 ± 0.05	7.33 ± 0.07	0.4097
Poids à la naissance (g)	3314 ± 315 †	2584.5 * †	<0.0001	3394 ± 307 †	2687 ± 270 * †	<0.0001
Longueur (cm)	49.0 ± 1.6 †	46.7 ± 1.9 *	<0.0001	49.5 ± 1.7 †	47.0 ± 1.8 *	<0.0001
Périmètre crânien (cm)	34.5 ± 1.1 †	32.8 ± 1.3 * †	<0.0001	35.0 ± 1.1 †	33.5 ± 1.3 * †	<0.0001
Index pondéral (g/cm <sup>3</sup> )	2.82 ± 0.22	2.54 ± 0.25 *	<0.0001	2.80 ± 0.22	2.59 ± 0.21 *	<0.0001
Poids du placenta (g)	616,2 ± 119,8	441,4 ± 94,8 *	<0.0001	607.63 ± 111.5	443.7 ± 92.5 *	<0.0001
Ratio poids de naissance/placenta	5.52 ± 0.92	6.06 ± 1.07 *	0.0001	5.73 ± 0.85	6.25 ± 1.19 *	0.0008
Diamètre du cordon ombilical (mm)	12.4 ± 2.6	10.9 ± 2.2 * †	<0.0001	13.16 ± 2.9	11.7 ± 2.3 * †	<0.0001

**Tableau 4:1 Données démographiques relatives à tous les patients inclus dans cette étude.**

Les caractères en gras indiquent les valeurs-P significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Ctr, contrôles adaptés pour l'âge gestationnel; RCIU, nouveau-nés en restriction de croissance; UV, veine ombilicale; UA, artère ombilicale; n/d, non disponible. Sauf mention contraire, les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type. \* Différence significative entre Ctr et RCIU; † différence significative entre filles et garçons (( $P < 0,05$  déterminée par le test de Mann-Whitney, excepté pour les valeurs de P marquées d'un #, qui ont été déterminées en utilisant un test exact de Fisher). L'index pondéral a été calculé selon la formule  $[100 * \text{poids de naissance} / \text{longueur}^3]$  (g / cm<sup>3</sup>).

La croissance du fœtus étant fortement liée à la croissance placentaire, nous pouvons envisager que le déficit pondéral placentaire soit du même ordre de grandeur que celui du nouveau-né dans le groupe RCIU. Nos données démontrent que c'est le cas, il y a une corrélation entre le poids du placenta et le poids de naissance chez les filles (Figure 4:1.A) (coefficient de corrélation  $r=0.7420$ ,  $P<0.0001$ ,  $n=127$ ) et chez les garçons (Figure 4:1.B) (coefficient de corrélation  $r=0.7357$ ,  $P<0.0001$ ,  $n=131$ ). Une corrélation a également été observée entre le diamètre du cordon ombilical et le poids de naissance chez la fille (Figure 4:1.C) (coefficient de corrélation  $r=0.2467$ ,  $P=0.0039$ ,  $n=135$ ) ainsi que chez le garçon (Figure 4:1.D) (coefficient de corrélation  $r=0.2699$ ,  $P=0.0014$ ,  $n=138$ ) (Peyter et al. placenta, 2014)(254).



**Figure 4:1 Corrélation entre le poids corporel à la naissance et le poids placentaire ou le diamètre du cordon ombilical.**

Corrélation entre le poids placentaire et poids corporel à la naissance (A, B), ou le diamètre du cordon ombilical et le poids de naissance (C, D) dans notre cohorte de filles (A, C) ou de garçons (B, D). La régression linéaire affiche une bonne corrélation entre poids placentaire et poids corporel à la naissance chez les filles (coefficient de corrélation  $r = 0,7420$ ,  $P < 0,0001$ ,  $n = 127$ ) et les garçons (coefficient de corrélation  $r = 0,7357$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n = 131$ ). Il y a également une corrélation entre le diamètre du cordon ombilical et le poids corporel à la naissance chez les filles (coefficient de corrélation  $r = 0,2467$ ,  $p = 0,0039$ ,  $n = 135$ ) et les garçons (coefficient de corrélation  $R = 0,2699$ ,  $p = 0,0014$ ,  $n = 134$ ). (Peyter et al. placenta, 2014)(254).

## 1.2 La répartition des patients à l'intérieur des groupes expérimentaux

Le Tableau 4:2 résume la distribution des patients selon le percentile (déterminé par le poids de naissance en fonction de l'âge gestationnel). Nous pouvons voir que la répartition des filles et des garçons dans chaque sous-groupe de percentile est très proche. Une cassure de la courbe de croissance a pu être documentée pour 74-77% des patients pour le groupe RCIU en se basant sur les données prénatales.

Groupe	Percentiles Sous-groupe	Nombre de patients inclus	Poids de naissance (g) (moyenne ± SD)	Poids du placenta (g) (moyenne ± SD)	Diamètre du cordon (mm) (moyenne ± SD)
<b>Filles</b>					
<b>Contrôle</b>	P75-P90	9 (11%)	3734 ± 139	792 ± 126	12.6 ± 3.2
	P50-P75	22 (27%)	3534 ± 163	662 ± 97	12.3 ± 1.8
	P25-P50	26 (32%)	3262 ± 161	584 ± 81	12.3 ± 2.1
	P10-P25	25 (30%)	2966 ± 130	551 ± 109	12.4 ± 4.1
<b>RCIU</b>	P5-P10	25 (42%)	2762 ± 159	499 ± 97	11.0 ± 2.4
	P3-P5	14 (24%)	2686 ± 101	451 ± 58	10.5 ± 2.4
	< P3	20 (34%)	2379 ± 237	392 ± 61	10.3 ± 1.9
<b>Garçons</b>					
<b>Contrôle</b>	P75-P90	8 (9%)	3945 ± 147	737 ± 148	15.0 ± 2.8
	P50-P75	21 (24%)	3706 ± 139	681 ± 129	13.9 ± 2.6
	P25-P50	27 (31%)	3363 ± 185	587 ± 89	13.3 ± 2.5
	P10-P25	31 (36%)	3130 ± 207	556 ± 87	12.6 ± 3.0
<b>RCIU</b>	P5-P10	19 (34%)	2848 ± 189	483 ± 94	12.6 ± 3.0
	P3-P5	15 (27%)	2767 ± 177	451 ± 49	10.5 ± 1.7
	< P3	22 (39%)	2509 ± 276	415 ± 88	11.5 ± 2.6

**Tableau 4:2 Représentation de la distribution des patients dans les différents sous-groupes selon leur percentile.**

Basé sur le poids à la naissance en fonction de l'âge gestationnel, résultats basés sur la population utilisée dans l'article Peyter et al. Placenta, 2014 (254).

## 2. Examen histologique et histomorphométrique des vaisseaux du cordon

### 2.1 Examen histologique

Cet examen a permis de vérifier l'intégrité structurelle des vaisseaux ombilicaux fixés et enrobés dans de la paraffine et de différencier la veine des artères ombilicales. Plusieurs éléments constituent et structurent la paroi des vaisseaux, notamment des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des constituants extracellulaires (fibres élastiques et collagène). Nous avons utilisé plusieurs types de coloration afin de mettre en évidence ces différentes structures :

- coloration à l'Hématoxyline-Eosine (H&E) afin d'observer l'aspect général des artères et de la veine.

- coloration à la Résorcine-Fuchsine (R&F) qui permet d'observer le contenu en élastine présent dans la gelée de Wharton et les vaisseaux.

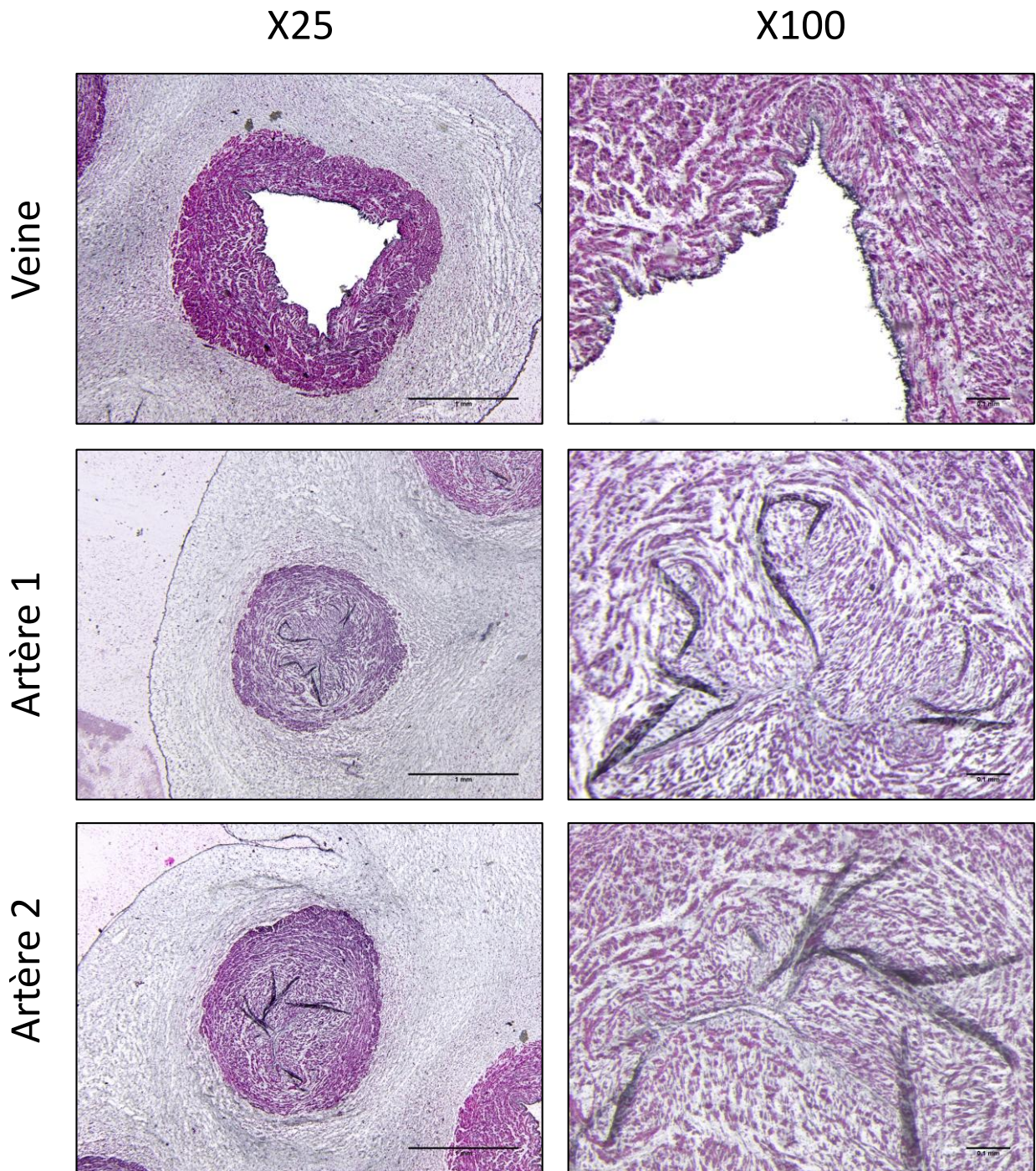
- coloration au Trichrome de Masson (TM) qui permet de distinguer le contenu en collagène présent dans la gelée de Wharton et les vaisseaux.

Nous avons comparé les résultats obtenus par les différents procédés de coloration avec le double marquage immunohistochimique du muscle lisse et de l'endothélium, considéré comme référence.



## **Identification des cellules endothéliales et musculaires lisses par immunohisto- chimie.**

Les images obtenues en immunohistochimie (Figure 4:2) montrent la présence de cellules positives pour le marqueur vWF au niveau de l'intima, ce qui indique que les cellules présentes correspondent bien à des cellules endothéliales. Comme attendu, les cellules présentes au niveau de la média sont positives à l' $\alpha$ SMA. Elles sont organisées en couches et représentent la majeure partie de la paroi vasculaire (Figure 4:2).

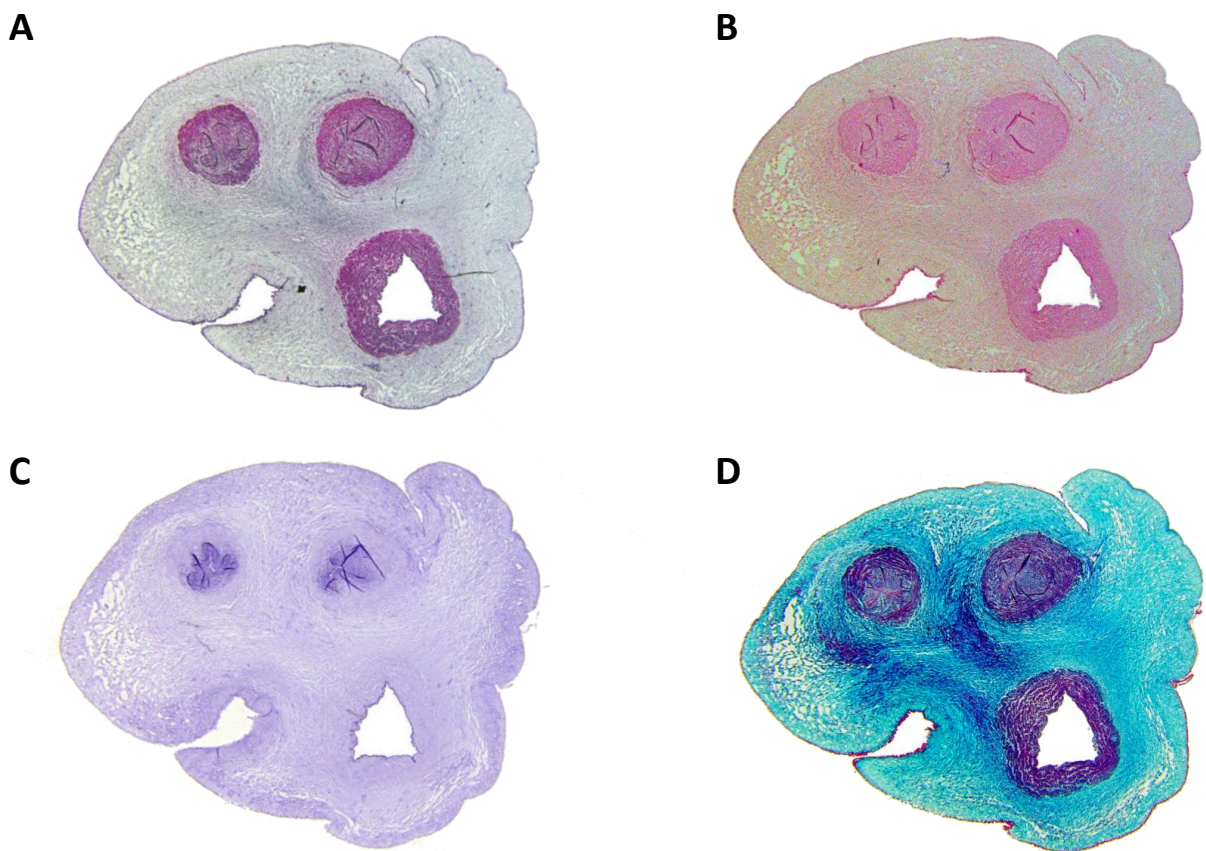


**Figure 4:2 Détection par immunohistochimie du muscle lisse et de l'endothélium.**

La structure de la paroi vasculaire des deux artères et de la veine du cordon ombilical est mise en évidence par immunomarquage, les cellules endothéliales ont été colorées par marquage du facteur de Von Willebrand (vWF, marquage bleu foncé/noir) et les cellules du muscle lisse par marquage de la  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA, marquage violet). (Objectifs  $\times 25$  (échelle = 1 mm) et  $\times 100$  (échelle = 0,1 mm), Microscope Leica M 205A).



Les figures 4:3 représentent les résultats obtenus par coloration histologique ou par immunomarquage sur des coupes histologiques successives de cordon ombilical de 5µm d'épaisseur. Les différents types de coloration nous permettent de distinguer les deux artères et la veine présentes dans la gelée de Wharton, ainsi que les différentes couches constituant la paroi vasculaire.



**Figure 4:3 Comparaison des différentes colorations histologiques obtenues avec le double marquage immunohistochimique (objectif 7.8X).**

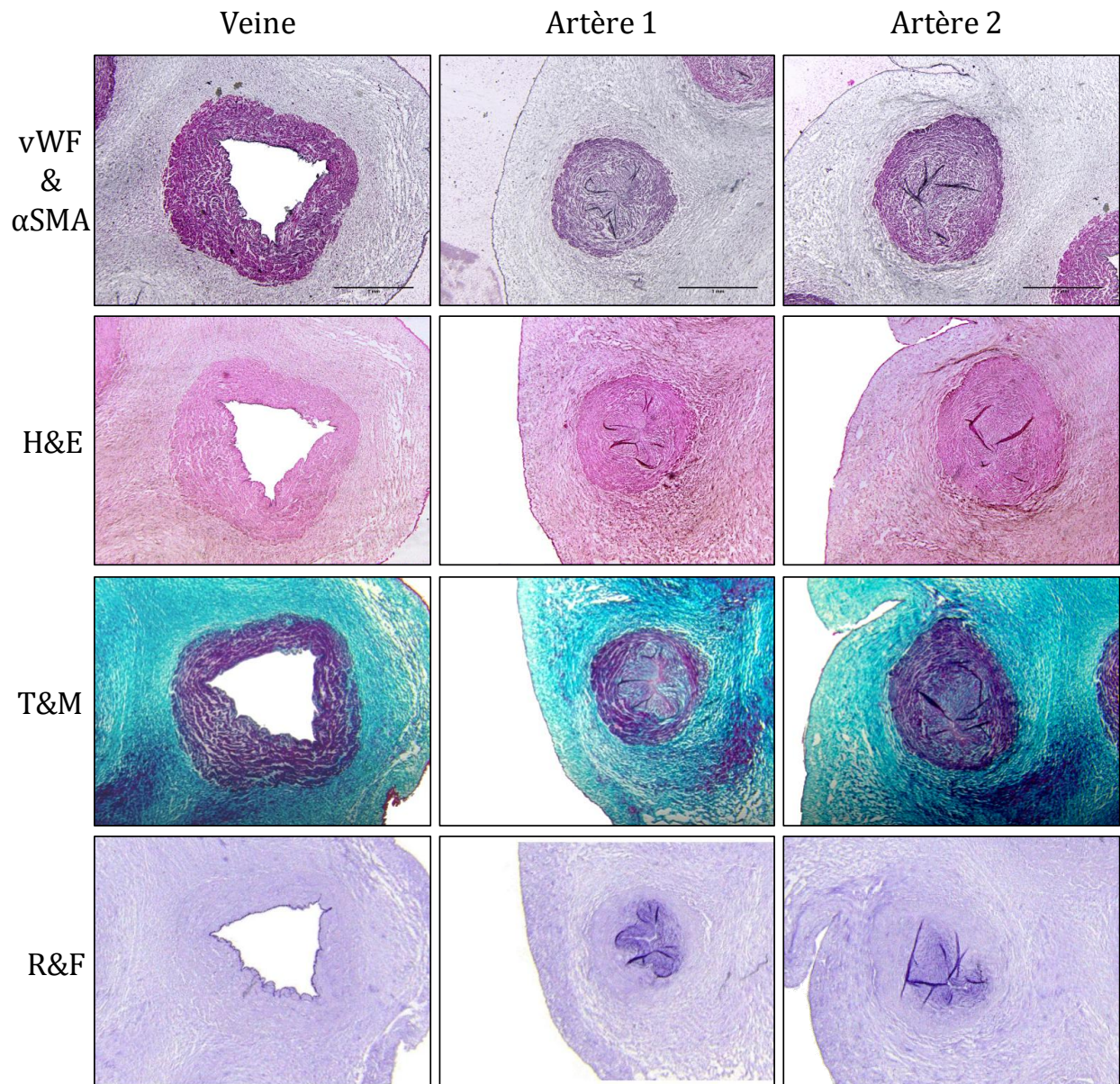
La détection des différentes structures composant le cordon ombilical (gelée de Wharton, veine et artères) a été évaluée sur des coupes histologiques de cordon ombilical par double marquage immunohistochimique du muscle lisse et de l'endothélium (A) ou par coloration à l'Hématoxyline&Eosine (B), la Résorcine&Fuchsine (C) ou le Trichrome de Masson (D). (Objectifs × 7,8 (échelle=1mm), Microscope Leica M 250A).

## **Identification des vaisseaux par différents types de coloration**

Les différentes colorations (H&E, TM et R&F) permettent de différencier plus facilement les deux artères de la veine unique. En effet, la veine et les artères présentent des différences dans leur structure générale et la composition de leur paroi.

Les artères ont en général une lumière étroite, souvent fermée et de forme étoilée. La média des artères est composée de deux couches de muscle lisse, une couche interne longitudinale et une couche externe circulaire (Figure 4:4). On peut également voir que, dans les artères, la quantité de collagène et d'élastine présente dans toute la couche interne longitudinale est plus importante comparée à la couche externe circulaire.

La veine, elle, a en général une lumière plus large que celle des artères. On observe au niveau de l'intima une couche élastique très fine mais de forte intensité. La média de la veine est plus fine que celle des artères et les fibres musculaires lisses forment une seule couche orientée de façon circulaire. Enfin, la quantité de collagène et d'élastine dans le muscle est faible (Figure 4:4).



**Figure 4:4 Comparaison des différentes colorations histologiques obtenues avec le double marquage immunohistochimique (objectif 25X).**

La structure des vaisseaux (veine et artères) composant un cordon ombilical a été évaluée par double marquage immunohistochimique du muscle lisse et de l'endothélium (vWF&αSMA), et par Hematoxyline & Eosine (H&E), Trichrome de Masson (TM), ou Résorcine&Fuchsine (R&F). (Objectifs × 25 (échelle=1mm), Microscope Leica M 250A).

Dans le cordon ombilical, l'adventice n'existe pas, c'est la gelée de Wharton qui assure cette fonction. On peut voir que la gelée de Wharton contient une forte proportion de collagène et peu d'élastine.

L'ensemble des observations faites par immunohistochimie montre une préservation du phénotype vasculaire pour les artères et la veine après inclusion en paraffine. La coloration H&E est suffisante pour différencier le muscle lisse de la gelée de Wharton, c'est pourquoi nous avons utilisé principalement cette coloration pour l'analyse de surfaces.

## 2.2 Mesures histomorphométriques

Le tableau 4:3 présente les mesures histomorphométriques obtenues à partir des coupes histologiques de cordons. Pour les deux sexes, lorsque l'on mesure l'aire totale des sections de cordon, celle-ci n'est pas significativement différente entre les RCIU et CTR. Or, nous avons vu précédemment que la mesure du diamètre de cordons ombilicaux frais donnait des résultats significativement diminués chez les nouveau-nés RCIU comparés aux CTR. En fait, l'étape d'inclusion à la paraffine mène à une réduction de l'aire totale des sections de cordons de ~34-37% chez les CTR et de ~23-24% chez les RCIU. L'aire totale des artères ombilicales, ainsi que l'aire de la gelée de Wharton sont similaires dans les deux groupes. Par contre, une différence significative est observée entre les RCIU et CTR pour la veine ombilicale. Chez les filles, la mesure de l'aire totale de la veine ombilicale, du muscle lisse et de la lumière sont significativement plus basses chez les RCIU comparées aux CTR (Figure 4:5.A). Chez les garçons, la diminution de l'aire totale de la veine est à la limite de la significativité, tandis que la diminution de l'aire de muscle lisse est significativement diminuée chez les RCIU comparée aux CTR (Figure 4:5.B).

La diminution observée pour l'aire totale de la veine et de son muscle lisse est de ~30% chez les filles et de ~15% chez les garçons.

Une corrélation entre l'aire totale de la veine et le poids de naissance a pu être mise en évidence chez les filles (Figure 4:5.C) (coefficient de corrélation  $r=0.4577$ ,  $P=0.0007$ ,

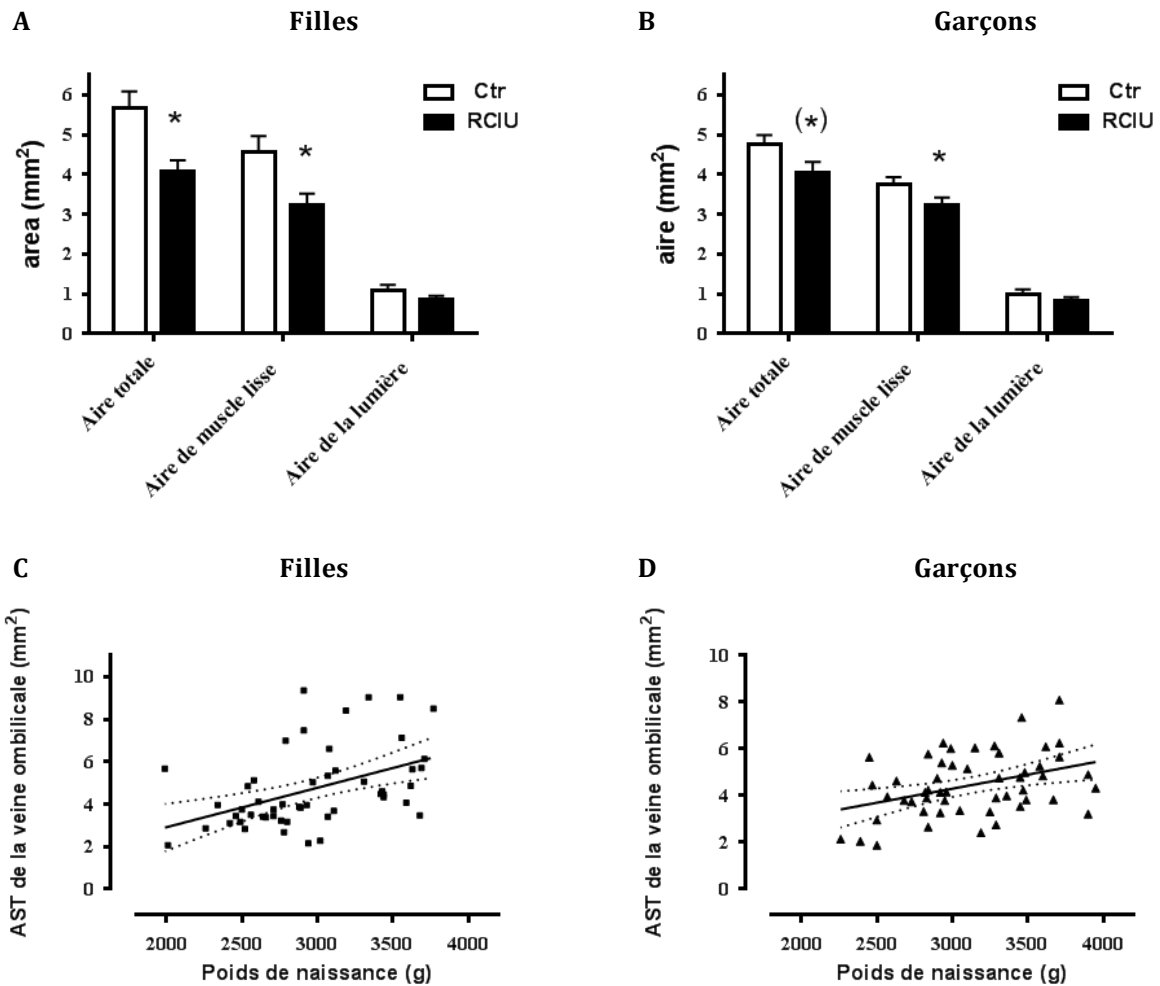


n=51) et chez les garçons (Figure 4:5.D) (coefficient de corrélation  $r=0.3899$ ,  $P=0.0043$ ,  $n=52$ ). Il n'y a pas de différence significative pour les données morphométriques entre filles et garçons.

	Ctr	RCIU	Valeur de P
<b>Filles</b>			
Nombre de patients inclus	28	23	
Diamètre cordon ombilical frais (mm)	11.91 ± 0.44	10.49 ± 0.31 *	<b>0.0246</b>
AST calculée de cordon ombilical frais (mm <sup>2</sup> )	115.50 ± 9.14	88.15 ± 5.25 *	<b>0.0246</b>
AST de cordon ombilical (mm <sup>2</sup> )	72.31 ± 4.93 ‡	67.97 ± 4.33 ‡	0.6840
AST de veine ombilicale totale (mm <sup>2</sup> )	5.44 ± 0.39	3.81 ± 0.22 *	<b>0.0013</b>
AST de muscle lisse de la veine ombilicale (mm <sup>2</sup> )	4.32 ± 0.35	3.03 ± 0.20 *	<b>0.0083</b>
AST de la lumière de la veine ombilicale (mm <sup>2</sup> )	1.12 ± 0.13	0.78 ± 0.09 *	<b>0.0439</b>
AST de l'artère ombilicale totale (mm <sup>2</sup> )	5.82 ± 0.30	5.88 ± 0.58	0.3891
AST de muscle lisse de l'artère ombilicale (mm <sup>2</sup> )	5.67 ± 0.29	5.26 ± 0.38	0.2222
AST de la lumière de l'artère ombilicale (mm <sup>2</sup> )	0.14 ± 0.05	0.61 ± 0.37	0.3788
AST de la gelée de Wharton (mm <sup>2</sup> )	61.05 ± 4.54	58.28 ± 3.98	0.7983
<b>Garçons</b>			
Nombre de patients inclus	30	22	
Diamètre cordon ombilical frais (mm)	12.56 ± 0.46	11.26 ± 0.37	<b>0.0627</b>
AST calculée de cordon ombilical frais (mm <sup>2</sup> )	128.80 ± 10.80	101.86 ± 6.78	<b>0.0627</b>
AST de cordon ombilical (mm <sup>2</sup> )	85.37 ± 5.83 ‡	77.85 ± 5.07 ‡	0.5229
AST de veine ombilicale totale (mm <sup>2</sup> )	4.75 ± 0.24	4.04 ± 0.27	<b>0.0654</b>
AST de muscle lisse de la veine ombilicale (mm <sup>2</sup> )	3.76 ± 0.18	3.21 ± 0.20 *	<b>0.0465</b>
AST de la lumière de la veine ombilicale (mm <sup>2</sup> )	0.99 ± 0.12	0.83 ± 0.10	0.4099
AST de l'artère ombilicale totale (mm <sup>2</sup> )	6.36 ± 0.27	5.81 ± 0.28	0.1917
AST de muscle lisse de l'artère ombilicale (mm <sup>2</sup> )	6.08 ± 0.24	5.67 ± 0.27	0.2786
AST de la lumière de l'artère ombilicale (mm <sup>2</sup> )	0.27 ± 0.12	0.13 ± 0.03	0.8895
AST de la gelée de Wharton (mm <sup>2</sup> )	74.26 ± 5.67	68.01 ± 4.90	0.5848

**Tableau 4:3 Mesures histomorphométriques de coupes de cordons ombilicaux fixés en paraffine.**

Les caractères en gras indiquent les valeurs-P significativement différentes ( $P < 0,05$ ), ou proches d'être significatives. Ctr, contrôles adaptés pour l'âge gestationnel; RCIU, nouveau-nés en restriction de croissance; UV, veine ombilicale; UA, artères ombilicales; AST, aire de la section transversale. Le "diamètre du cordon ombilical frais" (DCO) correspond à la moyenne des mesures du diamètre avant la dissection, de même "l'AST de cordon ombilical frais" a été calculé à partir du DCO frais. Les autres données ont été obtenues à partir de coupes en paraffine. L'aire totale de l'UA correspond à la somme des surfaces mesurées dans les deux UA de chaque cordon ombilical. La surface de la gelée de Wharton a été calculée comme suit [AST du cordon ombilical - (AST UV+ AST UA)]. Toutes les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \* Différence significative entre Ctr et RCIU ( $P < 0,05$  déterminée par le test de Mann-Whitney), ‡ différence significative entre l'AST du cordon ombilical total et l'AST du cordon frais correspondant ( $P < 0,05$  déterminée par le test de Wilcoxon sur les échantillons appariés). Il n'y avait pas de différence significative entre les données mesurées chez les garçons et les filles.(Peyter et al. placenta, 2014)(254).



**Figure 4:5 Mesures histomorphométriques de la veine ombilicale de nouveau-nés avec une croissance normale (Ctr) ou un retard de croissance intra-utérin (RCIU).**

Résultats des mesures histomorphométriques de la veine ombilicale chez des filles (A) et des garçons (B). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (chez les filles: Ctr n= 28; RCIU n=23 et chez les garçons: Ctr n=30; RCIU n=22). \* Différence significative entre Ctr et RCIU; (\*) ou proches d'être significatives entre les contrôles et RCIU ( $P < 0,05$  déterminée par le test de Mann-Whitney). Relations entre la taille de l'aire des coupes transversales (AST) de cordon ombilical et le poids de naissance chez les filles (C) et les garçons (D). Une corrélation a été mise en évidence par régression linéaire entre UV CSA et le poids total du corps chez les filles (coefficient de corrélation  $r = 0,4577$ ,  $p = 0,0007$ ,  $n = 51$ ) et les garçons (coefficient de corrélation  $r = 0,3899$ ,  $p = 0,0043$ ,  $n = 52$ ). (Peyter et al. placenta, 2014)(254).



### 3. Etudes pharmacologiques

#### 3.1 Contraction induite avec le 5-HT et U46619

Le Tableau 4:4 présente les valeurs de tension de repos de veines ombilicales isolées et les valeurs de tension résiduelle obtenues après pré-contraction au 5-HT ou au U46619. La tension de repos est similaire dans tous les groupes. Chez les filles, la tension résiduelle est similaire entre les nouveau-nés AGA et RCIU. Chez les garçons, les deux vasoconstricteurs induisent une tension résiduelle significativement plus basse chez les nouveau-nés en retard de croissance que chez les enfants AGA. Il n'y a pas de différence entre filles et garçons, excepté pour la tension résiduelle induite par le U46619 qui est significativement plus basse chez les garçons en retard de croissance que chez les filles.

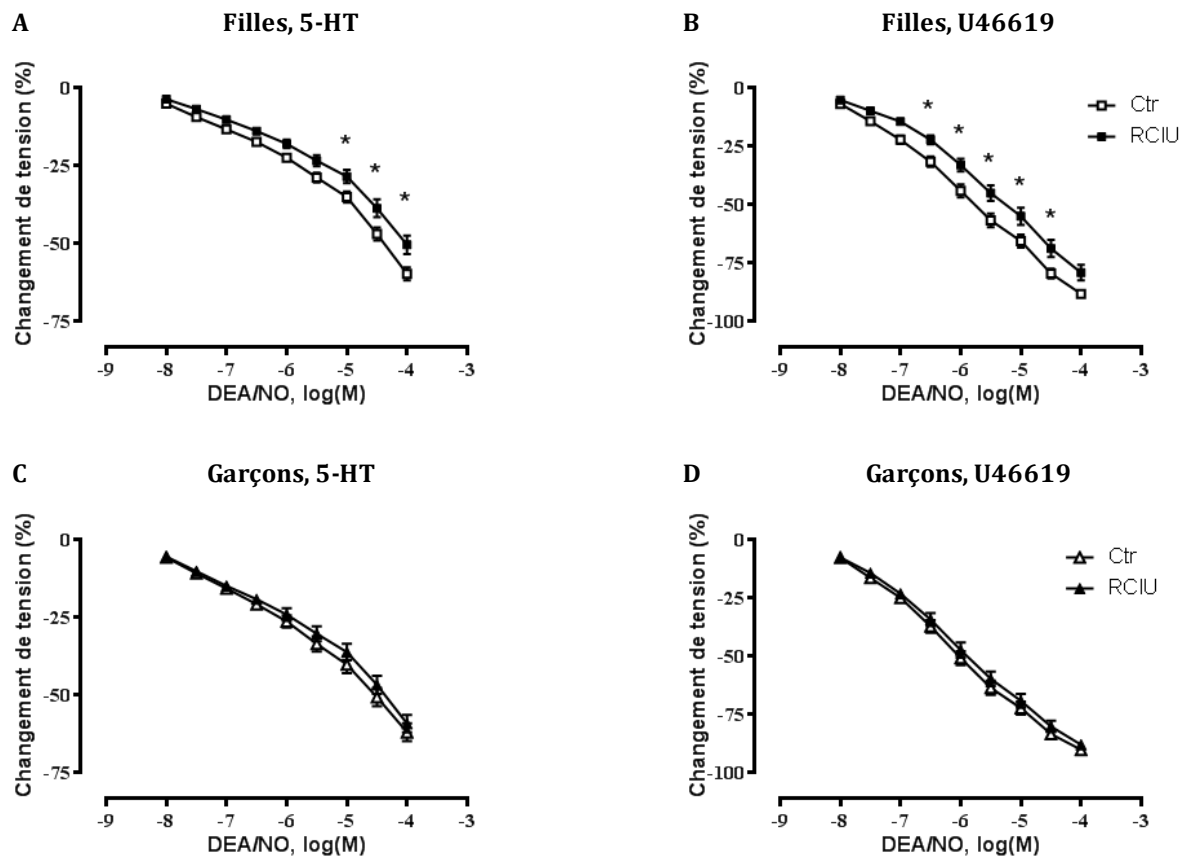
	Ctr	RCIU	Valeur de P
<b>Filles</b>			
<i>5-HT</i>	n = 52	n = 39	
Tension de repos (g)	0.20 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.5499
Tension résiduelle (g)	4.20 ± 0.16	4.13 ± 0.21	0.5316
<i>U46619</i>	n = 51	n = 39	
Tension de repos (g)	0.22 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.1994
Tension résiduelle (g)	4.01 ± 0.21	4.32 ± 0.31 †	0.4914
<b>Garçons</b>			
<i>5-HT</i>	n = 51	n = 45	
Tension de repos (g)	0.24 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.1023
Tension résiduelle (g)	4.02 ± 0.13	3.52 ± 0.16 *	<b>0.0406</b>
<i>U46619</i>	n = 51	n = 45	
Tension de repos (g)	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.5348
Tension résiduelle (g)	4.00 ± 0.15	3.40 ± 0.18 * †	<b>0.0321</b>

**Tableau 4:4 Tension de repos optimale et résiduelle de veine ombilicale isolée contractée au U46619 ou à la 5-HT.**

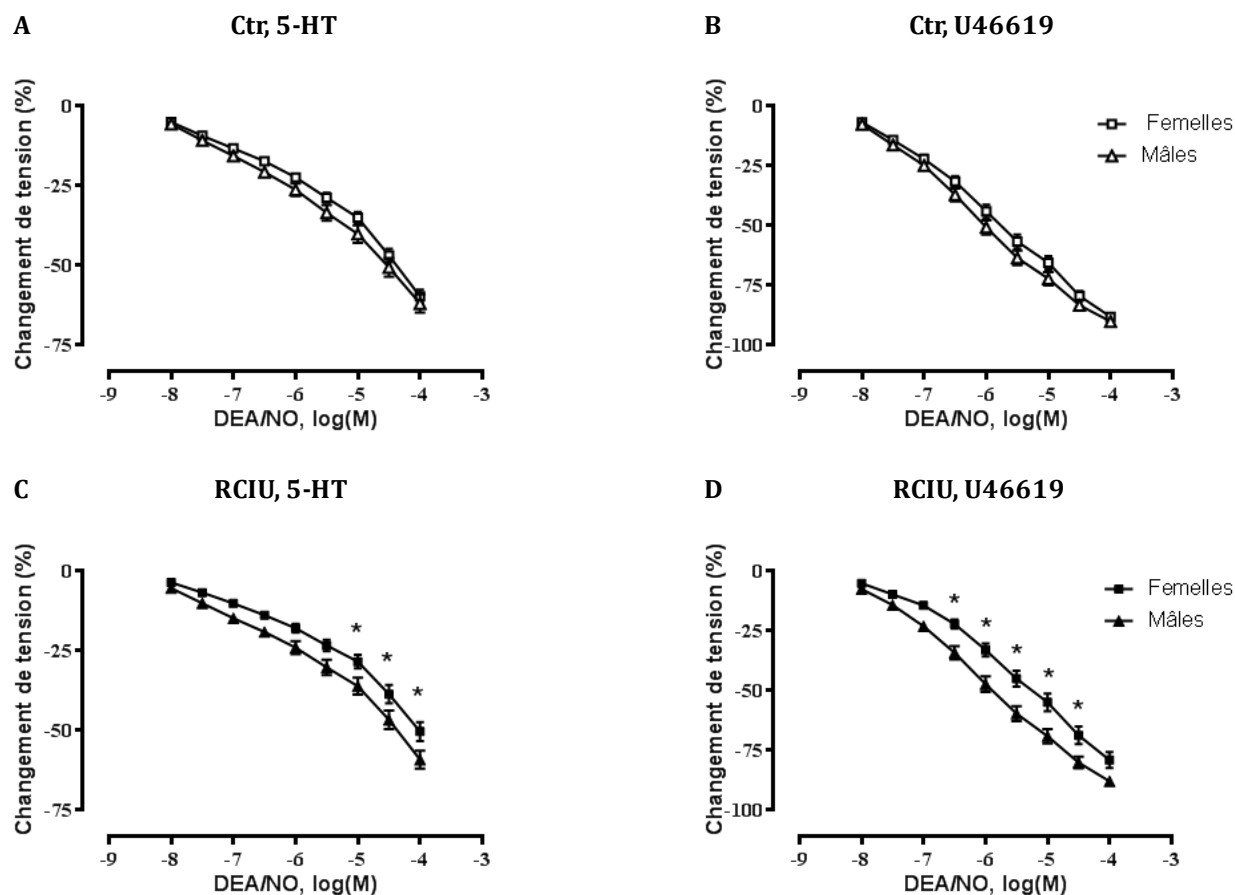
Les caractères en gras indiquent les valeurs-P significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Résultats de la tension optimale mesurée au repos et de la tension résiduelle mesurée après la contraction au thromboxane A2 (U46619;  $10^{-6}$  M) ou à la sérotonine (5-HT;  $10^{-5}$  M). Ctr, contrôles adaptés pour l'âge gestationnel; RCIU, nouveau-nés en restriction de croissance. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \* Différence significative entre les contrôles et les nouveau-nés RCIU; † différence significative entre filles et garçons; ‡ différence significative entre UV pré-contractée avec la 5-HT ou le U46619 ( $P < 0,05$  déterminée par le test de Mann-Whitney)(Peyter et al. placenta, 2014)(254).

### 3.2 Relaxation induite par le DEA/NO

La Figure 4:6 montre la relaxation de la veine ombilicale induite par des doses cumulatives de DEA/NO ( $10^{-8}$  à  $10^{-4}$  M). Chez les filles, pour les veines ombilicales précontractées avec le 5-HT ou le U46619, la relaxation induite par le DEA/NO est significativement plus faible chez les RCIU que chez les CTR (Figure 4:6, A et B). En revanche, chez les garçons, les deux groupes montrent une relaxation similaire en réponse au DEA/NO (Figure 4:6, C et D). Si on compare les réponses des deux sexes, filles et garçons affichent une réponse vasodilatatrice similaire chez les contrôles (Figure 4:7, A et B), tandis que chez les nouveau-nés en retard de croissance, la relaxation induite par le DEA/NO est significativement réduite chez les filles comparées aux garçons (Figure 4:7, C et D).



**Figure 4:6 Relaxation induite par des doses cumulatives de DEA/NO sur des veines ombilicales de nouveau-nés avec une croissance normale (Ctr) ou un retard de croissance intra-utérin (RCIU).** Relaxation induite par des doses cumulées de DEA/NO ( $10^{-8}$  à  $10^{-4}$  M), un donneur d'oxyde nitrique, sur des veines ombilicales isolées de filles (A, B) ou de garçons (C, D), pré-contractées avec le 5-HT ( $10^{-5}$  M) (A, C) ou U46619 ( $10^{-6}$  M) (B, D). Ctr, contrôles adaptés pour l'âge gestationnel; RCIU, nouveau-nés en restriction de croissance. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM du pourcentage de changement de la tension induite par le vasodilatateur (chez les filles:  $n=52$  Ctr et  $n=39$  RCIU et chez les garçons  $n=51$  Ctr et  $n=45$  RCIU). \* Différence statistique entre Ctr et IUGR ( $P < 0,05$  déterminée par ANOVA à deux facteurs). (Peyter et al. placenta, 2014)(254).



**Figure 4:7 Relaxation induite par des doses cumulatives de DEA/NO sur des veines ombilicales isolées, comparaison selon le sexe.**

La relaxation induite par des doses cumulées de DEA/NO ( $10^{-8}$  à  $10^{-4}$  M), un donneur d'oxyde nitrique en fonction du sexe sur des veines ombilicales pré-contractées avec le 5-HT ( $10^{-5}$  M) (A,C) ou U46619 ( $10^{-6}$  M) (B, D), chez des nouveau-nés Ctr (A, B) ou RCIU (C, D). \* Différence statistique entre les filles et les garçons ( $P < 0,05$ , déterminé par ANOVA à deux facteurs). (Peyter et al. placenta, 2014)(254).

Le Tableau 4:5 résume l'efficacité ( $E_{max}$ ) et la sensibilité ( $EC_{50}$ ) pour la relaxation induite par le DEA/NO. Il n'y a pas de différence pour la  $E_{max}$  et la  $EC_{50}$  entre les garçons RCIU et les CTR, alors que, chez les filles, le  $E_{max}$  pour les veines ombilicales pré-contractées avec 5-HT est significativement plus bas chez les RCIU comparés au CTR, et l' $EC_{50}$  pour les veines pré-contractées avec le U46619 est presque deux fois plus élevée chez les RCIU que chez les CTR. De plus, chez les nouveau-nés en retard de croissance, la  $E_{max}$  obtenue avec les deux vasoconstricteurs est significativement plus basse chez les filles que chez les garçons et l' $EC_{50}$  est plus haute chez les filles que chez les garçons

pour les veines ombilicales pré-contractées avec le U46619. Finalement, dans tous les groupes, la Emax est significativement plus haute dans les veines ombilicales pré-contractées avec le U46619 comparé au 5-HT. De plus, la EC<sub>50</sub> est significativement plus basse dans tous les groupes pour des veines ombilicales pré-contractées avec le U46619 comparé au 5-HT, excepté pour les filles en retard de croissance.

	Ctr	RCIU	Valeur de P
<b>Filles</b>			
<i>Pré-contraction 5-HT</i>	n = 52	n = 39	
EC50 DEA/NO (M)	$2.33 \cdot 10^{-6} \pm 3.62 \cdot 10^{-7}$	$3.07 \cdot 10^{-6} \pm 5.24 \cdot 10^{-7}$	0.5911
Emax DEA/NO (%)	51.08 ± 1.95	43.76 ± 2.84 * †	<b>0.0140</b>
<i>Pré-contraction U46619</i>	n = 51	n = 39	
EC50 DEA/NO (M)	$1.47 \cdot 10^{-6} \pm 2.10 \cdot 10^{-7} ‡$	$2.47 \cdot 10^{-6} \pm 4.19 \cdot 10^{-7} * †$	<b>0.0153</b>
Emax DEA/NO (%)	81.14 ± 1.78 ‡	73.11 ± 3.27 †‡	0.0951
<b>Garçons</b>			
<i>Pré-contraction 5-HT</i>	n = 51	n = 45	
EC50 DEA/NO (M)	$2.11 \cdot 10^{-6} \pm 4.24 \cdot 10^{-7}$	$2.91 \cdot 10^{-6} \pm 7.38 \cdot 10^{-7}$	0.3724
Emax DEA/NO (%)	53.14 ± 2.62	51.03 ± 2.58 †	0.6125
<i>Pré-contraction U46619</i>	n = 51	n = 45	
EC50 DEA/NO (M)	$1.30 \cdot 10^{-6} \pm 2.99 \cdot 10^{-7} ‡$	$1.74 \cdot 10^{-6} \pm 4.42 \cdot 10^{-7} †‡$	0.4764
Emax DEA/NO (%)	84.24 ± 1.88 ‡	82.43 ± 1.89 †‡	0.3163

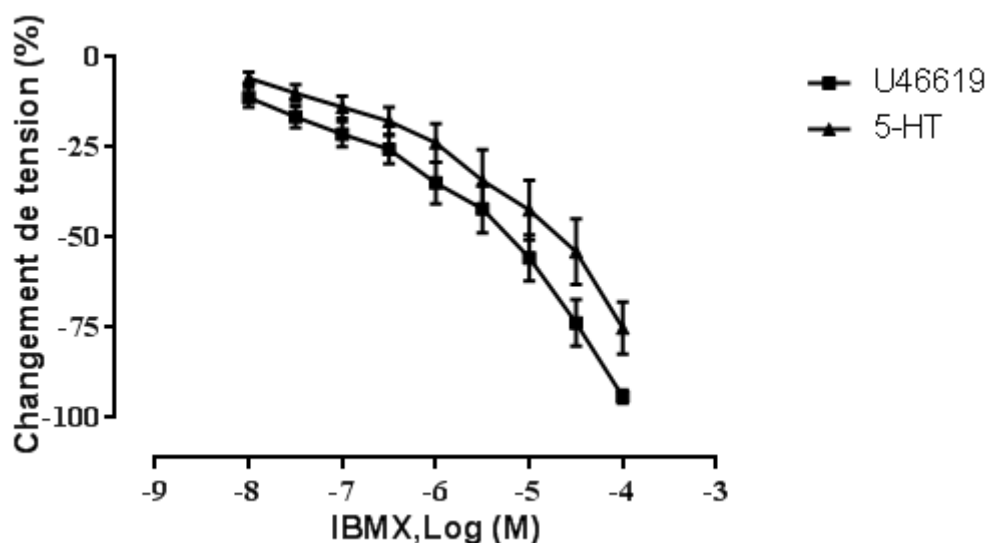
**Tableau 4:5 EC<sub>50</sub> et Emax calculées à partir des courbes de relaxation induites au DEA/NO.**

Les caractères en gras indiquent les valeurs-P significativement différentes (P <0,05). La EC<sub>50</sub> et Emax ont été calculées à partir des courbes de relaxation induites au DEA/NO (10<sup>-8</sup> à 10<sup>-4</sup> M) par analyse de régression non linéaire sur des veines ombilicales isolées contractées au thromboxane A2 (U46619; 10<sup>-6</sup>M) ou à la sérotonine (5-HT; 10<sup>-5</sup> M). CTR, contrôles adaptés pour l'âge gestationnel; RCIU, nouveau-nés en restriction de croissance. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. \* Différence significative entre Ctr et RCIU; † différence significative entre filles et garçons; ‡ différence significative entre UV pré-contractée avec le 5-HT ou U46619 (P <0,05 déterminée par le test de Mann-Whitney). (Peyter et al. placenta, 2014)(254).

### 3.3 Blocage de la dégradation du GMPc par l'IBMX

La Figure 4:8 représente la relaxation de la veine ombilicale induite par des doses cumulatives d'IBMX (10<sup>-8</sup> à 10<sup>-4</sup> M). Chez les filles et les garçons, pour les veines ombilicales pré-contractées avec le 5-HT ou le U46619, l'ajout d'IBMX induit une relaxation dose-dépendante de la veine ombilicale. Afin d'étudier le rôle joué par les PDEs sur la capacité de la veine à se relâcher en présence de DEA/NO nous avons décidé de pré-incuber les

veines avec une dose d'IBMX égale à  $10^{-4}$  M. Cette dose permet d'inhiber entre 70 et 95% des PDEs selon le vasoconstricteur utilisé pour pré-contracter.



**Figure 4:8 Relaxation induite par des doses cumulées d'IBMX sur des veines ombilicales isolées.** Relaxation induite par des doses cumulées d'IBMX un inhibiteur non spécifique des phosphodiesterases sur des veines ombilicales isolées pré-contractées au 5-HT  $10^{-5}$  M ou au U46619  $10^{-6}$  M. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM du pourcentage de changement de la tension induite par l'IBMX (filles n= 5 Ctr et garçons n= 4 Ctr).

### 3.4 Rôle fonctionnel des phosphodiesterases

Les veines ombilicales pré-contractées avec le 5-HT ou le U46619 ont été incubées avec des doses cumulatives de DEA/NO ( $10^{-8}$  à  $10^{-4}$  M), en présence ou absence d'IBMX ( $10^{-4}$  M) un inhibiteur non spécifique des PDEs afin de déterminer le rôle joué par les PDEs dans la relaxation induite par le DEA/NO.

Le Tableau 4:6 présente les valeurs de tension au repos de veines ombilicales isolées et les valeurs de tension résiduelle obtenues lorsqu'elles sont les pré-contractées au 5-HT ou au U46619, en présence ou absence d'IBMX.

La tension de repos est diminuée de manière significative dans tous les groupes en présence d'IBMX par rapport aux conditions de base. Comme publié précédemment (254)

et montré ci-dessus, en absence d'IBMX, les deux vasoconstricteurs induisent une tension résiduelle significativement plus basse chez les nouveau-nés garçons en retard de croissance comparés aux enfants AGA, tandis qu'en présence d'IBMX, seule la contraction au 5-HT est significativement diminuée. Chez les filles en conditions de base, la tension résiduelle est inchangée et reste similaire entre les nouveau-nés AGA et RCIU. L'incubation avec de l'IBMX réduit significativement la TRD dans les UV contractées avec le U46619 pour tous les groupes, à l'exception des garçons RCIU, tandis que dans les UV contractées avec le 5-HT, aucune différence significative n'est observée pour tous nos groupes.

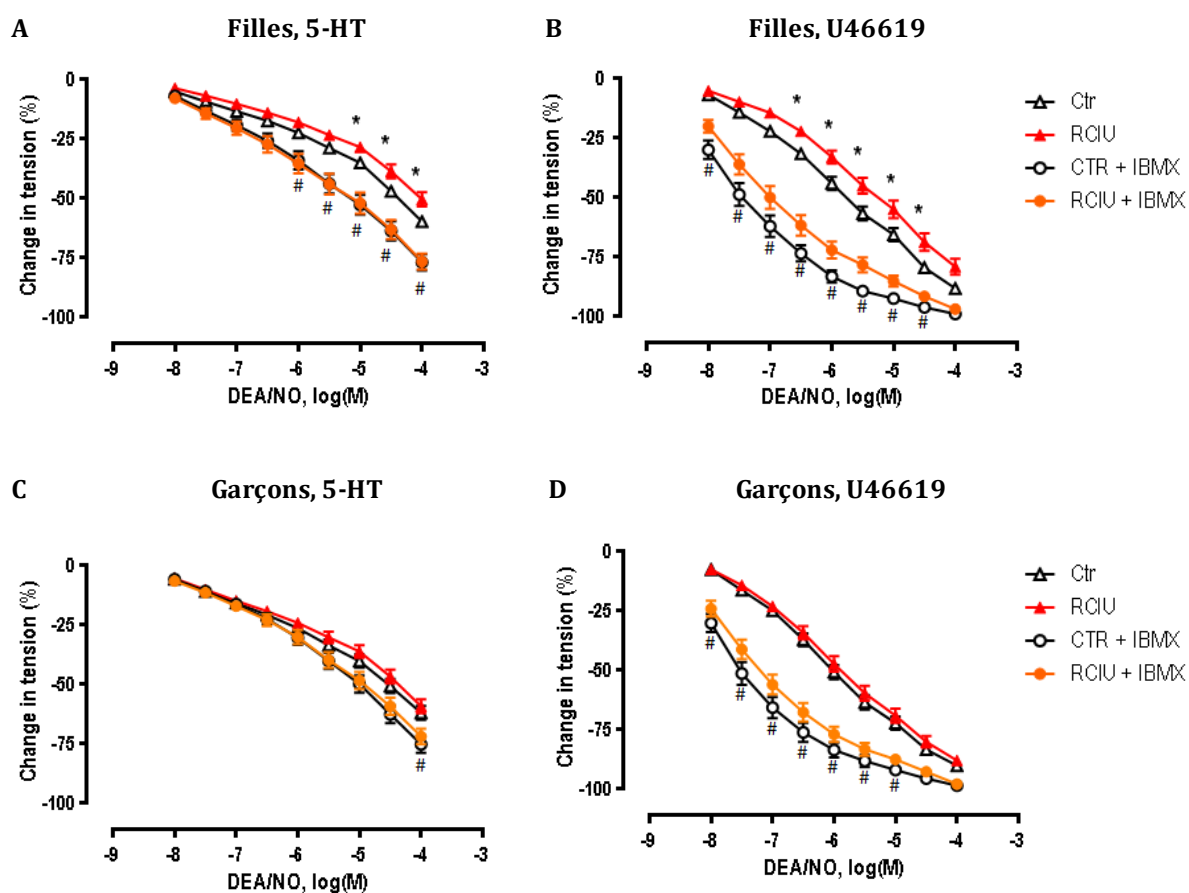
	sans IBMX			avec IBMX		
	Ctr	RCIU	Valeur de P	Ctr	RCIU	Valeur de P
<b>Filles</b>						
<i>5-HT</i>	n = 52	n = 39		n = 24	n = 24	
Tension de repos (g)	0.20 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.5499	0.05 ± 0.02 #	0.09 ± 0.02 #	0.2481
Tension résiduelle (g)	4.20 ± 0.16	4.13 ± 0.21	0.5316	4.12 ± 0.23	3.42 ± 0.24	0.0539
<i>U46619</i>	n = 51	n = 39		n = 24	n = 24	
Tension de repos (g)	0.22 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.1994	0.06 ± 0.02 #	0.12 ± 0.03 #	0.1294
Tension résiduelle (g)	4.01 ± 0.21	4.32 ± 0.31 †	0.4914	3.17 ± 0.21 ‡ #	3.11 ± 0.23 #	0.8690
<b>Garçons</b>						
<i>5-HT</i>	n = 51	n = 45		n = 24	n = 27	
Tension de repos (g)	0.24 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.1023	0.09 ± 0.02 #	0.14 ± 0.02 #	0.1240
Tension résiduelle (g)	4.02 ± 0.13	3.52 ± 0.16 *	<b>0.0406</b>	3.90 ± 0.21	3.27 ± 0.19 *	<b>0.0203</b>
<i>U46619</i>	n = 51	n = 45		n = 24	n = 27	
Tension de repos (g)	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.5348	0.08 ± 0.01 #	0.14 ± 0.03 #	0.2198
Tension résiduelle (g)	4.00 ± 0.15	3.40 ± 0.18 * †	<b>0.0321</b>	3.19 ± 0.16 ‡ #	2.91 ± 0.22	0.2308

**Tableau 4:6 Tension de repos optimale et tension résiduelle de veine ombilicale isolée contractée au thromboxane A2 (U46619) ou à la sérotonine (5-HT) en absence ou présence d'IBMX.**

Les caractères en gras indiquent les valeurs-P significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Tension optimale de repos et résiduelle du thromboxane A2 (U46619) ( $10^{-6}$  M) et de la sérotonine (5-HT) ( $10^{-5}$  M) en absence ou présence d'IBMX ( $10^{-4}$  M). CTR, contrôles adaptés pour l'âge gestationnel; RCIU, nouveau-nés en restriction de croissance. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.. \* Différence significative entre les contrôles et les nouveau-nés RCIU; † différence significative entre filles et garçons; # différence significative entre les UV pré-incubées avec ou sans IBMX; ‡ différence significative entre les UV pré-contractées avec le 5-HT ou U46619 ( $P < 0,05$  déterminée par le test de Mann-Whitney).

Nous avons précédemment montré que chez les filles, la relaxation de la veine ombilicale induite par des doses cumulatives de DEA/NO était significativement plus basse chez les RCIU que chez les CTR, quel que soit le vasoconstricteur utilisé (5-HT ou le U46619). Il est intéressant de noter qu'une pré-incubation des vaisseaux avec de l'IBMX améliore de façon significative la relaxation induite par le DEA/NO pour les veines ombi-

licales de nouveau-nés en retard de croissance et des contrôles. Dans ce cas, la relaxation n'est plus significativement différente entre les nouveau-nés RCIU et les CTR (Figure 4:9.A et B). Chez les garçons, nous avons vu précédemment que les RCIU et les CTR affichent une même réponse relaxante au DEA/NO. Le fait de pré-incuber les veines avec de l'IBMX augmente de façon significative la relaxation au DEA/NO, de façon similaire pour les nouveau-nés RCIU et CTR (Figure 4:9, C et D).



**Figure 4:9 Relaxation induite par des doses cumulatives de DEA/NO sur des veines ombilicales isolées, en présence ou absence d'IBMX.**

Relaxation induite par des doses cumulatives de DEA/NO ( $10^{-8}$  à  $10^{-4}$  M), un donneur d'oxyde nitrique, sur des veines ombilicales isolées chez des filles (A, B) et des garçons (C, D), pré-contractées avec le 5-HT  $10^{-5}$  M (A, C) ou U46619  $10^{-6}$  M (B, D), en présence ou absence d'IBMX ( $10^{-4}$  M). Ctr, contrôles adaptés pour l'âge gestationnel; RCIU, nouveau-nés en restriction de croissance. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (chez les filles n= 24-52 Ctr et n=24-39 RCIU, et chez les garçons n= 24-51 Ctr et n= 27-45 RCIU) du pourcentage de changement de la tension induite par le vasodilatateur. \* Différence statistique entre Ctr et IUGR ( $P < 0,05$ , déterminé par ANOVA à deux facteurs); # différence significative entre les UV pré-incubées avec ou sans IBMX ( $P < 0,05$ , déterminé par ANOVA à deux facteurs).



	sans IBMX			avec IBMX		
	Ctr	RCIU	Valeur de P	Ctr	RCIU	Valeur de P
<b>Filles</b>						
<i>Pré-contraction 5-HT</i>	n = 52	n = 39		n = 24	n = 24	
ECS <sub>50</sub> DEA/NO (M)	2.33 · 10 <sup>6</sup> ± 3.62 · 10 <sup>7</sup>	3.07 · 10 <sup>6</sup> ± 5.24 · 10 <sup>7</sup>	0.5911	1.72 · 10 <sup>6</sup> ± 3.03 · 10 <sup>7</sup>	1.84 · 10 <sup>6</sup> ± 3.91 · 10 <sup>7</sup>	0.7966
Emax DEA/NO (%)	51.08 ± 1.95	43.76 ± 2.84 * †	<b>0.0140</b>	67.30 ± 3.14 #	66.45 ± 3.17 #	0.7337
<i>Pré-contraction U46619</i>	n = 51	n = 39		n = 24	n = 24	
ECS <sub>50</sub> DEA/NO (M)	1.47 · 10 <sup>6</sup> ± 2.10 · 10 <sup>7</sup>	2.47 · 10 <sup>6</sup> ± 4.19 · 10 <sup>7</sup> * †	<b>0.0153</b>	7.97 · 10 <sup>8</sup> ± 2.25 · 10 <sup>8</sup> #	1.68 · 10 <sup>8</sup> ± 3.83 · 10 <sup>8</sup> * #	<b>0.0423</b>
Emax DEA/NO (%)	81.14 ± 1.78	73.11 ± 3.27 † ‡	0.0951	93.16 ± 1.11 #	88.00 ± 1.66 * #	<b>0.0193</b>
<b>Garçons</b>						
<i>Pré-contraction 5-HT</i>	n = 51	n = 45		n = 24	n = 27	
ECS <sub>50</sub> DEA/NO (M)	2.11 · 10 <sup>6</sup> ± 4.24 · 10 <sup>7</sup>	2.91 · 10 <sup>6</sup> ± 7.38 · 10 <sup>7</sup>	0.3724	2.38 · 10 <sup>6</sup> ± 5.87 · 10 <sup>7</sup>	2.16 · 10 <sup>6</sup> ± 6.06 · 10 <sup>7</sup>	0.5029
Emax DEA/NO (%)	53.14 ± 2.62	51.03 ± 2.58 †	0.6125	67.05 ± 3.33 #	62.95 ± 3.08 #	0.2459
<i>Pré-contraction U46619</i>	n = 51	n = 45		n = 24	n = 27	
ECS <sub>50</sub> DEA/NO (M)	1.30 · 10 <sup>6</sup> ± 2.99 · 10 <sup>7</sup>	1.74 · 10 <sup>6</sup> ± 4.42 · 10 <sup>7</sup> †	0.4764	9.29 · 10 <sup>8</sup> ± 3.84 · 10 <sup>8</sup> ‡ #	1.21 · 10 <sup>7</sup> ± 3.28 · 10 <sup>8</sup> #	0.1598
Emax DEA/NO (%)	84.24 ± 1.88	82.43 ± 1.89 †	0.3163	93.05 ± 1.25 #	89.74 ± 1.60 #	0.1151

**Tableau 4:7 EC<sub>50</sub> et Emax calculées par analyse de régression non linéaire à partir des courbes de relaxation induites au DEA/NO, en présence ou absence d'IBMX.**

Les caractères en gras indiquent les valeurs-P significativement différentes (P < 0,05). La EC<sub>50</sub> et Emax ont été calculées par analyse de régression non linéaire à partir des courbes de relaxation induites au DEA/NO (10<sup>-8</sup> à 10<sup>-4</sup> M) sur des veines ombilicales isolées contractées au thromboxane A2 (U46619) (10<sup>-6</sup>) ou à la sérotonine (5-HT) (10<sup>-5</sup> M), en présence ou absence d'IBMX (10<sup>-4</sup> M). CTR, contrôles adaptés pour l'âge gestationnel; RCIU, nouveau-nés en restriction de croissance. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour la comparaison des groupes CTR et RCIU. \* Différence significative entre les contrôles et les nouveau-nés RCIU; † différence significative entre filles et garçons; # différence significative entre les UV pré-incubées avec ou sans IBMX; ‡ différence significative entre les UV pré-contractées avec le 5-HT ou U46619 (P < 0,05 déterminée par le test de Mann-Whitney).

L'efficacité (Emax) et la sensibilité (EC<sub>50</sub>) de la relaxation induite par le DEA/NO sur des UV isolées en présence ou en absence d'IBMX sont résumées dans le tableau 4:7. Une pré-incubation des UV avec de l'IBMX améliore significativement la Emax dans tous les groupes (Filles/Garçons; CTR/RCIU) pour toutes les conditions (5-HT/U46619) et réduit de manière significative la EC<sub>50</sub> des UV pré-contractées avec le U46619. Chez les garçons, l'efficacité et la sensibilité restent similaires entre les nouveau-nés AGA et RCIU en présence d'IBMX. Chez les filles RCIU, la Emax est considérablement diminuée par rapport aux contrôles pour les UV pré-contractées avec le 5-HT en absence d'IBMX.

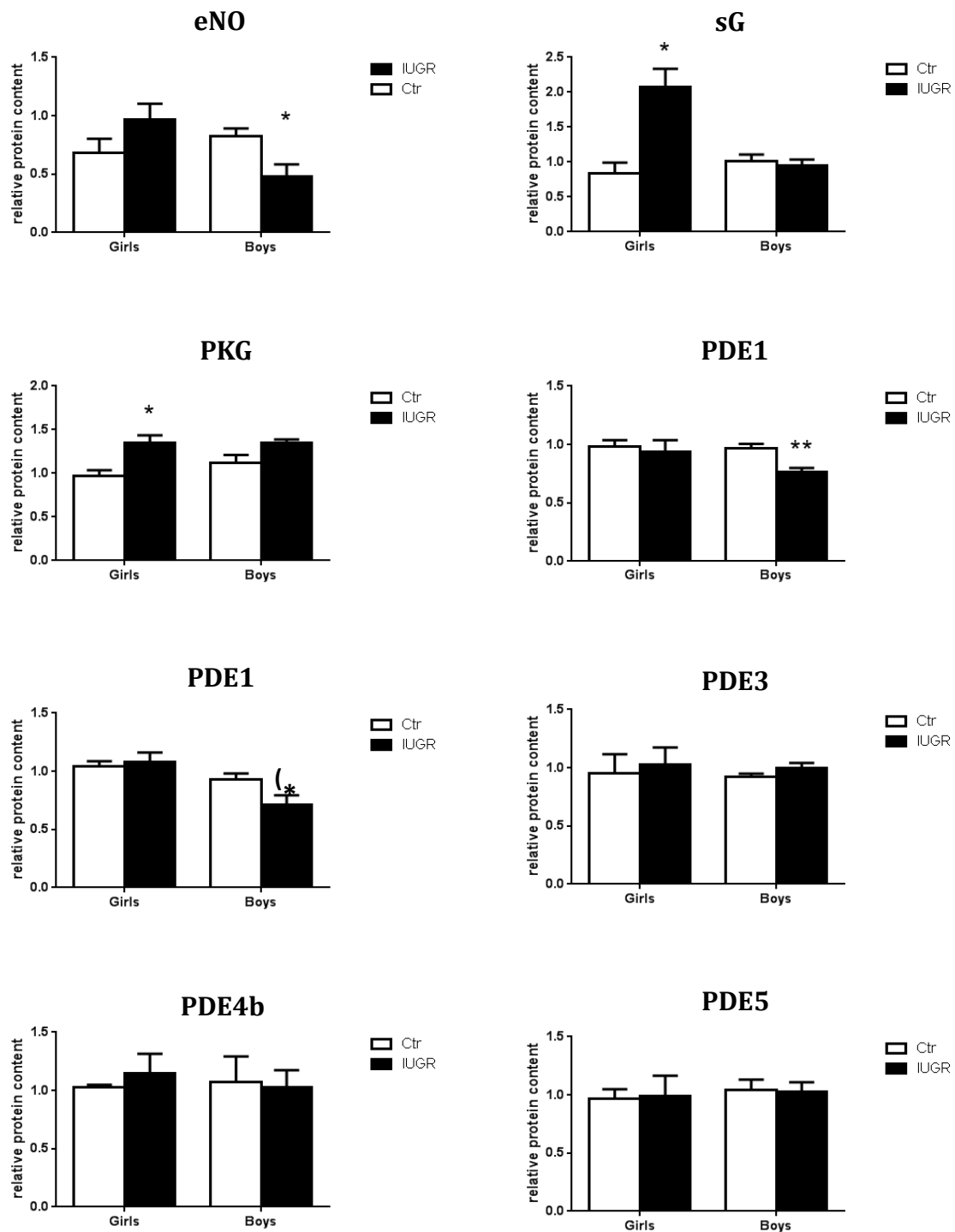
Chez les filles RCIU, l'EC<sub>50</sub> est significativement plus élevée que chez les CTR pour les veines ombilicales pré-contractées avec le U46619 (en présence ou absence d'IBMX), alors que l'Emax n'est significativement inférieure seulement en présence d'IBMX. L'ajout d'IBMX abolit toutes les différences entre filles et garçons. Enfin, dans tous les

groupes et toutes les conditions, la pré-contraction avec le U46619 résulte en une  $EC_{50}$  plus faible et une  $E_{max}$  plus grande par rapport à la 5-HT.

## 4. Etudes moléculaires

### 4.1 Western blot

La Figure 4:10 présente les résultats de western blot obtenus pour différentes protéines clés impliquées dans la voie NO/GMPc. Chez les filles, les quantités relatives de GCs et de PKG sont significativement plus élevées dans les veines ombilicales de nouveau-nés en retard de croissance comparés aux CTR, la eNOS est augmentée mais pas de façon significative chez les RCIU comparés au CTR, enfin les quantités relatives de PDE1b, PDE1c, PDE3a, PDE4b, PDE5a sont similaires chez les RCIU et CTR. Chez les garçons, il n'y a pas de différence significative pour la quantité relative de toutes ces protéines entre RCIU et CTR, excepté pour la eNOS et la PDE1b qui sont significativement diminuées chez les RCIU comparés au CTR et la PDE1c qui est très proche d'être significativement plus basse.



**Figure 4:10 Quantification relative des protéines impliquées dans la voie NO/GMPc à partir de veines ombilicales de nouveau-nés avec une croissance normale (Ctr) ou un retard de croissance intra-utérin (RCIU).**

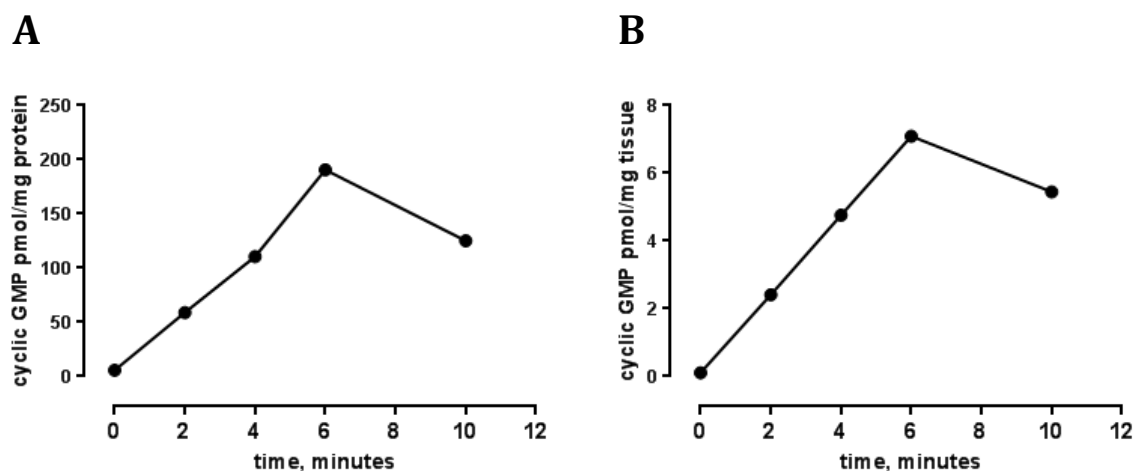
Les mesures semi-quantitatives de la quantité de eNOS, GCs, PKG, PDE1b, PDE1c, PDE3a, PDE4bet PDE5a ont été réalisées par Western blot sur des homogénats de veine ombilicale de filles et de garçons. Pour chaque groupe, des échantillons provenant de 40 patients ont été répartis au hasard dans quatre pools. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 4$  pools de 10 patients). Pour chaque protéine, les expériences ont été répétées 3 à 6 fois. \* Différence statistique entre les deux groupes ( \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  déterminé par test de Student non apparié et (\*) limite significatif).

## 4.2 Dosage du GMPc par ELISA, étude de la cinétique

La Figure 4:11 illustre la production de GMPc dans la veine ombilicale de filles en conditions basales ou après induction de la production de GMPc par le DEA/NO à différents temps (0, 2, 4, 6 et 10 min). Ces expériences ont été réalisées en présence des inhibiteurs NLA et indométacine afin de se rapprocher des conditions utilisées en chambre à organe, ainsi qu'en présence d'IBMX afin d'empêcher les PDEs d'interférer avec la mesure en dégradant le GMPc produit durant l'essai.

Dans des conditions dites basales (non activées au DEA/NO), la quantité de GMPc est très faible dans les veines ombilicales. La stimulation de la production de GMPc par addition de DEA/NO permet d'augmenter la quantité de GMPc dans la veine ombilicale; cette augmentation est proportionnelle dans le temps (2, 4 et 6 min), puis semble se stabiliser et commencer à chuter entre 6 et 10 min. La normalisation de la quantité de GMPc par la quantité de protéines ou par le poids des anneaux vasculaires donne des résultats similaires.

Afin d'étudier la capacité de la veine à produire du GMPc dans différentes conditions (RCIU/CTR; Filles/Garçons; en présence ou absence d'inhibiteurs des PDEs), nous avons décidé d'incuber des anneaux de veines ombilicales en absence ou en présence d'une dose de DEA/NO égale à  $10^{-4}$  M pendant 4 min afin de rester dans la portion linéaire de la cinétique.



**Figure 4:11 Quantification de la production de GMPc dans une veine ombilicale isolée de fille en présence de DEA/NO à différents temps (0, 2, 4, 6 et 10 min).**

La production de GMPc a été évaluée dans des anneaux isolés de veine ombilicale de fille en présence de NLA ( $10^{-4}$ M), d'indométacine ( $10^{-5}$ M) et d'IBMX ( $10^{-4}$  M). La production de GMPc a été mesurée après stimulation au DEA/NO ( $10^{-4}$  M), un donneur de NO, à différents temps (0, 2, 4, 6 et 10 min). La quantité de GMPc produite est exprimée en picomoles par milligramme de protéines (A) ou en picomoles par milligramme de tissu (B).

### 4.3 Dosage du GMPc par ELISA, comparaison entre CTR et

#### RCIU

La Figure 4:12 illustre la production de GMPc dans la veine ombilicale de filles en conditions basales ou après induction de la production de GMPc par le DEA/NO. Ces expériences ont été réalisées en présence des inhibiteurs NLA et indométacine afin de se rapprocher des conditions utilisées en chambre à organe. La contribution relative des PDEs dans la régulation du taux intracellulaire de GMPc a été étudiée à l'aide de l'IBMX ( $10^{-4}$  M), un inhibiteur non-spécifique des PDEs, de la vincapétine ( $10^{-5}$  M), un inhibiteur préférentiel de la PDE1, et du sildénafil ( $10^{-7}$  M), un inhibiteur préférentiel de la PDE5.

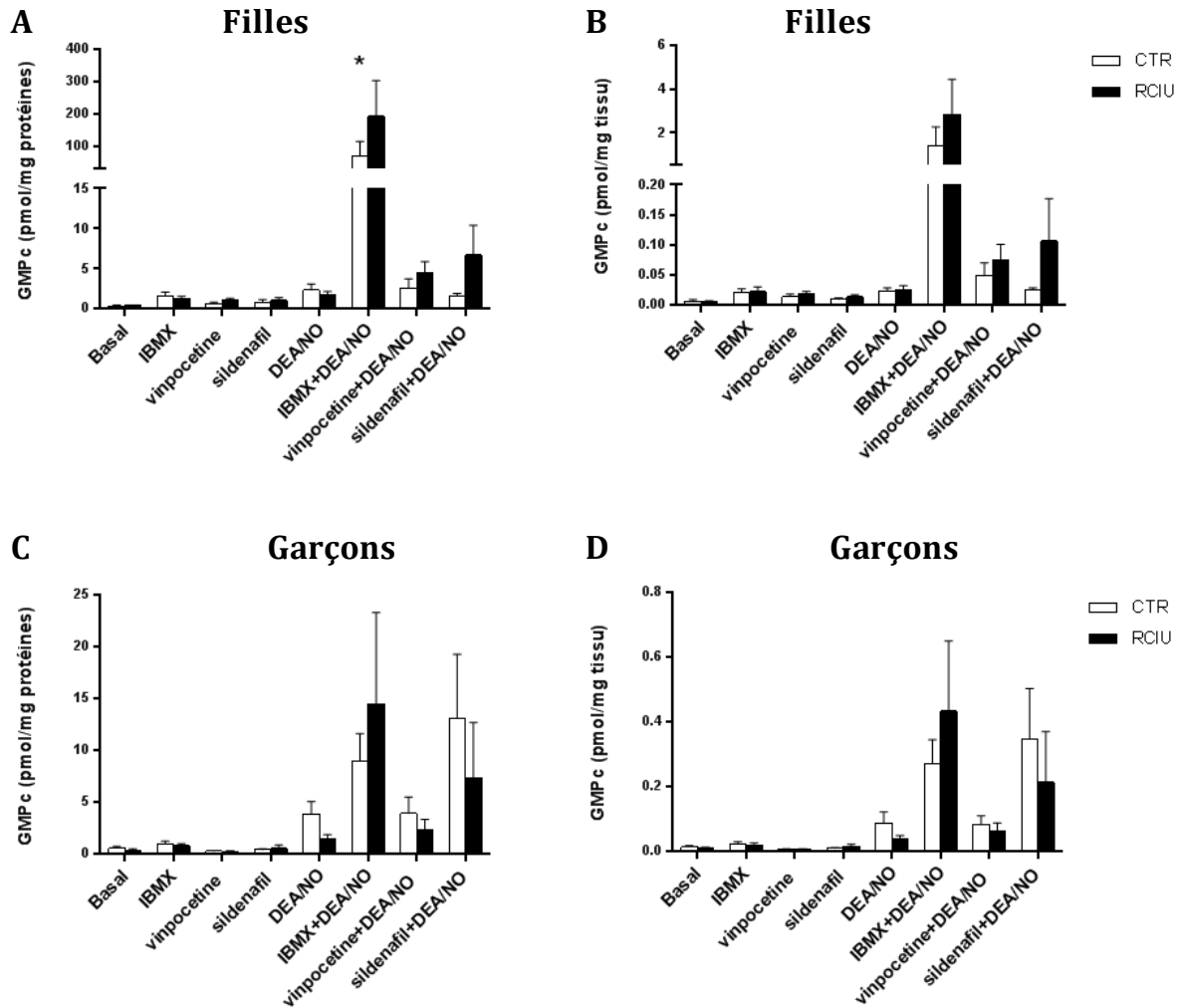
Chez les filles et les garçons (RCIU et CTR), dans des conditions dites basales (non activées au DEA/NO), la quantité de GMPc est très faible et similaire dans les veines ombilicales des RCIU et CTR. L'ajout des différents inhibiteurs de PDEs n'augmente pas de façon significative la quantité de GMPc.

La stimulation de la production de GMPc par addition de DEA/NO permet d'augmenter la quantité de GMPc dans la veine ombilicale. Cette augmentation est cependant significative seulement en présence d'IBMX chez les filles. L'addition de DEA/NO en présence d'IBMX entraîne une forte stimulation de la production de GMPc dans les deux groupes. Cette augmentation est significativement plus importante chez les RCIU comparés au CTR. En effet la concentration en GMPc est deux fois plus élevée chez les RCIU que chez les CTR.

Dans toutes les conditions testées à l'exception des veines ombilicales pré-incubées avec de l'IBMX et stimulées par le DEA/NO, la quantité de GMPc ne diffère pas significativement entre CTR et RCIU, que l'on soit en conditions basales ou sous activation par le DEA/NO.

Chez les garçons, la stimulation de la production de GMPc par addition de DEA/NO permet d'augmenter la quantité de GMPc dans la veine ombilicale. Cette augmentation est cependant significative seulement en présence de sildénafil.

La normalisation de la quantité de GMPc par la quantité de protéines ou par le poids des anneaux vasculaires donne des résultats similaires.



**Figure 4:12 Quantification de la production de GMPc à partir de veines ombilicales de nouveau-nés avec une croissance normale (Ctr) ou un retard de croissance intra-utérin (RCIU).**

La production basale de GMPc a été évaluée dans des anneaux isolés de veine ombilicale en l'absence ou en présence d'IBMX ( $10^{-4}$  M), de vinpocétine ( $10^{-5}$  M), ou de sildenafil ( $10^{-7}$  M). La production de GMPc a également été mesurée après stimulation avec du DEA/NO ( $10^{-4}$  M), un donneur de NO, en présence ou en absence d'inhibiteurs des PDEs. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM en picomoles de GMPc par milligramme de protéines (A, C) ou en picomoles par milligramme de tissu (B, D), chez les filles (A, B) et les garçons (C, D), ( $n = 5-6$  patients chez les CTR et  $n = 5$  patients chez les RCIU, chez les garçons et les filles). \* Différence significative entre Ctr et RCIU ( $p < 0,05$  déterminée par ANOVA à deux voies). Chez les filles, pour les deux groupes (RCIU et contrôle), la quantité de GMPc mesurée en présence d'IBMX + DEA/NO est significativement plus élevée que dans toutes les autres conditions expérimentales. Chez les garçons, la quantité de GMPc mesurée en présence d'IBMX + DEA/NO est significativement plus élevée que dans toutes les autres conditions expérimentales seulement chez les RCIU, tandis que le sildenafil + DEA/NO est significativement augmenté seulement chez les contrôles ( $P < 0,05$  déterminée par ANOVA à une voie).



# V. Discussion

Les nouveau-nés en retard de croissance ont un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte. Il y a actuellement peu de moyens efficaces de prévenir un RCIU, ni de traiter ou d'atténuer ses répercussions. La survie et le développement du fœtus dépendent principalement d'un apport continu en nutriments et en oxygène via le placenta, ainsi que de l'intégrité fonctionnelle de la circulation materno-fœtale. Dans ce projet, nous avons donc regardé s'il y avait des altérations dans le cordon ombilical en cas de RCIU chez l'humain, en nous intéressant plus particulièrement à la veine ombilicale.

# 1. Données démographiques

Les résultats démographiques ont montré que nos groupes sont homogènes pour l'âge maternel et l'âge gestationnel, tandis que les paramètres de croissance du fœtus sont diminués (poids, taille, périmètre crânien) ainsi que le poids du placenta et le diamètre du cordon ombilical. Ces résultats permettent de valider les paramètres d'inclusion et d'exclusion choisis pour séparer nos échantillons dans chacun des groupes (CTR ou RCIU).

Il est à noter que, pour une importante partie des femmes qui accouchent au CHUV, le suivi de la grossesse a été réalisé à l'extérieur de cet hôpital, limitant ainsi l'accès aux données médicales, telles que les mesures de la croissance fœtale ou les Doppler fœtaux. Il était donc impossible d'utiliser les données Doppler pour catégoriser en différents sous-groupes les nouveau-nés en retard de croissance, ni de corrélérer les résultats pharmacologiques ou morphologiques avec des mesures Doppler. Les données à disposition nous ont quand même permis de déterminer une cassure de la courbe de croissance dans 74-77 % des patients appartenant au groupe RCIU.

L'étude de la dispersion des filles et des garçons dans les différents sous-groupes de percentiles montre une répartition comparable, ce qui permet une comparaison selon le genre sans ajouter de biais.

## 2. Relation entre poids du placenta, diamètre du cordon ombilical et poids foetal

Dans notre cohorte, nous avons observé une forte corrélation entre le poids placentaire et le poids de naissance, ce qui confirme les résultats d'études antérieures (255-257). La forte réduction du poids du placenta (~27%) observée chez les nouveau-nés en retard de croissance comparés aux AGA plaide en faveur d'une contribution majeure du placenta dans la pathologie du RCIU.

Nous avons également montré une diminution significative du diamètre du cordon ombilical chez les nouveau-nés RCIU par rapport aux AGA et nous avons mis en évidence une corrélation entre le diamètre du cordon et le poids de naissance. Des études antérieures ont aussi établi des relations entre le diamètre du cordon obtenu par mesures échographiques et le devenir périnatal (46, 181, 258). Des courbes de percentiles correspondant au diamètre du cordon selon l'âge gestationnel publiées par Proctor et al. montrent que le diamètre du cordon est fortement associé au poids du placenta et au poids de naissance du nourrisson (259, 260). Les analyses morphométriques ont montré que l'aire totale des coupes en paraffine de cordon ombilical n'est pas significativement différente entre les RCIU et les contrôles, contrairement à ce que l'on observe lors de mesures de cordons frais. La perte de différence significative entre les valeurs calculées à partir de cordons frais ou de coupes en paraffine est probablement due au traitement des échantillons. Cela peut être lié en particulier aux différentes étapes de déshydratation, ainsi qu'à l'étape d'inclusion dans la paraffine. La gelée de Wharton doit être en

effet particulièrement sensible à une réduction de l'aire en raison de sa forte teneur en eau. L'aire moyenne des coupes de cordons en paraffine est diminuée de 34-37% chez les contrôles et de 23-24% chez les RCIU après inclusion, ce qui suggère une teneur en eau dans la gelée de Wharton de cordon frais plus élevée chez les nouveau-nés AGA comparée au RCIU. Par conséquent, la différence significative observée pour le diamètre du cordon ombilical entre les nouveau-nés RCIU et AGA est probablement due à une diminution de la superficie de la gelée de Wharton principalement, ce qui est en accord avec les données publiées récemment (259). Cette information est particulièrement intéressante, étant donné que la gelée de Wharton est non seulement impliquée dans la fermeté du cordon, mais permet également la diffusion de composés hydrophiles ainsi que la migration cellulaire. La gelée de Wharton est un tissu conjonctif, composé d'une structure poreuse et contenant un fluide visqueux (47). Les pores entourant les vaisseaux peuvent servir d'espace extravasculaire facilitant la dilatation et la contraction. Le fluide interstitiel est constitué de protéoglycanes, d'acide hyaluronique et d'autres molécules qui interagissent avec l'eau. Un niveau suffisant de glycosaminoglycanes est nécessaire pour assurer une bonne hydratation des tissus (47). D'autres investigations seront nécessaires pour comparer la composition de la gelée de Wharton entre les groupes RCIU et AGA.

### 3. Mesures histologiques des vaisseaux

Chez les nouveau-nés en retard de croissance, la surface totale de la veine et la surface de muscle lisse mesurées à partir de coupes histologiques montrent une réduction significative chez les RCIU par rapport aux contrôles. Cette réduction de la surface de muscle lisse pourrait être en relation avec des modifications de réactivité de la veine ombilicale. Une diminution significative de la surface de la veine ombilicale a déjà été décrite chez les fœtus en retard de croissance par des mesures échographiques (181, 258), ainsi que par des mesures de coupes en paraffine (261). De plus, un faible diamètre de cordon ombilical est un pronostic particulièrement grave avec des conséquences périnatales défavorables (48, 258).

Fait intéressant, nous avons observé dans la présente étude une corrélation pour les deux sexes entre la surface totale de la veine obtenue à partir des coupes et le poids de naissance. Ceci suggère que le RCIU est associé à des modifications structurelles de la veine ombilicale. Néanmoins, les résultats de nos mesures morphométriques doivent être abordés avec une certaine prudence. En effet, les vaisseaux n'ont pas été perfusés lors de la fixation du tissu, ce qui pourrait influencer les mesures de l'épaisseur du muscle lisse. Cependant, comme toutes les coupes ont été recueillies dans les mêmes conditions, les données obtenues dans les différents groupes peuvent être comparées entre elles. Pour résumer, les nouveau-nés en retard de croissance affichent pour les deux sexes une réduction significative des paramètres de croissance du fœtus (poids, longueur, circonférence de la tête, indice pondéral), ce qui correspond bien à la définition d'un RCIU. On observe également une importante réduction du poids du placenta, ainsi qu'une diminution significative du diamètre du cordon et de la surface de muscle lisse dans la veine ombilicale par rapport aux nouveau-nés CTR.

## 4. Réactivité de la veine ombilicale isolée

Nous avons ensuite testé l'hypothèse que l'apparition d'un RCIU pouvait être associée à une mauvaise circulation fœto-placentaire, en particulier, en raison d'une altération de la voie du NO-GMPc impliquée dans la relaxation vasculaire. Pour vérifier cette hypothèse, des anneaux vasculaires ont été pré-contractés avec de la sérotonine (5-HT,  $10^{-5}$  M) ou un analogue du thromboxane A2 (U46619,  $10^{-6}$  M) afin d'évaluer la réponse dilatatrice du vaisseau à des concentrations cumulatives d'un donneur de NO, le DEA/NO.

Concernant les propriétés vasoconstrictrices, la tension résiduelle induite par  $10^{-5}$  M de 5-HT ou  $10^{-6}$  M de U46619 est significativement diminuée dans la veine ombilicale des garçons RCIU comparés aux AGA et reste significativement plus basse que chez les filles RCIU et AGA. Cela suggère une altération de la vasoconstriction seulement dans les veines des garçons ayant un retard de croissance. Ces résultats sont un premier indice démontrant une altération du fonctionnement de la veine chez les RCIU comparé aux CTR. Une diminution significative de la capacité à se contracter des vaisseaux a déjà été décrite chez les fœtus en retard de croissance pour d'autres vaisseaux impliqués dans la circulation fœto-placentaire : la réponse vasoconstrictrice au U46619 est diminuée dans des artères chorioniques de placenta chez les RCIU (262); de même, la contraction induite par l'endothéline-1 et la noradrénaline est diminuée dans des artères ombilicales dont l'analyse Doppler montre une forme d'onde altérée, tandis que la contraction au U46619 et à la 5-HT n'est pas modifiée (263, 264). Les données obtenues chez les garçons RCIU restent néanmoins surprenantes, puisque, comme nous l'avons discuté précédemment, des études de la vélocimétrie de la veine et/ou de l'artère ombilicale chez

les RCIU sont souvent associées à un débit réduit et à une augmentation de la résistance vasculaire fœto-placentaire (51, 65-70).

Si on regarde les propriétés vasodilatatrices, la relaxation induite par le NO est significativement diminuée seulement dans les veines ombilicales des filles RCIU, quel que soit le vasoconstricteur utilisé (5-HT ou U46619). Si l'on regarde les caractéristiques pharmacologiques ( $EC_{50}$  et  $E_{max}$ ) liées à la relaxation induite par le DEA/NO, celles-ci varient selon le vasoconstricteur appliqué. En effet, l'efficacité du DEA/NO est plus élevée dans la veine ombilicale pré-contractée avec du U46619 comparée à la 5-HT. Quant à la sensibilité au DEA/NO, elle est aussi plus importante dans la veine ombilicale pré-contractée avec du U46619 comparée à la 5-HT pour tous les groupes, excepté les filles en retard de croissance.

Il est important de noter que nous avons limité notre étude fonctionnelle à des altérations survenant dans le muscle lisse. Nous avons en effet pré-incubé les veines isolées avec du NLA, suite à quoi nous avons donné des doses croissantes de DEA/NO de manière exogène. En procédant de cette façon, la production endogène de NO par les cellules endothéliales est bloquée. La réduction significative de la relaxation induite par le NO chez les filles RCIU semble donc liée à une réponse altérée du muscle lisse au DEA/NO. Les différences observées entre les sexes pour la réactivité vasculaire sont probablement liées à une expression et/ou une régulation différentielle des composants moléculaires de la voie de signalisation NO/GMPc : elle pourrait être due à une diminution de la synthèse de GMPc, à une augmentation de la dégradation du GMPc et/ou à des modifications en aval de certains composants impliqués dans la relaxation.

En résumé, les garçons et les filles affichent des altérations structurelles similaires, mais des altérations distinctes au niveau fonctionnel en cas de RCIU. En effet, les veines ombilicales des nouveau-nés en retard de croissance présentent une altération de la vaso-

constriction au 5-HT/U46619 chez les garçons et une altération de la vasodilatation au DEA/NO chez les filles, ce qui suggère la mise en place de mécanismes d'adaptation différents en fonction du sexe du fœtus. Fait intéressant, des différences entre les sexes sont souvent observées dans le domaine des origines développementales de maladies de l'adulte (265, 266), mais ce phénomène reste encore mal compris. Nous avons donc mené de nouvelles investigations au niveau moléculaire afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'altération de la relaxation de la veine ombilicale chez les filles souffrant d'un retard de croissance. Tout au long de cette étude, garçons et filles ont été analysés séparément afin de déterminer les modifications spécifiques au genre.



## 5. Etude des composants impliqués dans la voie de relaxation du NO/GMPc et sa régulation

L'analyse des Western blot montrent que les quantités relatives de GCs et de PKG sont significativement plus élevées dans les veines ombilicales de filles en retard de croissance comparées aux CTR. Etonnamment, les résultats obtenus sont en contradiction avec l'hypothèse de départ selon laquelle la veine ombilicale pourrait présenter une diminution de la quantité de protéines pro-relaxantes menant à l'altération de la capacité à se relâcher observée chez les filles RCIU. Au contraire, on observe une augmentation de la GCs et de la PKG, ce qui suggère la mise en place de mécanismes compensatoires en réponse à une capacité de relaxation amoindrie. La veine tente d'augmenter la quantité de protéines pro-relaxantes afin d'améliorer sa capacité à se relaxer, mais sans y parvenir ou alors seulement de façon transitoire. Il existe à ce jour encore peu d'études décrivant une modification de l'expression de ces protéines associée au RCIU chez l'homme, à l'exception d'une étude menée par Kingdom et al. qui montre une augmentation significative de la quantité de guanylate cyclase couplée au récepteur ANP chez les RCIU au niveau des villosités-souches dans le placenta (267). En revanche, chez les garçons RCIU, la quantité relative de GCs et de PKG ne diffère pas de celle des CTR, ce qui semble en accord avec les résultats obtenus pour la relaxation : la capacité à se relâcher en réponse à un donneur de NO est identique chez les AGA et RCIU et les protéines impliquées dans la relaxation ne sont pas modifiées. A notre connaissance, ceci est la première étude qui montre un dimorphisme sexuel au niveau des vaisseaux ombilicaux pour des protéines

clés impliquées de la voie du NO en lien avec le RCIU. En effet, les études antérieures ont surtout étudié la relation entre la production de NO lui-même et/ou de ses métabolites avec l'apparition d'un retard de la croissance fœtale. Les résultats obtenus divergent selon les études : une grande majorité a montré une augmentation significative de NO et/ou de ses métabolites en cas de RCIU, que ce soit dans le sang maternel (128, 268-271), chez le fœtus (272), dans le liquide amniotique (273, 274) ou dans la veine du cordon ombilical (270), tandis que d'autres montrent au contraire une diminution (275-278). Par ailleurs, dans ces études, les différences liées au sexe n'ont pas été investiguées.

La capacité apparente des vaisseaux à se relâcher peut donc résulter de différences dans l'expression des protéines clés impliquées dans la relaxation, mais va également dépendre de l'équilibre avec l'activité opposée, c'est-à-dire l'activité pro-contractante. C'est pourquoi nous avons également étudié l'expression de la PDE1, PDE3, PDE4 et PDE5 qui sont les principales isoenzymes trouvées dans le muscle lisse des vaisseaux ombilicaux impliquées dans la dégradation du GMPc (279). Une exploration approfondie de toutes les isoformes de PDEs potentiellement impliquées est malheureusement limitée par la faible disponibilité d'anticorps commerciaux spécifiques. Chez les filles, les quantités relatives de PDE1b, 1c, 3a, 4b et 5a sont similaires dans les veines ombilicales de nouveau-nés RCIU et CTR. Nous obtenons les mêmes résultats chez les garçons, excepté pour la PDE1b qui est significativement réduite chez les nouveau-nés RCIU, ainsi que pour la PDE1c dont la diminution est à la limite de la significativité. Ces résultats mettent une fois de plus en évidence une réponse différente selon le sexe. Au vu de ces résultats obtenus par western blot, les isoformes étudiées ne semblent pas contribuer à l'altération de la relaxation induite par le NO. Une étude plus approfondie des différentes isoformes de PDEs existantes présenterait un certain intérêt et permettrait d'évaluer

leur éventuelle contribution. Néanmoins, une expression pas ou peu modifiée des PDEs ne veut pas dire que celles-ci ne jouent aucun rôle dans l'altération de la relaxation. Il est en effet possible que l'activité enzymatique ou les mécanismes de régulation des PDEs soit différente entre les RCIU et les CTR. Nous avons donc décidé d'étudier leur contribution fonctionnelle potentielle dans l'altération de la relaxation induite par le NO chez les filles RCIU (254). Pour ce faire, le rôle joué par les PDEs a été évalué en présence/absence d'IBMX (un inhibiteur non spécifique des PDEs) sur des veines ombilicales isolées en OC et incubées avec des doses croissantes de DEA/NO.

Le traitement des veines ombilicales avec de l'IBMX améliore considérablement la relaxation induite par le NO dans tous les groupes, ce qui suggère un rôle important des PDEs jouent un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire de la veine. De plus, l'ajout d'IBMX abolit la différence de relaxation entre les filles RCIU et CTR, ce qui suggère que les PDEs contribuent grandement à l'altération de la relaxation induite par le NO observée dans les veines ombilicales des filles RCIU. Par conséquent, les PDEs ont un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire et représentent des cibles potentielles pour une intervention thérapeutique.

Nous avons ensuite étudié l'influence directe d'une inhibition des PDEs sur la production de GMPc. La concentration intracellulaire de GMPc a été évaluée dans des veines isolées en conditions basales ou activées (en absence ou en présence de DEA/NO respectivement) ainsi qu'en absence ou en présence d'IBMX (un inhibiteur non spécifique des PDEs), de vinpocétine (un inhibiteur préférentiel de la PDE1) ou de sildénafil (un inhibiteur préférentiel de la PDE5).

En l'absence d'inhibiteur des PDEs, la concentration en GMPc est dramatiquement basse, même lorsque l'on stimule avec du DEA/NO, ce qui suggère une activité importante des PDEs dans la veine ombilicale. Pré-incuber avec la vinpocétine ou le sildénafil seul n'est

pas suffisant pour augmenter de façon significative la concentration en GMPc dans les vaisseaux traités au DEA/NO, tandis qu'une pré-incubation avec de l'IBMX conduit à une augmentation significative de la concentration en GMPc dans les veines ombilicales stimulées au DEA/NO. Dans cette dernière condition, la concentration de GMPc est presque deux fois plus élevée chez les RCIU que chez les CTR. De façon intéressante, les analyses par western blot ont montré que la quantité de GCs est deux fois plus élevée dans la veine ombilicale des filles RCIU comparées aux CTR. Ces résultats semblent montrer une corrélation directe entre la quantité de GCs et la production GMPc.

En résumé, les résultats obtenus mettent en évidence de multiples altérations de la voie du NO/GMPc dans le muscle lisse de la veine ombilicale chez les filles RCIU, sans modification significative chez les garçons. A notre connaissance, ceci est la première étude montrant une association entre le RCIU et une altération des composants moléculaires de la voie du NO, assortie d'un dimorphisme sexuel. L'augmentation de la quantité de GCs et de PKG chez les filles en retard de croissance suggère la mise en place de mécanismes compensatoires : la veine augmente la quantité de protéines pro-relaxantes afin d'améliorer la relaxation mais sans réussite ou seulement de façon transitoire. Toutefois, l'amélioration de la partie pro-relaxante de la voie du NO/GMPc semble grandement contrebalancée par l'augmentation importante de l'activité PDE. Nous avons déjà observé des mécanismes compensatoires similaires dans les artères pulmonaires de souris adultes nées dans des conditions hypoxiques (280). En effet, la quantité relative de PKG et l'activité de la GCs sont augmentées dans les artères pulmonaires de filles adultes exposées à une hypoxie périnatale, tout comme l'activité des PDEs, ce qui pourraient contribuer aux conséquences néfastes d'une hypoxie périnatale sur la circulation pulmonaire à l'âge adulte. Des différences entre les sexes sont souvent observées dans le domaine

des origines développementales des maladies de l'adulte (265, 266). Il a par exemple été montré que l'incidence des maladies cardiovasculaires est plus grande chez les hommes âgés de 30-50 ans que chez les femmes du même âge (281, 282). Dans de nombreux cas, la prédisposition à ces maladies apparaît dès le début du développement et passe par une "reprogrammation fœtale". Les différences observées entre les sexes pourraient s'expliquer par des différences génétiques, hormonales ou des différences dans la réponse aux facteurs environnementaux (infection, sous-nutrition, médicaments ou stress). Il a en effet été montré que des différences liées au sexe apparaissent très tôt après la fécondation et peuvent agir sur la croissance fœtale. Chez la souris et les bovins, l'accélération du développement est déjà évidente au stade du blastocyste : la division cellulaire chez les embryons garçons est plus rapide que chez les filles (283). Chez les bovins, le sexe détermine le niveau d'expression d'un tiers de la totalité des gènes activement exprimés dans les blastocystes (284). Il est aujourd'hui bien connu et admis que la vitesse de croissance n'est pas identique selon le sexe. Chez l'humain, les garçons grandissent plus rapidement que les filles (285). Dans ce contexte développemental, le placenta, qui joue un rôle clé dans la croissance fœtale, va également varier selon le sexe. Dans des conditions normales de développement, il a été montré que, chez les souris, la taille du placenta des garçons est plus importante que celui des filles (286). Chez l'humain, le poids du placenta à la naissance est significativement plus élevé chez les garçons que chez les filles (287), néanmoins cette différence n'est pas observée dans l'étude que nous avons menée (254). De plus, le placenta comme le fœtus peut se reprogrammer en cas de modification de l'environnement intra-utérin et la réponse adaptative peut être différente selon le sexe. Les études menées à l'époque de la famine hollandaise sur les nouveau-nés ont mis en évidence que la dénutrition maternelle en début de gestation entraînait une plus grande diminution du placenta pour les garçons que pour les

filles (288). Le sexe de l'embryon peut donc affecter à la fois la taille du fœtus et du placenta, comme il peut modifier la capacité à répondre à des stimuli nocifs. Dans le cas du RCIU, il a été montré que l'incidence de la restriction de croissance n'est pas identique : les études épidémiologiques menées par Melamed et al. et Aibar et al. sur 30 000 et 60 000 nouveau-nés respectivement ont permis de mettre en évidence une incidence significativement plus élevée de retard de croissance chez les filles que chez les garçons (289, 290). Chez le rat, l'étude de nouveau-nés ayant subi un RCIU a montré que l'hypertension était plus importante chez les garçons et les filles comparés aux CTR avec un effet plus sévère chez les garçons (291). Ces différences adaptatives selon le sexe pourraient expliquer les différences observées dans la capacité à se contracter ou se relaxer des UV chez les garçons RCIU et chez les filles RCIU respectivement. Les hormones sexuelles stéroïdiennes (œstradiol, testostérone, progestérone) pourraient aussi jouer un rôle direct et modifier la capacité à se contracter des vaisseaux. En effet, il a été montré que la production totale de NO est plus importante chez les femmes (avant la ménopause) que chez les hommes (282). De même, les œstrogènes semblent impliqués dans les différences observées entre les sexes pour la libération de NO dans les artères de rats (292, 293), et la testostérone stimulerait la production dans les artères coronaires de porc et dans le muscle lisse des artères coronaires humaines (294). Cette hypothèse reste néanmoins peu probable pour le cordon ombilical au vu des résultats obtenus par Faussett et al. Dans cette étude, ils ont montré que, de toutes les hormones sexuelles stéroïdiennes testées (17- $\beta$ -œstradiol, estriol, estrone, testostérone et progestérone) sur des veines et des artères ombilicales, seule la 17- $\beta$ -œstradiol a un effet (25 à 29% de relaxation à  $10^{-4}$  M), les autres hormones n'induisant aucun effet même à des concentrations supra-physiologiques (295).

Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence des modifications spécifiques au genre dans la voie du NO/GMPc dans le muscle lisse des veines ombilicales. Les différences semblent principalement toucher les filles RCIU, avec des altérations de la capacité à se relâcher au DEA/NO, de l'expression de la PKG et de la GCs, ainsi que de la production de GMPc (254). Ces modifications pourraient perturber la circulation fœto-placentaire et ainsi contribuer à la pathologie du RCIU. Des dysfonctions de l'endothélium spécifiques au genre ont déjà été observées chez le rat avec un RCIU; Franco et al. ont montré que le dysfonctionnement endothélial était associé à une diminution de l'activité et de l'expression de la eNOS dans les aortes des nouveau-nés garçons (291). L'inhibition des PDEs semble être une piste thérapeutique intéressante, puisqu'elle permettrait d'améliorer la circulation foeto-placentaire. Il a été montré par exemple qu'un traitement au sildénafil, un inhibiteur de la PDE5, dans des cas de grossesse avec RCIU améliorerait de façon significative la vélocimétrie ombilicale mesurée par Doppler (118), ainsi que la fonction endothéliale des vaisseaux du myomètre (111). Toutefois, le rôle des différentes isoformes de PDEs dans le développement de RCIU et les mécanismes de régulation du cordon ombilical sont encore mal compris et peuvent être controversés selon l'étude (296). Pour ce travail nous avons étudié spécifiquement la relaxation induite par stimulation de la voie du NO/GMPc au niveau du muscle lisse du cordon ombilical : nous avons en effet utilisé du NLA, un inhibiteur de la eNOS, afin de bloquer la production de NO endogène par les cellules endothéliales et stimulé la relaxation en administrant directement un donneur de NO exogène. Cependant, les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses dans la paroi du vaisseau restent essentielles pour le fonctionnement des vaisseaux sanguins et une altération du fonctionnement de ces cellules peut contribuer au développement de processus pathologiques (297).

# VI. Conclusion et perspectives

La présente étude a permis de mettre en évidence des différences significatives dans le cordon ombilical de nouveau-nés en retard de croissance comparés aux CTR, tant au niveau structurel, fonctionnel que moléculaire. Nous avons également observé un dimorphisme sexuel. L'originalité de ce projet réside dans l'accent mis sur le cordon ombilical humain, alors que la plupart des études antérieures ont investigué le rôle du placenta dans la contribution au RCIU. Quant aux études montrant des modifications dans la circulation ombilicale chez les RCIU, elles sont principalement basées sur des mesures Doppler plutôt que sur l'identification de modifications moléculaires ou mécanistiques (69, 71-73). Notre hypothèse était que, même si l'identification de modifications placentaires permettait l'élaboration d'un traitement visant à les corriger, cela resterait relativement inefficace si la circulation ombilicale est altérée, car l'approvisionnement du fœtus en nutriments et en oxygène risquerait de rester compromis. Le présent travail a donc été axé sur la veine ombilicale qui est l'unique vaisseau impliqué dans l'approvisionnement en sang du fœtus et qui pourrait donc représenter une cible potentielle pour des interventions thérapeutiques visant à améliorer la circulation du placenta vers le fœtus. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition des PDEs semble être une stratégie thérapeutique intéressante puisqu'elle permettrait d'améliorer la circulation dans la veine ombilicale.

Une des grandes forces de cette étude est l'utilisation d'une pression partielle en O<sub>2</sub> "physiologique" pour les investigations fonctionnelles. Il est important de noter qu'au niveau de la circulation fœto-placentaire, la pression partielle d'O<sub>2</sub> est d'environ 25-27 mmHg. Nous avons utilisé pour ce projet une solution gazeuse contenant 21% d'O<sub>2</sub>,



permettant de recréer des conditions se rapprochant au maximum des conditions *in utero*. Cette faible pression partielle n'a pas toujours été prise en compte, la plupart des expériences ayant été réalisées avec des solutions de gaz contenant 95% d'O<sub>2</sub> (ce qui équivaut à des pressions partielles de 300 mmHg ou plus), conditions classiquement utilisées pour les expériences en chambres à organe. Or, Templeton et al. ont montré que de fortes pressions partielles en O<sub>2</sub> augmentent le tonus du muscle lisse au niveau de l'artère ombilicale (264).

Cette étude débouche sur plusieurs perspectives. Dans un premier temps, il sera nécessaire de mesurer l'activité de la PKG, afin d'évaluer sa contribution dans l'altération de la relaxation induite par le NO. En effet, l'altération de la relaxation induite par le NO chez les filles RCIU n'est peut-être pas seulement due à une augmentation de l'activité PDEs. D'autre part, les maladies apparaissant chez l'adulte et potentiellement liées à un événement périnatal, telles que l'hypertension artérielle systémique, les maladies cardiaques ischémiques ou le diabète non insulino-dépendant, sont des états cliniques que l'on peut associer à un certain degré de dysfonction endothéliale (298-303). L'oxyde nitrique et sa voie de signalisation semblent être largement impliqués dans ces pathologies (304). Il sera donc d'un grand intérêt d'étudier la contribution de la partie endothéliale de la voie du NO/GMPc dans la relaxation des veines ombilicales. Goodfellow et al. (302) et Leeson et al. (305) ont démontré que la restriction de croissance durant la grossesse était associée à une dysfonction de la relaxation endothéliale chez l'homme. Les auteurs ont utilisé une méthode non invasive pour évaluer la dilatation dépendante de l'endothélium dans l'artère brachiale chez des enfants et ont rapporté une association significative entre un faible poids de naissance et une altération de la fonction endothéliale (291). Des altérations ont déjà été observées dans l'endothélium de nouveau-nés en retard de croissance : la relaxation à l'insuline est diminuée dans la UA et UV et l'activa-

tion de la eNOS est réduite dans les UV (l'expression de la eNOS est augmentée chez les RCIU)(306). De notre côté, les résultats obtenus par western blot ont montré une augmentation de la quantité relative de eNOS chez les filles RCIU et une diminution significative chez les garçons RCIU, suggérant que cette pathologie est également associée à des modifications dépendantes du sexe du fœtus au niveau de l'endothélium. Nous prévoyons donc d'investiguer plus en détail les altérations survenant dans l'endothélium de la veine ombilicale chez des nouveau-nés RCIU, qui viendraient s'ajouter aux modifications d'expression observées avec la eNOS. Au niveau fonctionnel, nous avons axé préférentiellement notre travail sur la veine, en raison de son rôle clé dans l'approvisionnement du fœtus. Il serait également intéressant d'étudier les artères ombilicales qui reflètent probablement des réponses adaptatives du fœtus à une altération de l'approvisionnement en sang, en oxygène et/ou en nutriments. Il a d'ailleurs été montré grâce à la technique doppler qu'une altération du flux sanguin dans les artères ombilicales pouvait être associée au RCIU (71-73). De plus, la régulation de la voie du NO et l'expression de la eNOS semblent modifiées dans ces vaisseaux (307). Par ailleurs, il serait intéressant de comparer la capacité des veines à se contracter ou se relâcher entre les deux extrémités du cordon ombilical. En effet, étant donné que la vasomotricité peut varier le long du cordon, il pourrait y avoir des différences de relaxation ou de contraction entre la "partie distale" du cordon ombilical; partie la plus proche du placenta qui est non innervée (49), et la "partie proximale" du cordon ombilical; partie la plus proche du fœtus qui a fait l'objet de cette étude. Finalement, au vu des résultats obtenus au niveau structurel, il serait intéressant de comparer la composition de la gelée de Wharton entre les groupes RCIU et AGA, ainsi que d'évaluer son rôle dans la régulation de la circulation ombilicale.

En conclusion, la physiopathologie et les processus liés à l'apparition d'un RCIU durant la grossesse ne sont pas encore totalement connus. Nos résultats pourraient permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie ombilicale et, à plus long terme, pourraient permettre de développer de nouveaux traitements dans le but d'améliorer la croissance fœtale.

## **Partie 2.**

# **Stress gestationnel et activité respiratoire, une étude sur modèle animal**

# Résumé

Le système GABAergique, au niveau du tronc cérébral, module l'activité respiratoire et subit des changements importants en début de vie. Parce que ce processus de maturation est sensible au stress, nous avons testé l'hypothèse que le stress gestationnel (SG) altère le développement et la modulation GABAergique impliquée dans le contrôle respiratoire chez les rats. Les réponses respiratoires au muscimol, un agoniste sélectif du récepteur GABA<sub>A</sub> ont été comparées entre des nouveau-nés de mères soumises à un SG (lumière vive et odeur de prédateur; durant 20 min par jour, à partir du 9<sup>e</sup> jusqu'au 19<sup>e</sup> jour de gestation) ou maintenues dans des conditions standards (contrôles). L'activité respiratoire a été mesurée sur des nouveau-nés âgés de 1 et 4 jours, pour les deux sexes, par des approches *in vivo* (pléthysmographie sur animal entier) et *in vitro* (tronc cérébral isolé).

Chez les nouveau-nés contrôles, l'injection de muscimol (0,75 mg/kg; ip) diminue la ventilation/minute. Cette réponse est réduite chez des nouveau-nés stressés et à P4, le muscimol augmente la ventilation/minute chez les filles stressées. L'application du bain de muscimol (0,01 à 0,5 M) sur les préparations de tronc cérébral diminue la fréquence et l'amplitude des décharges inspiratoires (C4) d'une manière dose-dépendante, la réponse diminuant avec l'âge. Cependant, le SG a des effets limités sur ces résultats.

En conclusion, les résultats obtenus *in vivo* sont en accord avec notre hypothèse de départ et montrent que le SG retarde la maturation de l'activité respiratoire induite par la modulation GABAergique. Les différences observés entre les approches expérimentales *in vivo* et *in vitro* indiquent que l'effet du stress prénatal sur la maturation du contrôle respiratoire par la modulation GABAergique affecte principalement les composants périphériques/métaboliques de la commande du système respiratoire.

Mots-clés : contrôle respiratoire, développement, stress prénatal

# Abstract

The GABAergic system modulates respiratory activity in the brain stem and undergoes substantial changes during early life. Because this maturation process is sensitive to stress, we tested the hypothesis that gestational stress (GS) alters development of GABAergic modulation of respiratory control in rat pups. The respiratory responses to the selective GABA<sub>A</sub> receptor agonist muscimol were compared between pups born to dams subjected to GS (bright light and predator odor; 20 min/day from G9 to G19) or maintained under standard (control) conditions. Respiratory activity was measured on 1 and 4 days old pups of both sexes using *in vivo* (whole body plethysmography) and *in vitro* (isolated brainstem-spinal cord preparation) approaches. In intact pups, muscimol injection (0.75 mg/kg; i.p.) depressed minute ventilation; this response was less in GS pups, and at P4, muscimol augmented minute ventilation in GS females. Bath application of muscimol (0.01–0.5\_M) onto brainstem preparations decreased inspiratory (C4) burst frequency and amplitude in a dose-dependent manner; the responsiveness decreased with age. However, GS had limited effects on these results. We conclude that the results obtained *in vivo* are consistent with our hypothesis and show that GS delays maturation of GABAergic modulation of respiratory activity. The differences in the results observed between experimental approaches (*in vivo* versus *in vitro*) indicate that the effect of prenatal stress on maturation of GABAergic modulation of respiratory control mainly affects the peripheral/metabolic components of the respiratory control system.

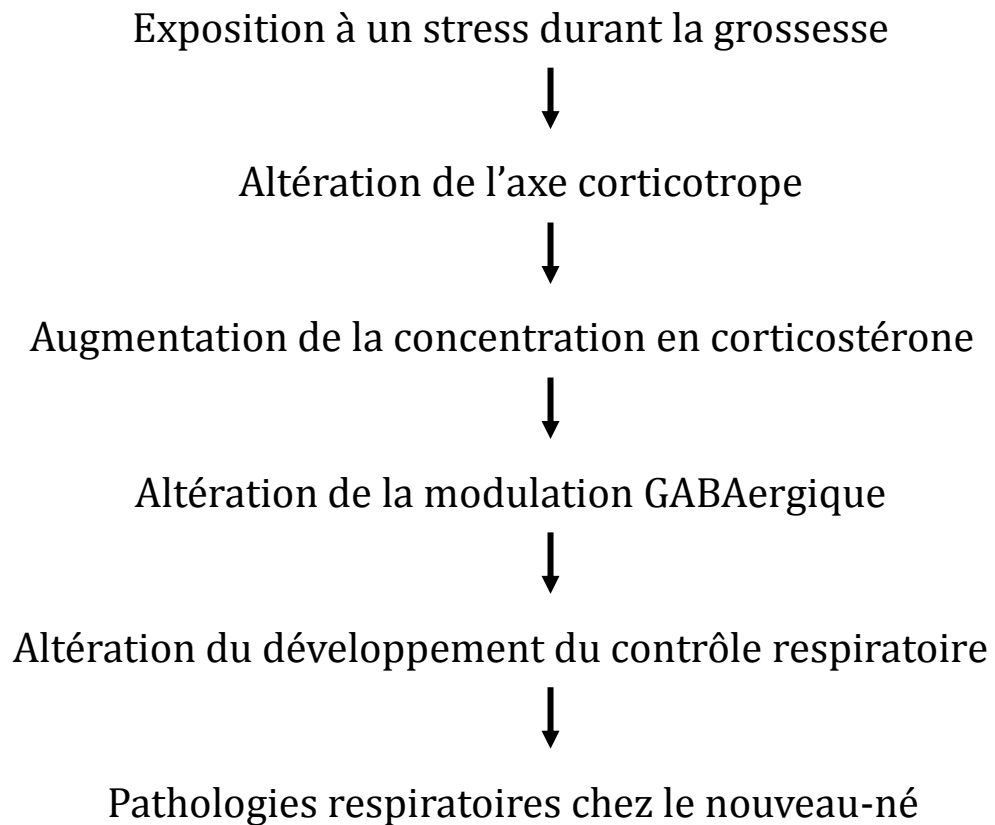
Keywords: Control of breathing, development, prenatal stress

# 1. Introduction

Tout comme le RCIU, les troubles respiratoires néonataux (TR) sont un problème important en médecine périnatale (204). Une altération du contrôle respiratoire durant la période périnatale est une cause fréquente d'admission hospitalière. Une telle altération est impliquée dans les apnées du prématuré et augmente le risque de mort subite du nourrisson. Les recherches effectuées sur les humains, les primates et les rongeurs montrent qu'une exposition au stress pendant la gestation peut modifier la trajectoire de développement du système nerveux central, ce qui va augmenter l'incidence de différents troubles neurologiques et peut perturber le fonctionnement du système de contrôle respiratoire (308-310). Compte tenu des limitations inhérentes à la recherche sur des sujets humains, liées en particulier aux facteurs de confusion tels que l'âge maternel, le style de vie et la capacité à répondre au stress ou le gérer, il est nécessaire d'utiliser d'autres approches. Des modèles expérimentaux ont été développés afin de comprendre avec précision les mécanismes sous-jacents impliqués dans les dysfonctionnements respiratoires. L'utilisation du rat comme modèle de recherche est particulièrement intéressant, car leur patrimoine génétique est aujourd'hui bien connu. De plus, il est facile de contrôler les conditions environnementales ainsi que le moment de la gestation où le facteur de stress va être appliqué. Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si l'effet d'un stress maternel prénatal pouvait altérer la modulation GABAergique impliquée dans la régulation de l'activité respiratoire chez le raton (Figure 1:1) (311). Pour cela, des mères gestantes ont été soumises à un stress psychologique à des moments précis durant la gestation (lumière vive et odeur de prédateur; 20 min/jour à partir du 9<sup>e</sup> jusqu'au 19<sup>e</sup> jour de gestation). Puis l'activité respiratoire a été



mesurée sur des nouveau-nés âgés de 1 et 4 jours par une approche *in vivo* (pléthysmographie sur animal entier) et *in vitro* (tronc cérébral isolé).



**Figure 1':1 Proposition de mécanisme conduisant aux pathologies respiratoires chez le nouveau-né.**

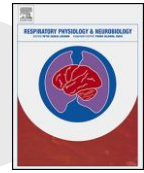
Une exposition à un stress durant la grossesse peut altérer l'axe corticotrope, ce qui induit une augmentation de la concentration de corticostérone. Cette augmentation va modifier la modulation GABAergique au niveau neuronal durant le développement du cerveau et entraîner une altération du contrôle respiratoire. Les nouveau-nés vont alors être prédisposés à différentes pathologies respiratoires.

2. Conséquences d'un stress gestationnel sur la modulation GABAergique de l'activité respiratoire chez des nouveau-nés en développement



Contents lists available at ScienceDirect

## Respiratory Physiology &amp; Neurobiology

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

## Consequences of gestational stress on GABAergic modulation of respiratory activity in developing newborn pups



Flavien Delhaes<sup>b</sup>, Stéphanie Fournier<sup>a</sup>, Jean-Francois Tolsa<sup>b</sup>, Anne-Christine Peyter<sup>b</sup>, Aida Bairam<sup>a</sup>, Richard Kinkead<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Département de Pédiatrie, Université Laval, Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Québec, QC, Canada

<sup>b</sup> Département médico-chirurgical de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland

### article info

#### Article history:

Accepted 23 May 2014

Available online 11 June 2014

#### Keywords:

Control of breathing

Development

Prenatal stress

### abstract

The GABAergic system modulates respiratory activity and undergoes substantial changes during early life. Because this maturation process is sensitive to stress, we tested the hypothesis that gestational stress (GS) alters development of GABAergic modulation of respiratory control in rat pups. The respiratory responses to the selective GABA<sub>A</sub> receptor agonist muscimol were compared between pups born to dams subjected to GS (bright light and predator odor; 20 min/day from G9 to G19) or maintained under standard (control) conditions. Respiratory activity was measured on 1 and 4 days old pups of both sexes using in vivo (whole body plethysmography) and in vitro (isolated brainstem-spinal cord preparation) approaches. In intact pups, muscimol injection (0.75 mg/kg; i.p.) depressed minute ventilation; this response was less in GS pups, and at P4, muscimol augmented minute ventilation in GS females. Bath application of muscimol (0.01–0.5 M) onto brainstem preparations decreased inspiratory (C4) burst frequency and amplitude in a dose-dependent manner; the responsiveness decreased with age. However, GS had limited effects on these results. We conclude that the results obtained in vivo are consistent with our hypothesis and show that GS delays maturation of GABAergic modulation of respiratory activity. The differences in the results observed between experimental approaches (in vivo versus in vitro) indicate that the effect of prenatal stress on maturation of GABAergic modulation of respiratory control mainly affects the peripheral/metabolic components of the respiratory control system.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Exposure to stress during early life alters the developmental trajectory of the central nervous system. Research performed on humans, primates, and rodents consistently show that exposure to stress during gestation (gestational stress, GS) increases the incidence of numerous neurological disorders in the offspring such as behavioral dysfunction, attention deficit, depression, schizophrenia, and drug abuse (Buitelaar et al., 2003; Hind and Audrey, 2008). In humans, stressful life events, depression, and anxiety during pregnancy have been associated with poor outcome at birth including a low APGAR score and increased need for resuscitation measures in infants (Markus and Miller, 2009; Ponirakis et al., 1998). These observations suggest that GS disrupts development of

the respiratory control system prior to birth; however, confounding factors such as maternal age and life style complicate data interpretation. In light of these limitations, the use of rat as a model allows better control over environmental conditions. It has recently been shown that GS is sufficient to interfere with respiratory development in newborn pups and that these effects are sex-specific (Fournier et al., 2013). By comparison with controls, apneic events are more frequent in rats born to stressed dams and this effect is proportional to the intensity of the stress response measured in the dams. While a deficit in serotonin was revealed as an important mechanism in the manifestation of GS-related respiratory abnormalities in pups (Fournier et al., 2013), the broad effects of GS on brain maturation raises the possibility that other key transmitters contribute to this abnormal development.

The influence that the GABAergic system exerts on neuronal excitability undergoes substantial changes during the perinatal period. At first, activation of GABA<sub>A</sub> receptors depolarizes neurons, but as chloride gradients are established, GABA progressively becomes the predominant inhibitory neurotransmitter of the CNS. This maturation process is sensitive to various stressors and

\* Corresponding author at: Centre de Recherche du CHU de Québec, Hôpital St-François d'Assise, 10 rue de l'Espérance, Québec, QC G1L 3L5, Canada. Tel.: +1 418 525 4444x52577; fax: +1 418 525 4195.

E-mail address: [Richard.Kinkead@crsfa.ulaval.ca](mailto:Richard.Kinkead@crsfa.ulaval.ca) (R. Kinkead).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.resphysiol.2014.05.015>

1569-9048/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

consequently, disruption of GABAergic neurotransmission has been evoked in the pathophysiology of diverse respiratory disorders in the newborn (Abu-Shaweesh and Martin, 2008; Darnall et al., 2006; Luo et al., 2004; Zhao et al., 2011). To complete our understanding of the impact of GS on respiratory control development, the present study tested the hypothesis that GS disrupts GABAergic modulation of respiratory activity in newborn rats. To address this issue, we compared the effect of the selective GABA<sub>A</sub> agonist muscimol on respiratory activity of pups born to control (undisturbed) dams versus to those from mothers subjected to GS between day 9 and 19 of gestation. We first used plethysmography to measure the ventilatory and O<sub>2</sub> consumption responses of intact pups. The second series of experiments used a reduced “en bloc” brainstem-spinal cord preparation to quantify the impact of GS on the core elements of the respiratory control system. All experiments were performed on 1 or 4 days old males and females to assess sex- and age-specific effects.

## 2. Methods

### 2.1. Animals

Experiments were performed on male and female Sprague-Dawley rats of 1 and 4 days of age (post-natal days 1 and 4 (P1 and P4), respectively). These pups were born from 46 virgin females mated in our animal care facility. Dams were supplied with food and water ad libitum and maintained in standard animal care conditions (21 °C, 12:12-h dark–light cycle: lights on at 07:00 h and off at 19:00 h) and randomly assigned to one of two experimental groups: control or gestational stress (GS; see below). Potential litter effects are a valid concern when using multiparous species in developmental studies (Wainwright et al., 2007; Zorrilla, 1997). Accordingly, this confounding factor was considered in the experimental design and data analysis. Male and female pups from each litter were equally distributed between the two experimental approaches used to record ventilatory activity (in vivo or in vitro). For each series of experiments, pups were then assigned to one of the age (P1 or P4) or drug treatment group. A total of 375 newborns were used in this study. The number of pups and litters used in each group appear in the tables. All experiments complied with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. The institutional animal care committee approved the specific protocols used in this study.

### 2.2. Gestational stress (GS) protocol

Much like immobilization (Dumont et al., 2000), novelty, bright light, and predator odor activate the neuroendocrine response to stress in rodents (Fendt and Endres, 2008). On day 9 of gestation (G9), dams were arbitrarily selected to complete their pregnancy either under control condition (standard care; n=28) or to be subjected to a GS protocol (GS; n=18) adapted from our previous study (Fournier et al., 2013). Briefly, dams assigned to GS protocol were transported outside the main housing area and placed in a contention holder. The restrained rat was then placed in a clean cage containing a piece of filter paper wetted with 35 μl of fox anal gland extract (2,5-dihydro-2,4,5-trimethylethiazoline; TMT, Pherotech, Delta, BC, Canada). A bright light was placed near the cage. The protocol was performed at 9:00 AM daily from G9 to G19 and lasted 20 min. Because the predator odor was still perceptible after removal of the paper impregnated with TMT, the dam remained in the experimental cage (with restraint) for an additional hour prior to being housed with other rats. This procedure was necessary to avoid propagating the fox odor to the main housing area. To assess the efficacy of our GS protocol, corticosterone was also measured

on the fourth day of exposure (i.e. at G12) by collecting a tail blood sample in control (undisturbed) and stressed rats.

### 2.3. Corticosterone measurement

Blood collection and plasma corticosterone measurements were performed according to standard laboratory procedures (Fournier et al., 2013). Blood was transferred from the syringe into a tube containing EDTA (microvette 500; Sarstedt). Plasma was separated by centrifugation, quickly frozen at –80 °C until assayed. Corticosterone levels were determined by an enzyme immunoassay (Assay Design). Corticosterone detection was done with a microplate spectrophotometer (Quant; Bio-Tek Instruments). The corticosterone concentration was calculated from the four-parameter logistic standard curve using Prism 6 (Graph pad software Inc., La Jolla, CA).

### 2.4. In vivo plethysmography recordings

Respiratory activity was recorded using whole body, flow-through plethysmography (Emka Technologies, Paris, France) as previously described for newborn pups (Bairam et al., 2013; Fournier et al., 2013; Niane and Bairam, 2012). The gas flow through the experimental chamber was set at about 100 ml/min and measured with a mass flowmeter (TSI model 4140, Shoreview, MN), the temperature was maintained at 34 °C (P1) or 32 °C (P4) using a temperature control system (Physitemp, Clifton, NJ). Calibration of the system was performed by rapidly injecting 0.5 ml of air into the chamber with a syringe. Tidal volume (V<sub>T</sub>) was calculated by integrating the pressure signal using specialized software (IOX, Version 1.8.9 EMKA Technology, Paris, France). Respiratory frequency (f<sub>R</sub>) and V<sub>T</sub> were recorded from the plethysmograph signal. Barometric pressure, body temperature, chamber temperature, and humidity were measured to correct and standardize V<sub>T</sub> and values were expressed in ml BTPS (Bartlett and Tenney, 1970; Drorbaugh and Fenn, 1955). These values were subsequently used to calculate minute ventilation (V<sub>E</sub> = f<sub>R</sub> × V<sub>T</sub>). Composition of the gas mixtures flowing in and out of the chamber was analyzed with an oxygen analyzer (model S-3A, Ametek, Pittsburgh, PA) for subsequent calculation of V<sub>O<sub>2</sub></sub> as an index of metabolic rate (Mortola and Dotta, 1992).

#### 2.4.1. Experimental protocol

Each rat received an intraperitoneal injection (2 μl/g) of saline (vehicle) or muscimol (specific GABA<sub>A</sub> receptor agonist; 0.75 mg/kg dissolved in saline). Preliminary experiments showed that this dose results in a robust inhibition of respiratory activity (~50% drop in breathing frequency) without compromising survival of the animal over the entire duration of the protocol. After the injection, the pup was placed in a small cage under a heating lamp for 30 min. Preliminary “time-course” experiments showed that this period is sufficient for the drug to become active and respiratory depression to reach a steady state. The rat was then placed in the plethysmography chamber breathing room air (normoxia; 21% O<sub>2</sub>). Breathing was recorded for 20 min once the pup appeared calm and breathing signal became regular (~10 min). At the end of the measurement, the chamber was opened and body temperature was measured by gently placing a small thermocouple for rodents inside the mouth of the pup (Harvard, Holliston, MA, USA). Note that performing a single measurement (rather than “before and after” injection) reduces pup handling and the duration of the protocol by at least 20 min. This ensures full efficacy of the drug and minimizes experimental stress to the animal.

## 2.5. In vitro measurements of the neural correlates of respiratory activity

The fictive respiratory activity was assessed using a reduced “en bloc” brainstem-spinal cord preparation using the procedures described previously (Fournier et al., 2013). Experiments were performed on brainstem preparations (i.e. without pons) because respiratory motor output is less likely to present episodic bursting and thus more stable. Briefly, 1 or 4 days old pups were anesthetized using cold until loss of the paw withdrawal reflex (~ 5 min). After decerebration, the brainstem-spinal cord was isolated, the pons was transected and the preparation was placed ventral side up in the recording chamber where it was superfused at 5 ml/min with artificial cerebro-spinal fluid (aCSF; composition (in mM): 129 NaCl, 3.35 KCl, 1.26 CaCl<sub>2</sub>, 1.15 MgCl<sub>2</sub>, 21 NaHCO<sub>3</sub>, 0.58 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 30 d-glucose; final pH 7.4). The aCSF was bubbled with a gas mixture of 95%O<sub>2</sub> and 5%CO<sub>2</sub> and its temperature was maintained at 26 °C (Temperature Controller TC-324B, Warner Instruments, Hamden, CT). The respiratory-related activity was recorded from the 4th cervical spinal root (C4) using a glass suction electrode. The signal was amplified (AC amplifier model 1700; A-M Systems, Everett, WA), band-pass filtered and fed to moving average (Paynter filter, Moving Averager model MA 821; CWE, Ardmore, PA). The signal was converted from analog-to-digital at 2.5 kHz and recorded in a data acquisition system (model DI-720; Dataq Instruments, Akron, OH) for further analysis.

### 2.5.1. Experimental protocol

The in vitro experiments first compared the effects of muscimol bath application on fictive breathing between control and GS pups; experiments were performed on males and females of both age groups (P1 and P4). The protocol began by recording respiratory-related motor output for 20 min; preparations were then exposed, in succession, to three increasing muscimol concentrations from another reservoir (0.01, 0.1, 0.5 M). These concentrations were selected based on preliminary results and the literature (Ren and Greer, 2006). The brainstem was exposed to each concentration for 20 min; this period is sufficient to obtain measurements that do not reflect a transient effect of the drug (Belzile et al., 2002; Kinkead et al., 2002; Onimaru et al., 1998). The final application was followed by a “wash out” period during which the preparation was superfused with drug-free aCSF for 20 min. In a second series of experiments, the specificity of the effects of muscimol application was assessed by superfusing the preparation with aCSF containing the selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline (4 or 8 M) prior to muscimol application (0.5 M). All drugs were obtained from Sigma/RBI Aldrich (St-Louis, MO) and dissolved in aCSF.

## 2.6. Data analyses

### 2.6.1. In vivo experiments

Respiratory variables ( $f_R$ ,  $V_T$ , and  $\dot{V}_{O_2}$ ) were obtained by analyzing the last 6 min of recording. These data were averaged and used to calculate  $\dot{V}_E$  and the convective requirement ratio ( $\dot{V}_E/\dot{V}_{O_2}$ ). Statistical analysis of the effects of age, sex, stress, and drug treatment were first performed on these absolute data (see below). However, between-group comparisons (and visualization) of the magnitude of the respiratory depression response induced by muscimol injection was facilitated by expressing the values obtained at the end of the measurement as a percent change from the mean value measured in pups injected with saline. ANOVA's were performed on both absolute and normalized data. The fact that results obtained with both approaches were similar validates our analyses.

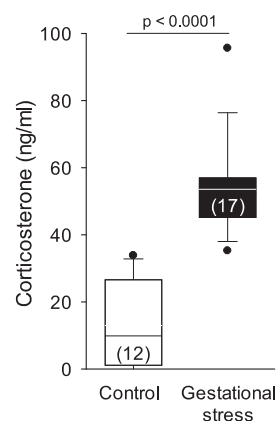


Fig. 1. Plasma corticosterone levels measured in dams on the 12th day of gestation. Box plot of the plasma corticosterone levels measured in gestating dams maintained under standard animal care conditions (control; white bars) and females subjected to gestational stress (black bars). Box boundaries correspond to the 25th and 75th percentiles (top and bottom, respectively); the line within the box indicates the median. Bars above and below show the 90th and 10th percentiles, respectively. Individual points show data outside these limits.

### 2.6.2. In vitro experiments

C4 burst frequency and amplitude values were obtained by analyzing the last 5 min of each condition. Changes in activity following muscimol or muscimol in presence of bicuculline were expressed as percent change from basal activity.

## 2.7. Statistics

Corticosterone levels were analyzed using a one-way ANOVA. A mixed analysis of variance model (mixed-effect model) was used to study the fixed effect of GS, age, sex, and drug on selected variables of interest. The mixed procedure was used with litter nested within “GS” as a random factor to take into account the correlation within animals from the same litter and thus ensure that between-group differences were not attributable to a litter effect. The advantages of this approach in developmental studies using multiparous species have been discussed elsewhere (Wainwright et al., 2007; Zorrilla, 1997). When ANOVA results indicated that a factor (or interaction between factors) was significant ( $p \leq 0.05$ ), the analysis was followed by Fisher's post hoc test, whenever appropriate. “p” values for ANOVA results are reported in the figures; results from post hoc tests are indicated by symbols in the figures. Analyses were performed using JMP (version 10; SAS Institute, Cary, NC). Data are reported as mean  $\pm$  1 SEM. Note that mean values reported in the text, tables, and figures are based on litter means (i.e. a mean value was obtained for each litter and these values were then averaged).

## 3. Results

Plasma corticosterone levels measured in dams on the 12th day of gestation show the efficiency of our stress protocol (Fig. 1). The following results illustrate the impact of GS in developing newborn pups.

### 3.1. Effects of gestational stress on body weight and basal physiology

At P1, pups born to stressed dams were lighter than controls. Weight increased with age, but at P4, stressed pups were still lighter than controls and the lowest gain was observed in female pups born to stressed dams (Table 1). In control and GS pups assigned

Table 1

Comparison of body weights between pups born from dams subjected to gestational stress versus pups born from undisturbed mothers (control).

		Control		Gestational stress		Stress effect	Age effect	Sex effect	Factorial interaction
		P1	P4	P1	P4				
Body weight (g)	♀	7,2 ± 0,3 (18; 49)	12,3 ± 0,5* (13; 45)	6,8 ± 0,3 (12; 42)	10,2 ± 0,3**† <sup>‡</sup> (11; 45)	p=0,01 F <sub>1,42</sub> =6,9	p < 0,0001 F <sub>2,359</sub> =1472,9	p < 0,0001 F <sub>1,331</sub> =27,3	Stress × age × sex p=0,01 F <sub>2,330</sub> =6,2
	♂	7,3 ± 0,3 (21; 49)	12,6 ± 0,5* (13; 52)	6,9 ± 0,4† (10; 44)	11,1 ± 0,2* (11; 44)				

Number of litters (bold) and pups per group are reported in parentheses. Data are reported as means ± SEM. Note that mean values are based on litter means. \* Different from P1 at p < 0,05. † Different from corresponding control value at p < 0,05. ‡ Different from corresponding male value at p < 0,05.

to the saline treatment, tidal volume, basal O<sub>2</sub> consumption ( $\dot{V}_{O_2}$ ) and body temperature were similar between males and females; thus these data are reported together. None of these results were affected by GS or age (Table 2). The effect of GS on basal breathing frequency was sex-specific. At P1, breathing frequency of control female pups was higher than males. These differences were not observed in GS pups and differences observed in controls were no longer present at P4 (Table 2). Consequently, similar sex-based differences in  $\dot{V}_E$  were observed in P1 pups also. However, these sex-specific effects did not translate into changes in convective ratio ( $\dot{V}_E/\dot{V}_{O_2}$ ).

### 3.2. Effects of gestational stress on respiratory responses to muscimol injection in vivo

Systemic injection of the GABA<sub>A</sub> agonist muscimol reduced all respiratory variables (including  $\dot{V}_{O_2}$ ) in all groups. Because these responses were influenced by GS, age, and sex, these results are reported as a percent change from saline treatment to facilitate their presentation (Fig. 2). In both age groups, the reduction in minute ventilation was less in pups born to stress dams (Fig. 2A and B). Though this effect of GS was observed in both age groups, the largest difference was observed in 4 days old females in which muscimol depressed minute ventilation of control pups by 35% but for GS pups, the same treatment increased minute ventilation by 5% (Fig. 2B). These effects of stress on the ventilatory response to muscimol were mainly mediated by breathing frequency (Fig. 2C and D). Tidal volume increased slightly following muscimol treatment; however, this effect did not change with age and was not affected by GS (data not shown). Muscimol reduced  $\dot{V}_{O_2}$ . At P1, this response was attenuated in GS pups and no sexual dimorphism

was observed (Fig. 2E). At P4, however, females born to stressed dams showed the largest  $\dot{V}_{O_2}$  depression in response to muscimol (Fig. 2F).

### 3.3. Effects of gestational stress on the fictive breathing at rest and in response to GABAergic drugs in vitro

Basal C4 burst frequency increased with age (Fig. 3). These values were not affected by GS and since they were similar for males and females, these data are reported together for both sexes. Addition of increasing concentration of muscimol (0,01–0,5 M) to the superfusion medium resulted in a dose-dependent depression of C4 burst frequency and amplitude (Fig. 4). The effect of muscimol on fictive breathing decreased with age. This age-dependent decrease in muscimol responsiveness was most notable on the frequency depression observed in male pups born to stressed dams. Unlike controls, frequency depression at P4 was observed only at the highest muscimol concentration (Fig. 4B).

Unlike burst frequency, none of the amplitude responses differed between males and females, and these data were pooled together (Fig. 4E and F). At P1, amplitude responses observed in GS pups were less than controls. The magnitude of the response decreased with age; this reduced responsiveness was more in controls than in preparations from GS pups (Fig. 4F).

In all groups, bath application of the selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline prevented depression of C4 activity during application of the highest muscimol concentration (0,5 M).

## 4. Discussion

The GABAergic system exerts a powerful influence on various groups of neurons that generate and regulate breathing. GABA<sub>A</sub>

Table 2

Comparison of selected physiological variables between pups born from dams subjected to gestational stress and pups born from undisturbed mothers (control) in saline injected animals.

		Control		Gestational stress		Stress effect	Age effect	Sex effect	Factorial interaction
		P1	P4	P1	P4				
Breathing frequency (breaths/min)	♀	162 ± 7 <sup>‡</sup> (5; 8)	151 ± 6 (5; 8)	140 ± 7 <sup>†</sup> (5; 9)	140 ± 5 (5; 8)	p=0,22 F <sub>1,15</sub> =1,65	p=0,42 F <sub>1,22</sub> =0,66	p=0,75 F <sub>1,45</sub> =0,11	Stress × sex p=0,02 F <sub>1,45</sub> =5,7
	♂	139 ± 4 (6; 8)	151 ± 4 (5; 7)	143 ± 5 (5; 9)	154 ± 7 (5; 8)				
Tidal volume (ml BTPS/100 g)		1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	p=0,89 F <sub>1,18</sub> =0,02	p=0,78 F <sub>1,26</sub> =0,08	p=0,55 F <sub>1,45</sub> =0,36	ND
Minute ventilation (ml BTPS/min/100 g)	♀	172 ± 10 <sup>‡</sup>	180 ± 13	163 ± 12	149 ± 13	p=0,67 F <sub>1,18</sub> =1,9	p=0,68 F <sub>1,27</sub> =0,17	p=0,40 F <sub>1,44</sub> =0,72	Stress × sex p=0,04 F <sub>1,44</sub> =4,5
	♂	148 ± 13	170 ± 14	162 ± 13	165 ± 12				
O <sub>2</sub> consumption (ml STPD/min/100 g)		4,3 ± 0,5	3,4 ± 0,8	3,8 ± 0,4	3,9 ± 0,4	p=0,99 F <sub>1,13</sub> =0,0002	p=0,31 F <sub>1,20</sub> =0,08	p=0,83 F <sub>1,41</sub> =0,05	ND
Ventilation/O <sub>2</sub> consumption		40 ± 3	69 ± 13*	49 ± 7	45 ± 6 <sup>†</sup>	p=0,24 F <sub>1,13</sub> =1,53	p=0,06 F <sub>1,20</sub> =4,0	p=0,18 F <sub>1,41</sub> =0,18	Stress × age p=0,02 F <sub>1,20</sub> =6,41
Body temperature (°C)		34,0 ± 0,1	33,6 ± 0,2	33,9 ± 0,1	33,8 ± 0,2	p=0,72 F <sub>1,57</sub> =0,13	p=0,07 F <sub>1,57</sub> =3,51	p=0,13 F <sub>1,57</sub> =2,4	ND

Number of litters (bold) and pups per group are reported in parentheses after breathing frequency. When sex-related differences are not observed, results obtained from male and female pups were pooled for that variable. Data are reported as means ± SEM. Note that mean values are based on litter means. ‡ Different from P1 at p < 0,05. † Different from corresponding control value at p < 0,05. \* Different from corresponding male value at p < 0,05.



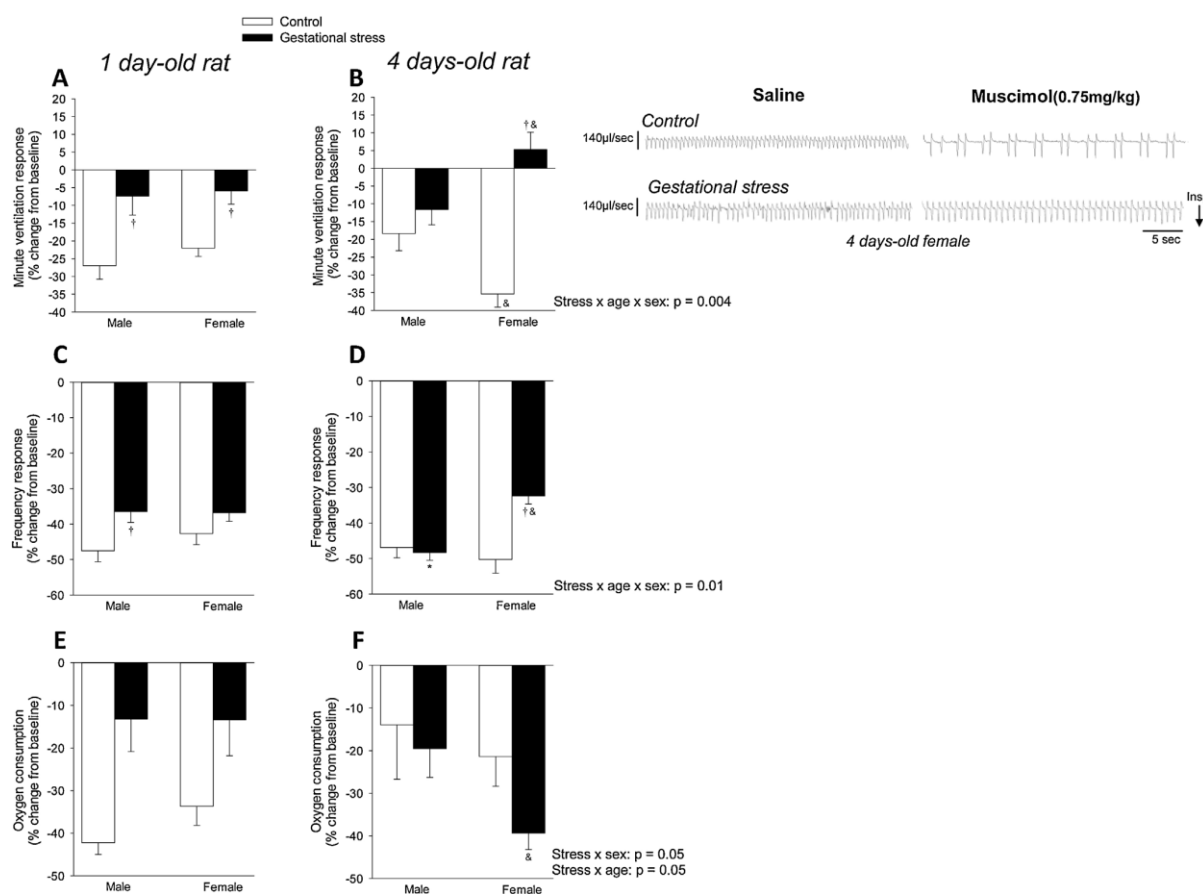


Fig. 2. Effects of gestational stress (GS) on the minute ventilation (A and B), breathing frequency (C and D), and  $O_2$  consumption (E and F) responses to systemic injection of the  $GABA_A$  agonist muscimol. Experiments were performed on 1 day old (left panels) and 4 days old pups born to control dams (white bars) and pups born to dams subjected to gestational stress (black bars). Each pup received an intraperitoneal injection of saline (2 l/g) or muscimol (0.75 mg/kg dissolved in saline). Ventilatory measurements were performed 60 min after the injection and data were obtained over the last 6 min. A representative plethysmographic recording comparing ventilatory activity in 4 days old females following saline and muscimol injection in both groups (GS versus control) is presented on the right. For each group, values obtained in muscimol-treated pups are expressed as a percent change from saline treatment and reported as means  $\pm$  SEM based on litter averages. These results were obtained from a total of 140 pups (70 controls and 70 GS) originating from 22 litters (10 controls and 10 GS); the male/female ratio was roughly similar in all groups. \*Different from P1 at  $p < 0.05$ . †Different from corresponding control value at  $p < 0.05$ . & Different from corresponding male value at  $p < 0.05$ .

receptors are present on respiratory nuclei of the brainstem and their activation typically inhibits respiratory activity. This regulatory mechanism emerges prior to birth and is fully functional in newborn mammals (Carroll, 2003; Darnall et al., 2006; Ren and Greer, 2006). However, because this maturation process can be influenced by various environmental factors (Verkuyl et al., 2005), the present study aimed to determine whether GS alters development of GABAergic modulation of respiratory activity in the first days of life. Our results showing that the respiratory depression resulting from systemic administration of muscimol (a  $GABA_A$  agonist) is substantially reduced in pups born to stressed dams (GS) is consistent with this hypothesis. Moreover, the large difference in the minute ventilation response observed in 4 days old females (in vivo) indicates that this effect of GS is sex-specific. The subsequent use of an in vitro preparation aimed to determine which aspects of these effects of GS can be ascribed to the central elements that generate and regulate breathing. The differences in the results obtained with each approach point to mechanisms outside the brainstem and highlight the scope and heterogeneity of the impact that GS exerts on GABAergic modulation of the different

components of the respiratory control system, including metabolic processes.

#### 4.1. Effectiveness of the stress protocol

Stress occurs in various forms. Whether systemic (e.g. hypoxia) or psychological (e.g. low socio-economic status), stressors ultimately trigger a neuroendocrine response to facilitate avoidance or alleviation of the initial threat, whether real or perceived. However, chronic or repeated exposure to stress has deleterious consequences on developing organisms and the negative impact of prenatal stressors such as nicotine consumption or intermittent hypoxia on respiratory control and its development illustrate this basic principle. Disruption of GABAergic modulation has been linked to those effects (Carroll, 2003; Darnall et al., 2006; Fregosi and Pilarski, 2008) and deciphering the mechanisms by which these stressors interfere with this neurotransmission is important both from a clinical and basic science perspective. However, the difficulty in distinguishing the direct effects of systemic stressors from those resulting from repeated release of stress hormones precludes

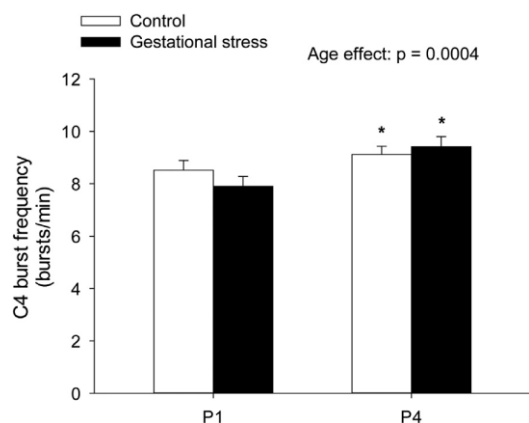


Fig. 3. Age-dependent increase in inspiratory (C4) burst frequency measured from in vitro brainstem preparation. Data were obtained under basal condition from 1 and 4 days old pups of both sexes and both groups (control: white bars; gestational stress: black bars). Note that since there is no difference between males and females, these data were pooled and are reported as means  $\pm$  SEM based on litter averages. Details concerning the number of pups and its distribution in all groups are the same as those reported in the legend for Fig. 2. \* Different from P1 at  $p < 0.05$ .

clear conclusions on this subject. To address this issue, we repeatedly exposed gestating dams to a combination of non-systemic stressors to elicit the release of stress hormones without any direct concurrent effect on the organism. While the hormone measurements obtained on G12 confirm the efficacy of our protocol, the levels achieved here were  $\sim 40\%$  lower than those reported previously (Fournier et al., 2013). This result was unexpected as we initially predicted that addition of immobilization to our predator odor protocol would augment the response. The factors responsible for this difference are uncertain, but rats can habituate to immobilization stress such that the magnitude of the corticosterone release is progressively dampened between sessions (Dumont et al., 2000). Nonetheless, birth weights and respiratory data clearly show that our GS protocol was adequate to compromise pup development and GABAergic modulation.

#### 4.2. The effects of gestational stress (GS) on GABA<sub>A</sub> modulation of respiratory regulation

GABA<sub>A</sub> receptors are the main effectors of GABAergic action. Other receptors can influence respiratory activity, but the robust responses and the fact that inactivation of GABA<sub>A</sub> receptors prior to muscimol application prevented respiratory depression confirms the selectivity of the agonist (muscimol) and importance of these receptors in respiratory regulation within the brainstem. GABA<sub>A</sub> receptors are also broadly distributed throughout the entire organism (including the carotid bodies and CNS), thus systemic injection of muscimol can elicit several interrelated responses along with respiratory depression. For instance, O<sub>2</sub> consumption is an important determinant of respiratory drive and intracisternal administration of GABA in artificially ventilated dogs reduces O<sub>2</sub> consumption independently of the central respiratory depression (Kneussl et al., 1986). Accordingly, the decrease in O<sub>2</sub> consumption is a concomitant response rather than a cause of respiratory depression following muscimol treatment. Data showing that muscimol did not affect minute ventilation in 4 days old female pups born to stressed dams despite the largest drop in O<sub>2</sub> consumption support this interpretation and illustrate the distinct actions of muscimol and the relative specificity of the effects of GS.

Except for P4 GS females, both in vivo and in vitro studies consistently highlight the strong depressant effect of muscimol on

the neural mechanisms that generate and regulate breathing frequency. However, the lack of a significant change in tidal volume following systemic muscimol injection contrasts with the dose-dependent depression of C4 burst amplitude observed in vitro. We are aware of the inherent limitations of plethysmography concerning the accuracy of tidal volume measurement in intact pups and this limitation could explain the lack of effect of muscimol on tidal volume. However, our ability to detect small tidal volume changes in newborn rats exposed to moderate hypercapnia suggests otherwise (Fournier et al., 2013). Arterial blood gases are difficult to measure in newborn; however, the respiratory depression caused by muscimol likely resulted in CO<sub>2</sub> retention and PaO<sub>2</sub> depletion that, despite reduction in O<sub>2</sub> consumption, was sufficient to activate respiratory chemoreflexes. The ensuing increase in respiratory drive could help maintain breathing (and thus tidal volume) in the face of pharmacologically induced depression of breathing frequency. Though speculative, this interpretation is supported by our recent work showing that at P4, the ventilatory response to CO<sub>2</sub> is highest in female pups born to dams subjected to GS (Fournier et al., 2013). Furthermore, brainstems from the same group showed robust decreases in burst frequency in response to muscimol application.

Unlike whole animals, in vitro experiments show that the frequency response to muscimol generally decreased with age. Though sex and GS influenced this process, age-dependent attenuation of respiratory burst depression was observed in controls also. This result is consistent with age-dependent effects of muscimol application onto in vitro "en bloc" preparations. At embryonic day 17 (E17), exposure to a similar concentration of the GABA<sub>A</sub> agonist (0.3 M) increases bursting frequency and performing this experiment with preparations from more mature animals shows that the response progressively become inhibitory (Ren and Greer, 2006). In this study, the peak inhibition was observed at E20 and the inhibitory effect of muscimol became weaker much like it has been shown here between P1 and P4. To the best of our knowledge, the factor(s) underlying this change are unknown but could reflect maturational changes in the influence exerted by other neurotransmitter systems (e.g. noradrenaline) on respiratory activity (Viemari et al., 2003).

Here, comparison of the results obtained from two distinct experimental approaches was used to discern whether disruption of GABAergic modulation of respiratory control takes place within the brainstem or elsewhere in the organism. Performing experiments in reduced medullary preparations eliminates the contribution of peripheral receptors (e.g. carotid bodies, baroreceptors) and other brain regions that modulate ventilation (e.g. pons). Each of elements can contribute to differences in the responses to GABAergic agents observed between each series of experiments. For instance, the age-dependent decrease in muscimol responsiveness observed in vitro was not observed in intact pups, except for O<sub>2</sub> consumption. Interestingly, metabolism is one of the main homeostatic processes that undergo substantial changes during the neonatal period (Mortola, 2001) and the results reported here suggest that changes in GABAergic modulation contribute to this maturation process. Besides these convergent effects, the differences between in vivo and in vitro results are not surprising, yet the factors responsible are difficult to determine with certainty. In the present context, the main difference between the two series of experiments results concerns the effects of GS. Experiments performed on intact pups clearly show that muscimol-induced respiratory inhibition is generally reduced by GS. While statistical analyses indicate that GS also affected responsiveness in vitro, these effects were relatively modest and their physiological relevance is uncertain. Accordingly, we conclude that GS interferes with GABAergic modulation of key structures that are not present in the "en bloc" preparation; the latter are numerous, but the



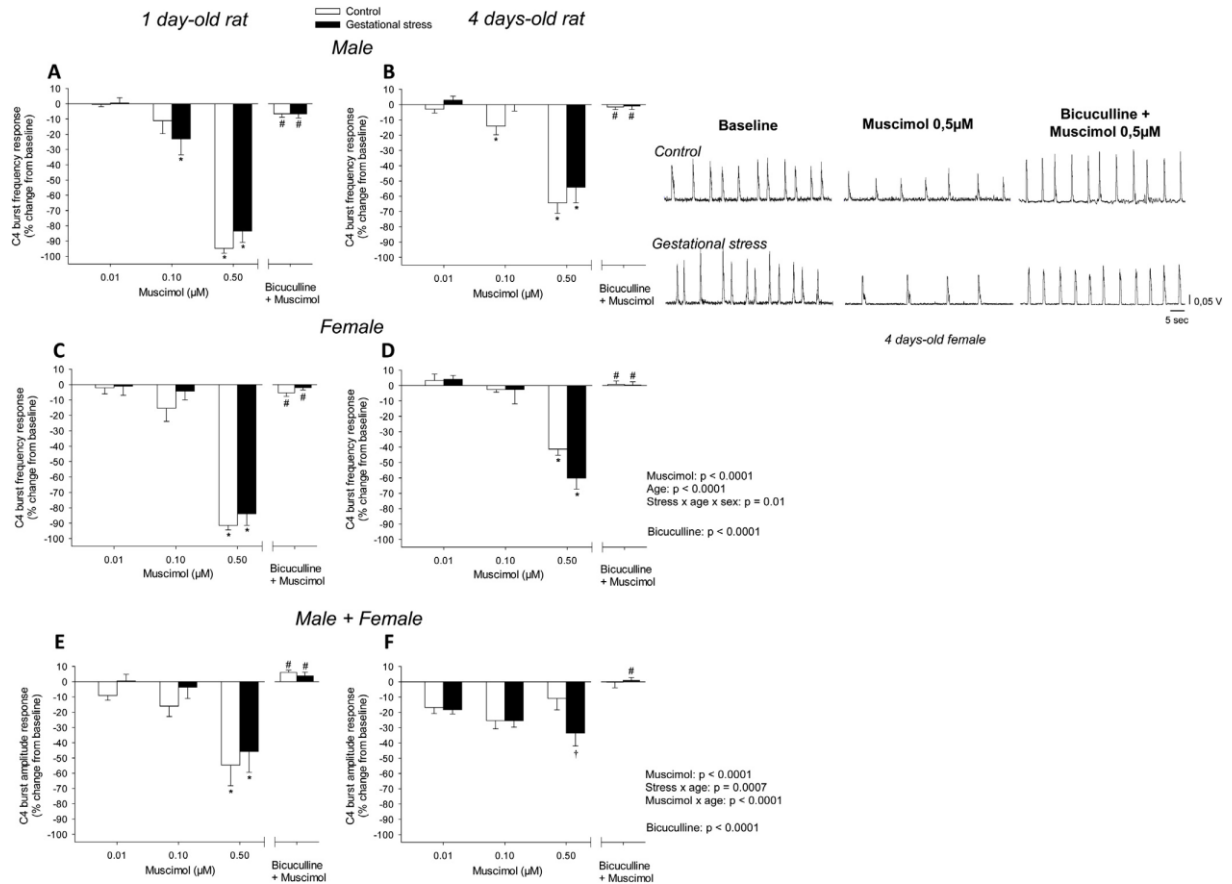


Fig. 4. Dose-dependent effects of muscimol application on inspiratory (C4) motor output during the neonatal period (P1–P4). Increasing muscimol concentrations (0.01, 0.1, and 0.5 M) were applied on brainstem-spinal cord preparations. In a separate series of experiments, the specificity of these effects was assessed by applying the selective GABA<sub>A</sub> antagonist bicuculline (4 or 8 M) prior to application of the highest muscimol concentration (0.5 M). Panels A to D show the effects on C4 burst frequency in preparations from 1 and 4 days old pups (left and right hand panels, respectively) of both sexes. The bottom panels show the effects on C4 burst amplitude in preparations from 1 and 4 days old pups (panels E and F, respectively). Note that since these data showed no sex-specific differences, these results were pooled. Data are compared between pups born from control dams (white bars) versus pups born to dams subjected to GS (black bars). All data are reported as a percentage change from baseline (pre-muscimol) and are expressed as means  $\pm$  SEM based on litter averages. These results were obtained from a total of 235 pups (128 controls and 107 GS) originating from 41 litters (25 controls and 16 GS). The male/female ratio was roughly similar in all groups. \*Different from baseline (muscimol = 0 M) at  $p < 0.05$ . #Different from the highest muscimol concentration (0.5 M) at  $p < 0.05$ . #Different from corresponding control value at  $p < 0.05$ .

carotid bodies and more rostral structures (e.g. pons) are likely candidates.

#### 4.3. Sex-based differences in the effects of gestational stress on GABAergic modulation

Much like glucocorticoids, sex hormones can influence gene expression and play an important role in early life programming of brain development. Within the central nervous system, the gonadotropic and corticotropic axes regulate secretions of these hormones and the close anatomical and functional interrelations of these regulatory processes contribute to sex-based differences in the manifestations of the consequences of stress on neurological processes. The most striking example of sexual dimorphism observed in the present study is that at P4, female pups born to GS dams show no ventilatory depression in response to muscimol injection.

Data obtained to date do not allow us to propose a definitive explanation for these sex-specific effects of GS. We know, however, that in male pups, GS augments circulating corticosterone and prevents the postnatal pulse of testosterone secretion that occurs near

P4 (Fournier et al., 2013). While these effects may explain why GS interferes with neurological development of males, the fact that GS does not increase circulating corticosterone in females brings us to consider alternate explanations for our results. Allopregnanolone (Allo) is a neuroactive steroid derived from progesterone which potentiates GABAergic inhibition (Melcangi and Panzica, 2013). During late gestation, Allo concentrations are elevated in the fetal brain. Because stress can influence Allo levels (Hirst et al., 2014), the results reported here suggest that GS attenuated Allo levels in a sex-specific fashion.

#### 4.4. Perspectives

Maturation of the GABAergic system is an important part of perinatal development and stressors that interfere with this process have been linked with a broad range of pathologies, including respiratory disorders (Darnall et al., 2006). Consumption of abuse substances (nicotine, ethanol) disrupts respiratory development and abnormal GABAergic function has been associated to these effects (Cayetanot et al., 2009; Dubois et al., 2006; Luo et al., 2004). Since these "external" factors can activate the neuroendocrine

axis, elevated stress hormones during gestation may contribute to abnormal development. Stress and glucocorticoids can alter GABAergic function (Hewitt et al., 2009; Majewska, 1987) and our results indicating that GS is sufficient to disrupt GABAergic modulation of respiratory control are consistent with this hypothesis.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Mélanie Pelletier for her help with animal care. This research was supported by an operating grant (RK and AB) from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 119337). RK was supported by the Canada Research Chair in Respiratory Neurobiology. FD's visit to Canada was supported by Le Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique (Swiss National Foundation; subside n° 32003B.138491).

#### References

- Abu-Shaweesh, J.M., Martin, R.J., 2008. Neonatal apnea: what's new? *Pediatr. Pulmonol.* 43, 937–944.
- Bairam, A., Lumbruso, D., Joseph, V., 2013. Effect of progesterone on respiratory response to moderate hypoxia and apnea frequency in developing rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 185, 515–525.
- Bartlett Jr., D., Tenney, S.M., 1970. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* 10, 384–395.
- Belzile, O., Gulemetova, R., Kinkead, R., 2002. Role of 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors in serotonergic modulation of respiratory motor output during tadpole development. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 133, 277–282.
- Buitelaar, J.K., Huizink, A.C., Mulder, E.J., de Medina, P.G.R., Visser, G.H.A., 2003. Prenatal stress and cognitive development and temperament in infants. *Neurobiol. Aging* 24, S53–S60.
- Carroll, J.L., 2003. Plasticity in respiratory motor control: invited review: developmental plasticity in respiratory control. *J. Appl. Physiol.* 94, 375–389.
- Cayetant, F., Larnicol, N., Peyronnet, J., 2009. Antenatal environmental stress and maturation of the breathing control, experimental data. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 168, 92–100.
- Darnall, R.A., Ariagno, R.L., Kinney, H.C., 2006. The late preterm infant and the control of breathing, sleep, and brainstem development: a review. *Clin. Perinatol.* 33, 883–914, abstract x.
- Drorbaugh, J.E., Fenn, W.O., 1955. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16, 81–87.
- Dubois, C., Naassila, M., Daoust, M., Pierrefiche, O., 2006. Early chronic ethanol exposure in rats disturbs respiratory network activity and increases sensitivity to ethanol. *J. Physiol. (Lond.)* 576, 297–307.
- Dumont, E.C., Kinkead, R., Trotter, J.F., Gosselin, I., Drolet, G., 2000. Effect of chronic psychogenic stress exposure on enkephalin neuronal activity and expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neurochem.* 75, 2200–2211.
- Fendt, M., Endres, T., 2008. 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor – just repugnant or really fear-inducing? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1259–1266.
- Fournier, S., Steele, S., Julien, C., Gulemetova, R., Caravagna, C., Soliz, J., Bairam, A., Kinkead, R., 2013. Gestational stress promotes pathological apneas and sex-specific disruption of respiratory control development in newborn rat. *J. Neurosci.* 33, 563–573.
- Fregosi, R.F., Pilarski, J.Q., 2008. Prenatal nicotine exposure and development of nicotinic and fast amino acid-mediated neurotransmission in the control of breathing. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164, 80–86.
- Hewitt, S.A., Wamsteeker, J.I., Kurz, E.J., Bains, J.S., 2009. Altered chloride homeostasis removes synaptic inhibitory constraint of the stress axis. *Nat. Neurosci.* 12, 438–443.
- Hind, B., Audrey, F.S., 2008. Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 22, 438–466.
- Hirst, J.J., Kelleher, M.A., Walker, D.W., Palliser, H.K., 2014. Neuroactive steroids in pregnancy: key regulatory and protective roles in the foetal brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 139, 144–153.
- Kinkead, R., Belzile, O., Gulemetova, R., 2002. Serotonergic modulation of respiratory motor output during tadpole development. *J. Appl. Physiol.* 93, 936–946.
- Kneussl, M.P., Pappagianopoulos, P., Hoop, B., Kazemi, H., 1986. Effect of centrally administered gamma-aminobutyric acid on metabolic function. *J. Appl. Physiol.* 61, 472–476.
- Luo, Z., Costy-Bennett, S., Fregosi, R.F., 2004. Prenatal nicotine exposure increases the strength of GABA(A) receptor-mediated inhibition of respiratory rhythm in neonatal rats. *J. Physiol.* 561, 387–393.
- Majewska, M.D., 1987. Antagonist-type interaction of glucocorticoids with the GABA receptor-coupled chloride channel. *Brain Res.* 418, 377–382.
- Markus, E.M., Miller, L.J., 2009. The other side of the risk equation: exploring risks of untreated depression and anxiety in pregnancy. *J. Clin. Psychiatry* 70, 1314–1315.
- Melcangi, R.C., Panzica, G.C., 2013. Allopregnanolone: state of the art. *Prog. Neurobiol.* 113, 1–5.
- Mortola, J.P., 2001. *Respiratory Physiology of Newborn Mammals: A Comparative Perspective*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Mortola, J.P., Dotta, A., 1992. Effects of hypoxia and ambient temperature on gaseous metabolism of newborn rats. *Am. J. Physiol.* 263, R267–R272.
- Niane, L.M., Bairam, A., 2012. Age-dependent changes in breathing stability in rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 758, 37–41.
- Onimaru, H., Shamoto, A., Homma, I., 1998. Modulation of respiratory rhythm by 5-HT in the brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Pflügers Arch.* 435, 485–494.
- Ponirakis, A., Susman, E.J., Stifter, C.A., 1998. Negative emotionality and cortisol during adolescent pregnancy and its effects on infant health and autonomic nervous system reactivity. *Dev. Psychobiol.* 33, 163–174.
- Ren, J., Greer, J.J., 2006. Modulation of respiratory rhythmogenesis by chloride-mediated conductances during the perinatal period. *J. Neurosci.* 26, 3721–3730.
- Verkuyf, J.M., Karst, H., Joels, M., 2005. GABAergic transmission in the rat paraventricular nucleus of the hypothalamus is suppressed by corticosterone and stress. *Eur. J. Neurosci.* 21, 113–121.
- Viemari, J.C., Burnet, H., Bevenegut, M., Hilaire, G., 2003. Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm-generator: in vivo and in vitro studies. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1233–1244.
- Wainwright, P.E., Leatherdale, S.T., Dubin, J.A., 2007. Advantages of mixed effects models over traditional ANOVA models in developmental studies: a worked example in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *Dev. Psychobiol.* 49, 664–674.
- Zhao, J., Gonzalez, F., Mu, D., 2011. Apnea of prematurity: from cause to treatment. *Eur. J. Pediatr.* 170, 1097–1105.
- Zorrilla, E.P., 1997. Multiparous species present problems (and possibilities) to developmentalists. *Dev. Psychobiol.* 30, 141–150.

### 3. Principaux résultats

Ce modèle rend possible l'étude approfondie des modifications du contrôle respiratoire résultant de l'exposition *in utero* à un stress. Sur le plan physiologique, on observe une tendance à la diminution du poids des nouveau-nés stressés comparés à ceux issus d'une gestation normale, la diminution la plus importante étant observée chez les filles à P4. Le niveau de corticostérone plasmatique est significativement augmenté chez les mères soumises à un SG, ce qui confirme l'efficacité de notre protocole de stress et indique une dérégulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS).

Chez les nouveau-nés contrôles, l'injection de muscimol (0,75 mg/kg; ip) diminue la ventilation/minute. Cette réponse est réduite chez les nouveau-nés stressés et à P4, le muscimol augmente même la ventilation minute chez les filles stressées. L'application du bain de muscimol (0,01 à 0,5 M) sur les préparations de tronc cérébral diminue la fréquence et l'amplitude des décharges inspiratoires (C4) d'une manière dose-dépendante, la réponse diminuant avec l'âge. Cependant, le SG a des effets limités sur ces résultats.

En conclusion, les résultats obtenus *in vivo* sont en accord avec notre hypothèse de départ et montrent que le SG influence la modulation de l'activité respiratoire par le GABA. Les différences dans les résultats obtenus par les deux approches expérimentales (*in vivo* par rapport à *in vitro*) indiquent que l'effet du stress prénatal sur la maturation du contrôle respiratoire par la modulation GABAergique affecte principalement les composants périphériques de la commande du système respiratoire. Ces modifications pourraient contribuer aux irrégularités respiratoires chez les nouveau-nés et en particulier chez les prématurés.

## VII. Conclusion générale

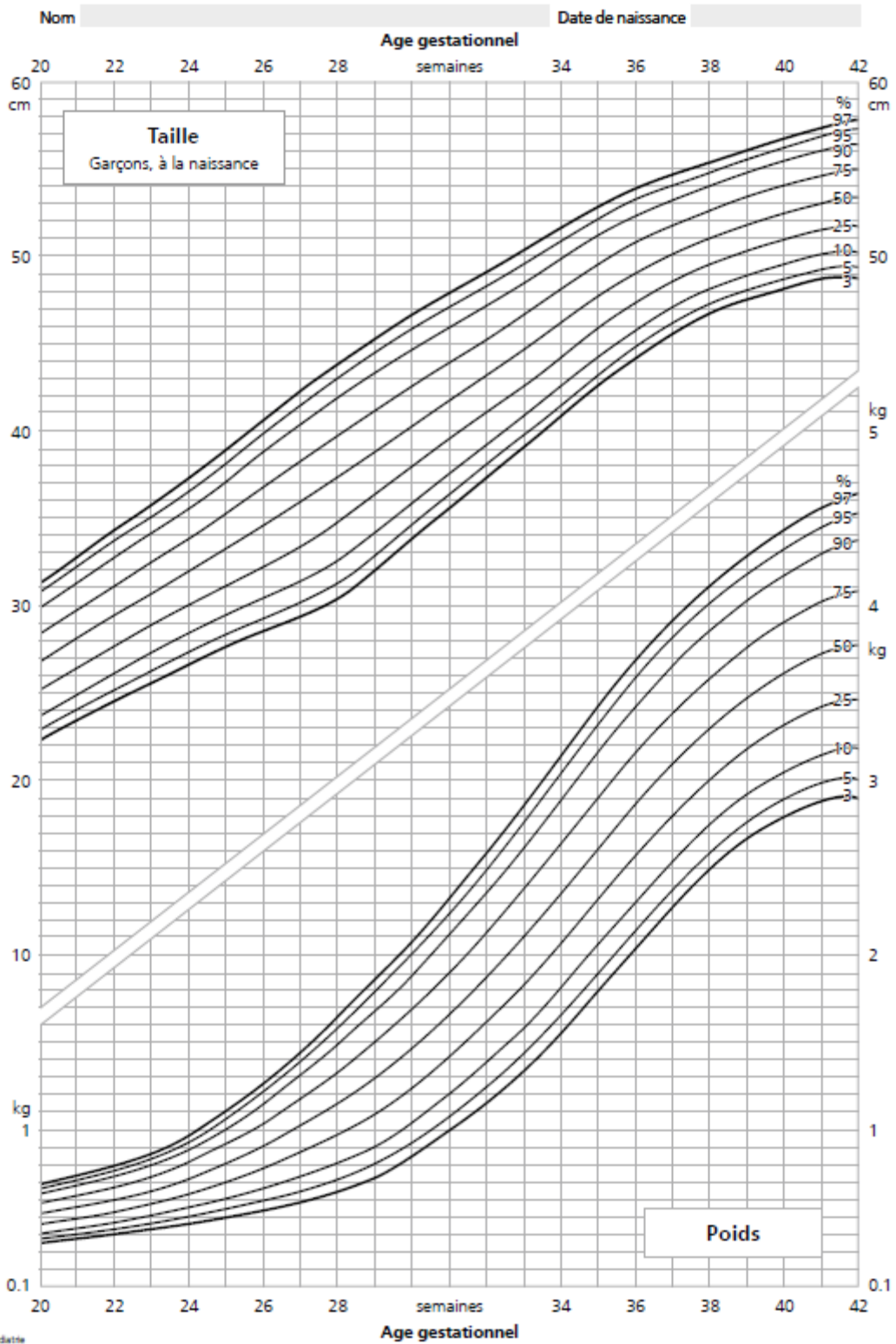
Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence des modifications structurelles dans le cordon ombilical de nouveau-nés présentant un RCIU, ainsi que des changements fonctionnels et moléculaires dans la veine ombilicale, en particulier dans la voie du NO/GMPc, qui pourraient contribuer au développement du RCIU. L'effet bénéfique de l'inhibition des PDEs sur la relaxation de la veine ombilicale suggère que ces PDEs pourraient constituer des cibles thérapeutiques potentielles. Les résultats obtenus permettent une meilleure compréhension des changements se mettant en place en cas de RCIU, et ont l'avantage d'être directement applicables puisque réalisés sur un modèle humain. Néanmoins, d'autres investigations seront nécessaires pour déterminer la contribution des autres composants moléculaires.

L'étude menée sur le modèle animal de rat a permis de mettre en évidence qu'une exposition *in utero* à un stress pouvait modifier la modulation de l'activité respiratoire par le GABA. Ces modifications pourraient contribuer aux irrégularités respiratoires chez les nouveau-nés et en particulier chez les prématurés. La grande force de cette étude est qu'elle permet de comprendre avec précision les mécanismes sous-jacents impliqués dans les dysfonctionnements respiratoires. Toutefois, les résultats obtenus ne sont pas directement applicables à l'homme et nécessitent d'autres investigations.

Ces deux travaux ont permis de mettre évidence qu'un stress/facteur pathologique durant la grossesse pouvait modifier le développement fœtal ainsi que le fonctionnement de ses annexes, dans notre cas le cordon ombilical. Pour ces deux travaux, l'analyse séparée des données obtenues chez les garçons et les filles a permis de mettre en évidence des modifications spécifiques au genre. Ces résultats démontrent qu'il existe de nombreuses différences entre garçons et filles et ceci dès la conception. Il est donc important

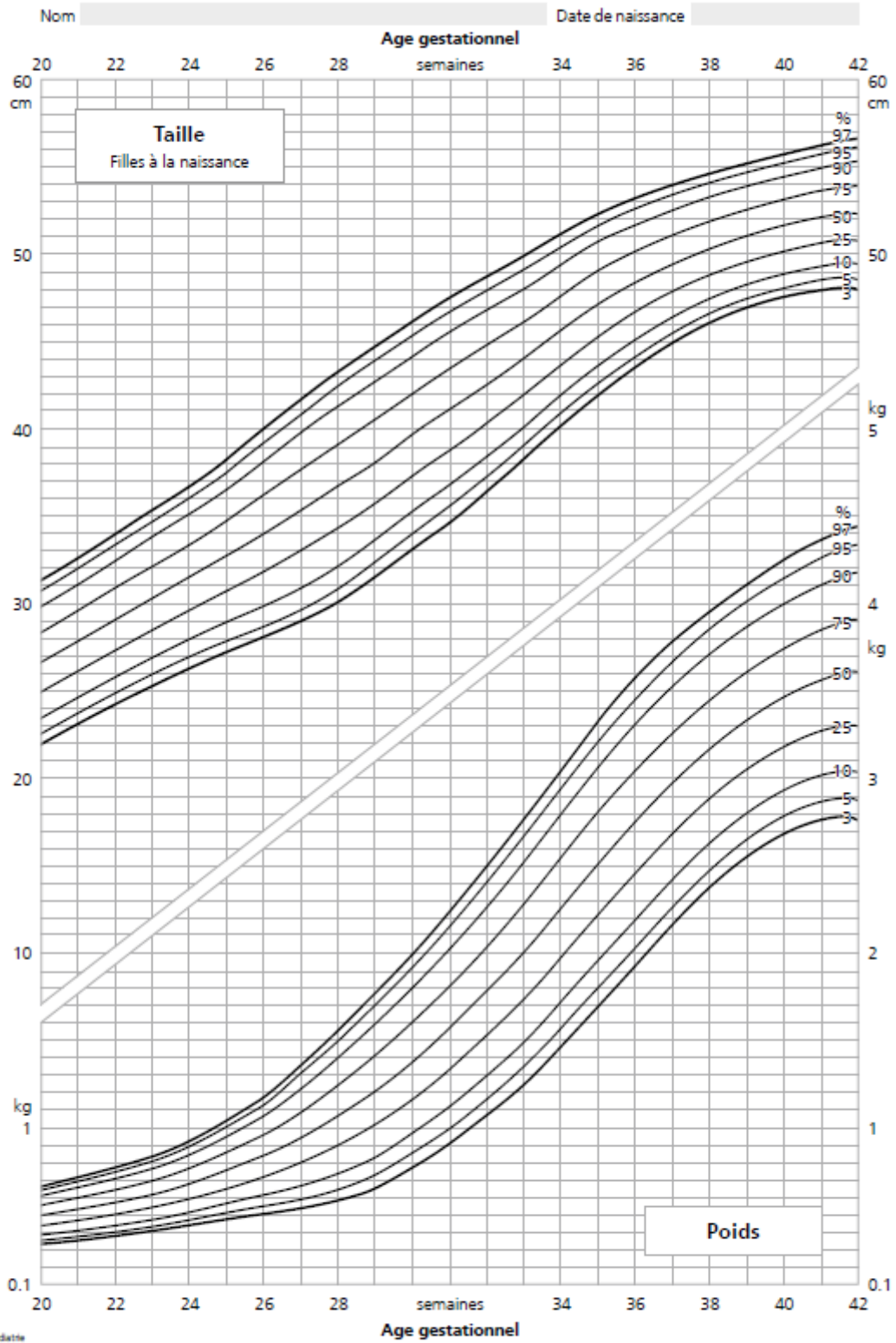
de prendre en compte ce facteur dans le cadre de démarches scientifiques, de la mise en place des protocoles scientifiques et dans toute analyse traitant de la santé ou de la maladie.

# Annexes



12/09/2012

Basé sur le programme "courbes de croissance" de la Clinique pédiatrique universitaire de Zurich (Pediatria 2011, Vol. 22, No 1)  
Source: M. Veinger, A., Analyse des Négabionnetabellen der Bundesrepublik Deutschland, Geburt Frauenheilk. 2006; 66: 956-970



Ces courbes de percentiles sont valables pour les paramètres de croissance à la naissance et ne sont pas indiquées comme référence pour la croissance postnatale.





## Intrauterine growth restriction is associated with structural alterations in human umbilical cord and decreased nitric oxide-induced relaxation of umbilical vein



A.-C. Peyter<sup>a,\*</sup>, F. Delhaes<sup>a,1</sup>, D. Baud<sup>b</sup>, Y. Vial<sup>b</sup>, G. Diaceri<sup>a</sup>, S. Menetrey<sup>a</sup>, P. Hohlfeld<sup>b</sup>, J.-F. Tolsa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Neonatal Research Laboratory, Clinic of Neonatology, Department of Pediatrics, Lausanne University Hospital, 1011 Lausanne, Switzerland

<sup>b</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Lausanne University Hospital, 1011 Lausanne, Switzerland

### article info

#### Article history:

Accepted 25 August 2014

#### Keywords:

Intrauterine growth restriction  
Human umbilical vein  
Umbilical cord  
Morphometry  
Vasodilatation  
Nitric oxide

### abstract

**Introduction:** Intrauterine growth restriction (IUGR) affects ~8% of all pregnancies and is associated with major perinatal mortality and morbidity, and with an increased risk to develop cardiovascular diseases in adulthood. Despite identification of several risk factors, the mechanisms implicated in the development of IUGR remain poorly understood. In case of placental insufficiency, reduced delivery of oxygen and/or nutrients to the fetus could be associated with alterations in the umbilical circulation, contributing further to the impairment of maternofetal exchanges. We compared the structural and functional properties of umbilical cords from growth-restricted and appropriate for gestational age (AGA) term newborns, with particular attention to the umbilical vein (UV).

**Methods:** Human umbilical cords were collected at delivery. Morphological changes were investigated by histomorphometry, and UV's reactivity by pharmacological studies.

**Results:** Growth-restricted newborns displayed significantly lower growth parameters, placental weight and umbilical cord diameter than AGA controls. Total cross-section and smooth muscle areas were significantly smaller in UV of growth-restricted neonates than in controls. Maximal vasoconstriction achieved in isolated UV was lower in growth-restricted boys than in controls, whereas nitric oxide-induced relaxation was significantly reduced in UV of growth-restricted girls compared to controls.

**Conclusion:** IUGR is associated with structural alterations of the UV in both genders, and with a decreased nitric oxide-induced relaxation in UV of newborn girls, whereas boys display impaired vasoconstriction. Further investigations will allow to better understand the regulation of umbilical circulation in growth-restricted neonates, which could contribute to devise potential novel therapeutic strategies to prevent or limit the development of IUGR.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Numerous epidemiological studies have associated adverse events occurring during the perinatal period with the development of chronic diseases in adulthood. Intrauterine growth restriction (IUGR), defined as a failure of the fetus to reach its full growth potential, is a common complication, affecting approximately 8% of all pregnancies. It is the second leading cause of perinatal mortality,

after prematurity. Besides perinatal complications, growth-restricted newborns are at increased risk of long-term neurological and developmental disorders. Moreover, they displayed a higher incidence of chronic diseases later in life, like coronary heart disease, systemic hypertension, stroke and non-insulin-dependent diabetes mellitus [1e6].

The mechanisms implicated in the development of IUGR are poorly understood, even though some maternal risk factors have been identified, such as maternal diseases (e.g. systemic arterial hypertension, lupus, renal insufficiency), malnutrition, mother's stress, strenuous work, as well as tobacco, alcohol and drug abuse [7]. Etiologies of IUGR are multiple and can be of fetal, placental, or maternal origins [8]. Placental insufficiency is associated with a decrease in maternofetal exchanges and is present in almost all

\* Corresponding author. Neonatal Research Laboratory, Clinic of Neonatology, Department of Pediatrics, Lausanne University Hospital, Maternity/C103-110, 1011 Lausanne, Switzerland. Tel.: þ 41 21 314 36 96; fax: þ 41 21 314 34 77.

E-mail address: [Anne-Christine.Peyter@chuv.ch](mailto:Anne-Christine.Peyter@chuv.ch) (A.-C. Peyter).

<sup>1</sup> Equal contribution to the present study.

cases of IUGR. Adequate fetal growth is primarily determined by nutrient availability and IUGR is associated with a reduction in oxygen and nutrients supply across the placenta [9]. The placenta can adapt to maternal environment by changing its size, structure and function, hence its contribution to fetal programming [10]. Placental insufficiency induces also adaptive mechanisms in the fetus, including modifications in fetal circulation, metabolism and endocrinology [11].

There is currently no efficient way to prevent or treat IUGR, but only potential preventive approaches to reduce risk factors, mainly by modifying mother's health behavior [7,12]. Identifying high-risk pregnancies is key in order to prevent or alleviate the consequences of poor fetal growth. Prenatal IUGR screening is based on ultrasonographic biometrical measurements of the fetus, as well as Doppler velocimetry of some relevant vessels [13e16]. Management of IUGR is mainly based on careful monitoring of fetal growth and biophysical profile. Premature delivery is often the only issue when fetal adaptation is overwhelmed, contributing to further increased risk of perinatal mortality and morbidity. Additional understanding of the mechanisms implicated in the development of IUGR and in the fetal programming of adult diseases is necessary to develop novel strategies to prevent or limit IUGR and its consequences.

The fetus survival and development depend mainly on the functional integrity of the maternal-placental-fetal circulation. In humans, umbilical arteries (UA) and vein (UV) are extremely long and muscular, contributing largely to the total umbilical-placental vascular resistance, whereas the placental microcirculation is characterized by low resistance [17]. IUGR has been linked to decreased umbilical blood flow and abnormal umbilical circulation, as shown by Doppler velocimetry [16,18e20]. Umbilical vascular tone is regulated by numerous vasoactive factors, such as nitric oxide (NO), calcitonin gene-related peptide, endothelin-1 and thromboxane [17]. Umbilical vasoreactivity was shown in vitro to vary along the umbilical cord (UC) [21], and to depend on gestational age [22] and experimental conditions, particularly the level of oxygenation [23e25].

We therefore hypothesized that IUGR could be related to structural and functional alterations in UC. Placental insufficiency and the resultant reduction in oxygen and/or nutrients delivery to the fetus could be associated with alterations in the regulation of umbilical vascular tone. Altered umbilical vasoreactivity could be either a direct consequence of placental insufficiency, or play a role among the global components of underlying pathologies resulting in decreased maternale fetal exchanges and finally IUGR.

This study therefore focused on identification of structural and functional alterations occurring in UC of growth-restricted newborns, with particular attention to UV, which is the only vessel to conduct the blood from the placenta to the fetus. In the present report, structural modifications were assessed by morphometrical measurements, whereas NO-induced relaxation was used to evaluate functional properties.

## 2. Methods

### 2.1. Samples collection e inclusion and exclusion criteria

The present study was approved by the ethical committee of the Faculty of Biology and Medicine of the University of Lausanne (protocol number 134/08).

Umbilical cords of 285 newborns delivered at the Maternity of the University Hospital CHUV in Lausanne (Switzerland) were collected between June 2009 and July 2013. Demographic and medical data were prospectively collected for each patient in our digital medical record system.

Inclusion criteria were term ( $\geq 37$  accomplished weeks of gestation) singleton pregnancies of either IUGR or AGA fetuses.

Exclusion criteria were fetal abnormalities, genetic syndromes, mothers presenting with HIV, hepatitis A, B or C, preeclampsia, single umbilical artery, and neonates with a birth weight  $>P90$ .

Based on measurements of body weight at birth, newborns were dichotomized into two categories: IUGR and AGA controls. Samples were assigned to the control group when birth weight was between P10 and P90, and to the IUGR group when birth weight was  $<P10$ . The percentile classification was determined according to growth charts endorsed by the Swiss Society of Pediatrics [26]. When available, prenatal data (e.g. estimated fetal weight) were used to determine whether a growth curve break occurred, namely a significant change in percentiles, in order to distinguish "IUGR" from constitutive "Small for Gestational Age", as proposed by Barker et al. [27]. Male and female neonates were studied separately.

Umbilical cords were collected at delivery, and used within 24 h. Because vasoreactivity was shown to vary along the UC [21], we decided to focus on the segment closer to the fetus. Umbilical cords were cut as close as possible to the fetus, and a 10e15-cm segment was kept at 4 °C in deoxygenated modified Krebs Ringer solution (118.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, and 11.1 mM glucose) until dissection.

Before dissection, UC diameter (UCD) was measured at three different places of the considered portion to calculate the average UCD for each patient.

For technical reasons, it was not possible to perform all types of experiments in each UC. However, we checked that each subset of samples used for the various experiments was representative of the entire population included in this study.

### 2.2. Histomorphological studies

A 1-cm length segment of UC was harvested, fixed in paraformaldehyde (PFA 4% 2 h, 4 °C) and paraffin embedded. Five-mm microtome sections were stained according to standard procedures using hematoxylin/eosin, as well as Masson's trichrome or resorcin/fuchsin to unequivocally distinguish UV from UA in tissue sections. Histomorphometrical measurements were performed using a Leica stereomicroscope (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) and ImageJ software (National Institutes of Health) to determine total cross-sectional area (CSA) of the cord, umbilical vessels' CSA, the luminal and smooth muscle (SM) areas of each vessel, and the area of Wharton's jelly (WJ) [28]. Three sections were analyzed for each patient, by two independent experimenters. Histomorphological data represent the mean of these measurements.

### 2.3. Pharmacological studies

The vascular reactivity of UV was investigated by isolated vessel tension studies, adapted from our previous experiments [29]. Briefly, UV was carefully dissected and cut into small rings (4e5 mm length). Each ring was suspended into an organ chamber filled with modified Krebs Ringer solution, with two stirrups (0.35 mm diameter) passed through the lumen. Preliminary experiments, performed as previously described [30], displayed that a 2-g stretch tension allowed umbilical vessels to achieve maximal contractile response to 100 mM KCl. A 2 g stretch tension was therefore applied to each vessel ring, followed by 20-min equilibration before washing. Stretch/equilibration/wash steps were repeated still three times, in order to get the vessels to their optimal resting tension (RT). After equilibration, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (10<sup>-4</sup> M) and indomethacin (10<sup>-5</sup> M) were added in order to exclude possible interference of endogenous NO and prostanooids, respectively. Preliminary experiments determined that 10<sup>-5</sup> M serotonin (5-HT) or 10<sup>-6</sup> M U46619, an analog of thromboxane A<sub>2</sub>, induced a sustained contraction in umbilical vessels. Vascular rings were pre-contracted by 5-HT or U46619, and relaxant response to cumulative doses of the NO-donor 2-(N,N-Diethylamino)-diazololate-2-oxide (DEA/NO) (10<sup>-8</sup>e10<sup>-4</sup> M) was then tested. Change in tension induced by DEA/NO was expressed as percent of the initial contraction induced by the vasoconstrictor (residual tension, RDT). Non-linear regression analysis was performed to calculate E<sub>max</sub> and EC<sub>50</sub> for each dose response curve.

Because umbilical vessels' reactivity was shown to depend on the partial pressure in oxygen (PO<sub>2</sub>) and pH [24,25], in utero conditions (PO<sub>2</sub> 23e29 mm Hg and pH 7.35 in UV) [31,32] were reproduced as closely as possible. Cords were therefore harvested in a deoxygenated physiological solution and UV vasoreactivity was tested in the presence of low PO<sub>2</sub> and pH near the fetal physiological pH. We obtained such conditions by bubbling 21% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, balanced with nitrogen, in organ chambers filled with modified Krebs Ringer solution maintained at 37.5 °C. PO<sub>2</sub> was assessed using an in-line electrode as previously described [33]. In our system, such experimental conditions led to PO<sub>2</sub> values of 25e27 mm Hg and pH of 7.32e7.38. As comparison, bubbling with 95% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> in the same conditions led to PO<sub>2</sub> of 6e7 mm Hg with in-line electrode.

### 2.4. Data analyses

Statistical analyses were performed using InStat 3.0 or Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Unless otherwise specified, data observed in growth-restricted newborns were compared to controls using the Mann-Whitney test. Two-way ANOVA was performed to compare the dose response curves in isolated vessel tension studies. The difference was considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

The efficiency (E<sub>max</sub>) and sensitivity (EC<sub>50</sub>) related to DEA/NO-induced relaxation were calculated by non-linear regression analysis of the dose response curves, using Prism 4.0.

Table 1  
Demographic data related to all patients included in this study.

	Girls			Boys		
	Ctrl	IUGR	P-value	Ctrl	IUGR	P-value
Number of patients included	82	59		88	56	
Maternal data						
Maternal age (years)	31.6 ± 5.8	31.0 ± 5.0	0.4568	32.6 ± 4.9	30.8 ± 5.8	0.0591
Smoking (yes/no)	9/51 (22 n/a)	14/40 (5 n/a)	0.1669#	9/52 (27 n/a)	16/23 (17 n/a)*	0.0044#
Primigravida (% (range gravidity))	30 (1e 8)	47 (1e 6)*	0.0357#	40 (1e 6)	34 (1e 7)	0.5991#
Primiparity (% (range parity))	49 (1e 5)	64 (1e 5)	0.0585#	59 (1e 6)	68 (1e 8)	0.2106#
Pathological Doppler (yes/no)	1/46 (35 n/a)	1/40 (18 n/a)	1.0000#	1/48 (39 n/a)	4/32 (20 n/a)	0.1576#
Neonatal data						
Gestational age (weeks)	39.5 ± 0.9	39.4 ± 1.0	0.9682	39.4 ± 1.1	39.4 ± 1.1	0.6707
Apgar score 1 min (median, range)	9 (3e 10)	9 (2e 10)	0.8536	9 (3e 10)	9 (4e 10)	0.8859
Apgar score 5 min (median, range)	10 (8e 10)	10 (7e 10)	0.5828	10 (8e 10)	10 (8e 10)	0.0565
Apgar score 10 min (median, range)	10 (9e 10)	10 (7e 10)	0.6013	10 (9e 10)	10 (9e 10)	0.8359
pH UA	7.27 ± 0.06	7.25 ± 0.08	0.0760	7.25 ± 0.06	7.23 ± 0.07	0.1972
pH UV	7.35 ± 0.06	7.32 ± 0.07*	0.0058	7.33 ± 0.06	7.32 ± 0.06	0.2389
Birth weight (g)	3297 ± 304y	2614 ± 247*	<0.0001	3418 ± 328y	2693 ± 268*	<0.0001
Length (cm)	49.0 ± 1.5	46.7 ± 1.8*	<0.0001	49.4 ± 1.8	47.0 ± 1.6*	<0.0001
Head circumference (cm)	34.4 ± 1.1y	32.8 ± 1.1*y	<0.0001	35.1 ± 1.0y	33.4 ± 1.3*y	<0.0001
Ponderal index (g/cm <sup>3</sup> )	2.80 ± 0.22	2.58 ± 0.25*	<0.0001	2.83 ± 0.21	2.59 ± 0.19*	<0.0001
Placental weight (g)	618.0 ± 126.1	450.9 ± 92.1*	<0.0001	614.4 ± 121.7	446.3 ± 84.7*	<0.0001
Body to placental weight ratio	5.48 ± 0.95	5.97 ± 1.02*	0.0044	5.73 ± 0.89	6.21 ± 1.13*	0.0143
Umbilical cord diameter (mm)	12.3 ± 2.8	10.6 ± 2.2*y	<0.0001	13.3 ± 2.8	11.6 ± 2.6*y	<0.0001

Bold indicates significant P values.

Ctrl, adapted for gestational age controls; IUGR, growth-restricted newborns; UV, umbilical vein; UA, umbilical artery; n/a, not available. Unless otherwise mentioned, data are expressed as mean ± SD. P-values were determined using Mann-Whitney test to compare both groups, excepted for P-values marked with #, which were determined using Fisher's exact test. \* Significant difference between Ctrl and IUGR ( $P < 0.05$ ); y significant difference between girls and boys. Ponderal index was calculated as  $[100 \times \text{birth weight}/\text{length}^3]$  (g/cm<sup>3</sup>).

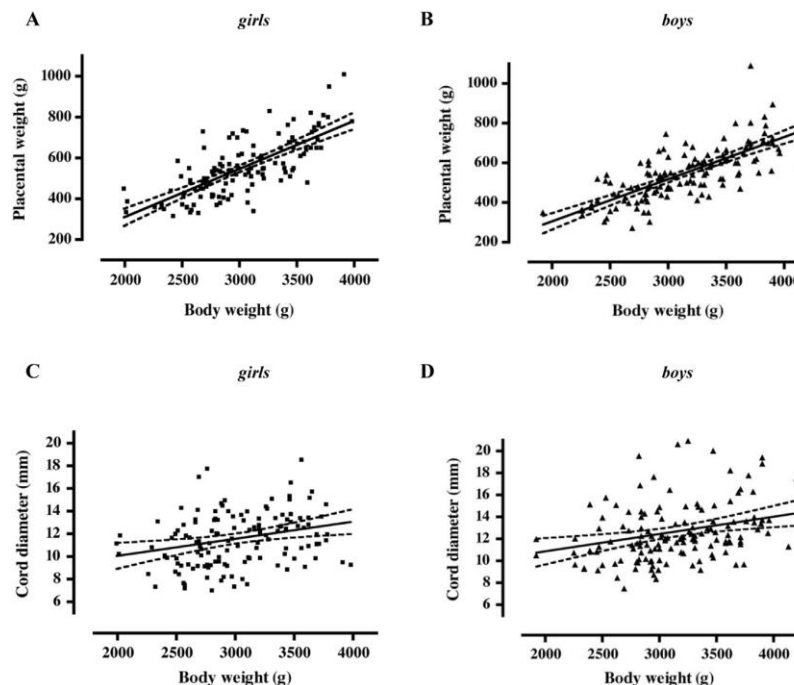


Fig. 1. Relationships between placental and body weight at birth (A, B), or umbilical cord diameter and birth weight (C, D) in our cohort of term newborn girls (A, C) or boys (B, D). Linear regression displayed a good correlation between placental and body weight at birth in girls (correlation coefficient  $r = 0.7420$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 127$ ) and boys (correlation coefficient  $r = 0.7357$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 131$ ). There was also some correlation between umbilical cord diameter and body weight at birth in girls (correlation coefficient  $r = 0.2467$ ,  $P = 0.0039$ ,  $n = 135$ ) and boys (correlation coefficient  $r = 0.2699$ ,  $P = 0.0014$ ,  $n = 138$ ).

Table 2  
Histomorphometric measurements on paraffin sections of umbilical cords.

	Ctrl	IUGR	P-value
<b>Girls</b>			
Number of patients included	28	23	
Fresh umbilical cord diameter (mm)	11.91 ± 0.44	10.49 ± 0.31*	0.0246
Calculated fresh umbilical cord CSA (mm <sup>2</sup> )	115.50 ± 9.14	88.15 ± 5.25*	0.0246
Umbilical cord CSA (mm <sup>2</sup> )	72.31 ± 4.93z	67.97 ± 4.33z	0.6840
UV total CSA (mm <sup>2</sup> )	5.44 ± 0.39	3.81 ± 0.22*	0.0013
UV muscle CSA (mm <sup>2</sup> )	4.32 ± 0.35	3.03 ± 0.20*	0.0083
UV lumen CSA (mm <sup>2</sup> )	1.12 ± 0.13	0.78 ± 0.09*	0.0439
UAs total CSA (mm <sup>2</sup> )	5.82 ± 0.30	5.88 ± 0.58	0.3891
UAs muscle CSA (mm <sup>2</sup> )	5.67 ± 0.29	5.26 ± 0.38	0.2222
UAs lumen CSA (mm <sup>2</sup> )	0.14 ± 0.05	0.61 ± 0.37	0.3788
Wharton's jelly CSA (mm <sup>2</sup> )	61.05 ± 4.54	58.28 ± 3.98	0.7983
<b>Boys</b>			
Number of patients included	30	22	
Fresh umbilical cord diameter (mm)	12.56 ± 0.46	11.26 ± 0.37	0.0627
Calculated fresh umbilical cord CSA (mm <sup>2</sup> )	128.80 ± 10.80	101.86 ± 6.78	0.0627
Umbilical cord CSA (mm <sup>2</sup> )	85.37 ± 5.83z	77.85 ± 5.07z	0.5229
UV total CSA (mm <sup>2</sup> )	4.75 ± 0.24	4.04 ± 0.27	0.0654
UV muscle CSA (mm <sup>2</sup> )	3.76 ± 0.18	3.21 ± 0.20*	0.0465
UV lumen CSA (mm <sup>2</sup> )	0.99 ± 0.12	0.83 ± 0.10	0.4099
UAs total CSA (mm <sup>2</sup> )	6.36 ± 0.27	5.81 ± 0.28	0.1917
UAs muscle CSA (mm <sup>2</sup> )	6.08 ± 0.24	5.67 ± 0.27	0.2786
UAs lumen CSA (mm <sup>2</sup> )	0.27 ± 0.12	0.13 ± 0.03	0.8895
Wharton's jelly CSA (mm <sup>2</sup> )	74.26 ± 5.67	68.01 ± 4.90	0.5848

Bold indicates significant (or borderline significant) P values. Ctrl, adapted for gestational age controls; IUGR, growth-restricted newborns; UV, umbilical vein; UAs, umbilical arteries; CSA, cross-sectional area. The fresh umbilical cord diameter (UCD) corresponds to the mean UCD measured, before dissection, on the fetal segment of umbilical cords used for histomorphometry. The fresh umbilical cord CSA was calculated using the fresh UCD. The other data were obtained from paraffin sections, UAs CSA correspond to the sum of areas measured in both UAs in each umbilical cord. Wharton's jelly CSA was calculated as [umbilical cord CSA - (UV total CSA + UAs total CSA)]. All data are expressed as mean ± SEM. \* Significant difference between both groups, P-values were determined using Manne Whitney test to compare both groups, and considered as significant when P < 0.05. z Significant difference between umbilical cord total CSA and the corresponding calculated fresh CSA, using Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test. There was no significant difference between data measured in boys and girls.

### 3. Results

#### 3.1. Demographic data

Table 1 summarizes maternal and neonatal characteristics of the studied population.

As expected, birth weight, length and head circumference were significantly reduced in IUGR compared to controls. Length and head circumference reduction was ~5% whereas the decrease in birth weight was ~21% Ponderal index was also significantly decreased (~8%) in IUGR, suggesting that growth-restricted newborns were thinner than controls. Placental weight was ~27% lower in IUGR than in controls. UCD was also significantly reduced (by ~13e14%) in IUGR newborns compared to controls.

There was a good correlation between placental and body weight at birth in girls (Fig. 1A) (correlation coefficient  $r = 0.7420$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 127$ ) and boys (Fig. 1B) (correlation coefficient  $r = 0.7357$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 131$ ). Some correlation was also found between UCD and body weight in girls (Fig. 1C) (correlation coefficient  $r = 0.2467$ ,  $P = 0.0039$ ,  $n = 135$ ) and boys (Fig. 1D) (correlation coefficient  $r = 0.2699$ ,  $P = 0.0014$ ,  $n = 138$ ).

Online Supplementary Table summarizes the distribution of our patients according to percentiles of birth weight versus gestational age. A growth curve break was documented in 74e77% of patients attributed to the IUGR group.

#### 3.2. Histomorphometry

Table 2 presents histomorphometrical measurements. Fresh UCD and calculated fresh UC CSA were lower in IUGR neonates than in controls. This difference was significant in girls, and borderline significant in boys. However, in both genders, total UC CSA measured on histological sections did not significantly differ between both groups. Paraffin-embedding led to a significant reduction in UC CSA of ~34e37% in controls and ~23e24% in IUGR.

Areas measured in UA, as well as calculated WJ area, were similar in both groups. Significant differences between IUGR and controls were found in UV. In girls, UV total CSA, muscular and luminal areas were significantly smaller in IUGR than in controls (Fig. 2B). In boys, the decrease in UV total CSA was borderline significant, whereas UV SM area was significantly reduced in IUGR compared to controls (Fig. 2C). The decrease observed in UV total CSA and SM area was ~30% in girls and ~15% in boys. A correlation was found between UV CSA and body weight in girls (Fig. 2D) (correlation coefficient  $r = 0.4577$ ,  $P = 0.0007$ ,  $n = 51$ ) and boys (Fig. 2E) (correlation coefficient  $r = 0.3899$ ,  $P = 0.0043$ ,  $n = 52$ ).

There was no significant difference in morphometrical data between boys and girls.

#### 3.3. Pharmacological studies

Table 3 (upper part) presents RT and RDT values achieved in each group. Resting tension was similar in all groups. There was no

Table 3  
Optimal resting tension and residual A2 (U46619) (upper part of the table), and EC50 and E<sub>max</sub> calculated by non-linear regression analysis of DEA/NO-induced relaxation curves (lower part of the table).

	Ctrl	IUGR	P-value
<b>Girls</b>			
5-HT	n = 52	n = 39	
Resting tension (g)	0.20 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.5499
Residual tension (g)	4.20 ± 0.16	4.13 ± 0.21	0.5316
U46619	n = 51	n = 39	
Resting tension (g)	0.22 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.1994
Residual tension (g)	4.01 ± 0.21	4.32 ± 0.31y	0.4914
<b>Boys</b>			
5-HT	n = 51	n = 45	
Resting tension (g)	0.24 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.1023
Residual tension (g)	4.02 ± 0.13	3.52 ± 0.16*	0.0406
U46619	n = 51	n = 45	
Resting tension (g)	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.5348
Residual tension (g)	4.00 ± 0.15	3.40 ± 0.18*y	0.0321
<b>Girls</b>			
5-HT pre-constriction	n = 52	n = 39	
EC50 DEA/NO (M)	2.33 § 10 <sup>À6</sup> ± 3.62 § 10 <sup>À7</sup>	3.07 § 10 <sup>À6</sup> ± 5.24 § 10 <sup>À7</sup>	0.5911
E <sub>max</sub> DEA/NO (%)	51.08 ± 1.95	43.76 ± 2.84*y	0.0140
U46619 pre-constriction	n = 51	n = 39	
EC50 DEA/NO (M)	1.47 § 10 <sup>À6</sup> ± 2.10 § 10 <sup>À7</sup> z	2.47 § 10 <sup>À6</sup> ± 4.19 § 10 <sup>À7</sup> *y	0.0153
E <sub>max</sub> DEA/NO (%)	81.14 ± 1.78z	73.11 ± 3.27yz	0.0951
<b>Boys</b>			
5-HT pre-constriction	n = 51	n = 45	
EC50 DEA/NO (M)	2.11 § 10 <sup>À6</sup> ± 4.24 § 10 <sup>À7</sup>	2.91 § 10 <sup>À6</sup> ± 7.38 § 10 <sup>À7</sup>	0.3724
E <sub>max</sub> DEA/NO (%)	53.14 ± 2.62	51.03 ± 2.58y	0.6125
U46619 pre-constriction	n = 51	n = 45	
EC50 DEA/NO (M)	1.30 § 10 <sup>À6</sup> ± 2.99 § 10 <sup>À7</sup> z	1.74 § 10 <sup>À6</sup> ± 4.42 § 10 <sup>À7</sup> yz	0.4764
E <sub>max</sub> DEA/NO (%)	84.24 ± 1.88z	82.43 ± 1.89yz	0.3163

Bold indicates significant P values.

Ctrl, adapted for gestational age controls; IUGR, growth-restricted newborns. Data are expressed as mean ± SEM. P-value was calculated using Manne Whitney test to compare both groups. \*significant difference between controls and IUGR newborns; y significant difference between girls and boys; z significant difference between UV pre-contracted with 5-HT or U46619 (P < 0.05).

significant difference between RDT achieved with 5-HT or U46619. In girls, RDT was similar between AGA and IUGR neonates. In boys, both vasoconstrictors induced significantly lower RDT in growth-restricted than AGA infants. There was no significant difference between girls and boys, excepted for RDT induced by U46619, which was lower in growth-restricted boys than girls.

DEA/NO induced a dose-dependent relaxation in isolated UV pre-constricted with 5-HT (Fig. 3A,C) or U46619 (Fig. 3B,D). In girls, NO-induced relaxation was significantly weaker in IUGR than in controls (Fig. 3A,B). In contrast, in boys, both groups displayed similar relaxant responses to DEA/NO (Fig. 3C,D). In controls, boys

and girls displayed similar relaxant responses (Fig 3E,F), whereas in growth-restricted newborns DEA/NO-induced relaxation was significantly reduced in girls compared to boys (Fig 3G,H).

Table 3 (lower part) summarizes the efficiency ( $E_{max}$ ) and sensitivity ( $EC_{50}$ ) related to DEA/NO-induced relaxation. There was no difference between growth-restricted and control boys, whereas in girls  $E_{max}$  induced by DEA/NO in UV pre-contracted with 5-HT was significantly lower in IUGR than in controls and  $EC_{50}$  in UV pre-contracted with U46619 was almost twice in IUGR compared to controls. Moreover, in growth-restricted infants,  $E_{max}$  was significantly lower in girls than in boys, with both vasoconstrictors,

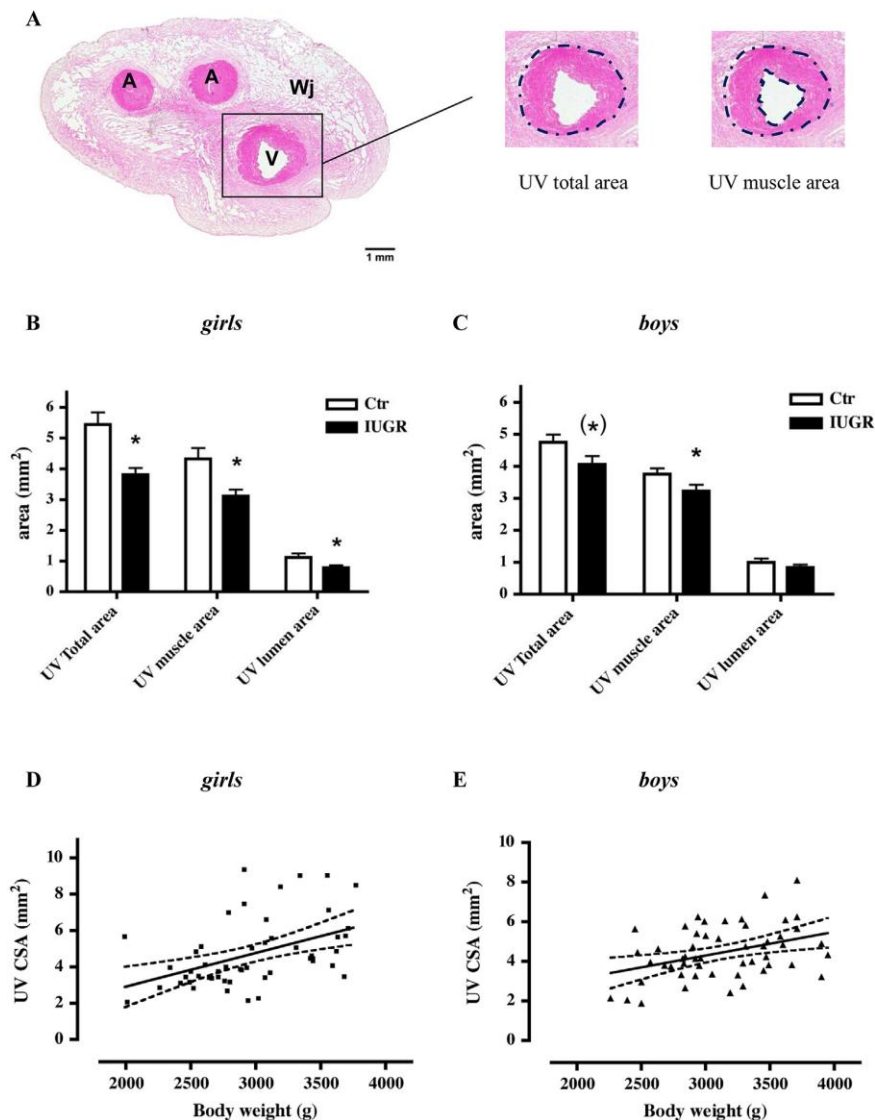


Fig. 2. Histomorphometry of umbilical cord from newborns with normal growth (Ctr) or intrauterine growth restriction (IUGR). A) Representative cross-section of umbilical cord stained with haematoxylin/eosin. A, artery, V, vein, Wj, Wharton's jelly. Be C) Umbilical vein's (UV) morphometry of newborn girls (B) and boys (C). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (in girls n  $\frac{1}{4}$  28 in Ctr and n  $\frac{1}{4}$  23 in IUGR, and in boys n  $\frac{1}{4}$  30 in Ctr and n  $\frac{1}{4}$  22 in IUGR). \*Significant or (\*) borderline significant difference between controls and IUGR ( $P < 0.05$ , as determined by Mann-Whitney test). D-E) Relationships between UV cross-sectional area (CSA) and birth weight in girls (D) and boys (E). Linear regression displayed a correlation was found between UV total CSA and body weight in girls (correlation coefficient  $r = 0.4577$ ,  $P = 0.0007$ , n  $\frac{1}{4}$  51) and boys (correlation coefficient  $r = 0.3899$ ,  $P = 0.0043$ , n  $\frac{1}{4}$  52).

and  $EC_{50}$  was higher in girls than in boys in UV pre-contracted with U46619. Finally, in all groups,  $E_{max}$  was significantly higher in UV pre-contracted with U46619 than 5-HT. Moreover,  $EC_{50}$  was significantly lower in UV pre-contracted with U46619 than 5-HT in all groups, excepted for growth-restricted girls.

#### 4. Discussion

Individuals born with IUGR have an increased risk to develop cardiovascular diseases in adulthood [2,3]. There is currently no efficient mean to prevent, treat or lessen IUGR and its impact. Fetus

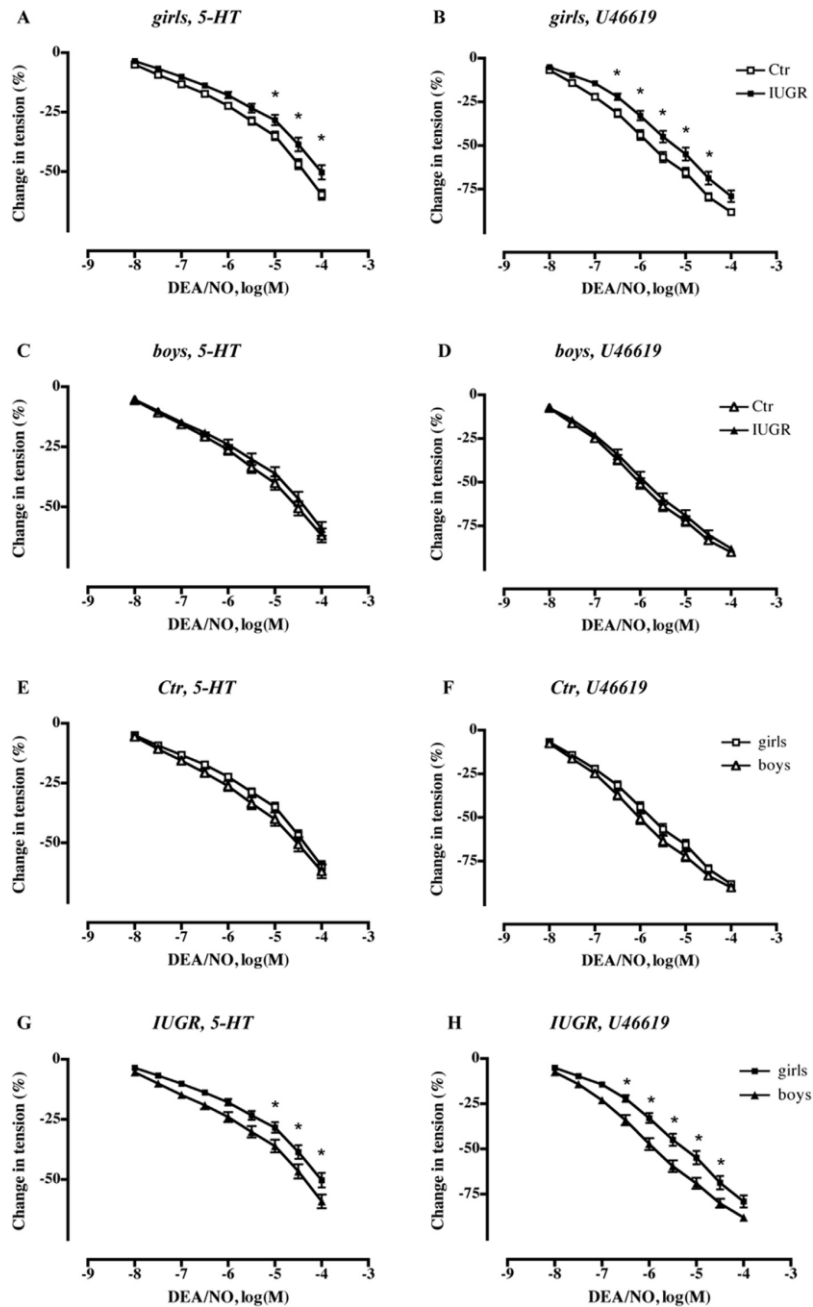


Fig. 3. Relaxation induced by cumulative doses of the nitric oxide-donor DEA/NO on isolated umbilical veins from newborn girls (A, B) and boys (C, D) pre-contracted with 5-HT  $10^{A5}$  M (A, C) or U46619  $10^{A6}$  M (B, D). Ctr, adapted for gestational age controls; IUGR, growth-restricted newborns. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (in girls n  $\frac{1}{4}$  52 in Ctr and n  $\frac{1}{4}$  39 in IUGR, and in boys n  $\frac{1}{4}$  51 in Ctr and n  $\frac{1}{4}$  45 in IUGR) of the percent of change in tension induced by the vasodilator. \*Statistical difference between Ctr and IUGR ( $P < 0.05$ , as determined by two-way ANOVA). Panels Ee H display a comparison between girls and boys of dose response curves of umbilical veins pre-contracted with 5-HT  $10^{A5}$  M (E, G) or U46619  $10^{A6}$  M (F, H), from Ctr (E, F) or IUGR (G, H) neonates. \*Statistical difference between girls and boys ( $P < 0.05$ , as determined by two-way ANOVA).



survival and development depend mainly on gaseous and nutritional exchanges through the placenta, and on the functional integrity of the maternal-placental-fetal circulation.

In our cohort, we observed a strong correlation between placental and birth weight, which confirms previous studies [34e 36]. The great reduction (~27%) in placental weight observed in growth-restricted compared to AGA neonates argues in favor of a major placental contribution to the pathology of IUGR.

We also showed significant alterations in UC of IUGR newborns, which were thinner than those of controls, and found some correlation between UCD and birth weight. Previous studies have established relationships between UCD determined by sonographic measurements and perinatal outcome [37e 39]. Recently, UCD percentile curves according to gestational age were published and UCD was shown strongly associated with placental and infant birth weight [40].

Morphometrical analyses showed that UC total CSA was not significantly different between IUGR and controls, in contrast to fresh CSA. The significant difference between values calculated from fresh UCD and data obtained in paraffin sections was probably due to sample processing with paraffin embedding, including dehydration steps. WJ should be particularly susceptible to area reduction because of its high water content. The average CSA was decreased by 34e 37% in controls and 23e 24% in IUGR after paraffin embedding, suggesting that water content in WJ of fresh UCs was higher in AGA than IUGR neonates. Therefore the difference observed in UCD between IUGR and AGA newborns was probably mainly due to a decrease in WJ area, which is in accordance with recently published data [40]. Such information could be of interest given that WJ is not only implicated in cord firmness but also allows for diffusion of hydrophilic compounds and cell migration. WJ is a connective tissue, with a porous scaffold containing a viscous fluid [41]. Pores surrounding the vessels may serve as an extra-vascular space to facilitate their expansion and contraction. The interstitial fluid consists in proteoglycans, hyaluronic acid and other molecules interacting with water. Sufficient levels of glycosaminoglycans are necessary to ensure hydration of the tissue [41]. Further comparison of WJ composition between IUGR and AGA groups needs to be investigated.

In growth-restricted neonates, UV total CSA and SM area were reduced compared to controls. This reduction in SM area could be in relation to alterations of UV reactivity. A significant decrease in UV area was previously described in IUGR fetuses by sonographic measurements [38,39]. In particular, very small UV area was shown to be a severe prognostic sign of adverse perinatal outcome [38,42]. Interestingly, in the present study, there was a correlation in both genders between UV CSA and birth weight. This suggests that IUGR is associated with structural modifications in UV. Some caution should nevertheless be taken regarding our morphometrical data, because the vessels were not perfused during fixation of the tissue, which could influence measurements of SM thickness. However, as all UC have been collected in the same conditions, the data obtained in the different groups should be comparable.

Growth-restricted newborns displayed in both genders significant reduction in growth parameters, placental weight and UCD, as well as structural alterations in UV compared to controls. In contrast, NO-induced relaxation was significantly decreased only in UV of IUGR girls. In the present study, we limited our functional investigations to alterations occurring in SM by testing the relaxant effect of exogenous NO. The reduction in NO-induced relaxation could be due to down-regulated cGMP synthesis, up-regulated cGMP degradation, and/or to alterations in downstream components of the relaxation pathway. Further investigations will be necessary to determine the molecular mechanisms implicated. We need also to study endothelium-dependent relaxation, because there are probably alterations in the UV endothelium of growth-

restricted neonates. It was recently demonstrated that normal UV displayed NO synthase-dependent insulin-induced relaxation, whereas such relaxant response was almost absent in IUGR UV [43].

DEA/NO-induced relaxation depended on the applied vasoconstrictor. DEA/NO efficiency was higher in UV pre-contracted with U46619 than with 5-HT. The sensitivity to DEA/NO was also greater in UV pre-contracted with U46619 compared to 5-HT in all groups, excepted for growth-restricted girls. Concerning vasoconstrictive properties, the decreased RDT induced by 5-HT or U46619 in UV of IUGR boys compared to AGA boys or IUGR girls suggested that vasoconstriction could be impaired in UV of growth-restricted boys.

The observed sexual dimorphism needs to be further investigated. Interestingly, gender differences are often observed in the field of developmental origins of adult diseases [44]. In the present study, boys and girls displayed similar structural, but distinct functional alterations in case of IUGR. Indeed, UV of growth-restricted neonates presented altered vasoconstriction in boys and impaired vasodilatation in girls, suggesting that there may be differential adaptive mechanisms depending on the sex of the fetus. The gender differences in vascular reactivity were probably due to differential expression and/or regulation of molecular components of the NO/cGMP signaling pathway, as well as in vasoconstrictive mechanisms. It is likely that some alterations also occur in the endothelium. Further investigations will focus on vasoconstriction and endothelium-dependent relaxation to better understand the mechanisms contributing to the altered umbilical circulation in growth-restricted babies.

It should be noted that an important part of pregnancies of women giving birth in our hospital was followed up outside, thus limiting access to medical data, like longitudinal fetal growth or Doppler measurements. It was therefore not possible to use Doppler data to sub-categorize growth-restricted newborns, nor to correlate pharmacological or morphological results with Doppler measurements.

However, despite some limitations, the present study displayed significant differences in UC of growth-restricted neonates compared to controls. The originality of this project is the focus on human UC, whereas most previous studies have investigated the placenta itself in the contribution to IUGR. Studies displaying alterations in umbilical circulation in IUGR were mainly based on Doppler measurements rather than identification of molecular or mechanistic modifications [16,18e 20]. Our assumption was that even if placental alterations could be corrected, this would be relatively inefficient if umbilical circulation is impaired to bring nutrients and oxygen supply to the fetus. The present report focused on UV, which is the unique vessel to ensure blood supply to the fetus and could therefore represent a potential target for therapeutic interventions to improve the circulation from the placenta to the fetus.

Umbilical arteries will be studied separately, because they probably reflect mainly adaptive responses of the fetus to altered blood/oxygen/nutrients supply.

Finally, it would be interesting to further study a distal portion of the UC, which is not innervated, in contrast to the proximal part of the UC, close to the fetus [45].

In summary, the present study demonstrated structural and functional alterations in UC and UV of growth-restricted newborns compared to controls, probably contributing to the development of IUGR. Moreover, we found a sexual dimorphism, with structural modifications present in both genders, whereas NO-induced relaxation was decreased only in girls.

Further investigations on umbilical circulation in growth-restricted infants are necessary to identify potential treatments to improve oxygen and nutrients supply to the fetus, thus preventing or limiting the development of IUGR.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this manuscript.

### Acknowledgments

This work was supported by the Swiss National Foundation (grant number 32003B\_138491). We are grateful to the team of midwives of the Department of Gynecology and Obstetrics at the Centre Hospitalier Universitaire Vaudois in Lausanne for their collaboration in umbilical cords harvesting. We also sincerely thank Sebastien Joye, Magaly Jacquier Goetschmann, Karine Lepigeon and Françoise Damnon for their work in data extraction from medical records. Finally, we are grateful to Vincent Muehlethaler, Celine Fischer and Jamel Chnayna for their help in initiating the project.

### Abbreviations

CSA	cross-sectional area
DEA/NO	2-(N,N-Diethylamino)-diazeneolate-2-oxide
5-HT	serotonin
NO	nitric oxide
RDT	residual tension
RT	resting tension
SM	smooth muscle
UC	umbilical cord
UCD	umbilical cord diameter
UA	umbilical artery
UV	umbilical vein
WJ	Wharton's jelly

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2014.08.090>.

### References

- [1] Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol* 2006;49(2):270e83.
- [2] Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004;305:1733e6.
- [3] Kaijser M, Bonamy AK, Akre O, Cnattingius S, Granath F, Norman M, et al. Perinatal risk factors for ischemic heart disease: disentangling the roles of birth weight and preterm birth. *Circulation* 2008;117(3):405e10.
- [4] Joss-Moore LA, Lane RH. The developmental origins of adult disease. *Curr Opin Pediatr* 2009;21(2):230e4.
- [5] Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, Simmonds SJ. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *Br Med J* 1993;307(6918):1519e24.
- [6] Ligi I, Grandvuillemin I, Andres V, Dignat-George F, Simeoni U. Low birth weight infants and the developmental programming of hypertension: a focus on vascular factors. *Semin Perinatol* 2010;34:188e92.
- [7] Romo A, Carceller R, Tobajas J. Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology. *Pediatr Endocrinol Rev* 2009;6(Suppl. 3):332e6.
- [8] Hendrix N, Berghella V. Non-placental causes of intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol* 2008;32(3):161e5.
- [9] Cetin I, Alvino G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta* 2009;30(Suppl. A):S77e82.
- [10] Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol* 2006;572:25e30.
- [11] Neerhof MG, Thaete LG. The fetal response to chronic placental insufficiency. *Semin Perinatol* 2008;32:201e5.
- [12] Bergmann RL. Prevention of intrauterine growth restriction: are there no effective methods available? *J Perinat Med* 2009;37(3):306e7.
- [13] Marsal K. Obstetric management of intrauterine growth restriction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2009;23:857e70.
- [14] Platz E, Newman R. Diagnosis of IUGR: traditional biometry. *Semin Perinatol* 2008;32(3):140e7.
- [15] Miller J, Turan S, Baschat AA. Fetal growth restriction. *Semin Perinatol* 2008;32:274e80.
- [16] Gerber S, Hohlfeld P, Viquerat F, Tolsa JF, Vial Y. Intrauterine growth restriction and absent or reverse end-diastolic blood flow in umbilical artery (Doppler class II or III): a retrospective study of short- and long-term fetal morbidity and mortality. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;126:20e6.
- [17] Adamson SL, Myatt L, Byrne BMP. Regulation of umbilical blood flow. In: Polin RA, Fox WW, editors. *Fetal and neonatal physiology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1998. p. 977e89.
- [18] Figueras F, Eixarch E, Gratacos E, Gardosi J. Predictiveness of antenatal umbilical artery Doppler for adverse pregnancy outcome in small-for-gestational-age babies according to customised birthweight centiles: population-based study. *Br J Obstet Gynaecol* 2008;115(5):590e4.
- [19] Ghosh GS, Gudmundsson S. Uterine and umbilical artery Doppler are comparable in predicting perinatal outcome of growth-restricted fetuses. *Br J Obstet Gynaecol* 2009;116(3):424e30.
- [20] Ferrazzi E, Rigano S, Bozzo M, Bellotti M, Giovannini N, Galan H, et al. Umbilical vein blood flow in growth-restricted fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000;16:432e8.
- [21] Tsukimori K, Nozaki M, Nakano H. Regional difference of endothelium-dependent contractility in human umbilical artery. *J Perinat Med* 2005;33(6):534e8.
- [22] Gupta S, Hanff LM, Visser W, Steegers EA, Saxena PR, Vulto AG, et al. Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy. *J Hypertens* 2006;24(7):1345e53.
- [23] Lovren F, Triggie C. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *Br J Pharmacol* 2000;131(3):521e9.
- [24] McGrath JC, MacLennan SJ, Mann AC, Stuart-Smith K, Whittle MJ. Contraction of human umbilical artery, but not vein, by oxygen. *J Physiol* 1986;380:513e9.
- [25] Mildemberger E, Biesel B, Siegel G, Versmold HT. Nitric oxide and endothelin in oxygen-dependent regulation of vascular tone of human umbilical vein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(4):H1730e7.
- [26] Voigt M, Fusch C, Olbertz D, Hartmann K, Rochow N, Renken C, et al. Analyse des Neugeborenenkollektivs des Bundesrepublik Deutschland - 12. Mitteilung: Vorstellung engmaschiger Perzentilwerte (-kurven) für die Körpermasse Neugeborener. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2006;66:956e70.
- [27] Barker ED, McAuliffe FM, Alderdice F, Unterscheider J, Daly S, Geary MP, et al. The role of growth trajectories in classifying fetal growth restriction. *Obstet Gynecol* 2013;122:248e54.
- [28] Togni FA, Araujo Junior E, Vasques FA, Moron AF, Torloni MR, Nardoza LM. The cross-sectional area of umbilical cord components in normal pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2007;96(3):156e61.
- [29] Peyter AC, Muehlethaler V, Liaudet L, Marino M, Di Bernardo S, Diaceri G, et al. Muscarinic receptor M1 and phosphodiesterase 1 are key determinants in pulmonary vascular dysfunction following perinatal hypoxia in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295(1):L201e13.
- [30] Gao Y, Zhou H, Raj JJ. Heterogeneity in role of endothelium-derived NO in pulmonary arteries and veins of full-term fetal lambs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995;268(4 Pt 2):H1586e92.
- [31] Nodwell A, Carmichael L, Ross M, Richardson B. Placental compared with umbilical cord blood to assess fetal blood gas and acid-base status. *Obstet Gynecol* 2005;105(1):129e38.
- [32] Valenzuela P, Guijarro R. The effects of time on pH and gas values in the blood contained in the umbilical cord. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85(11):1307e9.
- [33] Terraz S, Baechtold F, Renard D, Barsi A, Rosselet A, Gnaegi A, et al. Hypoxic contraction of small pulmonary arteries from normal and endotoxemic rats: fundamental role of NO. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;276(4 Pt 2):H1207e14.
- [34] Hasegawa J, Arakawa K, Nakamura M, Matsuoka R, Ichizuka K, Katsufumi O, et al. Analysis of placental weight centiles is useful to estimate cause of fetal growth restriction. *J Obstet Gynaecol Res* 2011;37(11):1658e65.
- [35] Pathak S, Jessop F, Hook L, Sebire NJ, Lees CC. Placental weight, digitally derived placental dimensions at term and their relationship to birth weight. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010;23(10):1176e82.
- [36] Wallace JM, Bhattacharya S, Horgan GW. Gestational age, gender and parity specific centile charts for placental weight for singleton deliveries in Aberdeen, UK. *Placenta* 2013;34(3):269e74.
- [37] Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;96(2):150e7.
- [38] Ghezzi F, Raio L, Gunter Duwe D, Cromi A, Karousou E, Durig P. Sonographic umbilical vessel morphometry and perinatal outcome of fetuses with a lean umbilical cord. *J Clin Ultrasound* 2005;33(1):18e23.
- [39] Raio L, Ghezzi F, Di Naro E, Duwe DG, Cromi A, Schneider H. Umbilical cord morphologic characteristics and umbilical artery Doppler parameters in intrauterine growth-restricted fetuses. *J Ultrasound Med* 2003;22(12):1341e7.
- [40] Proctor LK, Fitzgerald B, Whittle WL, Mokhtari N, Lee E, Machin G, et al. Umbilical cord diameter percentile curves and their correlation to birth weight and placental pathology. *Placenta* 2013;34(1):62e6.
- [41] Ferguson VL, Dodson RB. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;144(Suppl. 1):S108e13.
- [42] Rigano S, Bozzo M, Padoan A, Mustoni P, Bellotti M, Galan HL, et al. Small size-specific umbilical vein diameter in severe growth restricted fetuses that die in utero. *Prenat Diagn* 2008;28(10):908e13.
- [43] Krause BJ, Carrasco-Wong I, Caniguier A, Carvajal J, Farias M, Casanello P. Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular



- dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels. *Placenta* 2013; 34(1):20e8.
- [44] Gilbert JS, Nijland MJ. Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295(6):R1941e52.
- [45] Marzioni D, Tamagnone L, Capparuccia L, Marchini C, Amici A, Todros T, et al. Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal Semaphorin 3A. *Dev Dyn* 2004;231(4):839e48.



# Références bibliographiques

1. O'Rahilly R, Muller F. Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells, tissues, organs*. 2010;192(2):73-84.
2. Sutor CW. Perspectives on nutrition during pregnancy: Part I, Weight gain; Part II, Nutrient supplements. *Journal of the American Dietetic Association*. 1991;91(1):96-8.
3. Abrams B, Altman SL, Pickett KE. Pregnancy weight gain: still controversial. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(5 Suppl):1233S-41S.
4. Battaglia FC. Placental transport and utilization of amino acids and carbohydrates. *Federation proceedings*. 1986;45(10):2508-12.
5. Battaglia FC, Meschia G. Principal substrates of fetal metabolism. *Physiol Rev*. 1978;58(2):499-527.
6. Sibley C, Glazier J, D'Souza S. Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Exp Physiol*. 1997;82(2):389-402.
7. Hytten. *Nutrition. Clinical Physiology in Obstetrics* Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1980:163-92.
8. Takata K, Hirano H. Mechanism of glucose transport across the human and rat placental barrier: a review. *Microscopy research and technique*. 1997;38(1-2):145-52.
9. Jones CT, Rolph TP. Metabolism during fetal life: a functional assessment of metabolic development. *Physiol Rev*. 1985;65(2):357-430.
10. Fowden AL, Forhead AJ, Silver M, MacDonald AA. Glucose, lactate and oxygen metabolism in the fetal pig during late gestation. *Exp Physiol*. 1997;82(1):171-82.
11. Schneider H. Ontogenic changes in the nutritive function of the placenta. *Placenta*. 1996;17(1):15-26.
12. Battaglia FC, Regnault TR. Placental transport and metabolism of amino acids. *Placenta*. 2001;22(2-3):145-61.
13. Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, Ortega H. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res*. 2006;65 Suppl 3:59-64.
14. Coleman RA. Placental metabolism and transport of lipid. *Federation proceedings*. 1986;45(10):2519-23.
15. Herrera E, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA. Lipid metabolism in pregnancy. *Biol Neonate*. 1987;51(2):70-7.
16. McArdle HJ, Ashworth CJ. Micronutrients in fetal growth and development. *British medical bulletin*. 1999;55(3):499-510.
17. JW S. *Intrauterine growth and nutrition. Fetal and neonatal physiology* 2nd ed Philadelphia: WB Saunders Company. 1998:267-89.
18. Bonnin. *l'embryon chez l'homme et l'animal*. 2002:233.
19. Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine regulation of feto-placental growth. *Horm Res*. 2009;72(5):257-65.
20. Fowden AL. The role of insulin in prenatal growth. *J Dev Physiol*. 1989;12(4):173-82.
21. Fowden AL. The role of insulin in fetal growth. *Early Hum Dev*. 1992;29(1-3):177-81.
22. Osmanagaoglu MA, Osmanagaoglu S, Bozkaya H. The association of birthweight with maternal and cord serum and amniotic fluid growth hormone and insulin levels, and with neonatal and maternal factors in pregnant women who delivered at term. *J Perinat Med*. 2005;33(2):149-55.
23. Fowden AL. Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod Fertil Dev*. 1995;7(3):351-63.
24. Fowden AL. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta*. 2003;24(8-9):803-12.
25. Constanca M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. 2002;417(6892):945-8.
26. Wang J, Zhou J, Powell-Braxton L, Bondy C. Effects of Igf1 gene deletion on postnatal growth patterns. *Endocrinology*. 1999;140(7):3391-4.
27. Fowden AL, Forhead AJ. Hormones as epigenetic signals in developmental programming. *Exp Physiol*. 2009;94(6):607-25.
28. Milley JR. Effects of increased cortisol concentration on ovine fetal leucine kinetics and protein metabolism. *Am J Physiol*. 1995;268(6 Pt 1):E1114-22.
29. Miller SL, Sutherland AE, Supramaniam VG, Walker DW, Jenkin G, Wallace EM. Antenatal glucocorticoids reduce growth in appropriately grown and growth-restricted ovine fetuses in a sex-specific manner. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24(5):753-8.
30. Belkacemi L, Jelks A, Chen CH, Ross MG, Desai M. Altered placental development in undernourished rats: role of maternal glucocorticoids. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:105.
31. Fowden AL, Szemere J, Hughes P, Gilmour RS, Forhead AJ. The effects of cortisol on the growth rate of the sheep fetus during late gestation. *J Endocrinol*. 1996;151(1):97-105.
32. Barker DJ. Intrauterine programming of coronary heart disease and stroke. *Acta Paediatr Suppl*. 1997;423:178-82.
33. Barker DJ. Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med*. 1999;31(Suppl 1):3-6.
34. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol*. 2006;49(2):270-83.
35. Barker DJ. In utero programming of cardiovascular disease. *Theriogenology*. 2000;53(2):555-74.
36. Joss-Moore LA, Lane RH. The developmental origins of adult disease. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21(2):230-4.

37. Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, Simmonds SJ. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ*. 1993;307(6918):1519-24.
38. Ross MG, Beall MH. Adult sequelae of intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol*. 2008;32(3):213-8.
39. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*. 2008;359(1):61-73.
40. Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T, Low FM, Beedle AS. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(7):401-8.
41. Roberts CT. IFPA Award in Placentology Lecture: Complicated interactions between genes and the environment in placentation, pregnancy outcome and long term health. *Placenta*. 2010;31 Suppl:S47-53.
42. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev*. 2006;82(8):485-91.
43. Kyle UG, Pichard C. The Dutch Famine of 1944-1945: a pathophysiological model of long-term consequences of wasting disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2006;9(4):388-94.
44. Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, Simmers TA, Osmond C, Barker DJ, et al. Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(2):322-7; quiz 466-7.
45. Cetin I, Alvino G, Radaelli T, Pardi G. Fetal nutrition: a review. *Acta Paediatr Suppl*. 2005;94(449):7-13.
46. Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001;96(2):150-7.
47. Ferguson VL, Dodson RB. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009;144 Suppl 1:S108-13.
48. Rigano S, Bozzo M, Padoan A, Mustoni P, Bellotti M, Galan HL, et al. Small size-specific umbilical vein diameter in severe growth restricted fetuses that die in utero. *Prenat Diagn*. 2008;28(10):908-13.
49. Marzioni D, Tamagnone L, Capparuocia L, Marchini C, Amici A, Todros T, et al. Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal Semaphorin 3A. *Dev Dyn*. 2004;231(4):839-48.
50. Wang Y, Zhao S. *Vascular Biology of the Placenta. Integrated Systems Physiology: from Molecules to Function to Disease*. San Rafael (CA)2010.
51. Boito S, Struijk PC, Ursem NT, Stijnen T, Wladimiroff JW. Umbilical venous volume flow in the normally developing and growth-restricted human fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2002;19(4):344-9.
52. Gerson AG, Wallace DM, Stiller RJ, Paul D, Weiner S, Bolognese RJ. Doppler evaluation of umbilical venous and arterial blood flow in the second and third trimesters of normal pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1987;70(4):622-6.
53. Gill RW, Trudinger BJ, Garrett WJ, Kossoff G, Warren PS. Fetal umbilical venous flow measured in utero by pulsed Doppler and B-mode ultrasound. I. Normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1981;139(6):720-5.
54. Sutton MS, Theard MA, Bhatia SJ, Plappert T, Saltzman DH, Doubilet P. Changes in placental blood flow in the normal human fetus with gestational age. *Pediatr Res*. 1990;28(4):383-7.
55. Barbera A, Galan HL, Ferrazzi E, Rigano S, Jozwik M, Battaglia FC, et al. Relationship of umbilical vein blood flow to growth parameters in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;181(1):174-9.
56. Hecher K, Campbell S. Characteristics of fetal venous blood flow under normal circumstances and during fetal disease. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1996;7(1):68-83.
57. Adamson SL, Myatt L, Byrne BMP. Regulation of umbilical blood flow. In: Polin RA, Fox WW, editors. *Fetal and neonatal physiology*. 1. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1998. p. 977-89.
58. Skoll MA, Fouron JC, Sonesson SE, Nyctelius H, Lessard M, Drblik SP. Doppler velocimetric indices from the abdominal and placental ends of the umbilical artery of growth-restricted fetuses. *J Clin Ultrasound*. 1997;25(8):421-4.
59. Tsukimori K, Nozaki M, Nakano H. Regional difference of endothelium-dependent contractility in human umbilical artery. *J Perinat Med*. 2005;33(6):534-8.
60. Gupta S, Hanff LM, Visser W, Steegers EA, Saxena PR, Vulto AG, et al. Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy. *J Hypertens*. 2006;24(7):1345-53.
61. Lovren F, Triggie C. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *Br J Pharmacol*. 2000;131(3):521-9.
62. McGrath JC, MacLennan SJ, Mann AC, Stuart-Smith K, Whittle MJ. Contraction of human umbilical artery, but not vein, by oxygen. *J Physiol*. 1986;380:513-9.
63. Mildenberger E, Biesel B, Siegel G, Versmold HT. Nitric oxide and endothelin in oxygen-dependent regulation of vascular tone of human umbilical vein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(4):H1730-7.
64. Mildenberger E, Siegel G, Versmold HT. Oxygen-dependent regulation of membrane potential and vascular tone of human umbilical vein. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;181(3):696-700.
65. Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V, Lanzillotti G, et al. Umbilical vein blood flow in fetuses with normal and lean umbilical cord. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001;17(3):224-8.
66. Gill RW, Kossoff G, Warren PS, Garrett WJ. Umbilical venous flow in normal and complicated pregnancy. *Ultrasound in medicine & biology*. 1984;10(3):349-63.
67. Jouppila P, Kirkinen P. Umbilical vein blood flow as an indicator of fetal hypoxia. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1984;91(2):107-10.

68. Laurin J, Lingman G, Marsal K, Persson PH. Fetal blood flow in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Obstet Gynecol.* 1987;69(6):895-902.
69. Ferrazzi E, Bellotti M, Galan H, Pennati G, Bozzo M, Rigano S, et al. Doppler investigation in intrauterine growth restriction--from qualitative indices to flow measurements: a review of the experience of a collaborative group. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2001;943:316-25.
70. Ferrazzi E, Rigano S, Bozzo M, Bellotti M, Giovannini N, Galan H, et al. Umbilical vein blood flow in growth-restricted fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2000;16(5):432-8.
71. Figueras F, Eixarch E, Gratacos E, Gardosi J. Predictiveness of antenatal umbilical artery Doppler for adverse pregnancy outcome in small-for-gestational-age babies according to customised birthweight centiles: population-based study. *Bjog.* 2008;115(5):590-4.
72. Gerber S, Hohlfeld P, Viquerat F, Tolsa JF, Vial Y. Intrauterine growth restriction and absent or reverse end-diastolic blood flow in umbilical artery (Doppler class II or III): A retrospective study of short- and long-term fetal morbidity and mortality. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;126:20-6.
73. Ghosh GS, Gudmundsson S. Uterine and umbilical artery Doppler are comparable in predicting perinatal outcome of growth-restricted fetuses. *Bjog.* 2009;116(3):424-30.
74. Mari G, Hanif F. Fetal Doppler: umbilical artery, middle cerebral artery, and venous system. *Semin Perinatol.* 2008;32(4):253-7.
75. Turan OM, Turan S, Gungor S, Berg C, Moyano D, Gembruch U, et al. Progression of Doppler abnormalities in intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;32(2):160-7.
76. Baschat AA, Gembruch U, Weiner CP, Harman CR. Qualitative venous Doppler waveform analysis improves prediction of critical perinatal outcomes in premature growth-restricted fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003;22(3):240-5.
77. Schwarze A, Gembruch U, Krapp M, Katalinic A, Germer U, Axt-Fliedner R. Qualitative venous Doppler flow waveform analysis in preterm intrauterine growth-restricted fetuses with ARED flow in the umbilical artery--correlation with short-term outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2005;25(6):573-9.
78. Myatt L, Brewer A, Brockman DE. The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164(2):687-92.
79. Mauro A, Buscemi M, Provenzano S, Gerbino A. Human umbilical cord expresses several vasoactive peptides involved in the local regulation of vascular tone: protein and gene expression of Orphanin, Oxytocin, ANP, eNOS and iNOS. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society.* 2011;49(2):211-8.
80. Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Forstermann U, Murad F. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell calcium.* 1992;13(6-7):427-34.
81. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990;347(6295):768-70.
82. Calignano A, Whittle BJ, Di Rosa M, Moncada S. Involvement of endogenous nitric oxide in the regulation of rat intestinal motility in vivo. *Eur J Pharmacol.* 1992;229(2-3):273-6.
83. Cheah LS, Gwee M, Das R, Ballard H, Yang YF, Daniel EE, et al. Evidence for the existence of a constitutive nitric oxide synthase in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002;29(8):725-7.
84. Bachetti T, Comini L, Curello S, Bastianon D, Palmieri M, Bresciani G, et al. Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(5):939-45.
85. Schonfelder G, Fuhr N, Hadzidiakos D, John M, Hopp H, Paul M. Preeclampsia is associated with loss of neuronal nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells of the human umbilical cord. *Histopathology.* 2004;44(2):116-28.
86. Buchwalow IB, Podzuweit T, Bocker W, SamoiloVA VE, Thomas S, Wellner M, et al. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. *FASEB J.* 2002;16(6):500-8.
87. Viaro F, Capellini VK, Celotto AC, Carlotti CG, Jr., Rodrigues AJ, Reis GS, et al. Immunohistochemical evaluation of three nitric oxide synthase isoforms in human saphenous vein exposed to different degrees of distension pressures. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology.* 2010;19(6):e211-20.
88. de Frutos T, de Miguel LS, Garcia-Duran M, Gonzalez-Fernandez F, Rodriguez-Feo JA, Monton M, et al. NO from smooth muscle cells decreases NOS expression in endothelial cells: role of TNF-alpha. *Am J Physiol.* 1999;277(4 Pt 2):H1317-25.
89. Chester AH, Borland JA, Buttery LD, Mitchell JA, Cunningham DA, Hafizi S, et al. Induction of nitric oxide synthase in human vascular smooth muscle: interactions between proinflammatory cytokines. *Cardiovasc Res.* 1998;38(3):814-21.
90. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free radical research.* 1999;31(6):577-96.
91. Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med.* 2001;7(10):1138-43.
92. Wu CC, Hong HJ, Chou TC, Ding YA, Yen MH. Evidence for inducible nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;228(2):459-66.
93. Gabbai FB, Garcia GE, Blantz RC, De Nicola L. Role of nitric oxide in glomerular physiology and pathophysiology. *Advances in nephrology from the Necker Hospital.* 1995;24:3-18.
94. Schroeder RA, Kuo PC. Nitric oxide: physiology and pharmacology. *Anesthesia and analgesia.* 1995;81(5):1052-9.

95. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
96. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.
97. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Current vascular pharmacology*. 2012;10(1):4-18.
98. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*. 1989;2(8670):997-1000.
99. Celermajer DS, Dollery C, Burch M, Deanfield JE. Role of endothelium in the maintenance of low pulmonary vascular tone in normal children. *Circulation*. 1994;89(5):2041-4.
100. Gude NM, King RG, Brennecke SP. Role of endothelium-derived nitric oxide in maintenance of low fetal vascular resistance in placenta. *Lancet*. 1990;336(8730):1589-90.
101. Cary SP, Winger JA, Marletta MA. Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(37):13064-9.
102. Kass DA, Takimoto E, Nagayama T, Champion HC. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovasc Res*. 2007;75(2):303-14.
103. Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol*. 2003;64(3):533-46.
104. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):488-520.
105. Santos-Silva AJ, Cairrao E, Morgado M, Alvarez E, Verde I. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. *Eur J Pharmacol*. 2008;582(1-3):102-9.
106. Yanaka N, Kurosawa Y, Minami K, Kawai E, Omori K. cGMP-phosphodiesterase activity is up-regulated in response to pressure overload of rat ventricles. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2003;67(5):973-9.
107. Downing JW, Ramasubramanian R, Johnson RF, Minzter BH, Paschall RL, Sundell HW, et al. Hypothesis: selective phosphodiesterase-5 inhibition improves outcome in preeclampsia. *Med Hypotheses*. 2004;63(6):1057-64.
108. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther*. 2006;109(3):366-98.
109. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res*. 2003;93(4):280-91.
110. Maharaj CH, O'Toole D, Lynch T, Carney J, Jarman J, Higgins BD, et al. Effects and mechanisms of action of sildenafil citrate in human chorionic arteries. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:34.
111. Wareing M, Myers JE, O'Hara M, Baker PN. Sildenafil citrate (Viagra) enhances vasodilatation in fetal growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2550-5.
112. Refuerzo JS, Sokol RJ, Aranda JV, Hallak M, Hotra JW, Kruger M, et al. Sildenafil citrate and fetal outcome in pregnant rats. *Fetal Diagn Ther*. 2006;21(3):259-63.
113. Sanchez-Aparicio P, Mota-Rojas D, Nava-Ocampo AA, Trujillo-Ortega ME, Alfaro-Rodriguez A, Arch E, et al. Effects of sildenafil on the fetal growth of guinea pigs and their ability to survive induced intrapartum asphyxia. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(1):127 e1-e6.
114. Satterfield MC, Bazer FW, Spencer TE, Wu G. Sildenafil citrate treatment enhances amino acid availability in the conceptus and fetal growth in an ovine model of intrauterine growth restriction. *J Nutr*. 2010;140(2):251-8.
115. Dilworth MR, Andersson I, Renshall LJ, Cowley E, Baker P, Greenwood S, et al. Sildenafil citrate increases fetal weight in a mouse model of fetal growth restriction with a normal vascular phenotype. *PLoS one*. 2013;8(10):e77748.
116. von Dadelszen P, Dwinnell S, Magee L, Carleton B, Gruslin A, Lee B, et al. Sildenafil citrate therapy for severe early-onset intrauterine growth restriction. *BJOG*. 118(5):624-8.
117. Wareing M, Greenwood SL, Fyfe GK, Baker PN. Reactivity of human placental chorionic plate vessels from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction (IUGR). *Biol Reprod*. 2006;75(4):518-23.
118. Dastjerdi MV, Hosseini S, Bayani L. Sildenafil citrate and uteroplacental perfusion in fetal growth restriction. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2012;17(7):632-6.
119. Villanueva-Garcia D, Mota-Rojas D, Hernandez-Gonzalez R, Sanchez-Aparicio P, Alonso-Spilsbury M, Trujillo-Ortega ME, et al. A systematic review of experimental and clinical studies of sildenafil citrate for intrauterine growth restriction and pre-term labour. *J Obstet Gynaecol*. 2007;27(3):255-9.
120. Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1993;169(5):1316-20.
121. Molnar M, Suto T, Toth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170(5 Pt 1):1458-66.
122. Galan HL, Regnault TR, Le Cras TD, Tyson RW, Anthony RV, Wilkening RB, et al. Cotyledon and binucleate cell nitric oxide synthase expression in an ovine model of fetal growth restriction. *J Appl Physiol* (1985). 2001;90(6):2420-6.
123. Arroyo JA, Anthony RV, Parker TA, Galan HL. Differential expression of placental and vascular endothelial nitric oxide synthase in an ovine model of fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(3):771-7.

124. Arroyo JA, Anthony RV, Parker TA, Galan HL. eNOS, NO, and the activation of ERK and AKT signaling at mid-gestation and near-term in an ovine model of intrauterine growth restriction. *Systems biology in reproductive medicine*. 2010;56(1):62-73.
125. Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Greer IA, Lyall F. Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Human reproduction*. 1997;12(1):167-72.
126. Barut F, Barut A, Gun BD, Kandemir NO, Harma MI, Harma M, et al. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *Diagnostic pathology*. 2010;5:24.
127. Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Kossenjans W, Greer I, Lyall F. Inducible (type II) nitric oxide synthase in human placental villous tissue of normotensive, pre-eclamptic and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Placenta*. 1997;18(4):261-8.
128. Giannubilo SR, Menegazzi M, Tedeschi E, Bezzeccheri V, Suzuki H, Tranquilli AL. Doppler analysis and placental nitric oxide synthase expression during fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008;21(9):617-22.
129. Krause BJ, Costello PM, Munoz-Urrutia E, Lillycrop KA, Hanson MA, Casanello P. Role of DNA methyltransferase 1 on the altered eNOS expression in human umbilical endothelium from intrauterine growth restricted fetuses. *Epigenetics*. 2013;8(9):944-52.
130. Hata T, Hashimoto M, Manabe A, Aoki S, Iida K, Masumura S, et al. Maternal and fetal nitric oxide synthesis is decreased in pregnancies with small for gestational age infants. *Human reproduction*. 1998;13(4):1070-3.
131. Casanello P, Sobrevia L. 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. *Circ Res*. 2002;91(2):127-34.
132. Giles W, O'Callaghan S, Boura A, Walters W. Reduction in human fetal umbilical-placental vascular resistance by glyceryl trinitrate. *Lancet*. 1992;340(8823):856.
133. Schleussner E, Lehmann T, Kahler C, Schneider U, Schlembach D, Groten T. Impact of the nitric oxide-donor pentaerythryl-tetranitrate on perinatal outcome in risk pregnancies: a prospective, randomized, double-blinded trial. *J Perinat Med*. 2014;42(4):507-14.
134. Trapani AJ, Goncalves LF, Trapani TF, Franco MJ, Galluzzo RN, Pires MM. Comparison between transdermal nitroglycerin and sildenafil citrate in intrauterine growth restriction: effect on uterine, umbilical and fetal middle cerebral artery pulsatility index. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015.
135. Neri I, Mazza V, Galassi MC, Volpe A, Facchinetti F. Effects of L-arginine on utero-placental circulation in growth-retarded fetuses. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1996;75(3):208-12.
136. Marsal K. Obstetric management of intrauterine growth restriction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2009;23:857-70.
137. de Onis M, Blossner M, Villar J. Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries. *Eur J Clin Nutr*. 1998;52 Suppl 1:S5-15.
138. Hendrix N, Berghella V. Non-placental causes of intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol*. 2008;32(3):161-5.
139. Albouy-Llaty M, Thiebaugeorges O, Goua V, Magnin G, Schweitzer M, Forhan A, et al. Influence of fetal and parental factors on intrauterine growth measurements: results of the EDEN mother-child cohort. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011;38(6):673-80.
140. Cogswell ME, Yip R. The influence of fetal and maternal factors on the distribution of birthweight. *Semin Perinatol*. 1995;19(3):222-40.
141. Ueland K. Maternal cardiovascular dynamics. VII. Intrapartum blood volume changes. *Am J Obstet Gynecol*. 1976;126(6):671-7.
142. Thaler I, Manor D, Itskovitz J, Rottem S, Levit N, Timor-Tritsch I, et al. Changes in uterine blood flow during human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1990;162(1):121-5.
143. Albaiges G, Missfelder-Lobos H, Parra M, Lees C, Cooper D, Nicolaides KH. Comparison of color Doppler uterine artery indices in a population at high risk for adverse outcome at 24 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003;21(2):170-3.
144. Murphy VE, Smith R, Giles WB, Clifton VL. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev*. 2006;27(2):141-69.
145. Jensen GM, Moore LG. The effect of high altitude and other risk factors on birthweight: independent or interactive effects? *American journal of public health*. 1997;87(6):1003-7.
146. Krampfl E, Lees C, Bland JM, Espinoza Dorado J, Moscoco G, Campbell S. Fetal biometry at 4300 m compared to sea level in Peru. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2000;16(1):9-18.
147. Rondo PH, Ferreira RF, Nogueira F, Ribeiro MC, Lobert H, Artes R. Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57(2):266-72.
148. Rahman A, Bunn J, Lovel H, Creed F. Association between antenatal depression and low birthweight in a developing country. *Acta psychiatrica Scandinavica*. 2007;115(6):481-6.
149. Ciesielski TH, Marsit CJ, Williams SM. Maternal psychiatric disease and epigenetic evidence suggest a common biology for poor fetal growth. *BMC pregnancy and childbirth*. 2015;15:192.
150. Nordentoft M, Lou HC, Hansen D, Nim J, Pryds O, Rubin P, et al. Intrauterine growth retardation and premature delivery: the influence of maternal smoking and psychosocial factors. *American journal of public health*. 1996;86(3):347-54.

151. Evans J, Heron J, Patel RR, Wiles N. Depressive symptoms during pregnancy and low birth weight at term: longitudinal study. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 2007;191:84-5.
152. Andersson L, Sundstrom-Poromaa I, Wulff M, Astrom M, Bixo M. Neonatal outcome following maternal antenatal depression and anxiety: a population-based study. *American journal of epidemiology*. 2004;159(9):872-81.
153. Huizink AC, Mulder EJ, Buitelaar JK. Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychological bulletin*. 2004;130(1):115-42.
154. Mancuso RA, Schetter CD, Rini CM, Roesch SC, Hobel CJ. Maternal prenatal anxiety and corticotropin-releasing hormone associated with timing of delivery. *Psychosomatic medicine*. 2004;66(5):762-9.
155. Diego MA, Jones NA, Field T, Hernandez-Reif M, Schanberg S, Kuhn C, et al. Maternal psychological distress, prenatal cortisol, and fetal weight. *Psychosomatic medicine*. 2006;68(5):747-53.
156. Henrichs J, Schenk JJ, Roza SJ, van den Berg MP, Schmidt HG, Steegers EA, et al. Maternal psychological distress and fetal growth trajectories: the Generation R Study. *Psychological medicine*. 2010;40(4):633-43.
157. Skomsvoll JF, Baste V, Irgens LM, Ostensen M. The recurrence risk of adverse outcome in the second pregnancy in women with rheumatic disease. *Obstet Gynecol*. 2002;100(6):1196-202.
158. Fonager K, Sorensen HT, Olsen J, Dahlerup JF, Rasmussen SN. Pregnancy outcome for women with Crohn's disease: a follow-up study based on linkage between national registries. *The American journal of gastroenterology*. 1998;93(12):2426-30.
159. Aggarwal N, Sawhney H, Vasishta K, Chopra S, Bamberg P. Pregnancy in patients with systemic lupus erythematosus. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology*. 1999;39(1):28-30.
160. Shanthi V, Vanka A, Bhambal A, Saxena V, Saxena S, Kumar SS. Association of pregnant women periodontal status to preterm and low-birth weight babies: A systematic and evidence-based review. *Dental research journal*. 2012;9(4):368-80.
161. Fried M, Muga RO, Misore AO, Duffy PE. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-gamma and TNF-alpha associated with pregnancy outcomes. *J Immunol*. 1998;160(5):2523-30.
162. Hahn-Zoric M, Hagberg H, Kjellmer I, Ellis J, Wennergren M, Hanson LA. Aberrations in placental cytokine mRNA related to intrauterine growth retardation. *Pediatr Res*. 2002;51(2):201-6.
163. Suter MA, Anders AM, Aagaard KM. Maternal smoking as a model for environmental epigenetic changes affecting birthweight and fetal programming. *Molecular human reproduction*. 2013;19(1):1-6.
164. Luck W, Nau H, Hansen R, Steldinger R. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers. *Developmental pharmacology and therapeutics*. 1985;8(6):384-95.
165. Larroque B, Kaminski M, Lelong N, Subtil D, Dehaene P. Effects of birth weight of alcohol and caffeine consumption during pregnancy. *American journal of epidemiology*. 1993;137(9):941-50.
166. Zuckerman B, Frank DA, Hingson R, Amaro H, Levenson SM, Kayne H, et al. Effects of maternal marijuana and cocaine use on fetal growth. *N Engl J Med*. 1989;320(12):762-8.
167. Taylor SI. Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes*. 1992;41(11):1473-90.
168. Gremlich S, Nguyen D, Reymondin D, Hohlfeld P, Vial Y, Witkin SS, et al. Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. *J Reprod Immunol*. 2007;74(1-2):143-51.
169. Wang L, Wang X, Laird N, Zuckerman B, Stubblefield P, Xu X. Polymorphism in maternal LRP8 gene is associated with fetal growth. *American journal of human genetics*. 2006;78(5):770-7.
170. Sullivan AD, Nyirenda T, Cullinan T, Taylor T, Harlow SD, James SA, et al. Malaria infection during pregnancy: intrauterine growth retardation and preterm delivery in Malawi. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(6):1580-3.
171. Adams Waldorf KM, McAdams RM. Influence of infection during pregnancy on fetal development. *Reproduction*. 2013;146(5):R151-62.
172. Lopez M, Palacio M, Gonce A, Hernandez S, Barranco FJ, Garcia L, et al. Risk of intrauterine growth restriction among HIV-infected pregnant women: a cohort study. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2015;34(2):223-30.
173. Khan NA, Kazzi SN. Yield and costs of screening growth-retarded infants for torch infections. *Am J Perinatol*. 2000;17(3):131-5.
174. Neerhof MG, Thaete LG. The fetal response to chronic placental insufficiency. *Semin Perinatol*. 2008;32:201-5.
175. Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol*. 2006;572:25-30.
176. Bjoro K, Jr. Gross pathology of the placenta in intrauterine growth retardation. *Annales chirurgiae et gynaecologiae*. 1981;70(6):316-22.
177. Auriolles-Garibay A, Hernandez-Andrade E, Romero R, Qureshi F, Ahn H, Jacques SM, et al. Prenatal diagnosis of a placental infarction hematoma associated with fetal growth restriction, preeclampsia and fetal death: clinicopathological correlation. *Fetal Diagn Ther*. 2014;36(2):154-61.
178. Reynolds LP, Caton JS, Redmer DA, Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Borowicz PP, et al. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol*. 2006;572(Pt 1):51-8.
179. Chen CP, Bajoria R, Aplin JD. Decreased vascularization and cell proliferation in placentas of intrauterine growth-restricted fetuses with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(3):764-9.
180. Mayhew TM, Wijesekera J, Baker PN, Ong SS. Morphometric evidence that villous development and fetoplacental angiogenesis are compromised by intrauterine growth restriction but not by pre-eclampsia. *Placenta*. 2004;25(10):829-33.



181. Raio L, Ghezzi F, Di Naro E, Duwe DG, Cromi A, Schneider H. Umbilical cord morphologic characteristics and umbilical artery Doppler parameters in intrauterine growth-restricted fetuses. *J Ultrasound Med.* 2003;22(12):1341-7.
182. Proctor LK, Toal M, Keating S, Chitayat D, Okun N, Windrim RC, et al. Placental size and the prediction of severe early-onset intrauterine growth restriction in women with low pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;34(3):274-82.
183. Cetin I, Alvino G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta.* 2009;30 Suppl A:S77-82.
184. Jansson T, Scholtbach V, Powell TL. Placental transport of leucine and lysine is reduced in intrauterine growth restriction. *Pediatr Res.* 1998;44(4):532-7.
185. Norberg S, Powell TL, Jansson T. Intrauterine growth restriction is associated with a reduced activity of placental taurine transporters. *Pediatr Res.* 1998;44(2):233-8.
186. Cetin I, Giovannini N, Alvino G, Agostoni C, Riva E, Giovannini M, et al. Intrauterine growth restriction is associated with changes in polyunsaturated fatty acid fetal-maternal relationships. *Pediatr Res.* 2002;52(5):750-5.
187. Challis DE, Pfarrer CD, Ritchie JW, Koren G, Adamson SL. Glucose metabolism is elevated and vascular resistance and maternofetal transfer is normal in perfused placental cotyledons from severely growth-restricted fetuses. *Pediatr Res.* 2000;47(3):309-15.
188. Cetin I, Marconi AM, Bozzetti P, Sereni LP, Corbetta C, Pardi G, et al. Umbilical amino acid concentrations in appropriate and small for gestational age infants: a biochemical difference present in utero. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;158(1):120-6.
189. Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid programming. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004;1032:63-84.
190. Nugent JL, Wareing M, Palin V, Sibley CP, Baker PN, Ray DW, et al. Chronic glucocorticoid exposure potentiates placental chorionic plate artery constriction: implications for aberrant fetoplacental vascular resistance in fetal growth restriction. *Endocrinology.* 2013;154(2):876-87.
191. Goland RS, Jozak S, Warren WB, Conwell IM, Stark RI, Tropper PJ. Elevated levels of umbilical cord plasma corticotropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(5):1174-9.
192. Dormer RA, France JT. Cortisol and cortisone levels in umbilical cord plasma and maternal plasma of normal pregnancies. *Steroids.* 1973;21(4):497-510.
193. Shams M, Kilby MD, Somerset DA, Howie AJ, Gupta A, Wood PJ, et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Human reproduction.* 1998;13(4):799-804.
194. Shang Y, Jia Y, Sun Q, Shi W, Li R, Wang S, et al. Sexually dimorphic effects of maternal dietary protein restriction on fetal growth and placental expression of 11beta-HSD2 in the pig. *Animal reproduction science.* 2015;160:40-8.
195. Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia.* 1996;39(11):1299-305.
196. Platz E, Newman R. Diagnosis of IUGR: traditional biometry. *Semin Perinatol.* 2008;32(3):140-7.
197. Bamberg C, Kalache KD. Prenatal diagnosis of fetal growth restriction. *Seminars in fetal & neonatal medicine.* 2004;9(5):387-94.
198. Mari G, Picconi J. Doppler vascular changes in intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol.* 2008;32(3):182-9.
199. Barker ED, McAuliffe FM, Alderdice F, Unterscheider J, Daly S, Geary MP, et al. The role of growth trajectories in classifying fetal growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2013;122:248-54.
200. Singhal PK, Paul VK, Deorari AK, Singh M, Sundaram KR. Changing trends in intrauterine growth curves. *Indian Pediatr.* 1991;28(3):281-3.
201. Oja H, Koironen M, Rantakallio P. Fitting mixture models to birth weight data: a case study. *Biometrics.* 1991;47(3):883-97.
202. Power C. National trends in birth weight: implications for future adult disease. *BMJ.* 1994;308(6939):1270-1.
203. Alberman E. Are our babies becoming bigger? *Journal of the Royal Society of Medicine.* 1991;84(5):257-60.
204. 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. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(1 Pt 1):198-206.
205. Buck GM, Cookfair DL, Michalek AM, Nasca PC, Standfast SJ, Sever LE, et al. Intrauterine growth retardation and risk of sudden infant death syndrome (SIDS). *American journal of epidemiology.* 1989;129(5):874-84.
206. Wierenga H, Brand R, Geudeke T, van Geijn HP, van der Harten H, Verloove-Vanhorick SP. Prenatal risk factors for cot death in very preterm and small for gestational age infants. *Early Hum Dev.* 1990;23(1):15-26.
207. Yu VY, Upadhyay A. Neonatal management of the growth-restricted infant. *Seminars in fetal & neonatal medicine.* 2004;9(5):403-9.
208. Ulusoy E, Tufekci O, Duman N, Kumral A, Irken G, Oren H. Thrombocytopenia in neonates: causes and outcomes. *Annals of hematology.* 2013;92(7):961-7.
209. Doctor BA, O'Riordan MA, Kirchner HL, Shah D, Hack M. Perinatal correlates and neonatal outcomes of small for gestational age infants born at term gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185(3):652-9.
210. Kramer MS, Olivier M, McLean FH, Willis DM, Usher RH. Impact of intrauterine growth retardation and body proportionality on fetal and neonatal outcome. *Pediatrics.* 1990;86(5):707-13.

211. Hasmasanu MG, Bolboaca SD, Baizat MI, Drugan TC, Zaharie GC. Neonatal short-term outcomes in infants with intrauterine growth restriction. *Saudi Med J*. 2015;36(8):947-53.
212. Piper JM, Xenakis EM, McFarland M, Elliott BD, Berkus MD, Langer O. Do growth-retarded premature infants have different rates of perinatal morbidity and mortality than appropriately grown premature infants? *Obstet Gynecol*. 1996;87(2):169-74.
213. Clausson B, Cnattingius S, Axelsson O. Outcomes of post-term births: the role of fetal growth restriction and malformations. *Obstet Gynecol*. 1999;94(5 Pt 1):758-62.
214. Divon MY, Haglund B, Nisell H, Otterblad PO, Westgren M. Fetal and neonatal mortality in the postterm pregnancy: the impact of gestational age and fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(4):726-31.
215. Froen JF, Gardosi JO, Thurmann A, Francis A, Stray-Pedersen B. Restricted fetal growth in sudden intrauterine unexplained death. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004;83(9):801-7.
216. Wadsworth ME, Cripps HA, Midwinter RE, Colley JR. Blood pressure in a national birth cohort at the age of 36 related to social and familial factors, smoking, and body mass. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985;291(6508):1534-8.
217. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 1989;298(6673):564-7.
218. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989;2(8663):577-80.
219. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ*. 1990;301(6746):259-62.
220. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 2004;305:1733-6.
221. Kaijser M, Bonamy AK, Akre O, Cnattingius S, Granath F, Norman M, et al. Perinatal risk factors for ischemic heart disease: disentangling the roles of birth weight and preterm birth. *Circulation*. 2008;117(3):405-10.
222. Newsome CA, Shiell AW, Fall CH, Phillips DI, Shier R, Law CM. Is birth weight related to later glucose and insulin metabolism?--A systematic review. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2003;20(5):339-48.
223. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*. 1991;303(6809):1019-22.
224. Ong KK, Dunger DB. Birth weight, infant growth and insulin resistance. *Eur J Endocrinol*. 2004;151 Suppl 3:U131-9.
225. Tyson JE, Kennedy K, Broyles S, Rosenfeld CR. The small for gestational age infant: accelerated or delayed pulmonary maturation? Increased or decreased survival? *Pediatrics*. 1995;95(4):534-8.
226. Minior VK, Divon MY. Fetal growth restriction at term: myth or reality? *Obstet Gynecol*. 1998;92(1):57-60.
227. Rona RJ, Gulliford MC, Chinn S. Effects of prematurity and intrauterine growth on respiratory health and lung function in childhood. *BMJ*. 1993;306(6881):817-20.
228. Nikolajev K, Heinonen K, Hakulinen A, Lansimies E. Effects of intrauterine growth retardation and prematurity on spirometric flow values and lung volumes at school age in twin pairs. *Pediatr Pulmonol*. 1998;25(6):367-70.
229. Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO. Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ*. 1991;303(6804):671-5.
230. Stein CE, Kumaran K, Fall CH, Shaheen SO, Osmond C, Barker DJ. Relation of fetal growth to adult lung function in south India. *Thorax*. 1997;52(10):895-9.
231. Lopushaa CE, Roseboom TJ, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Bleker OP, et al. Atopy, lung function, and obstructive airways disease after prenatal exposure to famine. *Thorax*. 2000;55(7):555-61.
232. Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, Freschi M, Sancho Rossignol A, Lazeyras F, et al. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res*. 2004;56(1):132-8.
233. Lodygensky GA, Seghier ML, Warfield SK, Tolsa CB, Sizonenko S, Lazeyras F, et al. Intrauterine growth restriction affects the preterm infant's hippocampus. *Pediatr Res*. 2008;63(4):438-43.
234. Tolcos M, Bateman E, O'Dowd R, Markwick R, Vrijzen K, Rehn A, et al. Intrauterine growth restriction affects the maturation of myelin. *Exp Neurol*. 2011;232(1):53-65.
235. Story L, Damodaram MS, Allsop JM, McGuinness A, Patel A, Wylezinska M, et al. Brain metabolism in fetal intrauterine growth restriction: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205(5):483 e1-8.
236. Lagerstrom M, Bremme K, Eneroth P, Magnusson D. Behavior at 10 and 13 years of age for children with low birth weight. Perceptual and motor skills. 1990;71(2):579-94.
237. Breslau N, DelDotto JE, Brown GG, Kumar S, Ezhuthachan S, Hufnagle KG, et al. A gradient relationship between low birth weight and IQ at age 6 years. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*. 1994;148(4):377-83.
238. Leitner Y, Fattal-Valevski A, Geva R, Eshel R, Toledano-Alhadeef H, Rotstein M, et al. Neurodevelopmental outcome of children with intrauterine growth retardation: a longitudinal, 10-year prospective study. *J Child Neurol*. 2007;22(5):580-7.
239. Parkinson CE, Scrivener R, Graves L, Bunton J, Harvey D. Behavioural differences of school-age children who were small-for-dates babies. *Dev Med Child Neurol*. 1986;28(4):498-505.
240. Alford AA. The association of fetal and early childhood growth with adult mental distress: evidence from the Johns Hopkins collaborative perinatal study birth cohort. *Frontiers in psychiatry*. 2013;4:96.
241. Eide MG, Moster D, Irgens LM, Reichborn-Kjennerud T, Stoltenberg C, Skjaerven R, et al. Degree of fetal growth restriction associated with schizophrenia risk in a national cohort. *Psychological medicine*. 2013;43(10):2057-66.

242. Llanos AJ, Green JR, Creasy RK, Rudolph AM. Increased heart rate response to parasympathetic and beta adrenergic blockade in growth-retarded fetal lambs. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;136(6):808-13.
243. Kramer MS. The epidemiology of adverse pregnancy outcomes: an overview. *J Nutr.* 2003;133(5 Suppl 2):1592S-6S.
244. Bergmann RL. Prevention of intrauterine growth restriction: are there no effective methods available? *J Perinat Med.* 2009;37(3):306-7.
245. Romo A, Carceller R, Tobajas J. Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2009;6 Suppl 3:332-6.
246. Christian P, Khatry SK, Katz J, Pradhan EK, LeClerq SC, Shrestha SR, et al. Effects of alternative maternal micronutrient supplements on low birth weight in rural Nepal: double blind randomised community trial. *BMJ.* 2003;326(7389):571.
247. Tamura T, Goldenberg RL, Johnston KE, Cliver SP, Hoffman HJ. Serum concentrations of zinc, folate, vitamins A and E, and proteins, and their relationships to pregnancy outcome. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica Supplement.* 1997;165:63-70.
248. Scholl TO, Hediger ML, Bendich A, Schall JI, Smith WK, Krueger PM. Use of multivitamin/mineral prenatal supplements: influence on the outcome of pregnancy. *American journal of epidemiology.* 1997;146(2):134-41.
249. Macmahon B, Alpert M, Salber EJ. Infant weight and parental smoking habits. *American journal of epidemiology.* 1965;82(3):247-61.
250. Nodwell A, Carmichael L, Ross M, Richardson B. Placental compared with umbilical cord blood to assess fetal blood gas and acid-base status. *Obstet Gynecol.* 2005;105(1):129-38.
251. Valenzuela P, Guijarro R. The effects of time on pH and gas values in the blood contained in the umbilical cord. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2006;85(11):1307-9.
252. Terraz S, Baechtold F, Renard D, Barsi A, Rosselet A, Gnaegi A, et al. Hypoxic contraction of small pulmonary arteries from normal and endotoxemic rats: fundamental role of NO. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1999;276(4 Pt 2):H1207-14.
253. Angus JA, Wright CE. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *Journal of pharmacological and toxicological methods.* 2000;44(2):395-407.
254. Peyter AC, Delhaes F, Baud D, Vial Y, Diaceri G, Menetrey S, et al. Intrauterine growth restriction is associated with structural alterations in human umbilical cord and decreased nitric oxide-induced relaxation of umbilical vein. *Placenta.* 2014;35(11):891-9.
255. Hasegawa J, Arakawa K, Nakamura M, Matsuoka R, Ichizuka K, Katsufumi O, et al. Analysis of placental weight centiles is useful to estimate cause of fetal growth restriction. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011;37(11):1658-65.
256. Pathak S, Jessop F, Hook L, Sebire NJ, Lees CC. Placental weight, digitally derived placental dimensions at term and their relationship to birth weight. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23(10):1176-82.
257. Wallace JM, Bhattacharya S, Horgan GW. Gestational age, gender and parity specific centile charts for placental weight for singleton deliveries in Aberdeen, UK. *Placenta.* 2013;34(3):269-74.
258. Ghezzi F, Raio L, Gunter Duwe D, Cromi A, Karousou E, Durig P. Sonographic umbilical vessel morphometry and perinatal outcome of fetuses with a lean umbilical cord. *J Clin Ultrasound.* 2005;33(1):18-23.
259. Proctor LK, Fitzgerald B, Whittle WL, Mokhtari N, Lee E, Machin G, et al. Umbilical cord diameter percentile curves and their correlation to birth weight and placental pathology. *Placenta.* 2013;34(1):62-6.
260. Yoshimatsu J, Goto K, Nasu K, Narahara H, Miyakawa I. Intrauterine growth restriction and the proliferation of smooth muscle cells in umbilical vessels. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology.* 2006;46(3):212-6.
261. Bruch JF, Sibony O, Benali K, Challier JC, Blot P, Nessmann C. Computerized microscope morphometry of umbilical vessels from pregnancies with intrauterine growth retardation and abnormal umbilical artery Doppler. *Human pathology.* 1997;28(10):1139-45.
262. Wareing M, Baker PN. Vasoconstriction of small arteries isolated from the human placental chorionic plate in normal and compromised pregnancy. *Hypertens Pregnancy.* 2004;23(3):237-46.
263. Bodelsson G, Marsal K, Stjernquist M. Reduced contractile effect of endothelin-1 and noradrenalin in human umbilical artery from pregnancies with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *Early Hum Dev.* 1995;42(1):15-28.
264. Templeton AG, Kingdom JC, Whittle MJ, McGrath JC. Contractile responses of the human umbilical artery from pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *Placenta.* 1993;14(5):563-70.
265. Gilbert JS, Nijland MJ. Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;295(6):R1941-52.
266. Morton JS, Rueda-Clausen CF, Davidge ST. Mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in male and female, young and aged offspring born growth restricted. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(4):R930-8.
267. Kingdom JC, McQueen J, Ryan G, Connell JM, Whittle MJ. Fetal vascular atrial natriuretic peptide receptors in human placenta: alteration in intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170(1 Pt 1):142-7.
268. Akturk A, Onal EE, Atalay Y, Yurekli M, Erbas D, Okumus N, et al. Maternal and umbilical venous adrenomedullin and nitric oxide levels in intrauterine growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007;20(7):521-5.

269. Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM, et al. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998;358(1):134-9.
270. Lyall F, Greer IA, Young A, Myatt L. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in intrauterine growth restriction. *Placenta.* 1996;17(2-3):165-8.
271. Xu K, Dong M, Zhou J. [Changes of maternal and umbilical serum nitric oxide in patients with the intrauterine growth retardation]. *Zhonghua fu chan ke za zhi.* 2000;35(12):715-6.
272. Wijnberger LD, Krediet TG, Egberts J, van Bel F. Nitric oxide production during the early neonatal period in small-for-gestational-age infants. *Acta Paediatr.* 2001;90(5):569-72.
273. Di Iorio R, Marinoni E, Coacci F, La Torre R, Cosmi EV. Amniotic fluid nitric oxide and uteroplacental blood flow in pregnancy complicated by intrauterine growth retardation. *British journal of obstetrics and gynaecology.* 1997;104(10):1134-9.
274. Tranquilli AL, Bezzeccheri V, Giannubilo SR, Scagnoli C, Mazzanti L, Garzetti GG. Amniotic levels of nitric oxide in women with fetal intrauterine growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003;13(2):115-8.
275. Schiessl B, Strasburger C, Bidlingmaier M, Mylonas I, Jeschke U, Kainer F, et al. Plasma- and urine concentrations of nitrite/nitrate and cyclic Guanosinemonophosphate in intrauterine growth restricted and preeclamptic pregnancies. *Archives of gynecology and obstetrics.* 2006;274(3):150-4.
276. Xiao XM, Li LP. L-Arginine treatment for asymmetric fetal growth restriction. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005;88(1):15-8.
277. Karowicz-Bilinska A, Kowalska-Koprek U, Suzin J, Sieroszewski P. [Nitric oxide activity in women with intrauterine growth restriction treated by L-arginine]. *Ginekologia polska.* 2003;74(8):612-7.
278. Ying X, Chen Y, Ding J. [The relation between placental pathologic changes and serum nitric oxide levels of maternal and umbilical blood in intrauterine growth retardation]. *Zhonghua fu chan ke za zhi.* 1999;34(4):217-9.
279. Omori K, Kotera J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res.* 2007;100(3):309-27.
280. Peyter AC, Muehlethaler V, Liaudet L, Marino M, Di Bernardo S, Diaceri G, et al. Muscarinic receptor M1 and phosphodiesterase 1 are key determinants in pulmonary vascular dysfunction following perinatal hypoxia in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;295(1):L201-13.
281. Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.* 1996;10(5):615-24.
282. Forte P, Kneale BJ, Milne E, Chowienczyk PJ, Johnston A, Benjamin N, et al. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. *Hypertension.* 1998;32(4):730-4.
283. Mittwoch U. Blastocysts prepare for the race to be male. *Human reproduction.* 1993;8(10):1550-5.
284. Bermejo-Alvarez P, Rizos D, Rath D, Lonergan P, Gutierrez-Adan A. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3394-9.
285. Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boyd E. Intrauterine Growth as Estimated from Liveborn Birth-Weight Data at 24 to 42 Weeks of Gestation. *Pediatrics.* 1963;32:793-800.
286. Ishikawa H, Rattigan A, Fundele R, Burgoyne PS. Effects of sex chromosome dosage on placental size in mice. *Biol Reprod.* 2003;69(2):483-8.
287. Eriksson JG, Kajantie E, Osmond C, Thornburg K, Barker DJ. Boys live dangerously in the womb. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council.* 2010;22(3):330-5.
288. Roseboom TJ, Painter RC, de Rooij SR, van Abeelen AF, Veenendaal MV, Osmond C, et al. Effects of famine on placental size and efficiency. *Placenta.* 2011;32(5):395-9.
289. Aibar L, Puertas A, Valverde M, Carrillo MP, Montoya F. Fetal sex and perinatal outcomes. *J Perinat Med.* 2012;40(3):271-6.
290. Melamed N, Yogev Y, Glezerman M. Fetal gender and pregnancy outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23(4):338-44.
291. Franco Mdo C, Arruda RM, Dantas AP, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C, et al. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc Res.* 2002;56(1):145-53.
292. Meyer MC, Cummings K, Osol G. Estrogen replacement attenuates resistance artery adrenergic sensitivity via endothelial vasodilators. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 2):H2264-70.
293. Knot HJ, Lounsbury KM, Brayden JE, Nelson MT. Gender differences in coronary artery diameter reflect changes in both endothelial Ca<sup>2+</sup> and eNOS activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1999;276(3 Pt 2):H961-9.
294. Deenadayalu V, Puttabyatappa Y, Liu AT, Stallone JN, White RE. Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BKCa channels via the cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(1):H115-23.
295. Fausett MB, Belfort MA, Nanda R, Saade GR, Vedernikov Y. The effects of sex steroids on human umbilical artery and vein. *J Soc Gynecol Investig.* 1999;6(1):27-31.
296. Miller SL, Loose JM, Jenkin G, Wallace EM. The effects of sildenafil citrate (Viagra) on uterine blood flow and well being in the intrauterine growth-restricted fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200(1):102 e1-7.
297. Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol.* 2006;45(5):268-76.
298. Garcia Soriano F, Virag L, Jagtap P, Szabo E, Mabley JG, Liaudet L, et al. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med.* 2001;7(1):108-13.

299. Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, et al. Insulin Resistance, Hyperlipidemia, and Hypertension in Mice Lacking Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation*. 2001;104(3):342-5.
300. Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet*. 1997;349:837-42.
301. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(3):H985-1002.
302. Goodfellow J, Bellamy MF, Gorman ST, Brownlee M, Ramsey MW, Lewis MJ, et al. Endothelial function is impaired in fit young adults of low birth weight. *Cardiovasc Res*. 1998;40(3):600-6.
303. Stevens T, Rosenberg R, Aird W, Quertermous T, Johnson FL, Garcia JG, et al. NHLBI workshop report: endothelial cell phenotypes in heart, lung, and blood diseases. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281(5):C1422-33.
304. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.
305. Leeson CP, Whincup PH, Cook DG, Donald AE, Papacosta O, Lucas A, et al. Flow-mediated dilation in 9- to 11-year-old children: the influence of intrauterine and childhood factors. *Circulation*. 1997;96(7):2233-8.
306. Krause BJ, Carrasco-Wong I, Caniuguir A, Carvajal J, Farias M, Casanello P. Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels. *Placenta*. 2013;34(1):20-8.
307. Hracsko Z, Hermes E, Ferencz A, Orvos H, Novak Z, Pal A, et al. Endothelial nitric oxide synthase is up-regulated in the umbilical cord in pregnancies complicated with intrauterine growth retardation. *In Vivo*. 2009;23(5):727-32.
308. Fournier S, Steele S, Julien C, Fournier S, Gulemetova R, Caravagna C, et al. Gestational stress promotes pathological apneas and sex-specific disruption of respiratory control development in newborn rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2013;33(2):563-73.
309. Welberg LA, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *Journal of neuroendocrinology*. 2001;13(2):113-28.
310. Behan M, Kinkead R. Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. *Comprehensive Physiology*. 2011;1(4):2101-39.
311. Cao Y, Matsuyama K, Fujito Y, Aoki M. Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. *Neuroscience research*. 2006;56(3):322-31.

